

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

FLORENCIO PORTO FREITAS

*Investigação de Potenciais Biomarcadores
Redox – Um enfoque em aldeídos e seus
produtos*

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:

20/02/2014

FLORENCIO PORTO FREITAS

*Investigação de Potenciais Biomarcadores Redox
– Um enfoque em aldeídos e seus produtos*

*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
2014

Nome: **FREITAS, Florêncio Porto**

Título: **Investigação de Potenciais Biomarcadores Redox – Um enfoque em aldeídos e seus produtos**

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

Aprovado em: _____

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a).: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a).: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a).: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a).: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a).: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

*À minha família, em especial aos meus pais, Osman e
Idalina, meu suporte em todos os momentos,
e por me fazer muito feliz.*

AGRADECIMENTOS

É difícil agradecer adequadamente às pessoas que contribuíram para a realização e conclusão deste trabalho. Felizmente, as pessoas que merecem receber este singelo agradecimento me conhecem suficientemente para saber que minha memória... .. às vezes funciona direito. Então começarei com o mais fácil: agradecer à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Processos Redox em Biomedicina (INCT-Redoxoma) pelo apoio financeiro, sem o qual não seria possível a realização deste trabalho.

Agora a árdua tarefa de resumir em poucas palavras o quão importante vocês foram nesta jornada, e principalmente quão importantes são para mim.

Tenho muito agradecer a Marisa que sob o título de orientadora ajudou imensamente em meu crescimento científico, intelectual e emocional. Com quem tive momentos difíceis, mas de quem tive apoio em momentos mais difíceis. Marisa, muito obrigado pela paciência e dedicação nos momentos em que precisei.

A Prof. Dra. Camila Carrião... na verdade, quero agradecer à Carrião por ter sido importante de diversas formas. Pelos mapas que me ajudaram a andar nesta pauliceia, por ter me obrigado a comer vegetariana II nas longas noites de trabalho. AH!! Pelas camiladas, especialmente aquelas na última etapa dos protocolos longos. Pela paciência e disposição em ensinar sobre adutos de DNA e áreas afins; por me ouvir e aconselhar em diversos momentos. Por ter me ensina a trabalhar com a

Marisa, ou pelo menos tentado. Pelas noites de “bebedeira”. A lista vai longe, mas em poucas palavras: Camis, muito obrigado, mas muito obrigado mesmo, por ter estado ao meu lado todos estes dias, te devo muito amiga.

Ao Cabeça, vulgo José Pedro, por ter me ensinado a olhar a ciência de uma nova perspectiva, por ter me ensinado a não me levar tão a sério (sim, eu me levava a sério). Por ter me viciado em Naruto, por ter feito os finais de semana em São Paulo mais divertidos, mesmo no laboratório. Ahhh, pela estadia em Munique!!!! Agradeço a você e a Dani– Obrigado Dani – pelos bons momentos. Zé, só tenho a dizer: é “nóis” mano!!! Saudades.

Angel, obrigado!!! Primeiro, por me aguentar mesmo de mau humor (eu sei que é difícil, desculpe-me). Obrigado por ter sido tão prestativa, por ter me tirado do sufoco em incontáveis vezes, em incontáveis experimentos. Por ter me conseguido lugar pra ficar quando cheguei, só você e a Talita pra abrirem a porta pra um desconhecido. Aproveito pra agradecer enormemente a você Talita pela hospedagem e pelos bons momentos que você, Jessé, Neto, Bruno e Lica me proporcionaram. Obrigado. Angel, não tenho como agradecer por tudo, muito obrigado mesmo. Beijos.

Mariana, obrigado pela amizade!!! Por ter me metido em grandes roubadas, rs. Por ter me acolhido tão carinhosamente. O mais importante por ter tornado possível minha amizade com a Livia e a Thais. Beijos.

Priscila, muito obrigado pelos inenarráveis momentos de diversão com os ratinhos, pelas listas de tarefas diárias, pelos 20 testes de método e 500 extrações diárias.

Obrigado por você e o Fernando sempre terem me recebido tão bem na casa de vocês. Pela paciência e pela preocupação. Obrigado mesmo.

Tenho muito a agradecer ao Grande Osmar, que mesmo fugindo pra Santos definitivamente não vai se livrar de mim tão fácil de mim. Obrigado pela amizade, pelos preciosos conhecimentos de HPLC, por ter me socorrido em diversos experimentos. Osmar, prepara o bezerro que estou descendo.

Raphael Queiroz, obrigado pelas idas ao Outback e aos restaurantes japoneses, pelos ensandecidos experimentos que tive que acompanhar, e pelas loucuras e diversões.

Companheira Elis e Rubens, muito obrigado pelos passeios, pelos deliciosos almoços, pelas dúvidas de biomol esclarecidas. Muito obrigado.

Como ainda faltam muitas pessoas, perdoem-me, mas terei que ser breve. Afinal são só os agradecimentos, não a tese. Bem, agradeço aos amigos de laboratório pela paciência, ajuda e compreensão em diversos momentos. Alexandre, Edson, Thais, Adriana, Guilherme, Alessandra, Vanderson: Muito obrigado. À Lívia, que pacientemente me auxiliou no meu início no laboratório da Marisa.

Agradeço ao Paolo, por ter me recebido tão bem em seu laboratório e por ter tido participação em meu crescimento. À Agda, Fernanda e Izaura que por terem me auxiliado com os espectrômetros de massas e ajudado no laboratório do prof. Paolo. À Flávia (Zeca Baleiro sempre me renova as energias, saudades), Alexsandra, Marilene, Kátia, Tati muito obrigado por terem me aceito no laboratório de vocês.

Sou muito grato à Sayuri, que me co-orientou em parte dos experimentes e que me abriu as portas do laboratório. Agradeço à Paty pelas pipoquinhas e palhinhas de mamãe (Ah!! Não vai esquecer de levar palhinha na defesa, promessa é dívida!), à Dani, Tiaguito, Rafa, Taty, Zilda, Adriano e Lucas, por me condicionar a tomar café e pelos momentos de descontração durante as mil extrações diárias.

Tenho muito a agradecer ao meu amigo Humbas. Se não fosse pelo seu incentivo, empenho e confiança não estaria aqui hoje. Muito obrigado.

Agradeço à Ana Paula, sem a qual jamais teria interpretado os espectros de RMN. A ela e ao Tiago pela imensa ajuda nas análises de DNA.

Obrigado aos funcionários do Biotério, em especial à Flávia e à Renata Spalutto, sem os quais este projeto seria inexecutável.

Agradeço aos amigos Samarone e Giancarlo, por terem me acolhido no CRUSP e principalmente pela amizade. Agradeço ao Erivaldo, Carol e Tonhão pelos aprazíveis momentos regados a sofisticadas refeições. Aos amigos Washington, pela paciência e companheirismo em diversos momentos difíceis e estressantes, Alberto, pela solidariedade apoio e amizade e Thomas, pelo carinho e apoio em diversos momentos.

Agradeço a Ivonete e Cleuza por terem tornado minhas manhãs muito alegres e descontraídas.

Agradeço aos companheiros do IEP, que tiveram a paciência pelo apoio e principalmente pelo incentivo nestes momentos finais.

Por fim gostaria de fazer um agradecimento especial à minha família – meu suporte; meu incentivo; minha motivação; minha inspiração. A tia Biza, pelo apoio que sempre me deu e por ter incentivado o gosto pela leitura. A minha sobrinha Bárbara, pela força e entusiasmo para seguir em frente. Ao meu amado irmão Oscálmi, meu exemplo, com quem aprendi muito e que foi decisivo em minha escolha de fazer pós-graduação. À minha cunhada Karla e à minha sobrinha Laura, que tem nos ajudado a reconquistar a alegria a cada dia e seguir em frente. Aos meus pais, Idalina e Osman, que educaram a pessoa que sou hoje, que desde cedo cultivaram em mim o gosto pelos estudos, que docemente abriram mão de diversas coisas para que eu pudesse chegar onde cheguei. À minha irmã Djanira, a quem com palavras jamais poderei expressar minha gratidão; obrigado pela compreensão, pela preocupação e cuidado, pelo exemplo de força e superação que me de; e até mesmo pelas SAUDADES. Obrigado.

***“Não acredite em uma só palavra que lhe digo antes
de acreditar na sua capacidade de decisão!”***

Os`Cálmí

RESUMO

Freitas, F. P. **Investigação de Potenciais Biomarcadores Redox – Um enfoque em aldeídos e seus produtos**. 2014. 259p. Tese - Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

As espécies reativas são associadas a processos toxicológicos e fisiopatológicos, agindo como importantes mediadores, por exemplo, na sinalização celular. Diversas classes de compostos têm sido utilizadas como possíveis biomarcadores de estresse redox, destacando-se os aldeídos α,β -insaturados, capazes de alquilar biomoléculas como o DNA. Para evitar efeitos deletérios, estes aldeídos são detoxificados por glutathionilação e posterior metabolização a derivados mercaptúricos. Contudo, avaliar o estado redox em sistemas biológicos ainda é tarefa bastante complexa, sendo a dificuldade em quantificar de forma prática e acurada os efeitos de sinalização e/ou dano molecular o maior problema dos estudos redox. Assim, o objetivo deste trabalho foi desenvolver métodos acurados e sensíveis de análise de potenciais biomarcadores de estresse redox, isto é: nucleosídeos modificados, aldeídos endógenos e exógenos, glutathiona e produtos de glutathionilação, e avaliá-los em sistemas modelos, celular e animal, e em humanos. A avaliação dos níveis urinários de três nucleosídeos modificados por metodologia de HPLC-MS/MS desenvolvida pelo grupo em moradores da cidade de São Paulo – região com poluição atmosférica – demonstrou aumento significativo de 1, N^2 -propanodGuo comparado aos moradores de região não poluída. Ademais, comprova-se pela primeira vez que células deficientes em reparo de ligações

cruzadas apresentam níveis basais elevados de 1,N²-propanodGuo, em duas linhagens independentes, colocando este aduto como potencial mediador de carcinogênese em pacientes portadores de Anemia de Fanconi. Utilizando cérebro de ratos SOD1^{G93A} (modelo de Esclerose Lateral Amiotrófica - ELA), verificou-se aumento de 50% nos níveis de 1,N²-propanodGuo e de 100% nos de 1,N⁶-εdAdo em fase sintomática, sugerindo influência do conteúdo lipídico cerebral, levando a comprometimento do metabolismo neuronal e morte celular. O perfil de aldeídos determinado em cérebro de ratos SOD1^{G93A} demonstrou aumento de *trans*-hexa-2-enal e *trans,trans*-hexa-2,4-dienal em fase assintomática e de *trans,trans*-deca-2,4-dienal em fase sintomática, não sendo observada nenhuma alteração na medula. Conhecer estas variações permite direcionar estudos de modificações em biomoléculas, além de a metodologia *per se* corroborar com as áreas de análises lipidômicas. Técnicas distintas e o preparo de amostras refletiram nos níveis de glutathiona reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) relatados. A técnica de espectrometria de massas mostrou-se mais precisa que a detecção eletroquímica; e a alquilação do grupo tiol minimizou interferências de matriz. Por análise de HPLC-UV/Vis-ESI-MS/MS, a quantificação de *trans*-4-hidroxi-2-nonenal (HNE) e crotonaldeído conjugados com GSH demonstrou não haver alterações em cérebro e medula de ratos SOD1^{G93A}. Contudo, há formação esteroespecífica dos adutos de HNE *in vivo*. Ressalta-se que a metodologia desenvolvida é extremamente sensível e específica e permite análise simultânea de GSH, GSSG, cisteína, cistina e dos adutos supracitados, servindo para análise de outros adutos de glutathionilação de aldeídos que possam ser importantes em doenças associadas a estresse redox.

Palavras-chave: Biomarcadores, estresse redox, aldeídos, adutos de DNA, adutos de glutathionilação, Esclerose Lateral Amiotrófica.

ABSTRACT

Freitas, F.P. **Potential Redox Biomarkers Investigation – Focus on aldehydes and their products**. 2014. 259p. PhD Thesis - Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Free radicals and oxidant species are associated with toxicological and pathophysiological processes. It has been demonstrated that production of reactive oxygen species may be involved in cell signaling and regulation. Several biomarkers of redox processes have been used, including adducts formed through the reaction of α,β -unsaturated aldehydes with biomolecules such as DNA. In order to avoid these deleterious effects, aldehydes are detoxified through glutathionylation and further metabolized to mercapturic derivatives. However, assessing the redox status in biological systems is still a very complex task, and the difficulty in practical and accurate quantification of signaling effects and/or molecular damage is a major problem in redox studies. The objective of this work was to develop accurate and sensitive methods for analysis of potential biomarkers of redox stress, i.e., modified nucleosides, endogenous and exogenous aldehydes, glutathione and glutathionylation products, and their evaluation in cell, animal model and humans. Evaluation of urinary levels of 1, N^2 -propano-2'-deoxyguanosine (1, N^2 -propanodGuo), 1, N^2 -etheno-2'-deoxyguanosine and 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine in residents of São Paulo City – polluted region – showed a significant increase ($p < 0.05$) in 1, N^2 -propanodGuo levels compared to residents of an unpolluted region by a HPLC-MS/MS methodology developed by the group. Moreover, it was proven, for the first time, that repair deficient cells have basal levels of 1, N^2 -propanodGuo

higher than proficient cells in two independent strains, placing 1,*N*²-propanodGuo as a potential mediator of carcinogenesis in Fanconi Anemia patients. In an Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) animal model (SOD1^{G93A} rat), a 50% increase in the levels of 1,*N*²-propanodGuo and 100% in the 1,*N*⁶-etheno-2'-deoxyadenosine in brain tissue in the symptomatic phase was observed, suggesting that the high brain lipid content may play a role, leading to impairment of cell metabolism and neuronal cell death. There is an increase of *trans*-hex-2-enal and *trans,trans*-hexa-2,4-dienal in asymptomatic SOD1^{G93A} rats brain and of *trans,trans*-deca-2,4-dienal in symptomatic ones. However, no alteration was observed in spinal cord. Our approach contributes to a better understanding of the aldehyde status *in vivo* and allows us to predict biomolecule modifications. The developed methodology can contribute to lipidomic studies. The use of different techniques and sample preparation reflected in the reported levels of reduced (GSH) and oxidized glutathione (GSSG). The mass spectrometry technique proved to be more accurate than the electrochemical one, and the use of thiol alkylating agent minimizes matrix interference. No changes were observed in the levels of the GSH conjugates of *trans*-4-hydroxy-2-nonenal (HNE) and crotonaldehyde in brain and spinal cord of SOD1^{G93A} rats quantified by HPLC-UV/Vis-ESI-MS/MS compared to controls. However, it was observed stereospecific HNE adducts formation *in vivo*. Note that this methodology is extremely sensitive and specific and allows simultaneous analysis of GSH, GSSG, Cys, cystine and the aforementioned adducts, serving for analysis of other aldehyde-glutathionylation adducts that may be important in pathologies associated with stress redox.

Keywords: Biomarkers, stress redox, aldehydes, DNA adducts, glutathionylation adducts, Amyotrophic Lateral Sclerosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Principais vias de formação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio.....	39
Figura 2 – Principais vias de balanço redox de glutathiona.....	42
Figura 3 – Esquema representativo das reações de iniciação e propagação de peroxidação lipídica.....	46
Figura 4 – Exemplos de lesões ao DNA formados por oxidações de bases nitrogenadas, ou pela reação de dGuo, dAdo e dCyd e alguns produtos de peroxidação lipídica.....	50
Figura 5 – Mecanismo de formação de 1, <i>N</i> ² -eteno-2'-desoxiguanosina a partir de reação de <i>trans,trans</i> -deca-2,4-dienal com dGuo.....	53
Figura 6 – Formação de 1- <i>N</i> ² -propano-2'-desoxiguanosina.....	55
Figura 7 – Detoxificação de aldeídos, envolvendo reduções catalisadas por aldoceto redutase (AKR), oxidações catalisadas por aldeído desidrogenase (ALDH), conjugação catalisada por glutathiona S-transferase (GST) e conversão a derivados mercaptúricos.....	57
Figura 8 – Vias metabólicas que garantem a estabilidade genômica.....	59
Figura 9 – Mecanismo proposto para o reparo de ligações cruzadas interfitas acoplado à replicação do DNA.....	77
Figura 10 – Gel de agarose do produto de PCR obtido a partir das orelhas dos filhotes.....	85
Figura 11 – Linearidade da recuperação de 1, <i>N</i> ² -propanodGuo (A), 1, <i>N</i> ² -εdGuo (B) e 8-oxodGuo (C).....	118

Figura 12 – Cromatograma representativo da recuperação de desoxinucleosídeos modificados nos experimentos de validação.....	119
Figura 13 – Cromatograma representativo da análise por HPLC-MS/MS da fração de urina contendo 2'-desoxiguanosinas modificadas.	124
Figura 14 – Níveis totais dos diastereoisômeros de 1,N ² -propanodGuo em urinas de homens residentes em São Paulo (SP, região poluída) e São João da Boa Vista (SJBV, região não poluída).	125
Figura 15 – Níveis de 1,N ² -εdGuo e 8-oxodGuo em urinas de pessoas residentes em São Paulo (região poluída) e São João da Boa Vista (região não poluída).	126
Figura 16 – Níveis de 1,N ² -propanodGuo em células DT40 tratadas com acetaldeído por 2 horas a 37°C sob atmosfera com CO ₂	128
Figura 17 – Níveis de 1,N ² -propanodGuo em células MEF tratadas com acetaldeído por 2 horas a 37°C sob atmosfera com CO ₂	128
Figura 18 – Níveis de 1,N ² -propanodGuo em células DT40 tratadas com 10 mM de acetaldeído – preparado em meio a 4°C –, incubadas por 2 horas, a 37°C, em atmosfera de CO ₂	129
Figura 19 – Níveis de 1,N ² -propanodGuo em células MEF incubadas com acetaldeído – preparado em meio a 4°C –, incubadas por 2 horas, a 37°C, em atmosfera de CO ₂	130
Figura 20 – Cromatograma representativo da análise por HPLC-MS/MS de DNA extraído de cérebro de ratos SOD1 ^{G93A}	131
Figura 21 – Níveis de 1,N ² -propanodGuo (A) e de 1,N ⁶ -εdAdo (B) em cérebro de ratos machos assintomáticos (2 meses) e sintomáticos (4 meses) por HPLC-MS/MS em modo SRM.....	132

Figura 22 – Avaliação dos pesos dos animais modelo para ELA.	134
Figura 23 – Curva de peso dos animais SOD1 ^{G93A} comparado ao aparecimento de sintomas.	134
Figura 24 – Curvas de calibração de padrões de hidrazonas de: (A) <i>trans,trans</i> -deca-2,4-dienal (DDE); (B) <i>trans,trans</i> -nona-2,4-dienal (NDE); (C) <i>trans,trans</i> -hexa-2,4-dienal (HDE); e <i>trans</i> -hexa-2-enal (HE).	136
Figura 25 – Níveis de derivados hidrazônicos de aldeídos em medula de ratos transgênicos SOD1 ^{G93A} comparados com controle.	137
Figura 26 – Níveis de derivados hidrazônicos de aldeídos em cérebro de ratos transgênicos SOD1 ^{G93A} comparados com controle.	139
Figura 27 – Curvas de calibração de glutathiona reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) por metodologias de HPLC com detecção eletroquímica e acoplada à espectrometria de massa.	140
Figura 28 – Dosagem de glutathiona em cérebros de ratos por HPLC com detecção eletroquímica.	141
Figura 29 – Análise de glutathiona reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) por HPLC-MS em modo SRM em cérebros de ratos sintomáticos.	143
Figura 30 – Dosagem de glutathiona em cérebros de ratos por HPLC-MS/MS em modo SRM positivo.	144
Figura 31 – Cromatograma a 220nm da purificação do aduto glutathionil-4-hidroxinona-1-ol.	145
Figura 32 – Espectro de massa obtido por injeção direta das três frações coletadas na purificação do aduto glutathionil-4-hidroxinona-1-ol (GS-HNE).	147

Figura 33 – Espectro de fragmentação da molécula protonada $[M+H]^+$ $m/z = 464$ das três frações purificadas do aduto glutationil-4-hidroxinona-1-ol (GS-HNE).	148
Figura 34 – Espectro RMN 1H , em D_2O , da primeira fração coletada na purificação do aduto glutationil-4-hidroxinona-1-ol (GS-HNE).	149
Figura 35 – Espectro RMN ^{13}C , em D_2O , da primeira fração coletada na purificação do aduto glutationil-4-hidroxinona-1-ol (GS-HNE).	151
Figura 36 – Espectro DEPT, em D_2O , da primeira fração coletada na purificação do aduto glutationil-4-hidroxinona-1-ol (GS-HNE).	153
Figura 37 – Espectro de RMN de correlações heteronucleares a curta distância $^1H-^{13}C$ (HMQC), em D_2O , da primeira fração coletada na purificação do aduto glutationil-4-hidroxinona-1-ol (GS-HNE).	155
Figura 38 – Espectro de RMN de correlações heteronucleares a longa distância $^1H-^{13}C$ (HMBC), em D_2O , da primeira fração coletada na purificação do aduto glutationil-4-hidroxinona-1-ol (GS-HNE).	156
Figura 39 – Região de campo baixo do 1H e campo alto de ^{13}C do espectro HMBC da primeira fração coletada na purificação do aduto glutationil-4-hidroxinona-1-ol (GS-HNE).	156
Figura 40 – Região de campo alto do espectro HMBC da primeira fração coletada na purificação do aduto glutationil-4-hidroxinona-1-ol (GS-HNE).	157
Figura 41 – Região de campo alto de 1H e baixo de ^{13}C do espectro HMBC da primeira fração coletada na purificação do aduto glutationil-4-hidroxinona-1-ol (GS-HNE).	157

Figura 42 – Região de campo baixo do espectro HMBC da primeira fração coletada na purificação do aduto glutacionil-4-hidroxinona-1-ol (GS-HNE).....	158
Figura 43 – Região das carbonilas do espectro HMBC da primeira fração coletada na purificação do aduto glutacionil-4-hidroxinona-1-ol (GS-HNE).....	158
Figura 44 – Espectro RMN ¹ H, em D ₂ O, da segunda fração coletada na purificação do aduto glutacionil-4-hidroxinona-1-ol (GS-HNE).....	159
Figura 45 – Espectro RMN ¹ H, em D ₂ O, da terceira fração coletada na purificação do aduto glutacionil-4-hidroxinona-1-ol (GS-HNE).....	162
Figura 46 – Espectro de absorção de soluções de diferentes concentrações de glutacionil-4-hidroxinona-1-ol (GS-HNE).....	165
Figura 47 – Curva de concentração molar a 192 e 220 nm de glutacionil-4-hidroxinona-1-ol (GS-HNE).	165
Figura 48 – Análise do aduto [¹³ C ₂ , ¹⁵ N-glicina]-glutacionil-4-hidroxinona-1-ol por injeção direta em espectrômetro de massas.	167
Figura 49 – Cromatograma a 220nm da purificação do aduto S-(3-hidroxi-1-metilpropil)-glutaciona (GS-HMP).....	168
Figura 50 – Espectro de massa obtido por injeção direta das três frações coletadas na purificação do aduto S-(3-hidroxi-1metilpropil)-glutaciona (GS-HMP).	169
Figura 51 – Espectro RMN ¹ H de 500 Hz, em D ₂ O, do aduto S-(3-hidroxi-1metilpropil)-glutaciona (GS-HMP).....	170
Figura 52 – Espectro de DEPT, em D ₂ O, do aduto S-(3hidroxi-1metilpropil)-glutaciona (GS-HMP).	171

Figura 53 – Análise do aduto [¹³ C ₂ , ¹⁵ N-glicina]-S-(3-hidroxi-1-metilpropil)-glutationa por injeção direta em espectrômetro de massas.	172
Figura 54 – Curvas de calibração para glutaciona reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) e cisteína.	173
Figura 55 – Cromatograma representativo de análise de adutos de glutaciona em cérebro de ratos SOD1 ^{G93A}	174
Figura 56 – Dosagem de glutaciona e cisteína em cérebros e medula de ratos SOD1 ^{G93A} por HPLC-MS/MS em modo SRM positivo.	175
Figura 57 – Curvas de calibração para o primeiro par de isômeros do aduto glutationil-4-hidroxinona-1-ol (GS-HNE 1) a eluir da coluna, para os quatro isômeros subsequentes (GS-HNE 2) e para o aduto S-(3hidroxi-1-metilpropil)-glutaciona (GS-HMP).	176
Figura 58 – Quantificação do aduto glutationil-4-hidroxinona-1-ol em animais modelo de ELA.....	177
Figura 59 – Quantificação do aduto S-(3-hidroxi-1metilpropil)-glutaciona por HPLC-UV-ESI-MS/MS em modo SRM em ratos SOD1 ^{G93A}	177
Figura 60 – Reação de trans-4-hidroxi-2(E)-nonenal com glutaciona reduzida.....	204
Figura 61 – Biomarcadores redox: quantificação prática e acurada para avaliação do status redox em sistemas biológicos.	221

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Proteínas afetadas e genes mutados em ELA	69
Tabela 2 – Grupos de Complementação de Anemia de Fanconi.....	73
Tabela 3 – Composição do meio de PCR para genotipagem dos ratos SOD1 ^{G93A}	84
Tabela 4 – Gradiente utilizado durante a análise em sistema HPLC-ESI/MS/MS para detecção do 1,N ² -propanodGuo e 1,N ² -εdGuo.	90
Tabela 5 – Gradiente utilizado durante a análise em sistema HPLC-ESI-MS/MS para detecção de 1,N ⁶ -εdAdo.....	92
Tabela 6 – Gradiente eluição de nucleosídeos modificados em urina	96
Tabela 7 – Método gradiente para eluição dos derivados hidrazônicos dos aldeídos.....	101
Tabela 8 – Transições escolhidas para detecção de derivados hidrazônicos dos aldeídos e valores de energia de ionização e fragmentação.....	102
Tabela 9 – Método cromatográfico para detecção eletroquímica de GSH e GSSG....	104
Tabela 10 – Condições cromatográficas para análise de GSH e GSSG por espectrometria de massas.	105
Tabela 11 – Transições utilizadas para detecção de GSH e GSSG.	106
Tabela 12 – Gradiente de purificação de GS-HNE	109
Tabela 13 – Condições de análise dos adutos de glutatona por espectrometria de massas.....	110
Tabela 14 – Diluições de 3-trimetilsilil-1-propanosulfonato de sódio (DSS) e do aduto glutationil-4-hidroxinona-1-ol (GS-HNE) para determinação de concentração por ressonância magnética nuclear de hidrogênios.....	111

Tabela 15 – Gradiente utilizado para de análise de adutos de glutathiona, glutathiona e cisteína por HPLC-UV/Vis-ESI-MS/MS	114
Tabela 16 – Transições escolhidas para detecção de glutathiona oxidada, cisteína, cistina e dos adutos de glutathionilação de trans-4-hidroxi-2(E)-nonenal e crotonaldeído com as respectivas energias utilizadas.	115
Tabela 17 – Resumo dos níveis de 1,N ² -propanodGuo, 1,N ² -εdGuo e 8-oxodGuo nos experimentos de reprodutibilidade e taxa de recuperação.	117
Tabela 18 – Dados dos indivíduos das amostras selecionadas de acordo com as informações fornecidas nos questionários aplicados	120
Tabela 19 – Sumário dos níveis de 8-oxodGuo, 1,N ² -εdGuo e 1,N ² -propanodGuo....	125
Tabela 20 – Avaliação dos ratos transgênicos SOD1 ^{G93A} quanto ao peso, aparecimento de sintomas e ponto de eutanásia.	135
Tabela 21 – Concentração de glutathiona reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) obtida por detecção eletroquímica em cérebro de ratos	142
Tabela 22 – Rendimento obtido na síntese e purificação do aduto glutathionil-4-hidroxinona-1-ol (GS-HNE)	146
Tabela 23 – Deslocamentos químicos no espectro de RMN ¹ H, em D ₂ O, da primeira fração coletada na purificação do aduto glutathionil-4-hidroxinona-1-ol (GS-HNE).	150
Tabela 24 – Deslocamentos químicos no espectro de RMN ¹³ C, em D ₂ O, da primeira fração coletada na purificação do aduto glutathionil-4-hidroxinona-1-ol (GS-HNE).	154
Tabela 25 – Deslocamentos químicos no espectro de RMN ¹ H, em D ₂ O, da segunda fração coletada na purificação do aduto glutathionil-4-hidroxinona-1-ol (GS-HNE).	160

Tabela 26 – Deslocamentos químicos no espectro de RMN ¹ H, em D ₂ O, da terceira fração coletada na purificação do aduto glutathionil-4-hidroquinona-1-ol (GS-HNE).	163
Tabela 27 – Cálculo da concentração de glutathionil-4-hidroquinona-1-ol (GS-HNE) por RMN ¹ H.	164

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1, <i>N</i> ⁶ -εdAdo	1, <i>N</i> ⁶ -Eteno-2'-desoxiadenosina
[¹⁵ N ₅]1, <i>N</i> ⁶ -εdAdo	[¹⁵ N ₅]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 -α-OH- propanodGuo	1, <i>N</i> ² -(α-Hidroxi)propano -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 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
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
DDE	<i>Trans,trans</i> -deca-2,4-dienal
DEPT	do inglês <i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i>
dGuo	2'-Desoxiguanosina
DNPH	2,4-Dinitrofenilhidrazina
DNPO	Derivado hidrazônico
DSS	3-trimetilsilil-1-propanossulfonato de sódio
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	Glutaciona peroxidase
GS-HNE	Glutacionil-4-hidroxinona-1-ol
[¹³ C ₂ , ¹⁵ N-Gly]-GS-HNE	[¹³ C ₂ , ¹⁵ N-Glicina]- glutacionil-4-hidroxinona-1-ol
GS-HPM	S-(3-hidroxi-1-metilpropil)-glutaciona
[¹³ C ₂ , ¹⁵ N-Gly]-GS-HPM	[¹³ C ₂ , ¹⁵ N-Glicina]-S-(3-hidroxi-1-metilpropil)-glutaciona
GSH	Glutaciona reduzida
[¹³ C ₂ , ¹⁵ N-Gly]-GSH	[¹³ C ₂ , ¹⁵ N-Glicina]-glutaciona reduzida
GSSG	Glutaciona dissulfeto
[¹³ C ₂ , ¹⁵ N-Gly]-GSSG	[¹³ C ₂ , ¹⁵ N-Glicina]-glutaciona dissulfeto
GST	Glutaciona S-transferase
HDE	<i>Trans,trans</i> -hexa-2,4-dienal
HE	<i>Trans</i> -hexe-2-nal
HeptDE	<i>Trans,trans</i> -hepta-2,4-dienal
HMBC	do inglês <i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
HMQC	do inglês <i>Heteronuclear Multiple-Quantum Correlation</i>
HNE	<i>Trans</i> -4-hidroxi-2(E)-nonenal

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>
NDE	<i>Trans,trans</i> -nona-2,4-dienal
NEM	N-Etilmaleimida
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
RMN ¹³ C	Ressonância magnética nuclear de carbono-13
RMN ¹ H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
SOD1	Cu,Zn-Superóxido dismutase
SOD1 ^{G93A}	Enzima Cu,Zn-superóxido dismutase humana com substituição da glicina 93 por alanina.
SJBV	São João da Boa Vista – SP
SP	São Paulo – SP
SPE	sigla em inglês para Extração em fase sólida
SRM	sigla em inglês para Monitoramento de reação simples
TCR	sigla em inglês para Reparo acoplado à transcrição
Trx	Tiorredoxina
UDG	Uracila-DNA-glicosilase

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	36
1.1. <i>Estresse redox.....</i>	37
1.1.1. Defesas antioxidantes.....	40
1.2. <i>Lesões em biomoléculas</i>	43
1.2.1. Peroxidação lipídica.....	44
1.2.1.1. Aldeídos	47
1.2.2. Lesões em DNA.....	48
1.2.2.1. Adutos exocíclicos de DNA	51
1.3. <i>Mecanismo de detoxificação e defesa de biomoléculas</i>	56
1.3.1. Detoxificação de aldeídos.....	56
1.3.2. Reparo de DNA	58
1.4. <i>Biomarcadores e estresse redox.....</i>	62
1.5. <i>Modelos de estresse redox</i>	63
1.5.1. Poluição atmosférica.....	63
1.5.2. Esclerose Lateral Amiotrófica	65
1.5.2.1. Cu,Zn-Superóxido dismutase.....	68
1.5.3. Anemia de Fanconi.....	72
2. OBJETIVOS	79

3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	80
3.1. Reagentes.....	80
3.2. Equipamentos.....	81
3.3. Análises estatísticas.....	81
3.4. Sistemas de HPLC-UV/Vis-ESI-MS/MS.....	82
3.5. Animais modelo de Esclerose Lateral Amiotrófica.....	82
3.5.1. Genotipagem dos ratos SOD1 ^{G93A}	83
3.5.2. Avaliação dos Ratos Transgênicos SOD1 ^{G93A}	85
3.5.3. Coleta de órgãos e eutanásia.....	86
3.6. Extração de DNA.....	86
3.7. Hidrólise de DNA.....	87
3.8. Análise de 2'-desoxinucleosídeos modificados.....	88
3.8.1. Síntese de 1,N ² -eteno-2'-desoxiguanosina e [¹⁵ N ₅]-1,N ² - eteno-2'-desoxiguanosina.....	88
3.8.2. Síntese de 1,N ² -propano-2'-desoxiguanosina e [¹⁵ N ₅]-1,N ² - propano-2'-desoxiguanosina.....	88
3.8.3. Metodologia de quantificação de 1,N ² -propano-2'- desoxiguanosina e 1, N ² -eteno-2'-desoxiguanosina em DNA.....	89
3.8.4. Metodologia de quantificação de 1,N ⁶ -eteno-2'- desoxiadenosina no DNA.....	91
3.8.5. Quantificação de adutos de DNA em modelos de Anemia de Fanconi.....	93

3.8.5.1.	Cultura celular	93
3.8.5.2.	Tratamento de células DT40 e MEF com acetaldeído	94
3.8.6.	Quantificação de 2'-desoxinucleosídeos modificados em urina humana.....	94
3.8.6.1.	Coleta de urina.....	94
3.8.6.2.	Preparação e extração das urinas	95
3.8.6.3.	Metodologia quantificação de 8-oxodGuo, 1,N ² - εdGuo and 1,N ² -propanodGuo em amostras de urina.	96
3.8.6.4.	Reprodutibilidade e taxa de recuperação.....	97
3.8.6.5.	Curvas de calibração	98
3.8.6.6.	Quantificação de creatinina em urina.....	98
3.9.	<i>Análise de aldeídos em cérebro e medula de ratos transgênicos</i> <i>SOD1^{G93A}</i>	99
3.9.1.	Síntese dos padrões de dinitrofenilhidrazonas de aldeídos.....	99
3.9.2.	Derivatização e extração dos aldeídos dos tecidos	100
3.9.3.	Quantificação de aldeídos derivatizados com 2,4- dinitrofenilhidrazina por HPLC-ESI-MS/MS	101
3.10.	<i>Análise de glutathione</i>	103
3.10.1.	Quantificação simultânea de glutathione reduzida e glutathione oxidada por detecção eletroquímica	103
3.10.1.1.	Preparo das Amostras	104

3.10.2. Quantificação simultânea de glutathiona reduzida e glutathiona oxidada por espectrometria de massas	104
3.10.2.1. Preparo das Amostras	106
3.10.3. Dosagem de Proteínas	107
3.11. <i>Síntese, purificação e caracterização de adutos de glutathiona</i>	107
3.11.1. Síntese dos adutos de glutathiona.....	107
3.11.1.1. Redução dos adutos crotonaldeído com glutathiona	108
3.11.2. Purificação dos adutos de glutathiona	108
3.11.3. Caracterização dos adutos de glutathiona.....	109
3.11.4. Determinação dos coeficientes de extinção molar (ϵ) de adutos de glutathiona	110
3.12. <i>Síntese, purificação e caracterização dos padrões isotopicamente marcados dos adutos de glutathiona</i>	111
3.13. <i>Análise de adutos de glutathiona, glutathiona reduzida e oxidada, cisteína e cistina em ratos transgênicos modelo de ELA</i>	112
3.13.1. Preparo de amostras	112
3.13.2. Condições de HPLC-MS.....	113
3.13.3. Dosagem de proteínas.....	115
4. RESULTADOS	116
4.1. <i>Quantificação de 2'-desoxinucleosídeos modificados</i>	116
4.1.1. Em urina de indivíduos expostos à poluição atmosférica.	116

4.1.2.	Quantificação de adutos de DNA em modelo de Anemia de Fanconi.....	126
4.1.3.	Quantificação de desoxinucleosídeos modificados em ratos modelo de Esclerose Lateral Amiotrófica.....	130
4.2.	<i>Avaliação dos ratos transgênicos SOD1^{G93A}: modelo de Esclerose Lateral Amiotrófica</i>	133
4.3.	<i>Análise de aldeídos em cérebro e medula de ratos transgênicos SOD1^{G93A}</i>	135
4.4.	<i>Análise de glutathione</i>	140
4.5.	<i>Síntese, purificação e caracterização de adutos de glutathione</i>	144
4.5.1.	Síntese, purificação e caracterização do aduto Glutathionil-4-hidroquinona-1-ol (GS-HNE).....	144
4.5.2.	Determinação dos coeficientes de extinção molar (ϵ) de glutathionil-4-hidroquinona-1-ol.....	164
4.5.3.	Síntese, purificação e caracterização do padrão isotopicamente marcado [¹³ C ₂ , ¹⁵ N-glicina]-Glutathionil-4-hidroquinona-1-ol	166
4.5.4.	Síntese, purificação e caracterização do aduto S-(3-hidroxi-1-metilpropil)-glutathione	167
4.5.5.	Síntese, purificação e caracterização do padrão isotopicamente marcado [¹³ C ₂ , ¹⁵ N-glicina]-S-(3-hidroxi-1-metilpropil)- glutathione.....	172

4.6. <i>Análise de adutos de glutathiona em cérebro e medula de ratos</i>	
<i>SOD1^{G93A}</i>	173
5. DISCUSSÃO	178
5.1. <i>Nucleosídeos modificados – 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina, 1,N²-eteno-2'-desoxiguanosina, 1,N⁶-eteno-2'-desoxiadenosina e 1,N²-propano-2'-desoxiguanosina como biomarcadores</i>	179
5.1.1. <i>Análise em urina de indivíduos expostos à poluição atmosférica</i>	179
5.1.2. <i>Quantificação de adutos de DNA em modelo de Anemia de Fanconi</i>	184
5.1.3. <i>Quantificação de 2'-desoxirribonucleosídeos modificados em ratos modelo de Esclerose Lateral Amiotrófica</i>	189
5.2. <i>Avaliação dos ratos transgênicos SOD1^{G93A}: modelo de Esclerose Lateral Amiotrófica</i>	192
5.3. <i>Análise de aldeídos em cérebro e medula de ratos transgênicos SOD1^{G93A}</i>	194
5.4. <i>Análise de glutathiona</i>	199
5.5. <i>Síntese, purificação e caracterização de adutos de glutathiona</i>	203
5.5.1. <i>Síntese, purificação e caracterização do aduto Glutathionil-4-hidroquinona-1-ol (GS-HNE)</i>	204
5.5.2. <i>Determinação dos coeficientes de extinção molar (ϵ) de glutathionil-4-hidroquinona-1-ol</i>	210

5.5.3. Síntese, purificação e caracterização do padrão S-(3-hidroxi-1-metilpropil)-glutathiona (GS-HMP).....	211
5.6. <i>Análise de adutos de glutathiona em cérebro e medula de ratos</i> <i>SOD1^{G93A}</i>	212
6. CONCLUSÕES.....	218
7. REFERÊNCIAS	222
ANEXOS	260
APÊNDICE.....	264

1. INTRODUÇÃO

Com frequência, os termos “espécies reativas (de oxigênio)” e “radicais livres” são equivocadamente utilizados como sinônimos. Os radicais livres são moléculas ou fragmentos moleculares que possuem elétrons desemparelhados. Enquanto as espécies reativas (ER) abrangem derivados, radicalares ou não, tanto de oxigênio (ERO) como de nitrogênio (ERN). Estas espécies podem ser subdivididas em oxidantes por um (radicais) ou dois (não radicais) elétrons. Eles apresentam grande variação de reatividade e de capacidade oxidante (Winterbourn, 2008).

Implicadas em processos toxicológicos desde a década de 50 (Ross, 1950; Gueraud et al., 2010), as espécies reativas passaram a ser extensivamente estudadas e identificadas em diversos processos biológicos a partir de 1969, com a descrição da dismutação enzimática do ânion radical superóxido (McCord e Fridovic.I, 1969). Hoje não são apenas associadas a processos toxicológicos, mas a diversos processos fisiopatológicos agindo como importantes mediadores, por exemplo, na sinalização celular (Winterbourn, 2008; Murphy et al., 2011; Ray, Huang e Tsuji, 2012).

A associação de processos redox a diversas condições patológicas (revisado por Valko et al., 2007; Bocci e Valacchi, 2013), resultou no uso de diferentes classes de compostos como possíveis biomarcadores de estresse redox. Avaliação de produtos de oxidação de lipídios, em especial, constituintes da membrana plasmática como dienos conjugados, malonodialdeído (MDA),

isoprostanos/neuroprostanos, 4-hidroxi-alcenais e os seus derivados ácidos são amplamente empregados com este intuito (Guichardant e Lagarde, 2009).

Dentre os biomarcadores de peroxidação lipídica destacam-se os aldeídos α,β -insaturados. Eles e seus isômeros são agentes alquilantes com capacidade de se ligarem covalentemente a grupos nucleofílicos presentes em DNA, peptídeos e proteínas, alterando estruturas e conseqüentemente funções destas moléculas. Muitos trabalhos demonstraram a formação de adutos de DNA e proteínas a partir de *trans,trans*-deca-2,4-dienal (DDE), *trans*-4-hidroxi-2-nonenal (HNE) e MDA, assim como as implicações para a atividade celular, como, por exemplo, desacoplamento mitocondrial (Carvalho et al., 1998; Loureiro, . et al., 2000; Loureiro et al., 2002; Sigolo, Di Mascio e Medeiros, 2007; Blair, 2008; Vila et al., 2008).

A glutationilação é um dos mecanismos reconhecidos de detoxificação desses aldeídos (Esterbauer, Schaur e Zollner, 1991; Blair, 2006). Estes produtos, posteriormente metabolizados a derivados mercaptúricos, são facilmente excretados na urina. A detecção de adutos de glutatona vem sendo utilizada como marcador de peroxidação lipídica em cultura celular, tecidos e urina (Falletti et al., 2007; Jian et al., 2007; Falletti e Douki, 2008; Kuiper et al., 2008; Zhu, Jian e Blair, 2009; Kuiper et al., 2010; Long, Rosenberger e Picklo, 2010).

1.1. Estresse redox

Uma diversidade de espécies reativas (ERO e ERN) é gerada por vários agentes endógenos e exógenos. Entre as ERs podemos listar formas radicalares, a

exemplo de ânion radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), radical perhidroxila (HOO^{\bullet}), radical hidroxila (HO^{\bullet}), radical alcoxila (RO^{\bullet}), radical peroxila (ROO^{\bullet}) e ânion radical carbonato ($CO_3^{\bullet-}$), bem como formas não radicalares, como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ácido hipocloroso ($HOCl$), oxigênio singlete (1O_2), hidroperóxidos orgânicos ($ROOH$) e ozônio (O_3). Semelhantemente, entre as ERNs estão os radicais óxido nítrico (NO^{\bullet}) e dióxido de nitrogênio (NO_2^{\bullet}) e o não radical peroxinitrito ($ONOO^-$) (Halliwell e Gutteridge, 2007).

Considerada uma das principais fontes de ERs, a cadeia de transporte de elétrons mitocondrial gera formas parcialmente reduzidas de oxigênio (O_2) durante a transferência de elétrons pelos complexos da cadeia (Nohl, 1994).. Vários outros processos endógenos e exógenos geram estas espécies, destacando-se como potenciais fontes endógenas o metabolismo por enzimas do citocromo P450, xantina oxidase, peroxissomos, e ativação de células inflamatórias (Valko et al., 2007). A Figura 1 mostra um resumo das principais vias de formação destas espécies.

Outrossim, geradas por diversos processos, as ERN derivam de reações do óxido nítrico (NO^{\bullet}) (Augusto et al., 2002). A reação entre L-arginina e oxigênio catalisada pela enzima óxido nítrico sintase é a maior fonte desta espécie radicalar pouco reativa, que se difunde pela célula atuando na sinalização celular (Toledo e Augusto, 2012). Por meio de nitrosotióis, atua na sinalização e regulação celular de forma análoga aos produtos de oxidação de tióis (Winterbourn, 2008). Os efeitos deletérios do óxido nítrico dependem da formação de espécies mais reativas, como o peroxinitrito ($ONOO^-$) – formado pela reação com o ânion radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) (Saran, Michel e Bors, 1990; Toledo e Augusto, 2012). O peroxinitrito é capaz de gerar ânion radical carbonato ($CO_3^{\bullet-}$), dióxido de nitrogênio ($^{\bullet}NO_2$), nitrito (NO_2^-) e nitrato (NO_3^-), e causar danos em DNA, proteínas e lipídios (Ferrer-Sueta e Radi,

2009; Toledo e Augusto, 2012). Devido à sobreposição e à ligação entre produção, função e decomposição de ERO e ERN, o termo ERO é comumente utilizado para designar espécies reativas.

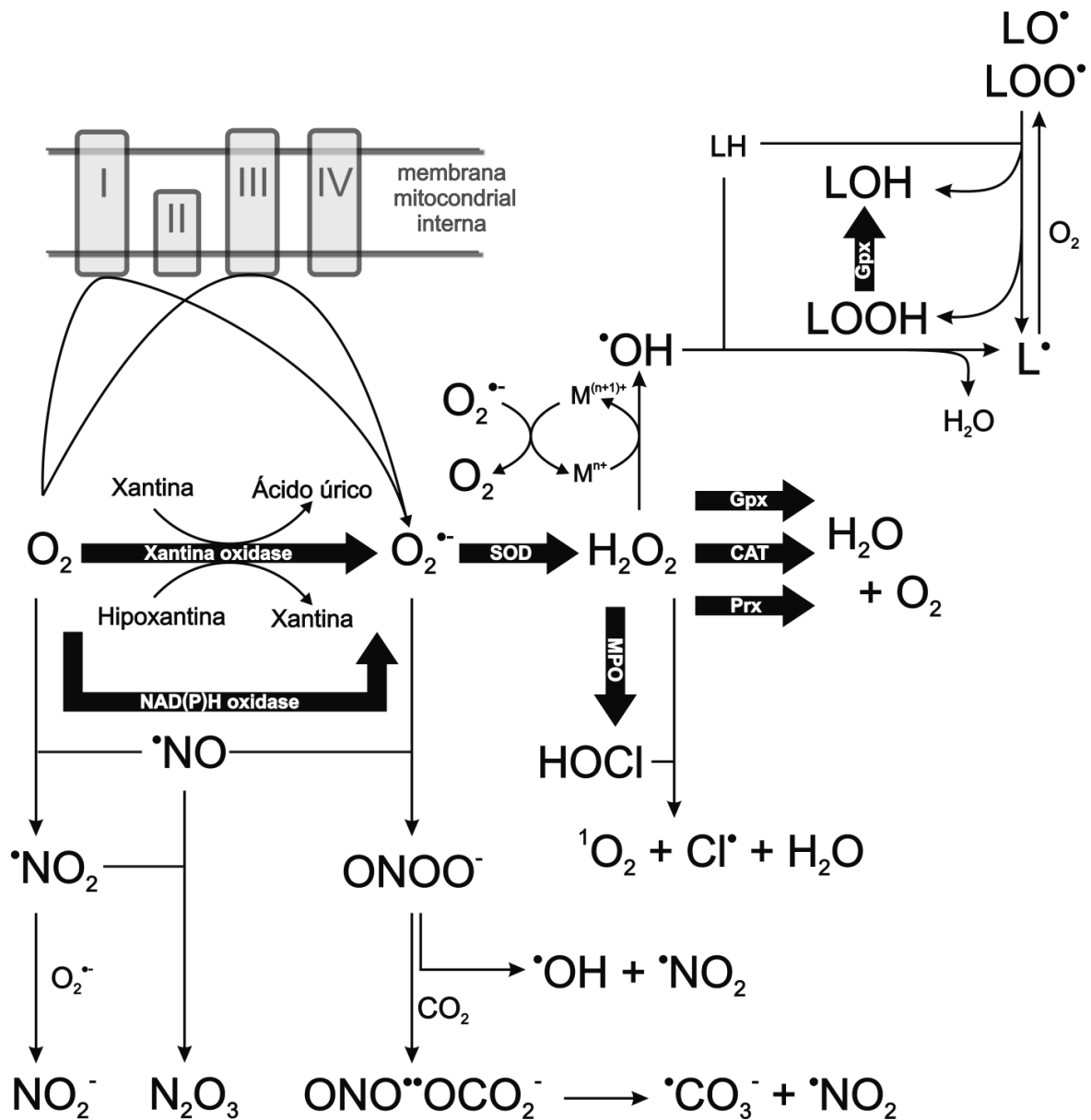


Figura 1 – Principais vias de formação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. As setas largas indicam as reações enzimáticas, e as setas finas indicam reação direta. CAT – catalase; Gpx – glutatona peroxidase; L^\bullet – radical alquila; LH – lipídios; LO^\bullet – radical alcóxila; LOH – hidróxido orgânico; LOO^\bullet – radical peróxila; LOOH – hidroperóxido orgânico; $M^{(n+1)+}$ – metal de transição; MPO – mieloperoxidase; Prx – peroxirredoxina; SOD - superóxido dismutase (adaptado de Valko et al., 2007; e Winterbourn, 2008).

Os impactos biológicos destas espécies dependem das moléculas envolvidas, de condições fisiopatológicas, e ainda do microambiente onde as ERs

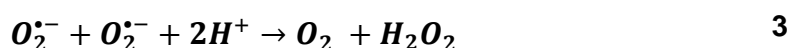
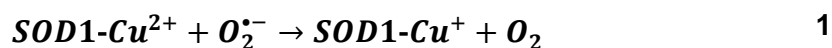
são geradas (Murphy et al., 2011). Quando a homeostase local é perturbada temos uma situação que definimos como estresse redox, onde a concentração fisiológica de diversas substâncias químicas é comprometida.

1.1.1. Defesas antioxidantes

Antioxidante é definido como molécula que em baixa concentração inibe ou minimiza processo de oxidação (Halliwell e Gutteridge, 2007). Do ponto de vista fisiológico, antioxidantes são moléculas que protegem contra os efeitos deletérios das ERs. Os organismos gozam múltiplos mecanismos defensivos para as diversas fontes e espécies geradas. Grosso modo podemos dividi-los em sistemas enzimáticos e em moléculas de baixo peso molecular, embora sejam em várias vias intrinsecamente ligados.

A Cu-Zn Superóxido Dismutase (SOD1), com 32 kDa, é formada por duas subunidades idênticas, cada uma contendo um íon Cu^{+2} e um íon Zn^{+2} . Embora predominantemente citoplasmática, é ainda encontrada em peroxissomos, no espaço intermembranas de mitocôndrias e no núcleo das células (Sturtz et al., 2001; Okado-Matsumoto e Fridovich, 2002; Roberts et al., 2007). Esta importante enzima do sistema antioxidante celular contém resíduos carregados formando um canal progressivamente mais estreito que dirige o íon radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) para o sítio ativo (Tainer et al., 1982), onde catalisa a dismutação deste radical através de um ciclo de oxidação e redução do cobre da enzima (Equação 3) (McCord e Fridovic.I,

1969). Pequenos íons como cianeto (CN^-) e N_3^- podem atravessar o canal e inibir a enzima ligando-se diretamente ao cobre (Rigo, 1975).



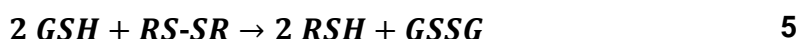
O peróxido de hidrogênio é dismutado por um mecanismo similar ao da SOD1 pela catalase (CAT). Esta heme proteína utiliza o ferro na catálise desta reação (Equação 4):



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 o tripeptídeo glutathione (GSH, γ -glutamil-cisteinil-glicina) como fonte de prótons e elétrons para as reações de redução. Cataliticamente, as Prx se auto-oxidam e são reduzidas por tioredoxinas (Trx) (revisado por Rhee et al., 2012). Encontradas no citoplasma e mitocôndrias, as tioproteínas Trx reduzem pontes dissulfetos em uma gama de proteínas. Neste processo as Trx também se oxidam e são regeneradas por tioredoxinas redutases à custa do consumo de NADPH (Lu e Holmgren, 2013). Trx, Trx redutase e NADPH são consideradas como sistema antioxidante tioredoxina, e em conjunto com GSH são um sistema de controle redox ímpar (Kemp, Go e Jones, 2008).

A GSH é o tiol não proteico mais abundante nas células. Esse tripeptídeo desempenha importante papel na defesa antioxidante e contra xenobióticos,

especialmente no sistema nervoso central (Kosower e Kosower, 1978; Dringen, 2000; Aoyama, Watabe e Nakaki, 2008). Com concentrações em torno de 10 mM no citosol (Ostergaard, Tachibana e Winther, 2004), GSH atua sequestrando ERs e mantendo o equilíbrio redox através do sistema tampão redox GSH/GSSG que pode transferir dois elétrons (Equação 5).



Posteriormente, a forma oxidada (GSSG) é reconvertida a GSH, principalmente, pela enzima glutathiona redutase, consumindo NADPH no processo (Equação 6 e Figura 2) (Lillig, Berndt e Holmgren, 2008).

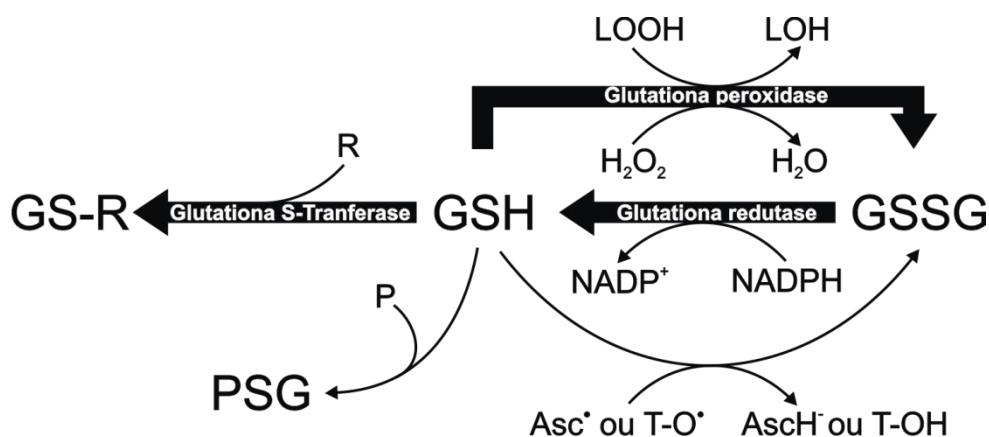


Figura 2 – Principais vias de balanço redox de glutathiona. As setas largas indicam as reações enzimáticas, e as setas finas indicam reação direta. Asc• – radical ascorbato; AscH• – ascorbato; GS-R – aduto de glutathiona; GSH – glutathiona reduzida; GSSG; glutathiona dissulfeto; LOH – “hidróxido” orgânico; LOOH – hidroperóxido orgânico; P – proteína; PSG – proteína glutathionilada; R – composto reativo; T-O• – radical tocoferil, T-OH – α-tocoferol.

Este tampão propicia um potencial citosólico redutor de aproximadamente -320 mV (Ostergaard, Tachibana e Winther, 2004; Morgan, Sobotta e Dick, 2011). Recentemente, foi demonstrado em *Saccharomyces* que este

é mantido por sequestro de GSSG em vacúolos e por múltiplos sistemas redutores de GSSG, como glutathione reductase, thioredoxina e glutathione reductase (Morgan et al., 2013). Estima-se assim uma relação citosólica de GSH:GSSG de 50.000:1, proporção muito maior que estimativas prévias – variando de 30 a 100:1 – baseadas no conteúdo total de glutathione (Winther e Jakob, 2013).

Ademais de sua função doadora de prótons, GSH atua em sinalização celular – como parece ser o caso da glutathionilação de proteínas (Zhang e Forman, 2012; Sanchez-Gomez et al., 2013) –, está envolvida no funcionamento do sistema neuromediador monoaminérgico (Jacobsen et al., 2005) e na regulação de apoptose (Hall, 1999; Du et al., 2008; Circo e Aw, 2010). Além disto, é importante na modulação do sítio redox-sensível em receptores glutamatérgicos NMDA (Varga et al., 1997), e na proteção contra a formação de adutos de DNA com produtos de peroxidação lipídica (Falletti e Douki, 2008).

Além de GSH, vitamina C e E, polifenóis, carotenoides, ácido úrico e uma série de outros compostos são considerados antioxidantes de baixo peso molecular. Seja pelo aumento da produção de ERs, seja pela ineficiência dos antioxidantes em aniquilá-las, o estresse redox pode gerar direta ou indiretamente grande número de lesões em biomoléculas.

1.2. Lesões em biomoléculas

Embora ERs possam reagir em simples e controladas condições experimentais com uma variedade de biomoléculas, muitas reações são

fisiopatologicamente inexpressivas (Winterbourn, 2008). A reatividade nos complexos sistemas biológicos dependerá de qual biomolécula alvo está nas proximidades de formação da ERO/ERN.

As ERs podem promover modificações reversíveis e irreversíveis em biomoléculas, como DNA, lipídios e proteínas. Isto pode desencadear uma série de respostas celulares, como morte celular, mutações e agregação proteica. Avaliar estas lesões é uma estratégia indireta de análise de espécies reativas, visto a detecção direta de algumas ERs ser extremamente difícil, quando possível. Atualmente muitas lesões são estudadas como biomarcadores redox, a exemplo dos produtos de lipoperoxidação e os adutos de DNA.

1.2.1. Peroxidação lipídica

O termo peroxidação lipídica (LPO) refere-se à degradação oxidativa de lipídios poli-insaturados (Halliwell e Gutteridge, 2007). Esta compreende um conjunto de reações – seja de origem radicalar, não radicalar ou enzimática (Niki et al., 2005) – que levam a formação de peróxidos lipídicos. Sabe-se que a LPO pode ser causada por uma série de fatores endógenos e exógenos, a exemplo de algumas enzimas, espécies reativas, íons metálicos, radiação UV, calor, fármacos, entre outros (Gueraud et al., 2010).

As ERs atacam preferencialmente ácidos graxos poli-insaturados, embora também ataquem em menor proporção os saturados e monoinsaturados. O ataque

radicalar não enzimático pode ser dividido em três partes: iniciação, propagação e terminação (Porter, Caldwell e Mills, 1995).

Inicialmente, os átomos de hidrogênio bis-álílicos, ou seja, ligados a carbono adjacente a duas duplas ligações, são abstraídos por radicais livres reativos gerando um radical centrado no carbono, o radical alquila (L^{\bullet}). Este radical se estabiliza por ressonância, formando duplas ligações conjugadas (Figura 3). A reação se propaga quando o oxigênio molecular dissolvido nas membranas se adiciona ao radical gerando outro radical mais estável, o radical peroxila (LOO^{\bullet}). Este inicia então uma cascata autocatalítica ao abstrair hidrogênio bis-álílico de ácido graxo vizinho, gerando outro radical alquila (L^{\bullet}) e um hidroperóxido lipídico ($LOOH$). Os radicais peroxila podem gerar também endoperóxidos e peróxidos cíclicos por outros mecanismos (Porter, 1984). O processo continua até que dois radicais se aniquilem, ou até o sistema antioxidante os transformem em não-radicais ou em radicais não reativos (revisado por Gueraud et al., 2010; Fritz e Petersen, 2013; Sultana, Perluigi e Butterfield, 2013).

Os hidroperóxidos lipídicos se decompõem via endoperóxidos e radicais alcóxila (LO^{\bullet}) em uma série de compostos não radicalares, por isso, mais estáveis e difusíveis pela célula. 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). Estes produtos secundários são equiparáveis a segundo mensageiros na sinalização celular, principalmente na regulação de ciclo celular (Gueraud et al., 2010).

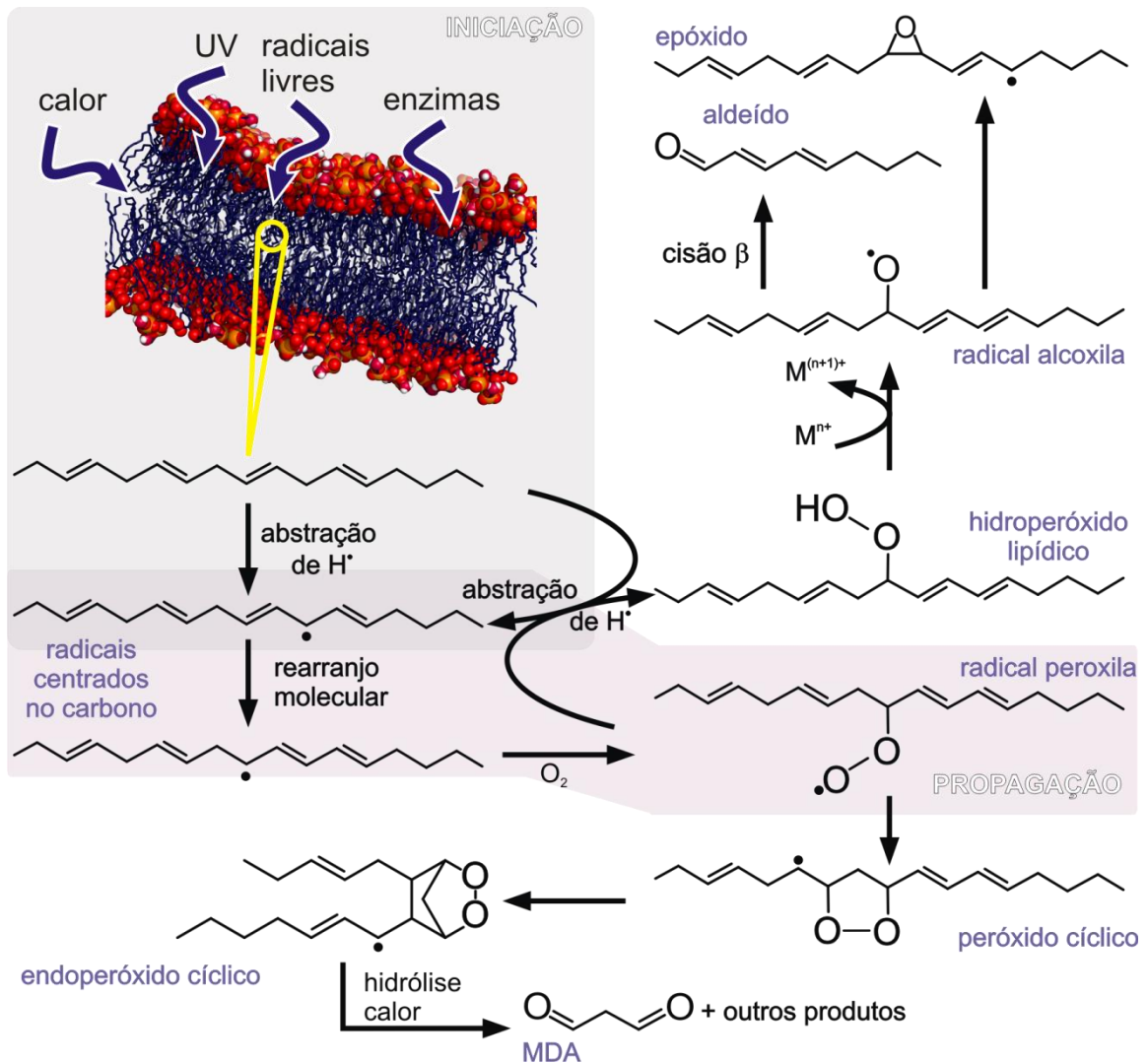


Figura 3 – Esquema representativo das reações de iniciação e propagação de peroxidação lipídica. Obs.: membrana criada a partir de modelo de Tieleman (Tieleman e Berendsen, 1998)

Os aldeídos são os mais estudados dentre os produtos secundários, em especial o MDA e os aldeídos α,β -insaturados. Nas últimas décadas estes compostos têm sido estudados por meio de técnicas imuno-histoquímicas, métodos analíticos de HPLC e uma série de ensaios *in vitro* (Sampey et al., 2003; Poli et al., 2008; Wakita et al., 2011).

1.2.1.1. Aldeídos

O MDA, os aldeídos α -dicarboxílicos (a exemplo do metilglioal) e os aldeídos α,β -insaturados, com destaque para *trans*-4-hidroxi-2-nonenal (HNE), acroleína (ou 2-propenal, ACR) e crotonaldeído (ou *trans*-2-butenal, CRT), são há muito tempo estudados e associados a diversos processos fisiopatológicos (revisado por Gueraud et al., 2010; Fritz e Petersen, 2013). Estes aldeídos reagem com grupamentos amina e tiol de diversas biomoléculas, a exemplo de proteínas, ácidos nucleicos e alguns lipídios. Promovem modificações, principalmente, via adição de Michael e por formação de base de Schiff (Forman, 2010; Fritz e Petersen, 2011; Domingues et al., 2013).

A variedade e a abundância de moléculas com as quais os aldeídos podem reagir dificultam a detecção de aldeídos livres. Além da reatividade, a polaridade e a ausência de grupos cromóforos ou fluoróforos tornam necessária uma etapa de derivatização nas análises destes compostos. Embora existam diversos agentes para este fim, cloridrato de O-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzil)hidroxialamina e 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) são os mais empregados. O primeiro é reagente referência para análises cromatográficas gasosas de aldeídos (revisado por Ferreira et al., 2006). Enquanto, DNPH é amplamente empregado para detecção de compostos carbonílicos em uma série de amostras. Tradicionalmente, os derivados gerados, as hidrazonas (DNPO), são analisados por cromatografia líquida com detecção UV-Vis em comprimentos de onda próximos a 360 nm ou acoplados a espectrometria de massa (Kolliker, Oehme e Dye, 1998; Eggink et al., 2008). As

condições brandas de reação da DNPH e sua análise por HPLC são vantagens deste reagente.

A caracterização de aldeídos derivatizados com ambos os compostos acima citados é feita a partir do perfil de fragmentação obtido por análises cromatográficas acopladas a espectrometria de massas (Kolliker, Oehme e Dye, 1998; Brombacher, Oehme e Beukes, 2001; Kawai, Takeda e Terao, 2007). Estes trabalhos são especialmente importantes, visto que, atualmente, técnicas de cromatografia líquida e gasosa acopladas a espectrometria de massas são as técnicas de escolha para detecção de aldeídos (Lili et al., 2010; Berdyshev, 2011). Em realidade, essas técnicas têm sido de grande relevância no estudo de biomoléculas modificadas por aldeídos, como proteínas e DNA.

1.2.2. Lesões em DNA

Danos causados por oxidação em DNA desempenham importante papel em carcinogênese, envelhecimento e diversos processos fisiopatológicos. Estimadas num total de 10.000 por dia (Lindhal, 1993), as lesões ao DNA podem resultar de ataque às bases nitrogenadas, aos resíduos de desoxirribose e às ligações fosfodiester (Gates, 2009) por oxidantes e compostos eletrofílicos. A constatação destes danos em indivíduos que não foram expostos a carcinógenos nem tratados com agentes genotóxicos, ou que possuíssem um hábito particular levou ao avanço da área de carcinogênese nos últimos 25 anos.

Ao longo deste período demonstrou-se que agentes exógenos inevitáveis – tais como radiação UV, radiação ionizante, radioisótopos naturais e substâncias genotóxicas presentes em alimentos e no ar – promovem estes danos (Marnett, Riggins e West, 2003; Bertram e Hass, 2008; Cadet, Douki e Ravanat, 2010). A radiação UV é um indutor de lesões ao DNA amplamente reconhecido. A exposição a este agente físico é capaz de induzir principalmente dois tipos de lesões: os ciclobutanos de pirimidina (CPDs) e os fotoprodutos (6-4)-pirimidina-pirimidona (6-4PPs) – ambos distorcivos da dupla hélice de DNA (Garnis et al., 2006, Schuch, et.al., 2009). O acúmulo destas lesões está associado a aumento no risco de desenvolvimento de câncer de pele (Saladi e Persaud, 2005).

Da mesma forma produtos, normais do metabolismo celular como ERs, produtos da peroxidação lipídica, agentes alquilantes, estrógenos, agentes clorinantes e certos intermediários de algumas vias metabólicas são fontes endógenas de danos ao DNA (Burcham, 1999; Cadet, Jean et al., 2012; Pruthi et al., 2012).

Oxidações de bases são modificações que foram por muitos anos elencadas entre as mais nocivas lesões ao DNA. Descoberta por Kasai e Nishimura (Kasai e Nishimura, 1984), a 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina (8-oxodGuo, Figura 4) é a lesão mais extensivamente estudada (Collins et al., 2004). Suas propriedades biológicas foram amplamente investigadas, sendo mutagênica em bactérias e células de mamífero, induzindo principalmente transversões G→T (Shibutani, Takeshita e Grollman, 1991; Cheng et al., 1992; Lepage et al., 1995). Por apresentar potencial de oxidação menor que qualquer outro nucleosídeo natural, a 8-oxodGuo se torna alvo preferencial de oxidantes cujo mecanismo envolva oxidação por 1 ou 2 elétrons (Burrows e Muller, 1998).

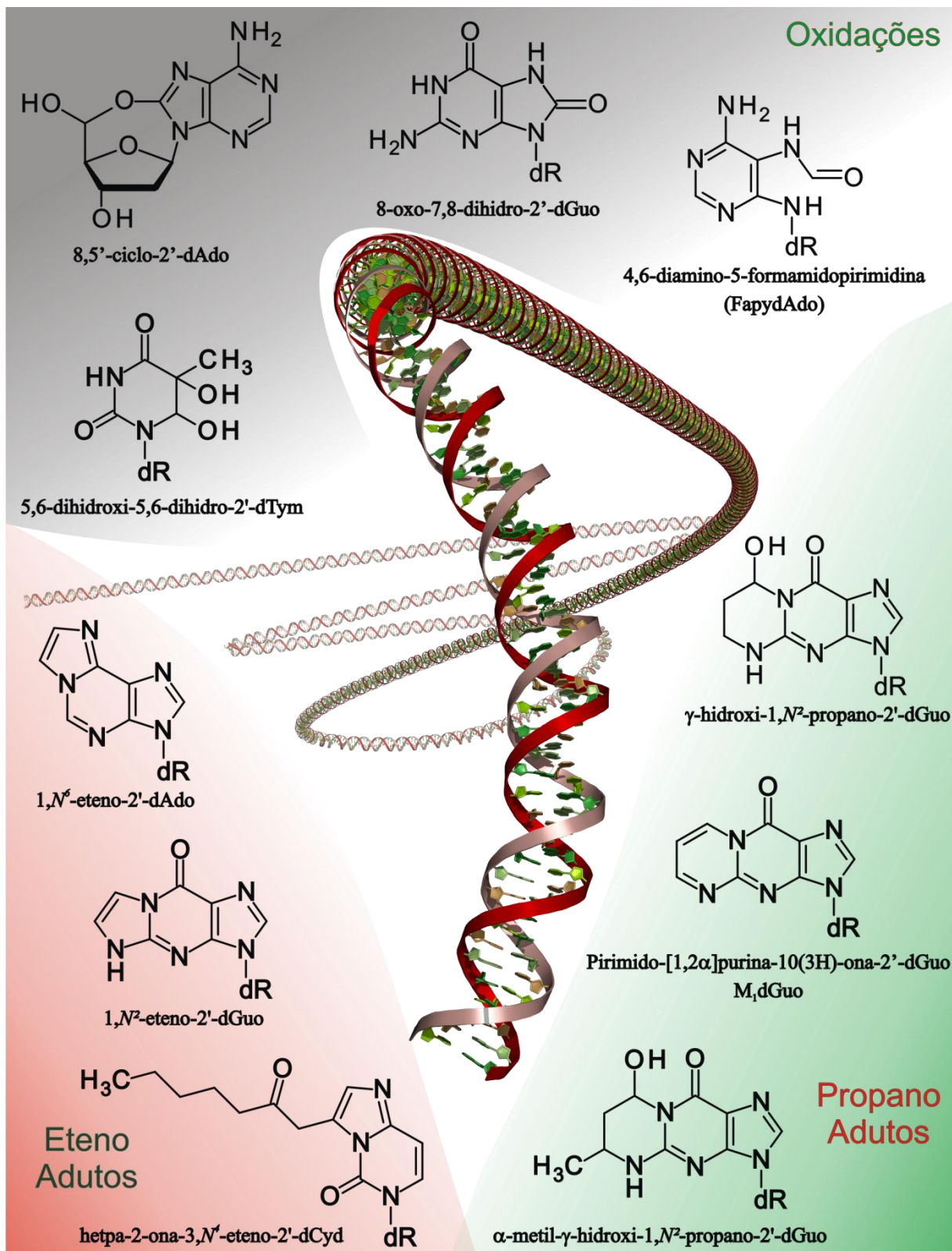


Figura 4 – Exemplos de lesões ao DNA formados por oxidações de bases nitrogenadas, ou pela reação de dGuo, dAdo e dCyd e alguns produtos de peroxidação lipídica (Adaptado de Medeiros, 2009).

Os níveis reportados de 8-oxodGuo são diretamente dependentes do método de análise utilizado, sendo descrito entre algumas lesões por 10^7 a 10^9 desoxiguanosinas não modificadas (Ravanat et al., 2002; Cadet e Poulsen, 2010). Essas diferenças de valores são decorrentes da metodologia utilizada e de oxidação artefactual de nucleosídeos durante a extração e hidrólise do DNA (Cadet et al., 2012). Por isso, isolar o núcleo em presença de antioxidantes e quelantes de ferro durante a extração é passo fundamental para evitar artefatos (Ravanat et al., 2002). Atualmente algumas poucas lesões por 10^6 nucleosídeos não modificados são consideradas o nível basal destas lesões medidas por métodos de HPLC com detecção eletroquímica ou acoplados a espectrometria de massas, os mais acurados na quantificação de bases oxidadas até o momento (Cadet, Douki e Ravanat, 2011).

Não obstante a importância das oxidações, adutos exocíclicos estão sendo bastante utilizados recentemente como ferramenta para estudar doenças associadas ao estresse redox, a exemplo das doenças neurodegenerativas, e para determinação de etiologia e risco de câncer (revisado por Medeiros, 2009). Modificações do DNA por agentes endógenos formam, em geral, propanos tricíclicos e eteno adutos, extensivamente estudados nos últimos anos.

1.2.2.1. Adutos exocíclicos de DNA

O crescente interesse nos adutos exocíclicos de DNA teve início com a verificação de que são induzidos por conhecidos carcinógenos ocupacionais e

ambientais, tais como cloreto de vinila e carbamato de etila (uretano) (Bartsch et al., 1994). Produtos de alquilação e adição nucleofílica, propanos cíclicos substituídos são formados pela reação de 2'-desoxiguanosina (dGuo) com aldeídos α,β -insaturados, como HNE, ACR e CRT, enquanto etenos decorrem de aldeídos epoxidados (Blair, 2008; Medeiros, 2009).

Descritos pela primeira vez por Kochetko (Kochetko, Shibaev e Kost, 1971), eteno adutos têm sido caracterizados, analisados e quantificados desde então. A quantificação basal de 1, N^6 -eteno-2'-desoxiadenosina (1, N^6 - ϵ dAdo, Figura 4), 3, N^4 -eteno-2'-desoxicitidina (3, N^4 - ϵ dCyd), N^2 ,3-eteno-2'-desoxiguanosina (N^2 ,3- ϵ dGuo) e 1, N^2 -eteno-2'-desoxiguanosina (1, N^2 - ϵ dGuo, Figura 4) em humanos não expostos a carcinógeno e, de igual modo, níveis aumentados em situações fisiopatológicas vêm sendo relatados desde então (Blair, 2008; Medeiros, 2009; Voulgaridou et al., 2011; Winczura, Zdzalik e Tudek, 2012).

A perda de homeostase em situações fisiopatológicas leva ao aumento de peroxidação lipídica e, por conseguinte, de adutos. Em decorrência, para caracterização estrutural de eteno adutos empregou-se a reação entre produtos de decomposição de peróxidos lipídicos e bases nitrogenadas, quer livres, quer no DNA intacto. Nosso grupo caracterizou e demonstrou a formação de eteno adutos a partir de aldeídos de peroxidação lipídica (Carvalho et al., 1998; Carvalho et al., 2000; Loureiro et al., 2000; Loureiro et al., 2004). Embora a via de formação de eteno adutos *in vivo* ainda não esteja completamente esclarecida (Winczura, Zdzalik e Tudek, 2012), a Figura 5 mostra um dos mecanismos de formação propostos.

Eteno adutos são atualmente considerados pro-mutagênicos, sendo bem estabelecida a indução, por eteno bases, de substituições de pares de bases. Em eucariotos, a presença de 1, N^6 - ϵ dAdo no DNA promove transversões AT \rightarrow CG e AT

→ TA e transições AT → GC cujas frequências dependem da localização na fita senso ou antissenso (Pandya e Moriya, 1996; Levine et al., 2000). Estudos com 3,*N*⁴-εdCyd, por sua vez, indicam indução de transições CG → TA e transversões CG → AT catalisadas pela polimerase α (Palejwala et al., 1993; Moriya et al., 1994). O 1,*N*²-εdGuo leva a deleções de um ou dois nucleotídeos, transversões GC → TA e GC → CG, ademais, a transições GC → AT igualmente induzida por *N*²,3-εdGuo (Cheng et al., 1991; Langouet, Muller e Guengerich, 1997; Langouet et al., 1998).

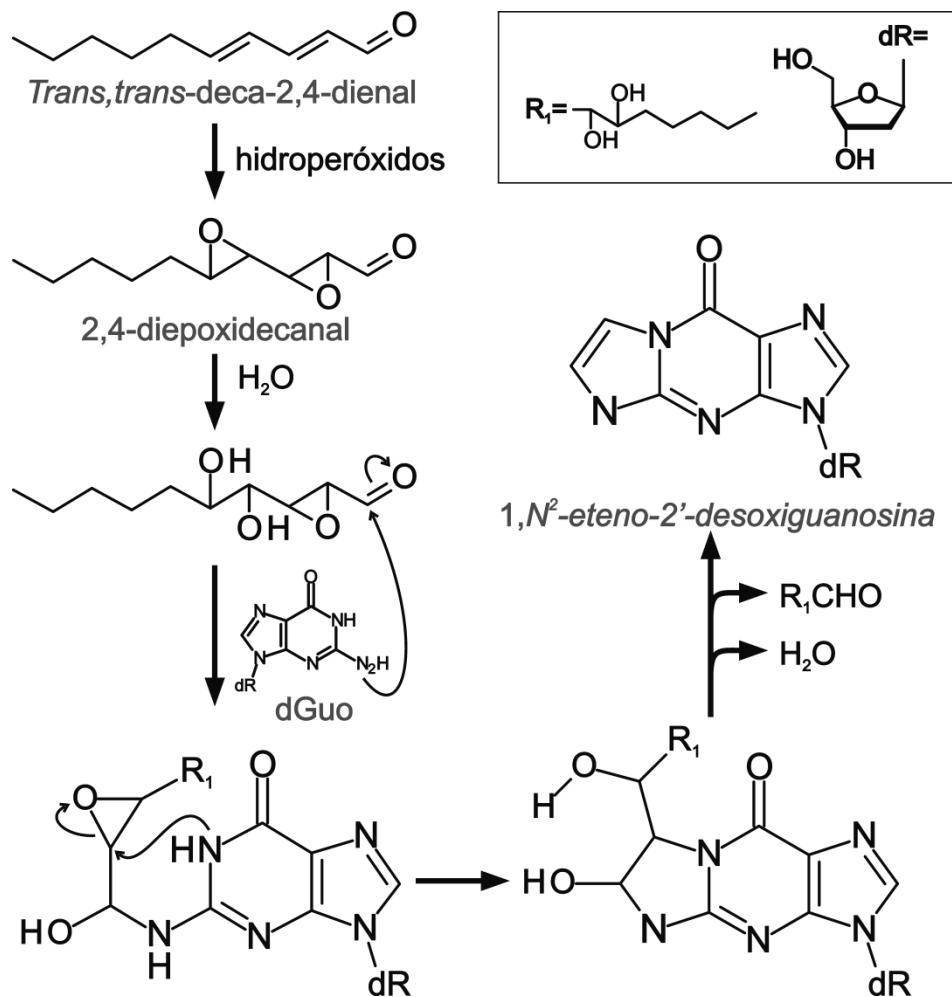


Figura 5 – Mecanismo de formação de 1,*N*²-eno-2'-desoxiguanosina a partir de reação de *trans,trans*-deca-2,4-dienal com dGuo (adaptado de Loureiro et al., 2000).

Outrossim, a mutagênese promovida por propano adutos é conhecida, principalmente para lesões decorrentes de alquilação de dGuo por MDA, CRT e ACR. Pirimido-[1,2 α]purina-10(3H)-ona-2'-desoxiguanosina (M₁dGuo, Figura 4) induz transversões GC \rightarrow TA e transições GC \rightarrow AT com a mesma frequência que o faz a 8-oxodGuo, além de *frame-shifts* (Maddukuri et al., 2010). Os mesmos tipos de transversões e transições são causadas pelos adutos 1,N²-(α -hidroxi)propano-2'-desoxiguanosina (1,N²- α -OH-propanodGuo) e 1,N²-(γ -hidroxi)propano-2'-desoxiguanosina (1,N²- γ -OH-propanodGuo, Figura 4) (Yang et al., 2002; Wang, H.-T. et al., 2009). Embora capaz de induzir transições e transversões, os isômeros R (6R, 8R) e S (6R, 8S) de 1,N²- α -metil- γ -hidroxipropano-2'-desoxiguanosina (1,N²-propanodGuo, Figura 4) induzem majoritariamente transversões GC \rightarrow TA, sendo o S potencialmente mais mutagênico (Fernandes et al., 2005; Stein et al., 2006).

Ademais, propanos exocíclicos no DNA ficam em equilíbrio entre a forma cíclica e de cadeia aberta, que lhes conferem características diferentes. Quando em dupla fita, a forma aberta é favorecida para M₁dGuo (Riggins et al., 2004), 1,N²- γ -OH-propanodGuo (De Los Santos, Zaliznyak e Johnson, 2001) e 1,N²-propanodGuo (Cho et al., 2006). A forma fechada interfere no pareamento de bases, possibilitando mutações. Na conformação aberta, o aduto apresenta uma carbonila aldeídica livre. A formação de base de Schiff entre este grupo reativo e aminas de ácidos nucleicos e aminoácidos cria ligações cruzadas interfitas e intrafitas do DNA ou DNA-proteínas/peptídeos (De Los Santos, Zaliznyak e Johnson, 2001; Cho et al., 2006; Stein et al., 2006; Stone et al., 2008; Huang, H. et al., 2011; Winczura, Zdzalik e Tudek, 2012).

Assim como etenos, concentrações basais de propano adutos foram descritas em condições fisiopatológicas e em indivíduos sadios, expostos a

determinados fatores (e.g. fumo e ingestão de óleo de girassol) ou não. De alguns até 300 adutos por 10^8 dGuo foram relatados em vários tipos de tecidos e fluidos biológicos utilizando diferentes metodologias (Nair, Bartsch e Nair, 2007).

Os mecanismos de formação de propano adutos são mais compreendidos do que os que envolvem a formação de eteno bases (Cadet, Douki e Ravanat, 2010). Havia, contudo, grande debate sobre a formação de 1, N^2 -propanodGuo a partir de adição direta de duas moléculas de acetaldeído (AA), como proposto por Wang (Wang et al., 2000). Não existiam dados que comprovassem a adição de duas moléculas de AA para formar este aduto, havendo possibilidade de o AA induzir peroxidação lipídica gerando CRT – clássico indutor desta lesão (Figura 6). Em 2011, nosso grupo demonstrou inequivocamente utilizando AA isotopicamente marcado a formação de 1, N^2 -propanodGuo por adição direta de duas moléculas de AA (Garcia et al., 2011).

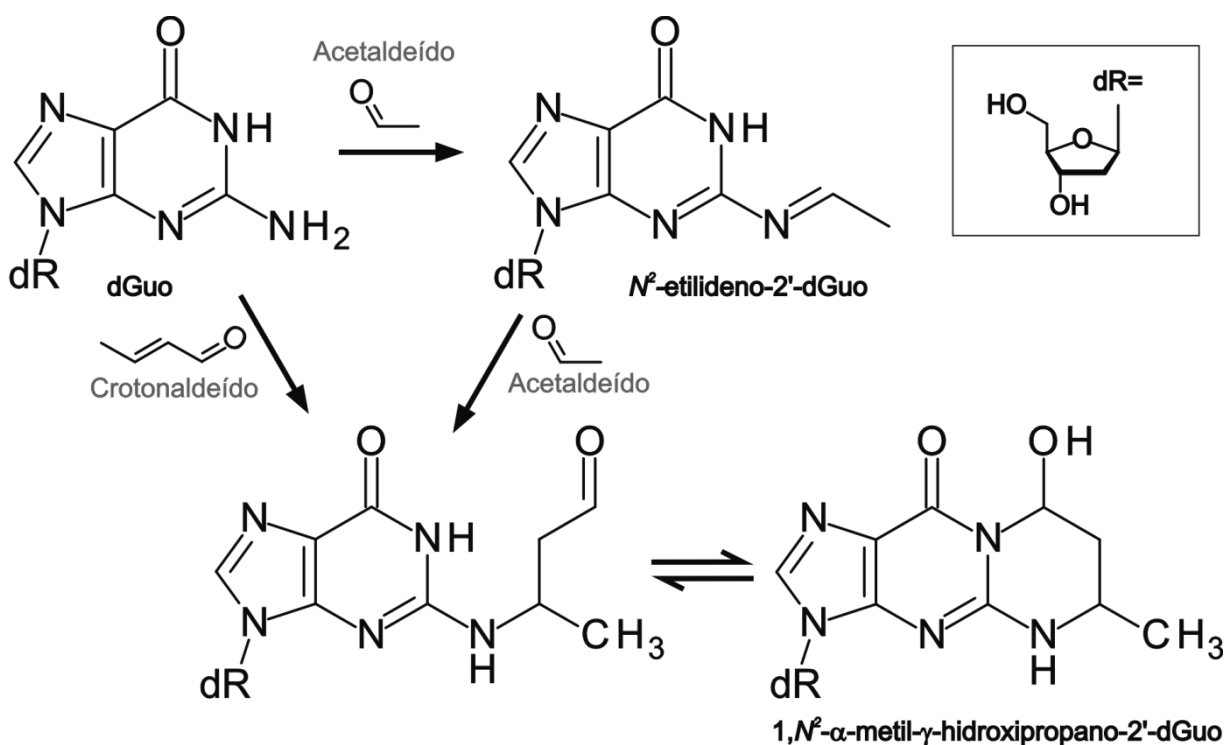


Figura 6 – Formação de 1, N^2 -propano-2'-desoxiguanosina (adaptado de Wang et al., 2000; Garcia et al., 2011). 2'-dGuo – 2'-desoxiguanosina.

1.3. Mecanismo de detoxificação e defesa de biomoléculas

As lesões em biomoléculas precisam ser eliminadas para evitar extensas lesões que prejudiquem o funcionamento celular. Para auxiliar os sistemas antioxidantes a conter lesões, existem sistemas auxiliares que evitam danos ou “processam” biomoléculas lesionadas. Estes sistemas de apoio compreendem desde mecanismos de detoxificação de fase I e II até degradação e reparo de biomoléculas. Aldeídos, por exemplo, são rapidamente metabolizados a espécies menos tóxicas e excretados na urina. Por sua vez, os danos ao DNA são reparados para garantir a integridade genômica (Dizdaroglu, 2012).

1.3.1. Detoxificação de aldeídos

Os aldeídos, endógenos e exógenos, são metabolizados a produtos menos tóxicos por mecanismos de oxidação/redução (fase I) e por conjugação (fase II) (Figura 7). Glutathione S-transferase (GST), aldeído desidrogenase (ALDH), aldo-ceto redutase (AKR), citocromo P450, álcool desidrogenase são enzimas diretamente envolvidas na detoxificação de aldeídos (Ellis, 2007). Apesar da importância relativa de cada uma das vias envolvidas ainda não ser compreendida, observa-se estreita relação destas com os grupos funcionais de cada classe de aldeído (insaturações, hidroxilas, etc.).

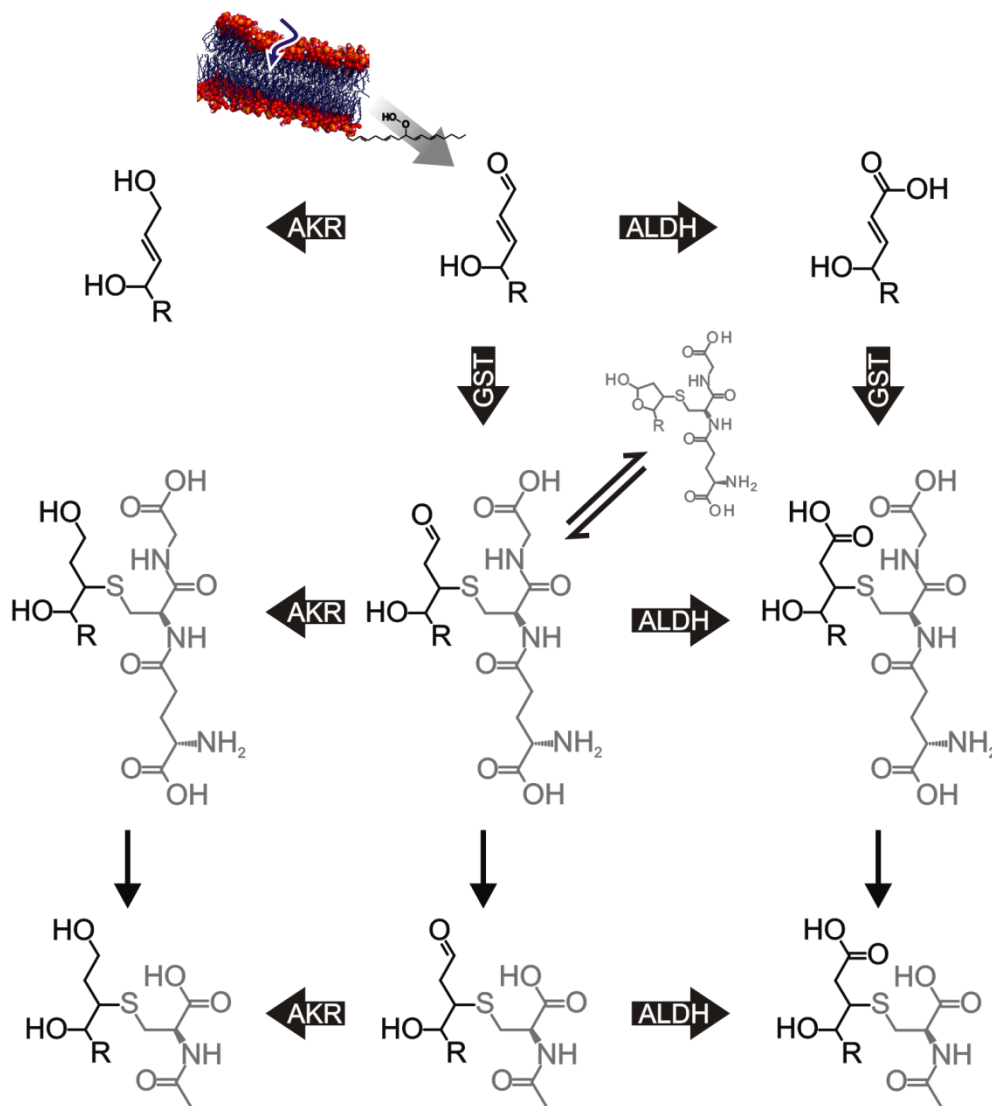


Figura 7 – Detoxificação de aldeídos, envolvendo reduções catalisadas por aldo-ceto redutase (AKR), oxidações catalisadas por aldeído desidrogenase (ALDH), conjugação catalisada por glutatona S-transferase (GST) e conversão a derivados mercaptúricos (adaptado de Kuiper et al., 2008).

A modificação da carbonila aldeídica é a via de detoxificação mais simples. ALDH e citocromo P450 oxidam aldeído ao correspondente ácido carboxílico. No caso do MDA, a ALDH é responsável por oxidá-lo a gás carbônico e água (Siu e Draper, 1982). AKR promove a redução ao álcool correspondente. Oxidação/redução são os mecanismos primordiais de alcanais sem grupos funcionais secundários.

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. A glutationilação é um processo espontâneo que ocorre de 300 a 600 vezes mais rápido quando catalisada pela GST (Esterbauer, Schaur e Zollner, 1991).

GSTs são enzimas citosólicas, mitocondriais e microsossomais, cuja principal função é conjugar GSH com compostos eletrofílicos (Oakley, 2011). Essa proteína ubíqua (Esterbauer, Schaur e Zollner, 1991) corresponde a 5% das proteínas solúveis do fígado (Eaton e Bammler, 1999), onde se dá maior parte da conjugação dos aldeídos.

Por ser reversível, a conjugação pode funcionar como “carreador” de aldeídos (Gueraud et al., 2010). Mesmo glutationilados estes aldeídos sofrem redução ou oxidação (Xie et al., 2013), suprimindo a reação reversa. Assim como outros conjugados de GSH, esses adutos são transportados ativamente por proteínas de emergente interesse clínico (Awasthi et al., 2009; Hillgren et al., 2013). Assim atingem a corrente sanguínea e são transportados até os rins, onde são metabolizados a derivados mercaptúricos – conjugados de N-acetilcisteína - e excretados na urina.

1.3.2. Reparo de DNA

Dada a grande quantidade de lesões a qual o DNA está sujeito diariamente, é necessário metabolizá-las para manter a estabilidade genômica. Atualmente são

conhecidas pelo menos seis vias metabólicas que reparam e/ou aumentam a tolerância às lesões ao DNA (Figura 8). Distorções na dupla hélice, modificações ou ausência de bases, pareamentos errôneos, e quebras na fita e ligações cruzadas são reconhecidos por estas vias, antes ou durante processos de replicação e transcrição. Contudo, se não reparada a lesão pode bloquear a replicação do DNA ou ser tolerada e o DNA replicado por uma DNA polimerase translesão. A falha de vias de reparo pode levar a mutagênese, citotoxicidade e morte celular.

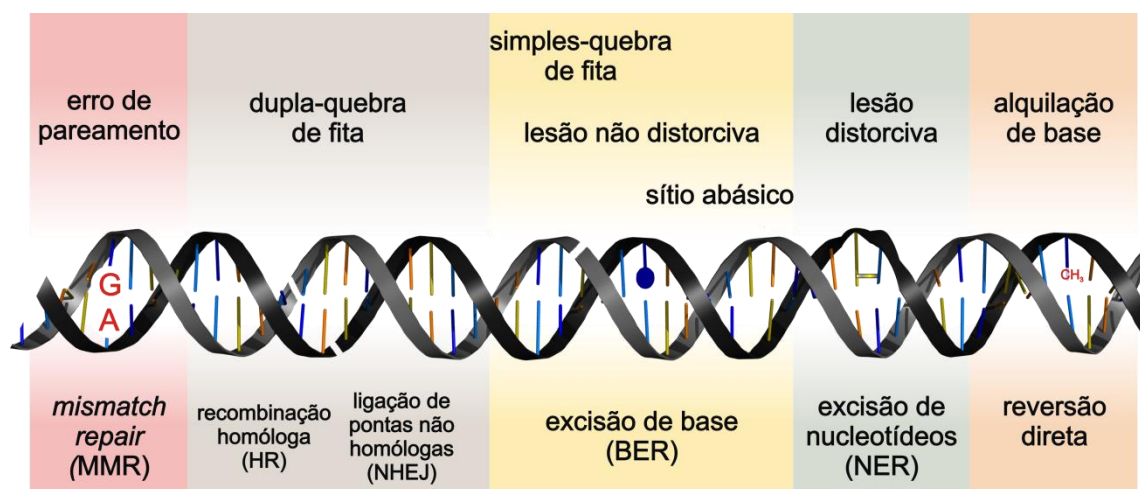


Figura 8 – Vias metabólicas que garantem a estabilidade genômica (adaptado de Lord e Ashworth, 2012).

As lesões induzidas por oxidação são reparadas principalmente por duas vias, a de excisão da base nitrogenada (BER – do inglês *base excision repair*) ou a de excisão do nucleotídeo (NER – do inglês *nucleotide excision repair*) (Berra et al., 2013). O BER convencional é iniciado pela remoção da base modificada por uma DNA glicosilase específica. O sítio abásico formado é então cortado por uma enzima endonuclease ou liase, e as extremidades 5' e 3' formadas são processadas por liases e fosfodiesterases, respectivamente. O espaço é preenchido por uma DNA polimerase e a fita religada por uma DNA ligase (Blair; Berquist e Wilson, 2012).

Assim como a 8-oxoguanina-DNA-glicosilase (OGG1) pode remover 8-oxodGuo (Radicella et al., 1997), o reparo de eteno bases pode ser mediado por

ação de glicosilases. O aduto $1,N^6$ - ϵ dAdo é substrato para a enzima alquilpurina-DNA-*N*-glicosilase (APNG), que também efetua o reparo de 3-metiladenina (Dosanjh et al., 1994). O reparo de $1,N^2$ - ϵ dGuo foi demonstrado ser específico de APNG e uracila-DNA-glicosilase (UDG) (Singer e Hang, 1999). Apesar de eteno adutos serem bons substratos para glicosilases, é possível o envolvimento de outras vias no reparo destes adutos.

Quando a lesão distorce a estrutura da dupla hélice, como os propano adutos, o reparo se dá preferencialmente por NER. Esta via divide-se em reparo do genoma global (GGR – do inglês *global genome repair*) ou reparo acoplado à transcrição (TCR – do inglês *transcription-coupled repair*) de acordo com mecanismo inicial de reconhecimento da lesão. No GGR, proteínas específicas (XPE e XPC) “varrem” o DNA genômico em busca de distorções. Caso a lesão bloqueie RNA polimerases, proteínas sinalizadoras (CSA e CSB) reconhecem este evento e sinalizam para o TCR. Nos dois casos, depois de reconhecida a lesão, complexos proteicos são recrutados para abrir a dupla fita de DNA e excisar o oligonucleotídeo contendo a lesão, permitindo a ressíntese do DNA (Cleaver, Lam e Revet, 2009; Hoeijmakers, 2009).

A despeito de BER e NER, o DNA pode ser replicado antes que a lesão seja corrigida. Neste caso, polimerases replicativas podem adicionar opostamente à lesão o nucleotídeo correto (replicação frutífera) ou errado. Ou ainda serem bloqueadas levando ora ao colapso da forquilha de replicação, ora à substituição por uma polimerase de translesão. Estas polimerases podem, igualmente, sintetizar a fita com o nucleotídeo correto ou com um pareamento errôneo (revisado por Berquist e Wilson, 2012).

Quando ocorre pareamento errôneo de bases no processo de replicação, a via de *mismatch repair* (MMR) reconhece e remove a base mal pareada da fita recém-sintetizada. De outra forma, a mutação pode ser fixada em um ciclo replicativo posterior. Se o erro de pareamento for causado por lesão na fita molde, o MMR corrige o erro na nova fita, permanecendo a lesão. Assim, o MMR permite mais tempo para a fita molde ser corrigida por via adequada. Caso contrário pode ocorrer outro ciclo replicativo – correto ou errôneo (Modrich, 2006; Fukui, 2010).

Oxidações e outros mecanismos podem promover quebras na fita de DNA. Quebras de apenas uma das fitas são reparadas via BER. Quando ocorrem quebras duplas, duas outras vias distintas são envolvidas. As pontas livres podem ser religadas diretamente, sendo passíveis de processamento e alteração do material genético, denominado reparo por ligação de pontas não homólogas (NHEJ – do inglês *non homologous end join*). Outra via requer regiões homólogas que sirvam de molde para o reparo, denominado de reparo por recombinação homóloga (HRR – do inglês *homologous recombination repair*). O reparo por estas duas vias são diferentemente reguladas ao longo do ciclo celular, especialmente pela existência ou não de molde homólogo nas fases de ciclo celular (Kass e Jasin, 2010).

Por convenção, as diferentes vias de reparo são divididas por mecanismos próprios e distintos. Atualmente, entretanto, sabe-se que estas vias trabalham em conjunto e em muitos casos se sobrepõem. A exemplo do reparo de ligações cruzadas interfitas, que podem ser formadas por propano adutos, pela via de Anemia de Fanconi, onde proteínas de NER e HRR estão associadas. Esta via é assim denominada devido à síndrome associada ao mau funcionamento desta via, discutida posteriormente.

1.4. Biomarcadores e estresse redox

Embora há muito tempo utilizados, os biomarcadores ganharam destaque com os recentes avanços científicos, que alteraram a concepção de saúde humana e os processos de cuidados de saúde. Biomarcadores, característica objetivamente mensurável de um indivíduo ou organismo que indique processos biológicos normais ou patogênicos ou sirva como indicador de resposta a alguma intervenção (Atkinson et al., 2001), adquirem agora alto grau de inovação, sofisticação e tecnologia.

Em 2004, frente ao declínio na descoberta de novas drogas o *US Food and Drug Administration* (FDA) publicou uma série de propostas – “Innovation or Stagnation: Challenge and Opportunity on the Critical Path to New Medical Products” (FDA, 2004) – para auxiliar na transposição dos avanços científicos para o desenvolvimento, avaliação e produção de produtos médicos. Neste documento, integrar biomarcadores no desenvolvimento de novas drogas é colocado como uma peça chave. Com este intuito, o FDA e agências de regulamentação de diversos países criaram parcerias público-privadas para partilhar dados e conhecimentos sobre biomarcadores e discutir a aplicação destes em ensaios pré-clínicos e clínicos (Goodsaid e Papaluca, 2010).

Em 2010, o FDA e o *National Institutes of Health* (NIH) iniciaram colaboração para incentivar a pesquisa translacional. Objetiva-se o desenvolvimento e o uso de novas ferramentas, padrões e abordagens para fins regulatórios. Emerge então a necessidade de estabelecer biomarcadores sensíveis e específicos que associados

à tecnologia propiciem intervenções terapêuticas precoces, seguras e eficazes (Woosley, 2013).

A participação de diferentes espécies reativas em diversas doenças e o melhor entendimento dos papéis que exercem deixam biomarcadores redox em situação estratégica. Contudo, a validação de biomarcadores redox é essencial para que sejam clinicamente úteis e possam ser incorporados no desenvolvimento de fármacos. Etapas de validação analítica e, em especial, a avaliação em modelos redox são fundamentais. Se bem conduzida, a análise de lesões oriundas de estresse redox propicia traçar um panorama do estado de saúde de um indivíduo.

1.5. Modelos de estresse redox

1.5.1. Poluição atmosférica

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 carcinógena para humanos (IARC grupo 1) baseado em evidências em humanos, em animais experimentais e mecanísticas propostas *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, 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 propano adutos 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). PM é constituído de inúmeros compostos – incluindo ácidos, 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, Spinosa De Martinis e col. analisaram a genotoxicidade de extratos orgânicos de PM coletado do ar de SP, verificando ser mais mutagênica a fração rica em cetonas, aldeídos e ácidos carboxílicos (Spinosa De Martinis et al., 1999).

Os mais de 7,5 milhões de veículos de SP (DETRAN-SP, 2013) conferem à cidade uma composição atmosférica peculiar comparada a outras megalópoles. A queima de combustíveis fósseis e etanol geram CRT e AA, entre outros poluentes (IARC, 1995; IARC, 1999). Sendo aldeídos clássicos indutores de adutos, é esperado que lesões ao DNA mediem a mutagenicidade observada por Spinosa De Martinis.

1.5.2. Esclerose Lateral Amiotrófica

Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA), doença motora neurodegenerativa, foi descrita há quase 150 anos pelo médico francês Jean Martin Charcot (Charcot e Joffroy, 1869). No Brasil o primeiro relato foi feito pelo Dr. Cypriano de Souza Freitas, em 1909 (Quadros, 2006). Atualmente, ELA é classificada pela Organização Mundial de Saúde como doença de neurônio motor - G12.2.

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). ELA acomete mais os homens (1,6 vezes), surgindo entre 50 e 70 anos – com pico aos 60 anos –, e 2 – 5 anos de expectativa de sobrevida (Kiernan et al., 2011; Krueger et al., 2013).

Os dados epidemiológicos no Brasil são escassos e questionáveis (Fga, Lima e Alvarenga, 2009). As características epidemiológicas brasileiras assemelham-se às mundiais, com destaque à precoce incidência, em média aos 52 anos (Dietrich-Neto et al., 2000).

Caracterizada por endurecimento (esclerose) do corno anterior da medula espinal e atrofia neurogênica (amiotrofia), ELA é um processo degenerativo progressivo do sistema motor em níveis bulbar, cervical, torácico e lombar. Os primeiros sintomas são, em geral, percebidos ao realizar simples tarefas como pentear os cabelos e vestir roupas. Os pacientes apresentam fraqueza e atrofia, fasciculação e câimbra muscular, espasticidade, disartria, dispneia e labilidade emocional (Mitchell e Borasio, 2007; Krueger et al., 2013). Todavia, a sensibilidade e

a capacidade cognitiva não são afetadas. Em alguns casos, alteração na sensibilidade pode estar presente como sintoma secundário (Brooks et al., 2000).

Até o momento, o diagnóstico é fundamentado em anamnese e exame físico do paciente, auxiliado por exames complementares, de acordo com os critérios de “El Escorial” (Brooks et al., 2000) e “Awaji” (De Carvalho et al., 2008). Em 2009, o Ministério da Saúde brasileiro estabeleceu protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para ELA por meio da portaria SAS/MS nº 496 (BRASIL, 2009), em acordo com os critérios internacionais.

A correta identificação de ELA nos estágios iniciais é rara. Nesta fase, os sinais de disfunção dos neurônios motores são mínimos. Os sinais sutis, a falta de conhecimento e experiência médica, dentre outros motivos, propiciam erros de diagnóstico. Nesse contexto, o diagnóstico correto ocorre, em média, 12 meses após o aparecimento dos primeiros sinais e sintomas (Cristini, 2006; Ekegren, Hanrieder e Bergquist, 2008; Krueger et al., 2013). O diagnóstico diferencial – avaliando desde doenças motoras, passando pelas inflamatórias, infecciosas, tóxicas e metabólicas, até diferentes doenças degenerativas do sistema nervoso central – é procedimento essencial na avaliação médica (Kiernan et al., 2011).

Até a presente data não existe tratamento efetivo. Os protocolos terapêuticos preconizam tratamentos farmacológicos para aliviar os sintomas, e suporte respiratório e nutricional em estágios avançados. O único medicamento aprovado para tratamento pelo FDA e demais órgãos reguladores é o riluzol (6-(trifluorometoxi)benzotiazol-2-amina), que aumenta a sobrevida em aproximadamente 3 meses (Lacomblez et al., 1996; De Groot et al., 2007; Miller, Mitchell e Moore, 2012). Dentre os diversos efeitos que possui, a inibição de

liberação de glutamato e de receptores glutamatérgicos do tipo AMPA (Cheah et al., 2010; Bellingham, 2011) parecem ser o mecanismo de ação.

Outras terapias testadas experimentalmente (Ferrante et al., 2001; Wu et al., 2003; Crow et al., 2005) não têm sido eficientes em pacientes (Contestabile, 2011; Zinman e Cudkowicz, 2011; Gibson e Bromberg, 2012). A falta de biomarcadores de diagnóstico e prognóstico são barreiras a serem sobrepostas para que se possa fazer melhores estudos clínicos para terapias de ELA.

ELA resulta de mecanismos complexos envolvendo estresse oxidativo, excitotoxicidade por glutamato, disfunção e agregação proteica, peroxidação lipídica e esterificação de colesterol, disfunção mitocondrial, problemas de transporte axonal, autofagia, apoptose e fatores genéticos (Okado-Matsumoto e Fridovich, 2002; Cozzolino, Ferri e Carri, 2008; Van Der Graaff et al., 2009; Barber e Shaw, 2010; Parakh et al., 2013). 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).

De acordo com o quadro clínico, a ELA pode ser classificada em oito fenótipos: clássico (1), bulbar (2), diplegia braquial (3), variante pseudopolineurítica (4), piramidal (5), respiratório (6), puro de neurônios motores inferiores (7) ou superiores (8) (Chio et al., 2011). Quanto ao genótipo, não se conhece componente hereditário na maioria dos casos, classificados como esporádicos. Somente em menos de 10% dos casos existe relação genética, sendo denominada de ELA familiar (ELAf) (Boillee, Vande Velde e Cleveland, 2006; Belzil e Rouleau, 2012).

1.5.2.1. Cu,Zn-Superóxido dismutase

Estudos genéticos em pacientes de ELA, na maioria com ELAf, descrevem mutações em genes de proteínas com funções diversas, como regulação transcricional (FUS e TDP-43), angiogênese (VGFE) e diferenciação neuronal (ANG) (Tabela 1). A maioria é autossômica dominante, havendo autossômicas recessivas e ligada ao sexo.

Uma mutação no gene que codifica a enzima SOD1 foi a primeira a ser descrita (Rosen et al., 1993). Atualmente foram descritos mais de 160 mutações nos 153 códons do gene *SOD1*. A maioria são mutações *missense*, sendo raras as deleções e as mutações silenciosas. As modificações ocorrem ao longo de toda a estrutura primária da proteína, podendo interferir, minoria dos casos, ou não na atividade de dismutase. A maior parte leva à morte neuronal motora.

A hipótese inicial era de que a perda de atividade enzimática estivesse relacionada com ELA, mas logo foi demonstrado que animais sem SOD1 não apresentam doença de neurônio motor (Reaume et al., 1996). Entretanto, animais que expressam SOD1 humana modificada em presença da SOD1 endógena apresentam sinais semelhantes aos de pacientes humanos. O mesmo não ocorre com a forma “selvagem” da SOD1 humana (Gurney et al., 1994). Atualmente, propõe-se ganho de função tóxica das enzimas modificadas.

Além da atividade “clássica” de dismutação, o sítio ativo da SOD1 pode interagir diretamente com o H_2O_2 , gerando um forte oxidante. Hodgson e Fridovich (Hodgson e Fridovich, 1975) inicialmente propuseram a formação de um radical HO^\bullet

Tabela 1 – Proteínas afetadas e genes mutados em ELA

'Tipo de ELA	Proteína afetada (GENE mutado)	Aparecimento sintomas [média] (anos)	Herança	Ano (referência)
ELA 1	Cu,Zn-Superóxido Dismutase (SOD1)	13 – 19 [47]	AD, AR ou DN	(Rosen et al., 1993)
-	Heavy neurofilament subunit (NEFH)	46 – 73 [60]	AD	(Tomkins et al., 1998; Al-Chalabi et al., 1999)
ELA 2	Alsina (ALS2)	1 – 3 [1]	AR	(Hadano et al., 2001)
Doença de neurônio motor inferior	Dinactina I (DCTN1)	48 – 64 [55]	-	(Puls et al., 2003)
-	Periferina (PRPH)	-	-	(Gros-Louis et al., 2004; Leung et al., 2004)
ELA 4	Senataxina (SETX)	1 – 73 [18]	AD	(Chen et al., 2004)
ELA 8	Proteína B associada à VAMP (VAPB)	18 – 73 [44]	AD	(Nishimura et al., 2004)
-	Charged multivesicular body protein (CHMP2)	-	AD	(Parkinson et al., 2006)
ELA 9	Angiogenina (ANG)	21 – 83 [55]	AD	(Greenway et al., 2006)
ELA 10	TAR- DNA binding protein (TARDBP)	30 -77 [55]	AD ou AR	(Gitcho et al., 2008; Kabashi et al., 2008; Sreedharan et al., 2008)
ELA 11	PI(3,5)P(2)5-phosphatase (FIG4)	29 – 77 [55]	AD	(Chow et al., 2009)
ELA 6	Fused in sacroma (FUS)	13 – 80 [46]	AD, AR ou DN	(Kwiatkowski et al., 2009; Vance et al., 2009)
ELA 12	Optineurina (OPTN)	24 – 83 [51]	AD ou AR	(Maruyama et al., 2010)
-	Ataxina (ATXN2)	21 – 87 [57]	AD	(Elden et al., 2010)
-	D-aminoácido oxidase (DAO)	42 – 55 [44]	-	(Mitchell et al., 2010)
ELA 5	Spatacsin (SPG11)	7 – 23 [16]	AR	(Orlacchio et al., 2010)
-	Valosin containing protein (VCP)	37 – 53 [49]	AD	(Johnson et al., 2010)
-	(C9orf72)	27 – 80 [56,8]	AD	2011 (Dejesus-Hernandez et al., 2011; Renton et al., 2011)
-	Receptor sigma 1 (SIGMAR1)	1 [1]	AD	(Al-Saif, Al-Mohanna e Bohlega, 2011)
-	(TAF15)	45 – 55 [50]	AD ou AR	(Ticozzi et al., 2011)
-	Ubiquilin 2 (UBQLN2)	16 – 71 [41]	DS	(Deng et al., 2011)

Herança: AD - Autossômica dominante, AR - Autossômica recessiva, DN - De Novo, DS - Dominante ligada ao sexo. (modificado de Al -Chalabi et al., 2012).

ligado ao íon Cu^{+2} , o qual atacaria um resíduo de histidina do sítio ativo, desencadeando o processo de inativação da enzima.

Foi demonstrado também que através da formação do complexo Cu^{+} -batocuproína dissulfonato que a oxidação da histidina causava a liberação do cobre na forma de Cu(I) (Jewett et al., 1999). A reação de Fenton entre H_2O_2 e Cu^{+} também poderia estar envolvida na atividade pró-oxidante. Posteriormente, foi demonstrado que o sistema $\text{SOD1/H}_2\text{O}_2$ oxida HCO_3^- formando $\text{CO}_3^{\bullet-}$ (Zhang et al., 2003) e NO_2^- formando $^{\bullet}\text{NO}_2$ (Singh et al., 1998; Augusto et al., 2002). Portanto, moléculas pequenas como o HCO_3^- poderiam atingir o sítio ativo da SOD1 e sofrer oxidação para $\text{CO}_3^{\bullet-}$, um oxidante que pode se difundir e oxidar diversos substratos em solução. Existe a proposta de que o peroxicarbonato (HCO_4^-) é o oxidante difusível produzido pelo sistema $\text{SOD1/H}_2\text{O}_2$ na presença de HCO_3^- (Elam et al., 2003; Medinas et al., 2007).

Todas essas propostas mecanísticas são recentes e baseadas em estudos com poucos substratos. Entretanto, têm importância direta na compreensão da oxidação de substratos biológicos mediada pela SOD1 e na compreensão dos mecanismos de ganho de “atividade tóxica” mediados pelas SOD1 mutantes relacionadas à ELAf.

Dados do nosso laboratório (Barbosa et al., 2009) indicam que a molécula de DNA, *in vitro*, é oxidada pelo sistema $\text{SOD1/H}_2\text{O}_2$ e $\text{SOD1/H}_2\text{O}_2/\text{HCO}_3^-$ gerando 8-oxodGuo e eteno adutos de DNA. É importante ressaltar que níveis aumentados de 8-oxodGuo, proteínas e lipídios oxidados foram observados em pacientes com ELA (Shaw et al., 1995; Beal et al., 1997; Ferrante et al., 1997; Lee et al., 2001), entretanto, os mecanismos de produção destas lesões ainda não estão esclarecidos.

Em 2009, uma mutação recessiva no gene *Sod1* canino foi associada à mielopatia degenerativa canina (Awano et al., 2009), desordem medular espinal relacionada a ELA, sendo este o primeiro modelo de ocorrência espontânea.

O uso de camundongos e ratos tem sido de singular importância nos estudos de patogênese de ELA, embora existam diversos modelos *in vitro*, como cultura organotípica (Kosuge et al., 2009) e células tronco pluripotentes induzidas (Dimos et al., 2008; Mitne-Neto et al., 2011), e muitos modelos transgênicos em *C. elegans* (Gidalevitz et al., 2009; Ash et al., 2010), *Drosophila melanogaster* (Feiguin et al., 2009; Estes et al., 2011) e Danio rerio (Lemmens et al., 2007; Kabashi et al., 2010).

Vários trabalhos em camundongos demonstram que superexpressão de SOD1 modificada promove morte neuronal motora e desmielinização axonal em medula levando a paralisia e atrofia muscular (Borchelt et al., 1994; Gurney et al., 1994; Ripps et al., 1995; Wong et al., 1995; Tu et al., 1996; Bruijn et al., 1997; Wang et al., 2003; Jonsson et al., 2006). Mais recentemente, comprovou-se que a forma selvagem da enzima também pode adquirir propriedades tóxicas sob estresse redox (Abou Ezzi, Urushitani e Julien, 2007; Bosco et al., 2010) e exacerbar a doença em camundongos transgênicos expressando SOD1h modificada (Wang, L. et al., 2009). Ratos transgênicos carregando os genes *SOD1h^{G93A}* e *SOD1^{H46R}* reproduzem a maioria das características fenotípicas de pacientes, como perda seletiva de neurônio motor, inclusões hialinas, ubiquitinação e neuroinflamação (Nagai et al., 2001; Howland et al., 2002).

1.5.3. Anemia de Fanconi

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). Clinicamente heterogênea, é caracterizada por malformação congênita, células-tronco deficientes e neoplasias. Estima-se incidência de 1:360.000 nascimentos (Alter e Kupfer, 1993; Crossan e Patel, 2012) e prevalência de 1 a 5 casos por 1.000.000 de pessoas (Taniguchi e D'andrea, 2006). Os pacientes têm expectativa de vida de 30 anos (Bakker, De Winter e Te Riele, 2013), sendo diagnosticados em média aos 6,5 anos de idade em homens e aos 8 anos em mulheres, variando desde o nascimento até os 48 anos (Taniguchi e D'andrea, 2006).

Dezesseis grupos de complementação foram identificados até o momento (Tabela 2), sendo aparentemente diferentes em severidade – FANCC e FANCG considerados severos e FANCA mediano em relação aos demais (Kee e D'andrea, 2012). Contudo, não é possível inferir acuradamente a severidade devido a fatores como pequeno número de pacientes em alguns grupos, graus variados de mutação dos alelos em outros (Cleton-Jansen et al., 1999; Demuth et al., 2000), diferenças de penetrância mesmo entre gêmeos monozigóticos (Mankad et al., 2006), presença de mosaicismo e relação com fontes endógenas ou exógenas (Crossan e Patel, 2012).

As chances aumentadas de malformações congênitas nos pacientes estão relacionadas ao defeito na via de reparo de ligações cruzadas interfitas do DNA – via de AF (Auerbach, 2009). Embora elevadas, a incidência de diversas deformações podem ser subestimadas (Shimamura e Alter, 2010). As mais frequentes são baixa

Tabela 2 – Grupos de Complementação de Anemia de Fanconi

Grupo de Complementação	Sinônimo	Localização no cromossomo	Função Molecular	Referências
<i>FANCA</i>		16q24.3	Complexo principal	(Lotenfoe et al., 1996; Meetei, Sechi, et al., 2003)
<i>FANCB</i>		Xp22.2	Complexo principal	(Meetei et al., 2004)
<i>FANCC</i>		9q22.32	Complexo principal	(Strathdee et al., 1992; Meetei, Sechi, et al., 2003)
<i>FANCD1</i>	<i>BRCA2</i>	13q13.1	Recombinação homóloga	(Howlett et al., 2002; Yang, H. J. et al., 2002)
<i>FANCD2</i>		3p25.3	Substrato do Complexo principal; atividade de exonuclease	(Garcia-Higuera et al., 2001; Pace et al., 2010)
<i>FANCE</i>		6p21.31	Interação com <i>FANCD2</i>	(Pace et al., 2002)
<i>FANCF</i>		11p14.3	Complexo principal	(De Winter et al., 2000)
<i>FANCG</i>		9p13.3	Complexo principal	(Garcia-Higuera et al., 1999)
<i>FANCI</i>		15q26.1	Complexo principal	(Smogorzewska et al., 2007)
<i>FANCI</i>	<i>BRIP1</i>	17q23.2	Resolução de quadrúplex-G	(Bridge et al., 2005)
<i>FANCL</i>		2p16.1	E3 ubiquitina- ligase	(Meetei, De Winter, et al., 2003)
<i>FANCN</i>	<i>PALB2</i>	16p12.2	Recombinação Homóloga	(Xia et al., 2006; Xia et al., 2007)
<i>FANCM</i>		14q21.2	Helicase/translocase	(Mosedale et al., 2005)
<i>FANCO</i>	<i>RAD51C</i>	17q22	Recombinação Homóloga, parólogo de <i>RAD5</i>	(Vaz et al., 2010)
<i>FANCP</i>	<i>SLX4</i>	16p13.3	Resolvase de junção Holliday	(Crossan et al., 2011; Kim et al., 2011; Stoepker et al., 2011)
<i>FANCQ</i>	<i>XPF</i>	16p13.12	Endonuclease	(Bogliolo et al., 2013)

Adaptado de Crossan, 2012 (Crossan e Patel, 2012).

estatura, pigmentação cutânea anormal, anomalias esqueléticas – especialmente polegar e antebraço –, microcefalia, microftalmia, malformações otológicas, renais e

urinárias, defeitos cardíacos, genitais e do sistema nervoso central (Shimamura e Alter, 2010; Kee e D'andrea, 2012). Contudo, aproximadamente 25 – 40% são fisicamente normais (Green e Kupfer, 2009; D'andrea, 2010; Shimamura e Alter, 2010).

A AF afeta células-tronco hematopoiéticas e germinativas. Diminuição da fertilidade, teratospermia e oligospermia, bem como falência ovariana e menopausa precoce são comuns nestes pacientes (Auerbach, 2009; Nabhan et al., 2010). Igualmente, a disfunção de medula óssea acomete, mediana ou severamente, 70 – 90% dos pacientes durante os primeiros 10 anos de idade (Kutler et al., 2003; Taniguchi e D'andrea, 2006). Isto resulta em anemia aplásica, síndrome mielodisplásica, leucemia mieloide aguda e outros distúrbios hematológicos (Kee e D'andrea, 2012). As leucemias – agudas – acometem 9% dos pacientes, em média aos 14 anos (Kutler et al., 2003; Alter et al., 2005; Kee e D'andrea, 2012), sendo a mielóide aguda responsável por 90% dos casos (Rosenberg, Greene e Alter, 2003).

Estes pacientes apresentam também grande predisposição para tumores sólidos, maior problema dos pacientes adultos (Taniguchi e D'andrea, 2006). Estima-se que 40% desenvolverão tumores sólidos até os 40 anos e 76% até os 50 anos (Rosenberg, Greene e Alter, 2003). Carcinomas de células escamosas de cabeça e pescoço, esôfago e região anogenital são os mais comuns (Rosenberg, Alter e Ebell, 2008; D'andrea, 2010).

Aldeídos endógenos são os fatores prováveis de malformações, de distúrbios hematopoiéticos e de predisposição a câncer em AF. A incidência elevada de câncer de trato aerodigestivo e falha de medula óssea tanto em paciente de AF como em pessoas que abusam do consumo de álcool (Nakao et al., 1991; Brooks et al., 2009; McKay et al., 2011) reforçam o papel do AA como um destes mediadores.

De fato, foi demonstrado que estes problemas associados ao consumo de álcool são mediados por acetaldeído (Langevin et al., 2011).

O diagnóstico de referência de AF é a avaliação do efeito clastogênico de diepoxibutano ou mitomicina C em linfócitos ou, em alguns casos, fibroblastos (Auerbach, 1993). Mas algumas síndromes podem apresentar resultado positivo neste teste (Van Der Lelij et al., 2010), sendo feita a determinação do grupo de complementação como diagnóstico definitivo (D'andrea, 2010; Kee e D'andrea, 2012). Dada à variação fenotípica, é mandatório aconselhamento genético e avaliação dos irmãos de pacientes de AF.

Todos os dezesseis subtipos apresentam mutações em genes que codificam proteínas envolvidas na preservação de integridade genômica (Tabela 2), por meio de reparo de alguns tipos de danos ao DNA – particularmente as ligações cruzadas interfitas (Joenje, 2011). Oito proteínas (FANCA, FANCB, FANCC, FANCE, FANCF, FANCG, FANCL e FANCM) formam o complexo proteico principal; duas (FANCD2 e FANCI) formam um heterodímero e as demais (FANCD1, FANCI, FANCN, FANCO, FANCP e FANCO) são efetores a jusante.

A proteína FANCM é a responsável por ativar a via através de um conjunto de ações que inclui reconhecer as ligações cruzadas no DNA e recrutar as outras proteínas do complexo proteico principal (Kim e D'andrea, 2012). A via parece ser ativada do mesmo modo pelo complexo MutS, componente da via de MMR (Huang, M. et al., 2011; Williams et al., 2011). O complexo proteico principal possui atividade E3 ubiquitina-ligase, catalisada pela subunidade FANCL (Cole, Lewis e Walden, 2010; Garner e Smogorzewska, 2011) que regula a via por meio da monoubiquitinação do heterodímero ID – FANCD2 e FANCI (Kim e D'andrea, 2012). A monoubiquitinação recruta o heterodímero para o local da lesão onde coordenará

o reparo junto com as proteínas à jusante da via (FANCD1/J/N/O/P/Q) (Kim e D'andrea, 2012; Shigechi et al., 2012).

Embora existam descrições incipientes de reparo independente de replicação (Jones e Huang, 2012), o reparo de ligações cruzadas é considerado predominantemente dependente de replicação (De Silva et al., 2000; Akkari et al., 2001). No mecanismo proposto as forquilhas de replicação convergem para a lesão e estagnam a 20 - 40 nucleotídeos de distância da lesão (Figura 9b). A maquinaria é então alterada e uma forquilha avança em uma fita até a distância de 1 nucleotídeo (Figura 9c). Após a monoubiquitinação de FANCD2, são feitas incisões a 3' e 5' da lesão na outra fita desfazendo a ligação entre as fitas (Figura 9d, e) e a cromátide intacta é replicada por polimerases translesão (Figura 9f, g). O reparo é finalizado (Figura 9i) por recombinação homóloga na cromátide cindida (Figura 9e), e por excisão do aduto ligado na fita intacta (Figura 9h) (Raeschle et al., 2008; Knipscheer et al., 2009; Long et al., 2011).

Embora diversas endonucleases sejam implicadas no reparo de ligações cruzadas – entre elas, FAN1 (Smogorzewska et al., 2010), MUS81-EME1 (Hanada et al., 2006), XPF-ERCC1 (Fisher, Bessho e Bessho, 2008) e SLX4-SLX1 (Svendsen et al., 2009) – não se sabe qual(is) a(s) responsável(is) pela etapa de incisão. Entretanto a nuclease 1 associada a FANCD2, FAN1, atua em etapas posteriores ou em via não clássica de AF (Kratz et al., 2010; Mackay et al., 2010).

A identificação de que mutações no gene *SLX4* causam um subtipo de AF, FANCP (Kim et al., 2011; Stoepker et al., 2011), e a interação da proteína SLX4 com as nucleases MUS81-EME1, XPF-ERCC1 e “SLX4-SLX1” (Fekairi et al., 2009; Svendsen et al., 2009) leva a crer que estas estejam diretamente envolvidas na incisão. Dados recentes apontam XPF-ERCC1 – conhecida nuclease da via de NER

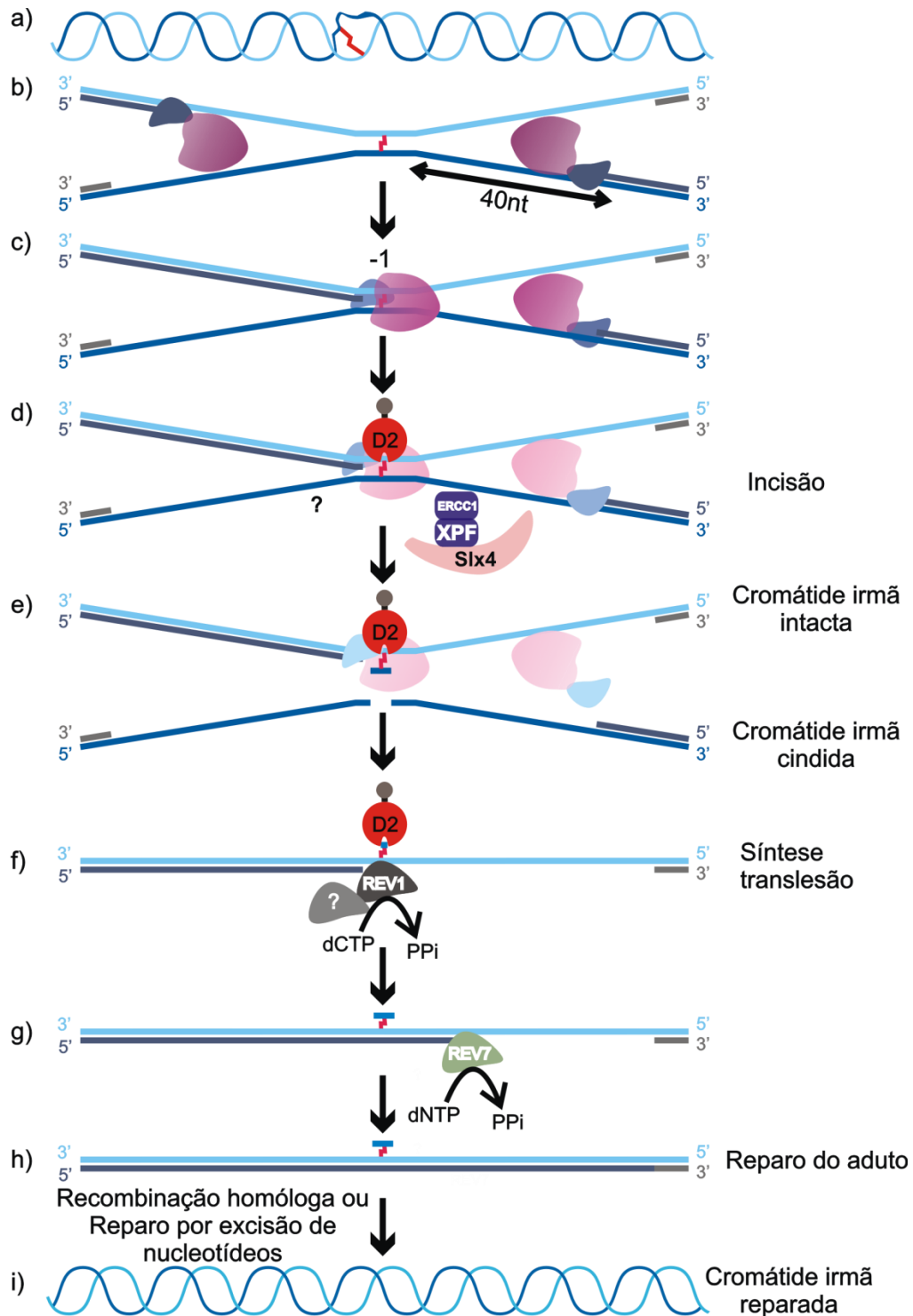


Figura 9 – Mecanismo proposto para o reparo de ligações cruzadas interfitas acoplado à replicação do DNA. (a) Ligação cruzada das fitas promovendo distorção da estrutura do DNA; (b) forquilha convergem para a lesão e estagnam a ~40 nt da lesão; (c) uma forquilha replica o DNA até a base adjacente à lesão; (d) FANCD2 monoubiquitinada recruta endonucleases que fazem incisões na fita oposta; (e) dupla-quebra de fita causada pela incisão que será reparada por recombinação homologa dependente de RAD51, (f) polimerase translesão adiciona um nucleotídeo oposto ao aduto de ligação cruzada; (g) outra polimerase translesão estende a fita além da lesão; (h) o aduto de guanina remanescente é reparado por recombinação homologa ou por excisão de nucleotídeos. (Adaptado de Crossan e Patel, 2012).

– como nuclease mais importante da etapa de incisão (Crossan e Patel, 2012; Kim et al., 2013). De fato a interação entre esta nuclease e SLX4 é essencial para o reparo de ligações cruzadas interfitas de DNA (Crossan et al., 2011; Kim et al., 2013). E embora MUS81-EME1 e SLX4-SLX1 participem em menor extensão da incisão, elas são mais importantes em outros processos (Kim et al., 2013). A recente caracterização do grupo de complementação FANCC, onde ocorrem mutações no gene *ERCC4* que codifica XPF, corrobora a participação de XPF-ERCC1 na etapa de incisão (Bogliolo et al., 2013).

2. OBJETIVOS

Dada a dificuldade em quantificar os efeitos de sinalização e/ou dano molecular decorrentes de estresse redox em sistemas biológicos, o objetivo deste trabalho foi avaliar potenciais biomarcadores de estresse redox – com enfoque em aldeídos e seus produtos – e desenvolver métodos acurados e sensíveis de análise.

Objetivos Específicos

1. Avaliar o potencial de desoxinucleosídeos modificados como marcadores de exposição a aldeídos exógenos – em modelo humano – e aldeídos produzidos endogenamente em decorrência de estresse redox – em modelo celular e animal.
2. Desenvolver metodologia sensível de avaliação e quantificação de aldeídos baseada em HPLC acoplado a espectrometria de massas para estudar o perfil de aldeídos gerados em modelo animal.
3. Estudar os produtos de metabolização de aldeídos envolvendo glutathiona, por meio de desenvolvimento de método analítico sensível e acurado para avaliar a possibilidade de uso destes compostos como biomarcadores de estresse redox.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Reagentes

Acetaldeído (AA), crotonaldeído (CRT), *trans*-4-hidroxi-2(E)-nonenal-dimetilacetal (HNE-DMA), *trans,trans*-deca-2,4-dienal (DDE), *trans,trans*-nona-2,4-dienal (NDE), *trans,trans*-hepta-2,4-dienal (HeptDE), *trans,trans*-hexa-2,4-dienal (HDE), *trans*-hexa-2-enal (HE), glutationa reduzida (GSH), glutationa oxidada (GSSG), cisteína, cistina, tris, EDTA, Triton-X100, cloreto de sódio, proteinase K, 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH), dodecilsulfato de sódio (SDS) e desferroxamina utilizados são da Sigma (St. Louis, MO). Ácido fórmico, fosfato de potássio, cloreto de magnésio, etanol, diclorometano, agarose e sacarose foram adquiridos da Merck (Darmstadt, Alemanha). Acetonitrila para cromatografia foi obtida da EM Science (Gibbstown, NJ) e todos os outros reagentes usados são da Sigma (St. Louis, MO). A água foi purificada em aparelho Milli-Q da Millipore (Bedford, MA). Soro fetal bovino foi obtido da Atená Biotecnologia (Campinas, SP).

[¹⁵N₅]-2'-Desoxiguanosina, [¹³C₂,¹⁵N-Gly]-glutationa foi fornecida por Cambridge Isotope Laboratories (Andover, MA). Filtros Ultrafree-Mc (0,22 µm de poro) pela Millipore (Bedford, MA). Bio-Rad protein assay foi fornecido pela Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA).

3.2. Equipamentos

Foram utilizados centrífuga modelo 5804 R com rotor de ângulo fixo F-45-30-11, thermomixer R, thermomixer Comfort e termociclador Mastercycler Gradient da Eppendorf (Hamburg, Alemanha). As soluções 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).

3.3. Análises estatísticas

As análises estatísticas de One-way ANOVA com pós-teste de Tukey-Kramer, e T-Student foram realizadas utilizando o software Origin 8.5.1 (OriginLab Corporation, Northampton, MA).

3.4. Sistemas de HPLC-UV/Vis-ESI-MS/MS

Para as análises foi utilizado o sistema de HPLC Agilent 1200 (Califórnia, USA) composto por autoinjeter (1200 High performance G1367C), um forno de coluna (1200 G1316B), uma válvula de troca automática, uma bomba binária (1200 SL G1312B), uma bomba isocrática (1200 SL G1310A), um detector UV (1200 DAD G1315C) acoplado a um espectrômetro de massas triplo-quadrupolo híbrido 4000QTRAP (Applied Biosystems, MDS Sciex, Foster City, CA) com fonte eletrospray (ESI). Para aquisição foram utilizados o software Analyst 1.4.2 ou versão superior.

3.5. Animais modelo 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 animais provieram da colônia do Biotério de Produção e Experimentação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e do Instituto de Química da Universidade de São Paulo fundada em 2007 a partir de matrizes adquiridas na Taconic (Germantown, USA).

Todos os experimentos obedeceram às diretrizes e normas preconizadas pelo *National Institute of Health* – NIH, pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório – SBCAL e pela lei nº 11.794, Sérgio Arouca de 2008. Todos os procedimentos foram ainda revisados e aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal do Instituto de Química – USP (CEUA/IQ USP 25/02/2008 – ANEXO I).

Os animais foram mantidos na área de experimentação do biotério supracitado com controle de ciclo claro/escuro de 12 h, comida e água *ad libitum*. Os animais

3.5.1. Genotipagem dos ratos SOD1^{G93A}

A ponta da orelha dos filhotes foi coletada aos 25 dias pelos funcionários do biotério em gelo seco e mantida a -80°C até o momento da análise. Os animais foram genotipados conforme descrito por Howland e col. Foram utilizados na reação em cadeia de polimerase (PCR, sigla em inglês) os oligonucleotídeos iniciadores específicos (*primers*, termo em inglês) sodi3-f (GTG GCA TCA GCC CTA ATC CA) e sodE4-r (CAC CAG TGT GCG GCC AAT GA) (Howland *et al.*, 2002) e kit de PCR da Qiagen como descrito na Tabela 3.

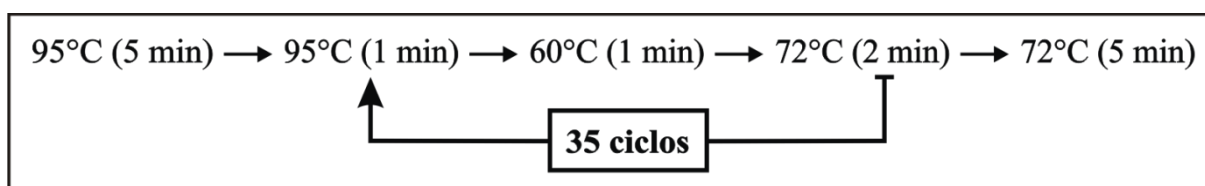
Primeiro, o tecido foi incubado a 65°C por 15 min em 300 µL de tampão de digestão (50 mM Tris-HCl, pH 8,0; 50 mM EDTA; 0,5% SDS). Então, foram adicionados 200 µL de tampão de digestão contendo proteinase K (1,25 mg × mL⁻¹) e a amostra digerida sob incubação a 55°C durante a noite. Em seguida as amostras

foram centrifugadas a 14.000 g por 5 min, o sobrenadante diluído 20 vezes em água Milli-Q autoclavada e aquecido a 95°C por 15 min. Uma alíquota de 2 µL da amostra diluída foi utilizada para a PCR descrita no Esquema 1.

Tabela 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-f 20 µM	1	0,4 µM
Primer sodE4-r 20 µM	1	0,4 µM
Taq DNA polimerase 2 U × µL ⁻¹	1	2 U × 50 µL
Amostra diluída	2	-
H ₂ O	38	-
Volume final	50	-

Ao fim da PCR, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 2% em TAE (50 mM Tris pH 8.0, 50 mM EDTA, 0.5% SDS), com 0,2 mg × mL⁻¹ de brometo de etídio, a 100 V, por uma hora. As amostras dos animais que herdaram o gene *SOD1* com a mutação G93A apresentaram banda de aproximadamente 200 pares de base.



Esquema 1 – Ciclo de PCR utilizado para genotipagem dos ratos *SOD1*^{G93A}

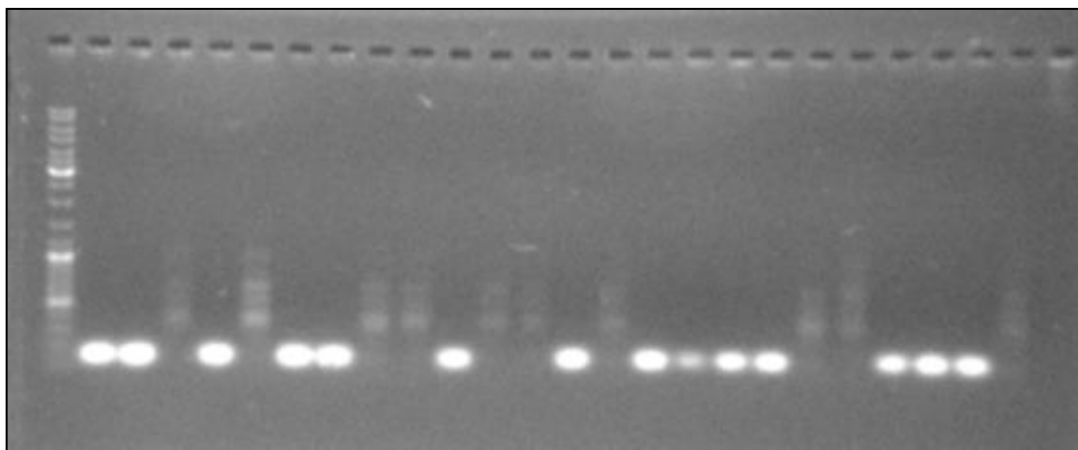


Figura 10 – Gel de agarose do produto de PCR obtido a partir das orelhas dos filhotes.

3.5.2. Avaliação dos Ratos Transgênicos SOD1^{G93A}

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. Os dados foram coletados com auxílio de tabela uma tabela de avaliação (APÊNDICE A). Para eutanásia estabelecemos limiar de perda de 15 a 20% do peso máximo do animal.

3.5.3. Coleta de órgãos e eutanásia

Os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de xilazina (0,56 mL × kg⁻¹ de peso de animal, solução 2%) e ketamina (0,9 ml × kg⁻¹ 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 cérebro e medula, lavados em solução salina (NaCl 0,9%) e utilizados imediatamente para análise (quando indicado) ou congelados em nitrogênio líquido. As amostras foram armazenadas em freezer a -80°C até o momento das análises.

3.6. Extração de DNA

Entre 200 e 400 mg de tecido 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 1500g por 10 min a 4°C. O precipitado foi ressuspenso em 5 mL de tampão A e centrifugado novamente nas mesmas condições. O precipitado foi ressuspenso em 2,4 mL de tampão B (Tris-HCl 10 mM, EDTA-Na₂ 5 mM, desferroxamina 0,15 mM, pH 8,0) e 140 µL de uma solução de SDS 10%. A esta solução foram adicionados 120 µL de uma solução 10 mg × mL⁻¹ de RNase A (em tampão acetato de sódio 10 mM, pH 5,0, previamente fervida por 15 min) e 24 µL de uma solução 20 U × µL⁻¹ 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 90 µL de uma solução de proteinase K 20 mg × mL⁻¹. 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 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.

3.7. Hidrólise de 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⁻¹) e 15 µL de solução de [¹⁵N]-1,N²-εdGuo e [¹⁵N]-1,N²-propanodGuo (10 fmol × µL⁻¹ 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⁻¹). 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.

3.8. Análise de 2'-desoxinucleosídeos modificados

3.8.1. Síntese de 1,N²-eteno-2'-desoxiguanosina e [¹⁵N₅]-1,N²-eteno-2'-desoxiguanosina.

O padrão não marcado 1,N²-eteno-2'-desoxiguanosina (1,N²-εdGuo) e o padrão isotopicamente marcado [¹⁵N₅]-1,N²-eteno-2'-desoxiguanosina ([¹⁵N₅]-1,N²-εdGuo) foram obtidos reagindo 2'-desoxiguanosina (dGuo) e [¹⁵N₅]-dGuo, respectivamente, com cloroacetaldeído, como descrito por Loureiro et al. (Loureiro, et al., 2000). À uma solução de 0,04 nmol de dGuo em tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 6,4, foi adicionado 0,06 mmol de cloroacetaldeído. Posteriormente a solução foi incubada 37°C por 96 h e purificados por cromatografia líquida.

3.8.2. Síntese de 1,N²-propano-2'-desoxiguanosina e [¹⁵N₅]-1,N²-propano-2'-desoxiguanosina.

O padrão não marcado 1,N²-propano-2'-desoxiguanosina (1,N²-propanodGuo) e o padrão isotopicamente marcado [¹⁵N₅]-1,N²-propano-2'-desoxiguanosina ([¹⁵N₅]-1,N²-propanodGuo) foram sintetizados reagindo dGuo e [¹⁵N₅]-dGuo (25 μmol dissolvidos em 2 mL de tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 8), respectivamente, com acetaldeído (50 μL) em presença de lisina (0,05 mmol)

sob agitação de 500 rpm, a 37°C por 24 h como descrito por Garcia et al. (Garcia et al., 2010).

3.8.3. Metodologia de quantificação de 1,N²-propano-2'-desoxiguanosina e 1, N²-eteno-2'-desoxiguanosina em DNA

Para quantificação de 1,N²-propanodGuo e 1,N²-εdGuo foi utilizado o método descrito por Garcia e col. (Garcia et al., 2010). Foi utilizado sistema de HPLC-UV/Vis-ESI-MS/MS descrito (item 3.4). O forno de coluna foi mantido a 18°C e o autoinjeter a 4°C. As amostras foram, inicialmente, separadas 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 ácido fórmico 0,1% e acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico, descrito na Tabela 4.

A bomba isocrática foi usada para alimentar uma segunda coluna Agilent C18(2) 150 mm x 2 mm i.d., 3 μm com fluxo isocrático (0,2 mL × min⁻¹) de uma solução (60:40) água e acetonitrila contendo 0,1% ácido fórmico. Uma válvula para direcionar o fluxo troca duas vezes de posição: aos 13 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 23 min, permitindo a lavagem e equilíbrio da segunda coluna. O tempo total desta análise foi de 37 min.

Tabela 4 – Gradiente de ácido fórmico 0,1% e acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico utilizado durante a análise em sistema HPLC-ESI/MS/MS para detecção do 1,N²-propanodGuo e 1,N²-εdGuo.

Tempo (min)	% de Acetonitrila	Fluxo (μL× min ⁻¹)
0	10	650
10	40	200
16	30	200
20	60	200
21	40	200
22	90	650
26	90	650
27	10	650
32	10	650

Os adutos foram analisados com ionização por eletrospray (ESI) no modo positivo e detecção por monitoramento de reação selecionada (SRM – *selected reaction monitoring*).

Todas as amostras injetadas continham [¹⁵N₅]-1,N²-εdGuo e [¹⁵N₅]-1,N²-propanodGuo como padrões internos (100 fmol). As transições m/z escolhidas para os íons 1,N²-εdGuo e [¹⁵N₅]-1,N²-εdGuo [M+H]⁺ foram 292 → 176 e 297 → 181, respectivamente, e para os íons 1,N²-propanodGuo e [¹⁵N₅]-1,N²-propanodGuo [M+H]⁺ foram 338 → 222 e 343 → 227, respectivamente.

Todos os parâmetros do espectrômetro de massa foram ajustados para aquisição da melhor transição [M+H]⁺ / [M+H-(2-D-eritro-pentose)]⁺. Sendo que, *curtain gas* (fluxo de gás que impede a entrada de gotículas de solvente) foi de 25 psi, temperatura 450°C, gás de nebulização e gás auxiliar 60 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. Para

as transições 338 → 222 e 343 → 227, foram selecionados 19 V de energia de colisão, o potencial de colisão na saída de Q2 foi de 20 V e a diferença de potencial entre Q0 e a *orifice plate (declustering potential)* em 51 V. Já, para as transições 222 → 176 e 227 → 181 os parâmetros acima foram de 17, 16 e 41 V, respectivamente.

3.8.4. Metodologia de quantificação de 1,N⁶-eteno-2'-desoxiadenosina no DNA

Para quantificação de 1,N⁶-εdAdo foi utilizado o sistema de HPLC-ESI-MS/MS descrito no item 3.4. O forno de coluna foi mantido a 25°C e o auto injetor a 4°C. As amostras foram, inicialmente, separadas 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 metanol 5% (fase móvel A) e metanol com 0,1% de ácido fórmico (fase móvel B), descrito na Tabela 5.

A bomba isocrática foi usada para alimentar uma segunda coluna Agilent C18(2) 150 mm x 2 mm i.d., 3 μm com fluxo isocrático (0,2 mL × min⁻¹) de metanol 12,5%. Uma válvula para direcionar o fluxo troca quatro vezes de posição: aos 13 e aos 23 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; aos 20 min e aos 29 min, permitindo a lavagem e o equilíbrio da segunda coluna. O tempo total desta análise foi de 70 min. O aduto foi analisado com ionização por eletrospray (ESI) no modo positivo e detecção por monitoramento de reação selecionada (SRM).

Tabela 5 – Gradiente de metanol 5% (fase móvel A) e metanol com 0,1% de ácido fórmico (fase móvel B) utilizado durante a análise em sistema HPLC-ESI-MS/MS para detecção de 1,N⁶-εdAdo.

Tempo (min)	% de B	Fluxo (μL× min ⁻¹)
0	3	200
10	3	200
35	8	200
42	8	200
50	40	200
53	40	200
55	3	200
70	3	200

Todas as amostras injetadas continham [¹⁵N₅]-1,N⁶-εdAdo como padrão interno (50 fmol), gentilmente cedido pela Prof. Dra. Ana Paula de Melo Loureiro. As transições m/z escolhidas para os íons 1,N⁶-εdAdo e [¹⁵N₅]-1,N⁶-εdAdo [M+H]⁺ foram 276→160 e 281→165, respectivamente.

Todos os parâmetros do espectrômetro de massa foram ajustados para aquisição da melhor transição [M+H]⁺ / [M+H-(2-D-eritro-pentose)]⁺. Sendo que, *curtain gas* (fluxo de gás que impede a entrada de gotículas de solvente) foi de 10 psi, temperatura 600°C, gás de nebulização e gás auxiliar 55 psi, voltagem aplicada no spray de íons na Fonte Turbo Ion Spray 5500 V, gás de colisão baixo, aquecimento da *interface heater* ativado em 100°C e o potencial de entrada fixado em 10 V. Para as transições 276 → 160 e 281 → 165, foram selecionados 31 V de energia de colisão, o potencial de colisão na saída de Q2 foi de 6 V e a diferença de potencial entre Q0 e a orifice plate (declustering potential) de 41 V.

3.8.5. Quantificação de adutos de DNA em modelos de Anemia de Fanconi

3.8.5.1. Cultura celular

Células DT40 parental (DT40 WT) e deficiente de FancL (DT40 Δ FancL) e fibroblastos embrionários de camundongos selvagem (MEF WT) ou deficiente em SLX4 (MEF $Slx4^{-/-}$) foram gentilmente cedidos pelo prof. Dr. K.J. Patel (MRC Laboratory of Molecular Biology, Cambridge, UK).

Células DT40 foram mantidas em suspensão em meio RPMI Glutamax-I (Gibco) suplementado com 3% de soro de galinha, 7% de soro fetal bovino inativado, 1% de PenStrep (Gibco, 10.000 unidades de penicilina e 10.000 μ g de estreptomicina \times mL⁻¹) e 50 μ M de β -mercaptoetanol.

MEF foram mantidos em meio DMEM (Gibco) suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado, 1% de PenStrep (Gibco, 10.000 unidades de penicilina e 10.000 μ g de estreptomicina \times mL⁻¹) (Crossan et al., 2011).

Os meios foram esterilizados por filtração (0,22 μ m, TPP, suíça). As células foram incubadas a 37°C, em atmosfera contendo 5% CO₂. Células DT40 foram mantidas em densidades entre 2 – 8 \times 10⁶ células \times mL⁻¹, e MEF em confluências entre 20 – 80%.

3.8.5.2. Tratamento de células DT40 e MEF com acetaldeído

Células DT40 (5×10^6 células $\times 40 \text{ mL}^{-1}$) e MEF (2×10^6 células $\times 150 \text{ cm}^2$) foram tratados com 0,25; 1; 2; 4 ou 10 mM de acetaldeído (AA), conforme indicado nos resultados, ou sem AA. Após a remoção do meio, foi adicionado meio fresco (a 4°C ou 37°C, conforme descrito nos resultados) com AA recém adicionado. As células foram incubadas por 2 h a 37°C sob atmosfera com 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 3.6). A remoção de meio e de PBS-A das células DT40 foi feita por centrifugação em tubos de 50 mL a 1500 rpm por 5 min.

3.8.6. Quantificação de 2'-desoxinucleosídeos modificados em urina humana

3.8.6.1. Coleta de urina

Os indivíduos utilizados neste estudo foram voluntários homens moradores das cidades de São Paulo (SP) ou São João da Boa Vista (SJBV), São Paulo, Brasil. Todos assinaram termo de consentimento. Foram solicitadas informações sobre idade, peso, altura, consumo de cigarros, álcool, medicamentos e suplementos alimentares, prática de atividade física e problemas de saúde (respiratórios,

cardíacos, renais, gastrointestinais, diabetes). Foram excluídos os indivíduos fumantes, os que faziam uso de suplementação de aminoácido, com problemas de saúde, e que ingeriram álcool a menos de 3 dias antes da coleta das amostras. Esta pesquisa foi aprovada pela comissão de ética em pesquisa com seres humanos do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo sob título de “Estudo de biomarcadores de estresse redox em urina e sangue humano”, parecer 891/CEP (ANEXO III).

3.8.6.2. Preparação e extração das urinas

As amostras foram coletadas nas primeiras horas da manhã em tubos falcon e mantidas a -80°C até o momento das análises. Para as análises, 1,5 mL de urinas a 4°C foi adicionado a 1,5 mL de tampão acetato de amônio 5 mM, 0,1 mM de mesilato de desferroxamina (pH 5) e 250 fmol de 1,*N*²- ϵ dGuo e 1,*N*²-propanodGuo, cada. A mistura foi aquecida a 37°C e centrifugada por 15 min a 4000 rpm (modificado de Hillestrom et al., 2004).

O sobrenadante foi extraído por extração em fase sólida (SPE – do inglês “*solid phase extraction*”). Colunas Strata C18E (Phenomenex) de 3 mL foram condicionadas usando 2 mL de metanol e 2 mL de água. Após eluição, as frações coletadas foram liofilizadas individualmente e diluídas em 100 μL de água pré-tratada com Chelex ®, para subsequente análise (40 μL) por HPLC acoplado à espectroscopia de massas.

3.8.6.3. Metodologia quantificação de 8-oxodGuo, 1,N²- ϵ dGuo and 1,N²-propanodGuo em amostras de urina.

Análises por HPLC-ESI-MS/MS em modo positivo foram realizadas usando um espectrômetro de massas API-4000 QTRAP (item 3.4). O nucleosídeo oxidado 8-oxodGuo, e os adutos 1,N²- ϵ dGuo and 1,N²-propanodGuo nas amostras de urina foram detectados por monitoramento de reação selecionada (SRM). Foi utilizado neste sistema uma coluna analítica (Eclipse XDB-C18, 150 mm \times 4,6 mm d. i., 5 μ m, Agilent) mantida a 18°C. Os compostos foram eluídos da coluna com um gradiente de ácido fórmico (0,1% em água) e acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico (Tabela 6). A bomba isocrática foi utilizada para manter um fluxo constante de 0,1 mL \times min⁻¹ de acetonitrila:água (40:60) com 0,1% de ácido fórmico para o espectrômetro de massas durante a análise. A posição da válvula foi modificada duas vezes: em 12 min, permitindo ao eluente da coluna ir para o espectrômetro de massas, e em 25 min, permitindo a lavagem da coluna. O tempo total de análise foi de 35 min.

Tabela 6 – Gradiente eluição de nucleosídeos modificados em urina

Tempo (min)	Fluxo (mL \times min ⁻¹)	Acetonitrila (%)
0	0,4	3
25	0,2	25
26	0,4	100
30	0,4	100
31	0,4	3
35	0,4	3

As amostras de urina contendo 100 fmol de padrões interno [$^{15}\text{N}_5$]-1, N^2 - ϵ dGuo e [$^{15}\text{N}_5$]-1, N^2 -propanodGuo foram injetadas no sistema descrito acima. As transições m/z 292 \rightarrow 176 (1, N^2 - ϵ dGuo), 297 \rightarrow 181 ([$^{15}\text{N}_5$]-1, N^2 - ϵ dGuo), m/z 338 \rightarrow 222 (1, N^2 -propanodGuo), 343 \rightarrow 227 ([$^{15}\text{N}_5$]-1, N^2 -propanodGuo), 284 \rightarrow 168 (8-oxodGuo) dos íons moleculares $[\text{M}+\text{H}]^+$ foram monitoradas com *dwell time* de 200 ms. Todos os parâmetros do espectrômetro de massas foram ajustados para a aquisição da melhor $[\text{M}+\text{H}]^+ / [\text{M}+\text{H} - (2\text{-D-eritro-pentose})]^+$ transição. O *curtain gas* foi ajustado em 25 psi, a temperatura da fonte mantida em 450°C, *nebulizer* e *auxiliar gas* foram mantidos em 60 psi, a *voltage da Turbo Ion Spray* em 5500 V, *collision gas* ajustado em *high*, *interface heater* mantida em 100°C e o potencial de entrada em 10 V. Para as transições 338 \rightarrow 222 e 343 \rightarrow 227 foi selecionado 19 V como energia de colisão, 20 V como energia de saída da cela de colisão e 51 V como *declustering potential*. Para as transições 222 \rightarrow 176 e 227 \rightarrow 181 os parâmetros foram 17, 16 e 40 V, e as transições 284 \rightarrow 168 foram 17, 16 e 46 V, respectivamente. Os dados foram analisados utilizando o software Analyst 1.4.2.

3.8.6.4. Reprodutibilidade e taxa de recuperação

Avaliamos a reprodutibilidade e a taxa de recuperação dos desoxinucleosídeos modificados na urina aplicando 0, 25, 100 e 200 fmol de cada aduto (1, N^2 - ϵ dGuo, 1, N^2 -propanodGuo) e 0, 125, 500 e 1000 fmol de 8-oxodGuo em urina, com adição de 100 fmol de padrão isotopicamente marcado ([$^{15}\text{N}_5$]-1, N^2 - ϵ dGuo,

[¹⁵N₅]1,N²-propanodGuo). Foram utilizadas 4 urinas diferentes, cada amostra injetada três vezes independentemente e a taxa de recuperação calculada. A linearidade do método foi calculada plotando a quantidade teórica carregada na coluna de SPE versus o valor recuperado.

3.8.6.5. Curvas de calibração

Foram construídas curvas de calibração para 1,N²-propanodGuo, 1,N²-εdGuo e 8-oxodGuo em relação aos padrões isotopicamente marcados apropriados (em particular, [¹⁵N₅]-1,N²-εdGuo foi utilizado para normalização de 8-oxodGuo e 1,N²-εdGuo, enquanto [¹⁵N₅]1,N²-propanodGuo foi utilizado para normalização de 1,N²-propanodGuo). As concentrações dos padrões variaram de 10 amol a 1000 fmol, sendo adicionado em cada amostra 100 fmol de padrões isotopicamente marcados. A curva foi construída pela relação entre as áreas de cada aduto e seu respectivo padrão marcado versus a quantidade de padrão não marcado adicionado.

3.8.6.6. Quantificação de creatinina em urina.

A quantidade total de creatinina nas amostras de urina foi analisada utilizando kit da Labtest Diagnóstica (Brasil) seguindo as instruções do fabricante.

Uma curva de calibração foi feita utilizando soluções de concentrações ($\text{mg} \times \text{mL}^{-1}$) conhecidas de creatinina.

3.9. Análise de aldeídos em cérebro e medula de ratos transgênicos SOD1^{G93A}

3.9.1. Síntese dos padrões de dinitrofenilhidrazonas de aldeídos

Para a síntese dos padrões foram utilizados 6 aldeídos: *trans,trans*-deca-2,4-dienal (DDE); *trans*-4-hidroxi-2-nonenal (HNE); *trans,trans*-nona-2,4-dienal (NDE); *trans,trans*-hepta-2,4-dienal (HeptDE); *trans,trans*-hexa-2,4-dienal (HDE) e *trans*-hexa-2-enal (HE). A derivatização foi feita a partir de 100 μL de solução etanólica contendo 5 μmol do aldeído, a exceção do HNE que foi feito em solução aquosa ácida obtida conforme descrito abaixo. A estas soluções foram adicionados 100 μL de 2,4-dinitrofenilhidrazina (20 mM) com 1,0 M de HCl (solução etanólica). Foram então incubados a 37°C por 1 h sob agitação de 900 rpm. As dinitrofenilhidrazonas (aldeído-DNPO) foram purificadas por recristalização em etanol.

A solução de HNE foi obtida pela hidrólise de HNE dimetilcetal (HNE-DMA) conforme instruções da Sigma-Aldrich. Inicialmente, a solução hexânica de HNE-

DMA foi seca sob fluxo de nitrogênio. Ao resíduo de HNE-DMA foi adicionado 500 μL de HCl (1 mM) e incubou-se a 4°C por 30 min, sob agitação de 500 rpm.

3.9.2. Derivatização e Extração dos Aldeídos dos Tecidos

Para análise dos aldeídos, 30 mg de tecido foram homogeneizados em 150 μL de tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,0 contendo 5mM de EDTA. Ao homogenato foram adicionados 100 μL de dodecilsulfato de sódio 10% e 150 μL de butil-hidroxitolueno 0,2% em etanol. As amostras foram então incubadas em gelo por uma hora e centrifugadas a 3.500 rpm por 10 min. Foi retirada uma alíquota de 25 μL do sobrenadante para dosar proteínas. Adicionou-se 750 μL de etanol. Após homogeneização a amostra foi centrifugada a 14.000 rpm a 4°C por 10 min. Uma alíquota de 500 μL do sobrenadante foi transferida para um tubo, onde se adicionou 100 μL de 2,4-dinitrofenilhidrazina (20 mM) em HCl 1,0 M (solução etanólica).

As amostras foram então incubadas por 2 h a 37°C, sob agitação de 500 rpm. Após este tempo as amostras foram extraídas com 500 μL de diclorometano e 300 μL de água miliQ. A fase inferior diclorometanólica foi coletada e o solvente evaporado a temperatura ambiente sob agitação. O resíduo foi solubilizado em 500 μL de acetonitrila e 40 μL foram injetados no HPLC-ESI-MS/MS.

3.9.3. Quantificação de aldeídos derivatizados com 2,4-dinitrofenilhidrazina por HPLC-ESI-MS/MS

Uma coluna Luna C18(2) 250 mm x 4.6 mm i.d., 5 μm (Phenomenex, Torrance, CA) foi utilizada a 22°C no sistema de HPLC-ESI-MS/MS (item 3.4) para a quantificação dos aldeídos nos tecidos de ratos. As amostras mantidas a 4°C foram analisadas em gradiente de metanol (com 0,05% de hidróxido de amônio)/água 75:25 (fase A) e acetonitrila contendo 0,05% de hidróxido de amônio (fase B) de acordo com o gradiente descrito na Tabela 7.

Tabela 7 – Método gradiente para eluição dos derivados hidrazônicos dos aldeídos.

<i>Tempo (min)</i>	<i>% de B</i>	<i>Fluxo ($\mu\text{L} \times \text{min}^{-1}$)</i>
0 – 10	60 – 80	1000 – 830
10 - 20	80-100	830
20 – 21	100 - 60	830 – 1000
21 – 28	60	1000

Foi utilizada uma válvula para direcionar o fluxo da coluna para o espectrômetro de massas entre 3 e 11 min e entre 17 a 20 min. No restante do tempo o eluente era descartado e o massa alimentado por uma bomba isocrática.

Os derivados hidrazônicos foram analisados com ionização por eletrospray no modo negativo (ESI-) e detectados por monitoramento de reação selecionada (SRM). As transições m/z escolhidas para os íons das dinitrofenilhidrazonas estão apresentadas na Tabela 8.

Tabela 8 – Transições escolhidas para detecção de derivados hidrazônicos dos aldeídos e valores de energia de ionização e fragmentação.

<i>Ion</i>	<i>Transição</i>	<i>DP</i>	<i>CE</i>	<i>CXP</i>
DDE-DNPO [M-H] ⁺	331 → 181	-55	-30	-9
	331 → 109	-55	-50	-19
HNE-DNPO [M-H] ⁺	335 → 167	-75	-22	-1
	335 → 182	-75	-30	-9
NDE-DNPO [M-H] ⁺	317 → 181	-60	-28	-9
	317 → 109	-60	-44	-5
HeptDE-DNPO [M-H] ⁺	289 → 181	-50	-24	-9
	289 → 109	-50	-38	-19
HDE-DNPO [M-H] ⁺	275 → 181	-50	-24	-1
	275 → 163	-50	-20	-1
HE-DNPO [M-H] ⁺	277 → 181	-50	-28	-9
	277 → 163	-50	-20	-1

Abreviações: DDE-DNPO – *trans,trans-deca-2,4-dienal-hidrazona*; HNE-DNPO – *trans-4-hidroxi-2(E)-nonenal-hidrazona*; NDE-DNPO – *trans,trans-nona-2,4-dienal-hidrazona*; HeptDE-DNPO – *trans,trans-hepta-2,4-dienal-hidrazona*, HDE-DNPO – *trans,trans-hexa-2,4-dienal-hidrazona*, HE-DNPO – *trans-hexa-2-enal-hidrazona*.

Todos os parâmetros do espectrômetro de massa foram ajustados para melhor aquisição das transições escolhidas. Sendo escolhidos os seguintes parâmetros, *curtain gas* de 12 psi, temperatura 600°C, gás de nebulização e gás auxiliar 50 psi, voltagem aplicada no *spray* de íons na Fonte Turbo Ion Spray -3500 V, gás de colisão alto, aquecimento da *interface heater* ativado em 100°C e o potencial de entrada fixado em -10 V. Para cada transição foram selecionados as melhores energias de colisão (CE), potencial de colisão na saída (CXP) e a diferença de potencial entre Q0 e a *orifice plate* (*declustering potential* – DP) conforme Tabela 8.

3.10. Análise de glutathiona

As análises de glutathiona reduzida (GSH) e glutathiona oxidada (GSSG) foram feitas por HPLC com detecção eletroquímica e por HPLC acoplado a espectrometria de massa.

3.10.1. Quantificação simultânea de glutathiona reduzida e glutathiona oxidada por detecção eletroquímica

Para análise de GSH e GSSG foi utilizado um sistema de HPLC com detecção eletroquímica da ESA (Thermo Scientific, Sunnyvale, CA). O sistema com bombas modelo 584, detector CoulArray 5600A, e um detector UV-Vis SPD-10AV-vp (Shimadzu, Kyoto, Japão) foi utilizado com uma coluna Kinetex C18 150 x 4,6 mm, 2,6 μ m 100Å (Phenomenex, Torrance, CA) mantida a 28°C. A fase móvel composta de tampão fosfato de sódio 25 mM com 25 μ M de ácido octassulfônico e 1% de acetonitrila (fase móvel A) e acetonitrila 1% (fase móvel B) com fluxo de 0,7 mL \times min⁻¹. As análises foram feitas a 215 nm no detector UV, e a 400, 600 e 950 mV no detector eletroquímico, seguindo o método da Tabela 9.

Tabela 9 – Método cromatográfico para detecção eletroquímica de GSH e GSSG

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

3.10.1.1. Preparo das Amostras

As amostras foram preparadas homogeneizando 50 mg de tecido em 500 μL (1:10) de fase móvel A. Adicionou-se 250 μL de ácido metafosfórico 5% e a amostra foi incubada em gelo por meia hora. Após este tempo as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 10 minutos. Do sobrenadante, foram injetados 10 μL no HPLC, e retirada alíquota de 100 μL para posterior dosagem de proteínas.

3.10.2. Quantificação simultânea de glutatona reduzida e glutatona oxidada por espectrometria de massas

Para análise foi utilizado sistema de HPLC Agilent constituído por um autoinjeter Agilent 1200 high performance resfriado a 4°C, bomba Agilent 1200

binary pump SL, detector Agilent 1200 DAD G1315C, forno de coluna Agilent 1200 G1216B a 18°C. Foi utilizada coluna analítica Luna C18(2) 150 mm x 3.0 mm i.d., 3 µm (Phenomenex, Torrance, CA) e a amostra eluída em gradiente de ácido fórmico 0,1% (Fase A) e acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico (Fase B), fluxo de 0,2 mL × min, conforme Tabela 10.

Tabela 10 – Condições cromatográficas para análise de GSH e GSSG por espectrometria de massas.

Tempo (min)	Concentração de B (%)
0	0
17	12
20	80
25	80
27	0
42	0

O HPLC foi acoplado a um espectrômetro de massas Quattro II (Micromass, Manchester, UK) com fonte eletrospray em modo positivo (ESI+). Foi feito o monitoramento de reações selecionadas (SRM – *selected reaction monitoring*) utilizados os parâmetros da Tabela 11. As condições utilizadas para as análises foram: voltagem do capilar – 3500 V; temperatura de bloco – 100°C; temperatura de dessolvatação – 250°C; voltagem do cone – 20 V.

Tabela 11 – Transições utilizadas para detecção de GSH e GSSG.

<i>Composto</i>	<i>Transição</i>	<i>Voltagem do cone</i>	<i>Energia de colisão</i>
GSH	308 → 179	25	15
	308 → 162	25	15
[¹³ C ₂ , ¹⁵ N-Gly]GSH	311 → 182	25	15
	311 → 165	25	15
GSSG	307 → 130	30	15
	613 → 484	30	15
[¹³ C ₄ , ¹⁵ N ₂ -Gly]GSSG	310 → 130	30	15
	619 → 484	30	15

3.10.2.1. Preparo das Amostras

As amostras foram preparadas homogeneizando o tecido em 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, como descrito no item 3.6. Após centrifugação 350 µL do sobrenadante foi adicionado a 100 µL de ácido tricloroacético. Após centrifugação a 5.000 g por 15 min a 4°C, 90 µL do sobrenadante foram coletados e adicionados 10 µL de uma solução 20 pmol × µL⁻¹ de cada padrão interno ([¹³C₂, ¹⁵N-Gly]-GSH e [¹³C₄, ¹⁵N₂-Gly]-GSSG).

3.10.3. Dosagem de Proteínas

A dosagem de proteínas foi feita utilizando kit de dosagem de proteína da Bio-Rad (Protein Assay) baseado no método de Bradford. As amostras foram diluídas 10x e 10 µL foram adicionados a 980 µL do reagente de cor diluído 1:4 em água. As absorvâncias foram lidas em espectrofotometro Shimadzu UV-1650PC, a 595 nm. A concentração calculada a partir de uma curva de calibração ($Y=0,0506x+0,028$; $R^2=0,9972$). A curva e as amostras foram feitas em triplicata.

3.11. Síntese, purificação e caracterização de adutos de glutathiona

3.11.1. Síntese dos adutos de glutathiona

Foram sintetizados adutos de glutathiona (GSH) com *trans*-4-hidroxi-2(E)-nonenal (HNE) e crotonaldeído (CRT) de acordo com o método descrito por Falletti (Falletti et al., 2007), com pequenas modificações. Aproximadamente 5×10^{-5} mols de aldeído (HNE-DMA – 10,0 mg; CRT – 3,5 mg) foram incubados separadamente com 20×10^{-5} mols de GSH em 1 mL de tampão fosfato de potássio (concentração final 50 mM, pH 8,0). A incubação foi feita em Thermomixer Eppendorf sob agitação de 500 rpm a 25°C por 1 hora.

Antes da incubação com GSH, HNE dimetilcetal (HNE-DMA) foi hidrolisado conforme instruções da Sigma-Aldrich. Inicialmente, a solução hexânica de HNE-DMA foi seca sob fluxo de nitrogênio. Ao resíduo de HNE-DMA foi adicionado 500 μ L de HCl (1 mM) e incubou-se a 4°C por 30 min, sob agitação de 500 rpm. Esta solução foi utilizada para síntese do aduto de HNE com GSH.

O aduto de HNE, glutathionil-4-hidroxi-3-penten-2-ol (GS-HNE), foi purificado e caracterizado, enquanto o aduto de CRT foi reduzido antes da purificação.

3.11.1.1. Redução dos adutos crotonaldeído com glutathiona

O aduto de CRT, sintetizado como descrito acima, foi reduzido à forma mais estável: (S-(3-hidroxi-1-metilpropil)-glutathiona – GS-HMP). A redução foi feita pela adição de boridreto de sódio em excesso (20 mg). O NaBH_4 não consumido foi destruído pela adição lenta de HCl concentrado até que cessasse a emissão de gás. O aduto GS-HMP foi então purificado e caracterizado.

3.11.2. Purificação dos adutos de glutathiona

Os adutos GS-HNE e GS-HMP foram purificados com sistema semipreparativo de HPLC Shimadzu (Kyoto, Japão) composto por duas bombas LC-

6AD, um injetor manual, um detector de arranjo de fotodiodo, uma controladora e software Class VP com coluna Luna C18(2), 250 x 10 mm, 5 μ m, 100 Å (Phenomenex, Torrance, CA) mantida a temperatura ambiente (cerca de 25°C). A absorvância foi monitorada a 220 nm.

Para purificação do aduto de HNE (GS-HNE) foi utilizado gradiente de ácido fórmico 0,1% (fase A) e acetonitrila com 0,1% de AF (fase B) e fluxos, 5 mL \times min⁻¹. A Tabela 12 descreve o gradiente utilizado. Enquanto o aduto de CRT (GS-HMP) foi purificado isocráticamente com fluxo de 6 mL \times mL⁻¹ de acetonitrila 5% com 0,1% AF em água.

Tabela 12 – Gradiente de purificação de GS-HNE

<i>Intervalo de Tempo (min)</i>	<i>Acetonitrila com 0,1% AF (%)</i>
0 – 40	10 – 30
40 – 45	30 – 50
45 – 50	50
50 – 55	50 – 10
55 – 60	10

3.11.3. Caracterização dos adutos de glutathione

Os adutos foram identificados e caracterizados utilizando um espectrômetro *Bruker DRX-500* (MA) da central analítica do Instituto de Química da USP e espectrômetro de massa triplo quadrupolo Quattro II (Micromass, Manchester, UK) com fonte de ionização eletrospray no modo positivo (ESI+).

Os adutos purificados foram secos por liofilização e solubilizados em D₂O. Foram obtidos espectros de RMN ¹H, RMN ¹³C, DEPT, correlações heteronucleares a curta distância ¹H-¹³C (HMQC) e correlações heteronucleares a longa distância ¹H-¹³C (HMBC) em 500 MHz (¹H) e 125 MHz (¹³C). Os espectros obtidos foram analisados utilizando o programa MestReNova 6.0.4 (Mestrelab Research).

Também foram feitas análises de espectrometria de massas por injeção direta com: voltagem do capilar – 4,00 kV; voltagem do extrator – 5 V; temperatura do bloco da fonte – 100°C; temperatura de dessolvatação – 200°C. Foi feita varredura de 100 a 600 m/z para GS-HNE e de 100 a 850 m/z para GS-HMP.

Tabela 13 – Condições de análise dos adutos de glutatona por espectrometria de massas.

Aduto	Íon molecular [M+H] ⁺ (m/z)	Voltagem do cone (V)	Energia de colisão (eV)
GS-HNE	464	10	10
GS-HMP	380	20	20

3.11.4. Determinação dos coeficientes de extinção molar (ε) de adutos de glutatona

O coeficiente de extinção molar do aduto GS-HNE foi determinado através de metodologia envolvendo espectrometria de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e espectrofotometria de UV-Vis. Primeiramente foi determinada a concentração do aduto solubilizado em D₂O por RMN ¹H, utilizando 3-trimetilsilil-1-propanosulfonato de sódio (DSS) como padrão interno. Para isto, foram preparadas

três soluções com concentrações diferentes de DSS e mesma concentração do aduto, da seguinte forma:

Tabela 14 – Diluições de 3-trimetilsilil-1-propanosulfonato de sódio (DSS) e do aduto glutationil-4-hidroxinona-1-ol (GS-HNE) para determinação de concentração por ressonância magnética nuclear de hidrogênios.

	DSS 10 mM (μL)	Solução do aduto (μL)	D ₂ O (μL)	[DSS] final (mM)	V _{final} (μL)
Solução 1	60	100	440	1	600
Solução 2	180	100	320	3	600
Solução 3	300	100	200	5	600

Pela razão entre a intensidade do sinal de próton do aduto e de DSS nos espectros de RMN, e sabendo a concentração de DSS, determinamos a concentração de cada aduto na solução, solução mãe.

A partir das soluções mãe foram preparadas para cada aduto soluções de 1, 5, 10, 50 e 75 μM . Foram obtidos espectros de 190 a 240 nm destas soluções. O valor do coeficiente foi calculado plotando-se as concentrações das soluções pela absorbância no comprimento de onda.

3.12. Síntese, purificação e caracterização dos padrões isotopicamente marcados dos adutos de glutaciona

A síntese e purificação de padrões isotopicamente marcados foram feitas de forma semelhante às dos padrões não marcado. Os aldeídos foram incubados, na

razão de 1:3, com GSH marcada com ^{13}C e ^{15}N no resíduo de glicina. Foram purificados em coluna Luna C18(2), $250 \times 4,6$ mm, $5\mu\text{m}$ (Phenomenex) com fluxo reduzidos num fator de 4,7, usando as mesmas condições cromatográficas previamente descritas (item 3.11.2).

A caracterização foi feita por injeção direta em espectrômetro de massa triplo quadrupolo Quattro II (Micromass, Manchester, UK) com fonte de ionização eletrospray no modo positivo (ESI+). Foram utilizadas as seguintes condições: voltagem do capilar – 4,00 kV; voltagem do extrator – 5 V; temperatura do bloco da fonte – 100°C ; temperatura de dessolvatação – 200°C . Foi feita varredura de 100 a 600 m/z para [$^{13}\text{C}_2, ^{15}\text{N}$ -Gly]-GS-HNE e de 100 a 850 m/z para [$^{13}\text{C}_2, ^{15}\text{N}$ -Gly]-GS-HMP.

3.13. Análise de adutos de glutatona, glutatona reduzida e oxidada, cisteína e cistina em ratos transgênicos modelo de ELA

3.13.1. Preparo de amostras

Uma alíquota de 100 mg de tecido foram homogeneizados em 1 mL de tampão A (Sacarose 320 mM, MgCl_2 5 mM, Tris-HCl 10 mM, desferroxamina 0,1 mM, 1% de triton X-100, pH 7,5) contendo $20 \text{ fmol} \times \mu\text{L}^{-1}$ de [$^{13}\text{C}_2, ^{15}\text{N}$ -Gly]-GS-HNE e [$^{13}\text{C}_2, ^{15}\text{N}$ -Gly]-GS-HPM, cada. Os homogenatos foram centrifugados a 1500g por

10 min a 4°C, e 150 µL do sobrenadante adicionados a 120 µL de solução aquosa de 20 mM N-etilmaleimida (NEM), contendo 2 mM de EDTA e 1 mM de desferroxiamina. Após homogeneização em a mistura foi mantida em gelo por 30 min; após este período foram adicionado 30 µL de ácido tricloracético e agitado vigorosamente. As amostras foram centrifugadas a 10.000 g por 10 min, e o sobrenadante filtrado em filtro de 0,22 µm. Foram injetados 10 µL para análise de espectrometria de massas.

3.13.2. Condições de HPLC-MS

Uma coluna analítica Kinetex, 100 mm x 3,0 mm d. i., 5µm, 100Å (Phenomenex, Torrance, CA, USA) mantida a 25°C foi acoplada ao sistema de HPLC-UV/Vis-ESI-MS/MS (3.4). As amostras mantidas a 4°C foram analisadas utilizando gradiente de ácido fórmico 0,1% (fase A) e acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico (fase B), como descrito na Tabela 15.

Foi utilizado sistema de válvula para direcionar o eluato da coluna entre 1,75 a 10,5 min e 14,50 e 22,50 min para o espectrômetro de massas. Direcionando para descarte o eluato no restante do tempo.

Todos os parâmetros do espectrômetro de massa foram ajustados para melhor aquisição das transições escolhidas. Sendo *curtain gas* de 20 psi, temperatura 550°C, gás de nebulização 60 psi e gás auxiliar 65 psi, voltagem aplicada no *spray* de íons na Fonte Turbo Ion Spray 5500 V, gás de colisão baixo, aquecimento da *interface heater* ativado em 100°C e o potencial de entrada fixado

em 10 V. Para cada transição foram selecionados as melhores energias de colisão (CE), potencial de colisão na saída (CXP) e a diferença de potencial entre Q0 e a *orifice plate* (*declustering potential* – DP) conforme Tabela 16.

Tabela 15 – Gradiente utilizado para de análise de adutos de glutathiona, glutathiona e cisteína por HPLC-UV/Vis-ESI-MS/MS

Tempo (min)	Fluxo ($\mu\text{L} \times \text{min}^{-1}$)	Acetonitrila (%)
-5	200	2,5
0	200	2,5
15	200	35
17	210	44
20	300	80
27	300	90
31	300	90
32	300	2,5
36	100	2,5

A análise foi dividida em dois períodos. No primeiro, de 0 a 11 min, foram analisadas as transições de SRM de glutathiona oxidada, cisteína, cistina e do aduto GS-HMP. No segundo período foram analisadas as do aduto GS-HNE. Para cada analito foi utilizado uma transição para quantificação e uma segunda para confirmação da identidade do composto.

Tabela 16 – Transições escolhidas para detecção de glutatona oxidada, cisteína, cistina e dos adutos de glutatona de *trans*-4-hidroxi-2(E)-nonenal e crotonaldeído com as respectivas energias utilizadas.

Composto	Trasição	Dwell time (ms)	DP	CE	CXP	Período
Cys-NEM	247,1 → 158,1	51	46	29	8	1
	247,1 → 200,9	51	46	19	10	1
Cistina	241,1 → 152,0	52	51	19	8	1
	241,1 → 74,1	52	51	41	12	1
GSSG	307,2 → 355,0	51	31	17	8	1
	613,2 → 355,0	51	71	33	8	1
GS-HMP	380,2 → 161,9	50,00	66	31	8	1
	380,2 → 233,9	50,00	66	27	14	1
$[^{15}\text{N}_1, ^{13}\text{C}_2\text{-Gly}]$ GS-HMP	383,2 → 164,9	50,00	66	31	8	1
	383,2 → 236,9	50,00	66	27	14	1
GS-HNE	464,2 → 308,0	120	46	19	6	2
	464,2 → 179,0	120	46	29	10	2
$[^{15}\text{N}_1, ^{13}\text{C}_2\text{-Gly}]$ GS-HNE	467,2 → 311,0	120	46	19	6	2
	467,2 → 182,0	120	46	29	10	2

Cys-NEM – cisteína derivatizada com N-etilmaleimida; GS-HMP – S-(3-hidroxi-1-metilpropil)-glutatona; GS-HNE – glutatona-4-hidroxinona-1-ol; GSSG – glutatona oxidada; $[^{15}\text{N}_1, ^{13}\text{C}_2\text{-Gly}]$ GS-HMP – $[^{15}\text{N}_1, ^{13}\text{C}_2\text{-glicina}]$ -S-(3-hidroxi-1-metilpropil)-glutatona; $[^{15}\text{N}_1, ^{13}\text{C}_2\text{-Gly}]$ GS-HNE – $[^{15}\text{N}_1, ^{13}\text{C}_2\text{-glicina}]$ -glutatona-4-hidroxinona-1-ol.

3.13.3. Dosagem de proteínas

A dosagem de proteínas foi feita utilizando kit da Bio-Rad (Protein Assay) baseado no método de Bradford, conforme instruções do fabricante. A dosagem foi feita no sobrenadante do homogenato antes da adição de NEM.

4. RESULTADOS

4.1. Quantificação de 2'-desoxinucleosídeos modificados

4.1.1. Em urina de indivíduos expostos à poluição atmosférica.

Níveis urinários de 1,*N*²-propanodGuo, 1,*N*²-εdGuo e 8-oxodGuo foram avaliados em amostras de moradores das cidades de São Paulo (SP) – região com poluição atmosférica – e São João da Boa Vista (SJBV) – região não poluída. As amostras de urina foram analisadas por metodologia de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas desenvolvida pelo nosso grupo que permite a quantificação direta de 750 amol de 1,*N*²-propanodGuo e 1,*N*²-εdGuo e 25 fmol de 8-oxodGuo em 1,5 mL de urina, considerando o limite de quantificação a relação sinal/ruído igual ou maior a 10 (Garcia et al., 2013).

As taxas de recuperação e reprodutibilidade foram avaliadas adicionando (3 concentrações) ou não padrões em quatro diferentes amostras de urina, com adição de 100 fmol de padrão isotopicamente marcado. Cada amostra foi injetada três vezes independentemente e a taxa de recuperação calculada a partir da diferença entre a quantificação das amostras fortificadas e os níveis basais (sem adição de padrão). A taxa de recuperação dos três analitos foi superior a 80% (Tabela 17), sendo que 1,*N*²-propanodGuo apresentou melhor reprodutibilidade.

Tabela 17 - Resumo dos níveis de 1,N²-propanodGuo, 1,N²-εdGuo e 8-oxodGuo nos experimentos de reprodutibilidade e taxa de recuperação.

	Adicionado (fmol)	Recuperado (fmol)	Recuperado (%)
1,N ² -propanodGuo	25	25,1 ± 4,0	100 ± 16
	100	98,1 ± 6,6	98 ± 7
	200	192,6 ± 9,7	96 ± 5
1- N ² -εdGuo	25	26,3 ± 5,0	105 ± 20
	100	89,8 ± 12,6	89 ± 13
	200	167,6 ± 33,5	84 ± 17
8-oxodGuo	125	189,3 ± 59,3	151 ± 47
	500	418,2 ± 327,8	84 ± 66
	1000	923,8 ± 275,7	92 ± 28

Quando plotada a quantidade teórica carregada na coluna de SPE versus a quantidade detectada observamos linearidade com r^2 acima de 0,9872 para os três desoxinucleosídeos analisados (Figura 11). O que é visualmente observado nos cromatogramas de 1,N²-propanodGuo e 1,N²-εdGuo (Figura 12).

Foram coletadas amostras de 64 voluntários na capital e de 52 no interior, todos de sexo masculino, para análise pela metodologia validada. Quando da coleta das amostras, todos os voluntários preencheram junto ao Termo de Consentimento um pequeno questionário (APÊNDICE B). Neste foram levantadas informações sobre idade, peso, altura, prática de atividade física, problemas de saúde, além de uso de suplementos alimentares, bebidas alcoólicas, cigarro e medicamentos. Foi ratificado verbalmente a não ingestão de álcool nos 3 dias precedentes à coleta.

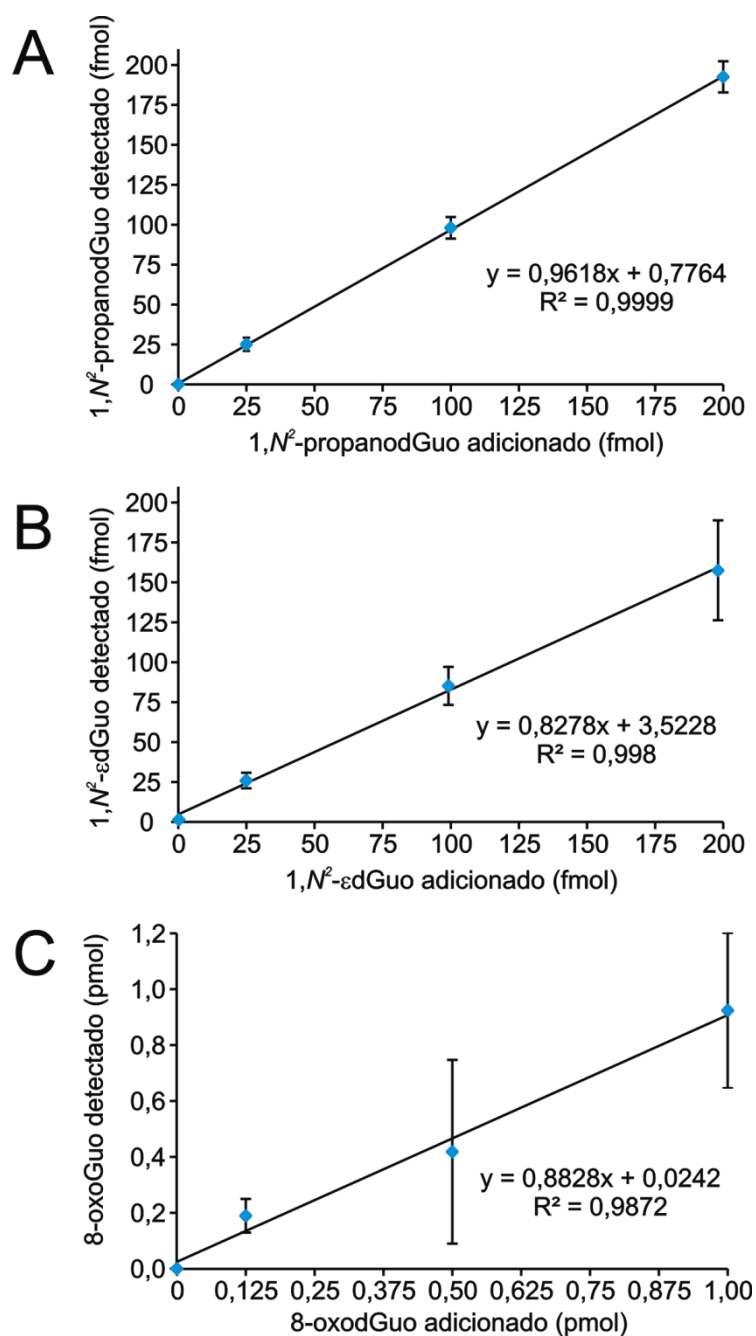


Figura 11 – Linearidade da recuperação de 1,N²-propanodGuo (A), 1,N²-εdGuo (B) e 8-oxodGuo (C). As curvas foram construídas de 0 a 200 fmol de nucleosídeos modificados adicionados versus a quantidade recuperada. Todos os dados foram normalizados usando 100 fmol do padrão interno apropriado (em particular, [¹⁵N₅]-1,N²-εdGuo foi utilizado para normalização de 8-oxodGuo e 1,N²-εdGuo, enquanto [¹⁵N₅]-1,N²-propanodGuo foi utilizado para normalização de 1,N²-propanodGuo).

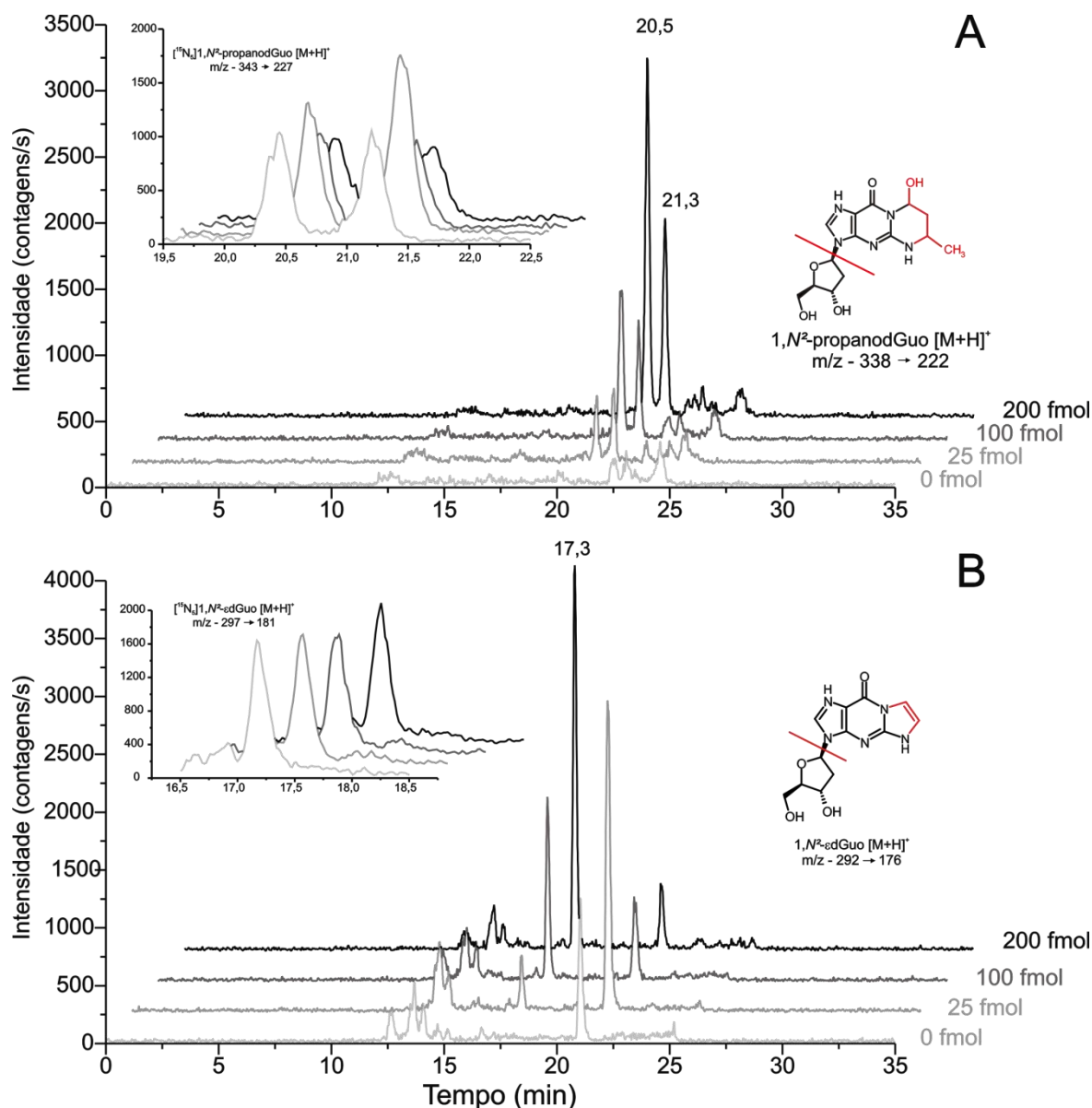


Figura 12 – Cromatograma representativo da recuperação de desoxinucleosídeos modificados nos experimentos de validação. Cromatogramas de $1,N^2\text{-propanodGuo}$ (A) e $1,N^2\text{-}\epsilon\text{dGuo}$ (B), com os respectivos padrões interno em destaque. Foram adicionados 25, 100 e 200 fmol dos adutos e 100 fmol de padrão interno.

Na análise dos dados, foram considerados potenciais interferentes o hábito de fumar, suplementação dietética com aminoácidos, problemas crônicos de saúde, e consumo de álcool nos três dias precedentes à coleta da amostra. Amostras de indivíduos com pelo menos umas das condições acima foram excluídas do estudo. Ao final, foram analisadas amostras de 47 de moradores de SP e 35 de moradores de SJBV (Tabela 18). A Figura 13 mostra cromatograma ilustrativo da análise de HPLC-ESI-MS/MS de urina após a eluição por SPE.

Tabela 18 – Dados dos indivíduos das amostras selecionadas de acordo com as informações fornecidas nos questionários aplicados

Amostra	Idade (anos)	Cidade	Peso (kg)	Altura (cm)	Problemas de saúde ^A	Atividade física	Qual frequência semanal da atividade física	Frequência de consumo de bebidas alcoólicas	Tomou medicamento nos últimos 2 dias? Qual?	Suplementação nutricional	8-oxodGuo (pmol)/creatinina (mg)	1,N ² -etenodGuo (fmol)/creatinina (mg)	1,N ² -propanodGuo (fmol)/creatinina (g)
2	24	SP	86	177	Não	Mod	3 vezes	Não	Anti-inflamatório	Não	3,1	0,2	65,4
4	30	SP	65	179	Não	Mod	3 vezes	Não	Não	Não	6,1	0,4	18,1
8	25	SP	NI	NI	Não	Lev	3 vezes	Não	Amoxicilina/Paracetamol	Não	24,6	0,6	15,7
10	23	SP	NI	NI	Não	Mod	Outra	Não	Não	Vitamina C	5,2	ND	24,4
11	19	SP	NI	NI	Não	Mod	1 vez	Não	Não	Não	3,5	0,3	20,8
13	29	SP	65	175	Não	Mod	1 vez	Não	Não	Não	16,9	3,2	193,0
14	NI	SP	77	168	Não	Mod	1 vez	raramente	Paracetamol	Não	5,1	0,1	17,5
15	31	SP	80	167	Não	Mod	3 vezes	raramente	Não	Não	3,8	0,5	29,4
16	20	SP	62	171	Não	Mod	3 vezes	1 vez/semana	DORFLEX®	Não	5,6	0,8	35,7
17	30	SP	NI	NI	Não	Mod	3 vezes	Não	Não	Não	12,4	ND	24,7
19	31	SP	78	171	Não	Mod	3 vezes	fins de semana	Não	Não	35,8	ND	16,7
20	26	SP	36	60	Não	Mod	Outra	Não	Não	Não	9,6	ND	27,4
21	25	SP	72	173	Não	Mod	Diariamente	Sim (NI)	Não	Não	19,4	ND	29,0
22	24	SP	NI	NI	Não	Mod	3 vezes	Não	Oximetazolina	Não	6,7	ND	13,2
23	30	SP	80	171	Não	Mod	1 vez	Não	Loratadina	Não	2,5	ND	2,8
24	23	SP	61	177	Não	Mod	1 vez	Não	Não	Não	2,1	0,1	3,7
27	24	SP	79	176	Não	Mod	Diariamente	Não	Não	Não	11,5	1,2	8,3

Tabela 18 (cont.) – Dados dos indivíduos das amostras selecionadas de acordo com as informações fornecidas nos questionários aplicados

Amostra	Idade (anos)	Cidade	Peso (kg)	Altura (cm)	Problemas de saúde ^a	Atividade física	Qual frequência semanal da atividade física	Frequência de consumo de bebidas alcoólicas	Tomou medicamento nos últimos 2 dias? Qual?	Suplementação nutricional	8-oxodguo (pmol)/creatina (mg)	1,N ² -etenodguo (fmol)/creatina (mg)	1,N ² -propanodguo (fmol)/creatina (g)
30	21	SP	68	171	-	Lev	3 vezes	Não	NI	Proteínas	4,8	0,4	5,0
31	26	SP	81	182	Não	Lev	3 vezes	Não	Não	Não	67,6	ND	3,4
34	26	SP	72	176	Não	Mod	3 vezes	Não	Não	Maltodextrina	7,9	ND	6,1
36	25	SP	80	176	Não	Mod	3 vezes	Não	Não	Não	4,9	0,6	4,5
37	22	SP	73	175	Não	Mod	1 vez	Não	Não	Não	21,1	ND	14,5
38	25	SP	82	176	Não	Mod	Outra	Não	Não	Não	8,7	0,3	11,4
39	31	SP	86	174	Não	Int	Diariamente	Não	Não	Sim (NI)	17,3	ND	2,3
40	23	SP	70	179	Não	Lev	3 vezes	1 vez/semana	Não	Não	31,4	ND	7,4
41	22	SP	72	173	Não	Lev	3 vezes	1 vez/semana	Não	Não	12,6	ND	6,3
42	30	SP	84	174	Não	Mod	3 vezes	2 vezes/mês	Não	Não	10,7	0,8	159,6
43	29	SP	75	173	Não	Mod	3 vezes	1 vez/semana	Não	Não	12,9	1,2	333,0
44	27	SP	NI	NI	Não	Mod	3 vezes	Não	Não	Não	7,4	1,3	179,0
45	24	SP	78	175	Não	Lev	1 vez	1 vez/semana	Não	Não	10,7	0,4	124,9
47	21	SP	89	180	Não	Mod	1 vez	1 vez/semana	Não	Não	325,3	10,6	109,3
67	18	SJBV	64	178	Não	Mod	Diariamente	eventualmente	Não	Massa	11,6	0,7	18,3
69	18	SJBV	62	172	Não	Mod	Diariamente	1 vez/semana	Não	Proteínas	4,8	ND	33,1
71	18	SJBV	NI	NI	Não	Int	Diariamente	Não	Não	Não	24,2	0,5	11,9

Tabela 18 (cont.) – Dados dos indivíduos das amostras selecionadas de acordo com as informações fornecidas nos questionários aplicados

Amostra	Idade (anos)	Cidade	Peso (kg)	Altura (cm)	Problemas de saúde ^A	Atividade física	Qual frequência semanal da atividade física	Frequência de consumo de bebidas alcoólicas	Tomou medicamento nos últimos 2 dias? Qual?	Suplementação nutricional	8-oxodGuo (pmol)/ creatinina (mg)	1,N ² -etenodGuo (fmol)/ creatinina (mg)	1,N ² -propanodGuo (fmol)/ creatinina (g)
74	18	SJBV	88	183	Não	Int	Diariamente	Não	Não	Massa e creatinina	6,1	0,2	9,5
75	18	SJBV	72	169	Não	Mod	3 vezes	Não	Não	Não	6,4	0,4	7,6
76	18	SJBV	75	173	Não	Mod	1 vez	1 vez/semana	Não	Pó de guaraná	6,2	ND	7,9
77	18	SJBV	60	170	Não	Int	Diariamente	1 vez/semana	Não	Não	3,5	0,4	14,6
78	18	SJBV	78	175	Não	Mod	1 vez	raramente	Não	Não	12,8	0,6	15,1
80	18	SJBV	56	173	Não	Mod	Diariamente	Não	Não	Não	12,8	ND	10,1
81	18	SJBV	78	172	Não	Mod	Diariamente	Não	Não	Não	2,7	0,2	24,3
82	18	SJBV	70	188	Não	Mod	Diariamente	3 vezes/semana	Não	Não	20,4	0,4	23,8
84	18	SJBV	75	175	Não	Mod	3 vezes	Não	Não	Não	11,8	0,7	53,1
85	18	SJBV	93	177	Não	Lev	1 vez	fins de semana	Não	Não	6,5	0,2	52,7
86	18	SJBV	90	173	Não	Mod	3 vezes	Não	Não	Não	7,8	ND	18,1
87	18	SJBV	70	178	Não	Lev	1 vez	Não	Não	Não	20,8	ND	30,1
88	18	SJBV	76	185	Não	Mod	3 vezes	raramente	Antigripal	Não	13,8	ND	23,0
90	18	SJBV	74	183	Não	Mod	3 vezes	dificilmente	Não	Sim (NI)	26,1	0,4	17,3
91	18	SJBV	70	175	Não	Int	Diariamente	Não	Não	Não	9,2	0,1	7,5
92	18	SJBV	62	175	Não	MLev	Diariamente	2 vezes/semana	Não	Não	5,4	0,9	4,3
95	18	SJBV	61	177	Não	Lev	Diariamente	Não	Não	Não	12,3	0,4	4,5

Tabela 18 (final) – Dados dos indivíduos das amostras selecionadas de acordo com as informações fornecidas nos questionários aplicados

Amostra	Idade (anos)	Cidade	Peso (kg)	Altura (cm)	Problemas de saúde ^A	Atividade física	Qual frequência semanal da atividade física	Frequência de consumo de bebidas alcoólicas	Tomou medicamento nos últimos 2 dias? Qual?	Suplementação nutricional	8-oxodGuo (pmol)/creatinina (mg)	1,N ² -etenodGuo (fmol)/creatinina (mg)	1,N ² -propanodGuo (fmol)/creatinina (g)
96	18	SJBV	61	180	Não	Mod	Diariamente	Não	Não	Não	6,6	0,2	4,7
97	18	SJBV	65	179	Não	Mod	3 vezes	1 vez/semana	Não	Não	35,3	0,5	3,6
99	NI	SJBV	65	170	Não	Mod	Diariamente	Não	Não	Não	182,9	ND	5,1
100	18	SJBV	72	172	Não	Mod	Diariamente	Não	Não	Não	17,2	ND	7,3
101	18	SJBV	68	175	Não	Lev	1 vez	Não	Não	Não	7,1	0,1	5,5
102	18	SJBV	NI	NI	Não	Lev	3 vezes	Não	Carbamazepina	Não	6,5	0,2	3,3
103	18	SJBV	73	175	Não	Mod	3 vezes	Não	Não	Não	25,4	ND	2,9
104	18	SJBV	80	178	Não	Mod	3 vezes	eventualmente	Dipirona	Não	6,8	ND	4,1
105	18	SJBV	75	190	Não	Mod	Diariamente	Não	Não	Não	8,1	0,5	4,6
110	18	SJBV	NI	NI	Não	Mod	Diariamente	Não	Não	Não	3,6	ND	2,6
112	19	SJBV	NI	NI	Não	Mod	3 vezes	Não	Não	Não	1,5	ND	8,8
113	18	SJBV	69	177	Não	Int	Diariamente	Não	Não	Não	153,1	4,5	4,4
114	18	SJBV	NI	NI	Não	Mod	1 vez	2 vezes/mês	Não	Não	8,8	ND	3,4
115	18	SJBV	80	177	Não	Mod	3 vezes	fins de semana	Não	Não	0	ND	4,7
117	18	SJBV	63	168	Não	Mod	Diariamente	Não	Não	Não	0	ND	8,1

NI - não informado; ND - não detectado; SP - São Paulo - SP; SJBV - São João da Boa Vista - SP; Mod - moderada; Lev - Leve; Int - Intensa; MLev - Muito leve.
A - Problemas renais, cardiovasculares, hepáticos, gastrointestinais, diabetes e outros.

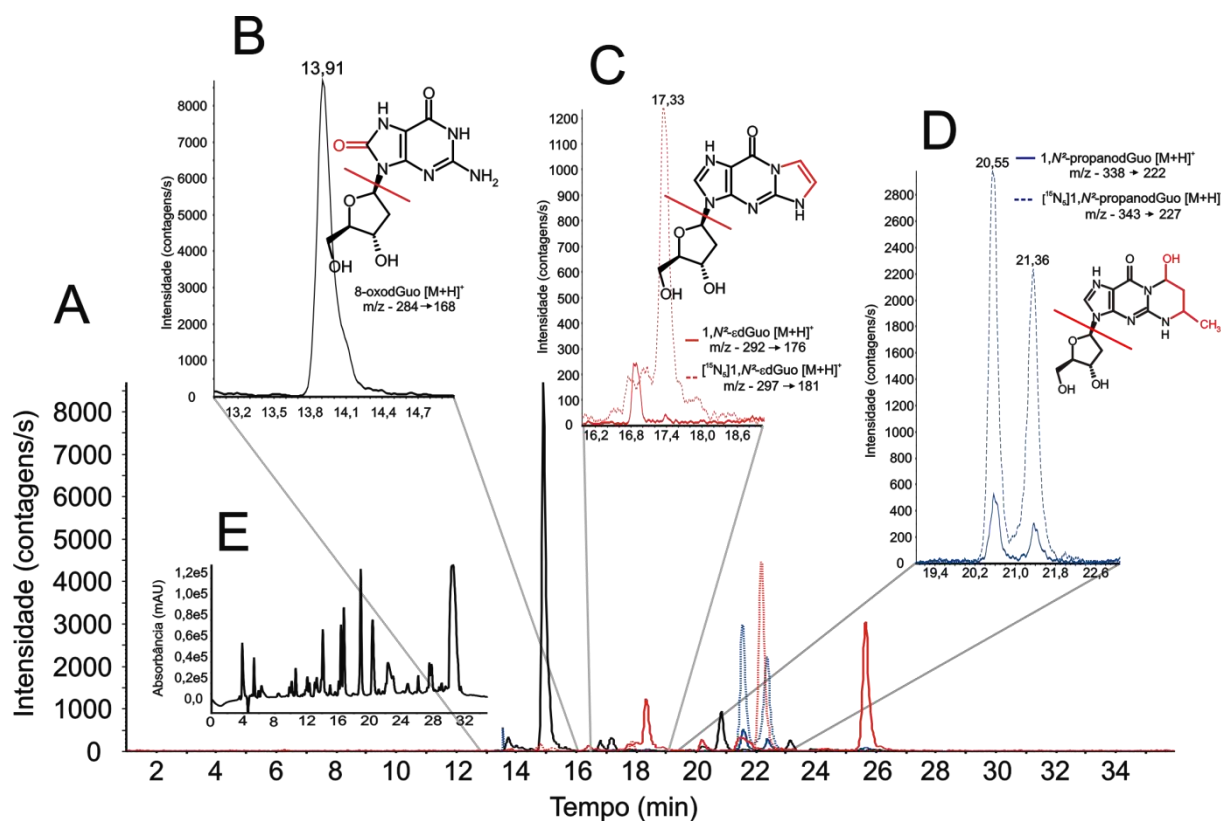


Figura 13 – Cromatograma representativo da análise por HPLC-MS/MS da fração de urina contendo 2'-desoxiguanosinas modificadas. Os cromatogramas indicam o perfil de eluição total (A), 8-oxodGuo (13,9 min, B); 1,N²-εdGuo e [¹⁵N₅]1,N²-εdGuo (17,3 min, C); e os diastereoisômeros de 1,N²-propanodGuo e [¹⁵N₅]1,N²-propanodGuo (20,6 e 21,4 min, D) e também detecção UV (monitorado de 200 a 350 nm).

Foi observado que cerca de 10% (4/35) das amostras de moradores de SJBV apresentam níveis superiores a 25 fmol de 1,N²-propanodGuo × mg⁻¹ de creatinina, enquanto que em SP mais de 50% (24/47) apresentam níveis superiores a este valor (Figura 14A). Ademais, pode-se notar que os níveis em todas as amostras de SJBV são menores que 75 fmol de 1,N²-propanodGuo × mg⁻¹ de creatinina, enquanto nas amostras de SP se distribuem até 350 1,N²-propanodGuo × mg⁻¹ de creatinina (Figura 14A).

Nestas amostras os valores de 1,N²-propanodGuo foram significativamente diferentes entre os dois grupos ($p < 0,05$, Figura 14B). Os níveis apresentaram-se maiores em indivíduos expostos à poluição atmosférica comparados com indivíduos

de região menos poluída (mediana de $20,8 \text{ fmol} \times \text{mg}^{-1}$ de creatinina em SP versus 7,9 em SJBV, Tabela 19).

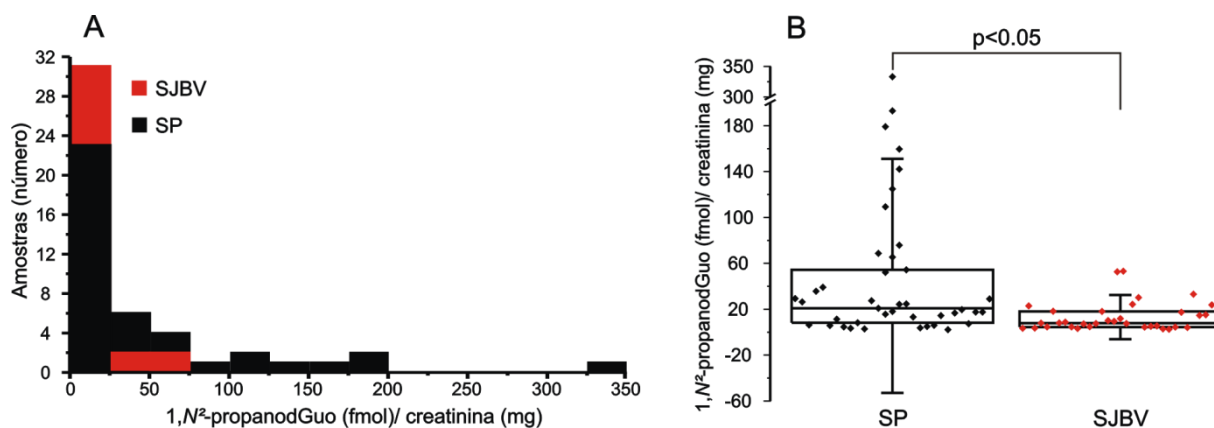


Figura 14 – Níveis totais dos diastereoisômeros de $1,N^2$ -propanodGuo em urinas de homens residentes em São Paulo (SP, região poluída, $n = 47$) e São João da Boa Vista (SJBV, região não poluída, $n = 35$). (A) Histograma dos níveis de $1,N^2$ -propanodGuo; as barras vermelhas indicam amostras de moradores de SJBV, enquanto barras pretas indicam amostras de moradores de SP. (B) *Boxplot* dos níveis de $1,N^2$ -propanodGuo em amostras de SP e SJBV. As amostras são estatisticamente diferentes ao nível de $p < 0,05$ nos testes não paramétricos de Mann-Whitney e Kolmogorov-Smirnov.

Tabela 19 – Sumário dos níveis de 8-oxodGuo, $1,N^2$ - ϵ dGuo e $1,N^2$ -propanodGuo.

	8-oxodGuo	$1,N^2$-ϵdGuo	$1,N^2$-propanodGuo
	($\text{pmol} \times \text{mg}^{-1}$ creatinina)	($\text{fmol} \times \text{mg}^{-1}$ creatinina)	($\text{fmol} \times \text{mg}^{-1}$ creatinina)
SP	<i>mínimo</i>	2,1	ND
	<i>mediana</i>	14,3	0,6
	<i>máximo</i>	325,3	10,6
SJBV	<i>mínimo</i>	ND	2,6
	<i>mediana</i>	8,8	0,4
	<i>máximo</i>	182,9	4,5

O aduto exocíclico $1,N^2$ - ϵ dGuo, clássico marcador de peroxidação lipídica, foi detectado apenas em parte das amostras. Observamos os níveis de $1,N^2$ - ϵ dGuo tem distribuição semelhante nas duas amostras (Figura 15A). Os níveis de 8-oxodGuo também têm distribuição similar para as amostras de SP e SJBV (Figura 15B). De fato

não foi observada diferença estatisticamente significativa para nenhuma destes 2'-desoxirribonucleosídeos modificados.

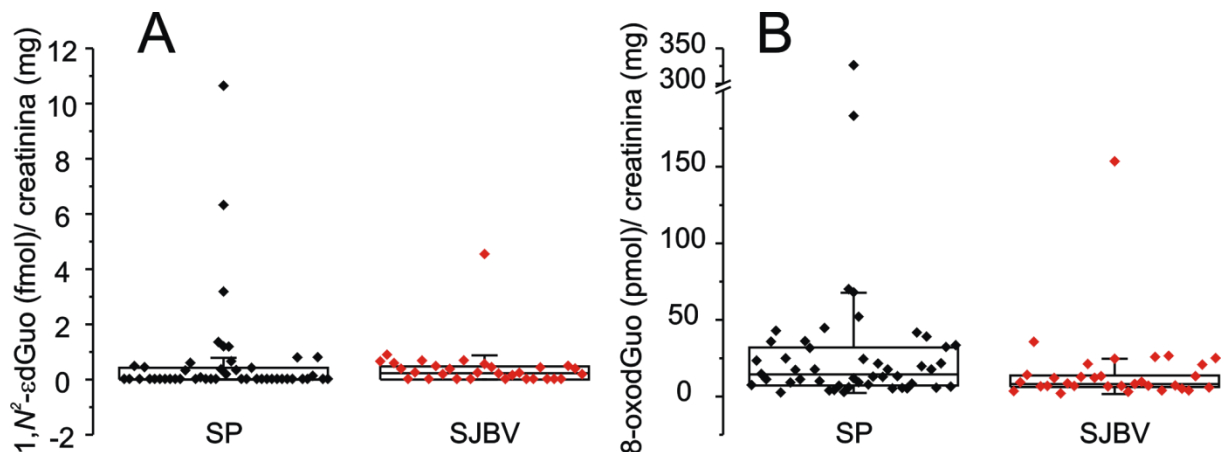


Figura 15 – Níveis de 1,N²-εdGuo e 8-oxodGuo em urinas de pessoas residentes em São Paulo (região poluída, n = 47) e São João da Boa Vista (região não poluída, n = 35). *Boxplot* dos níveis de 1,N²-εdGuo (A) e 8-oxodGuo (B). Pontos em vermelho indicam amostras de moradores de SJBV, enquanto os pretos indicam amostras de moradores de SP. Não há diferença significativa para testes não paramétricos de Kolmogorov-Smirnov e Mann-Whitney.

4.1.2. Quantificação de adutos de DNA em modelo de Anemia de Fanconi

Anemia de Fanconi (AF) é uma doença caracterizada por malformação congênita, falência medular óssea e neoplasias. O consumo de álcool por estes indivíduos está associado com o maior risco de câncer do trato aerodigestivo (Brooks et al., 2009; MacKay et al., 2011). Produto de metabolização de etanol, o acetaldeído (AA) foi demonstrado ser tóxico para animais modelo de AF (Langevin et al., 2011).

Com intuito de investigar a participação de adutos de DNA, em especial 1,N²-propanodGuo, na sensibilidade de células deficientes na via de reparo de ligações

cruzadas, avaliamos os níveis de $1,N^2$ -propanodGuo e $1,N^2$ - ϵ dGuo em duas linhagens. Utilizamos células linfocitárias de galinha (DT40) e fibroblastos embrionários de camundongos (MEF), deficientes ou não no reparo de ligações cruzadas, gentilmente cedidas pelo professor KJ Patel do *MRC Laboratory of Molecular Biology* (Cambridge, UK).

Incubamos as supracitadas linhagens com concentrações crescentes de AA – aldeído capaz de promover ligações cruzadas via formação de $1,N^2$ -propanodGuo (Cho et al., 2006). Os níveis basais de $1,N^2$ - ϵ dGuo em células DT40 ou MEF estavam abaixo dos limites de detecção do método. O aduto, cuja formação a partir de AA não é descrita na literatura, não foi observado mesmo em células tratadas com AA.

Para o aduto $1,N^2$ -propanodGuo, verificamos na linhagem DT40 perfil similar entre células deficientes de FancL (Δ FancL) – proteína responsável por regular a via de AF através de atividade E3 ubiquitina-ligase (Cole, Lewis e Walden, 2010; Garner e Smogorzewska, 2011; Kim e D'andrea, 2012) – e células proficientes – selvagens (WT). Não houve, contudo resposta concentração-dependente definida (Figura 16).

Resposta similar foi obtida com MEFs. Células deficientes de Slx4 ($Slx4^{-/-}$) – proteína envolvida na incisão (FancP) – e células selvagens (WT) apresentaram níveis de $1,N^2$ -propanodGuo semelhantes em todas as concentrações testadas (Figura 17). Contudo, os desvios foram altos e o aumento na concentração de AA não promoveu aumento nos níveis do aduto.

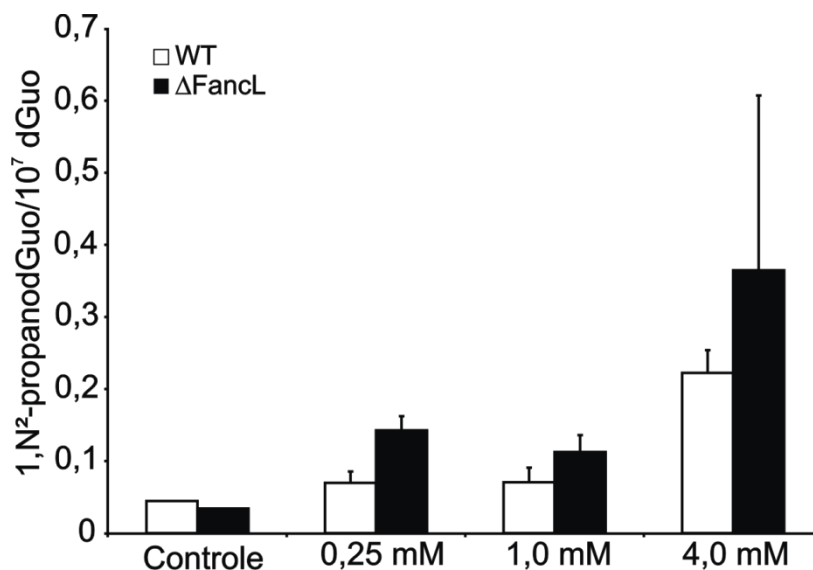


Figura 16 – Níveis de 1,N²-propanodGuo em células DT40 tratadas com acetaldéido por 2 horas a 37°C sob atmosfera com CO₂. WT – célula parental proficiente em FancL; ΔFancL – célula deficiente de FancL; controle – células mantidas em meio sem acetaldéido sob mesmas condições. Valores representam a média ± desvio padrão (n = 3).

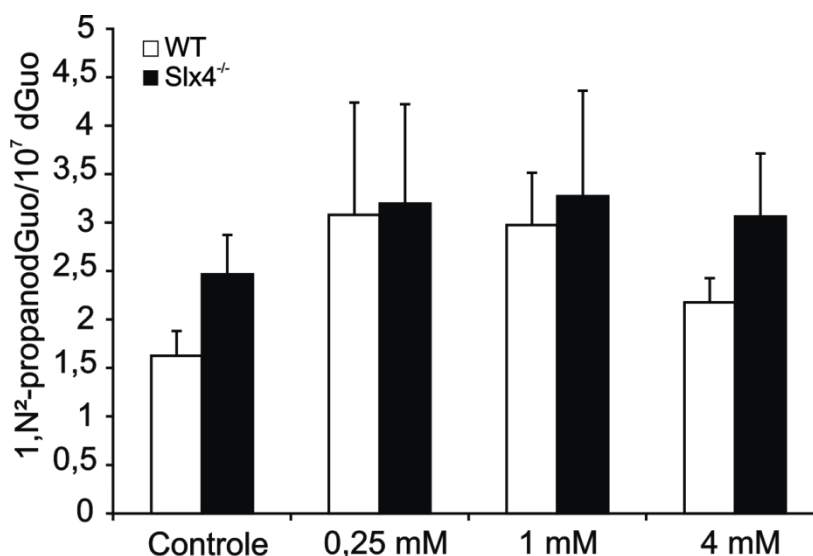


Figura 17 – Níveis de 1,N²-propanodGuo em células MEF tratadas com acetaldéido por 2 horas a 37°C sob atmosfera com CO₂. WT – célula parental proficiente em Slx4; Slx4⁻ – célula deficiente de Slx4; controle – células mantidas em meio sem acetaldéido sob mesmas condições. Valores representam a média ± desvio padrão (n = 2).

Para verificar a influência da volatilização do AA no meio a 37°C, os experimentos foram refeitos com solução de AA em meio gelado (4°C) preparado imediatamente antes da incubação com as células – duas horas, 37°C, sob atmosfera

de CO₂. Nas células DT40 houve uma resposta satisfatória com concentração final de 10 mM de AA (Figura 18), embora não tenha diferença estatisticamente significante.

MEFs também responderam a este novo tratamento (Figura 19). As células controles (WT) apresentaram níveis de 1,N²-propanodGuo aumentados quando tratadas com 10 mM de AA (Figura 19A). Foi observado níveis 5 vezes maiores em resposta ao tratamento. As células deficientes em reparo (MEFs Slx4^{-/-}) também responderam ao tratamento de 2 mM de AA, com aumento de cerca de 30% nos níveis do aduto (Figura 19B). Foi observada diferença estatisticamente significante (p<0,01 para WT e p<0,05 para Slx4^{-/-}) em relação ao controle.

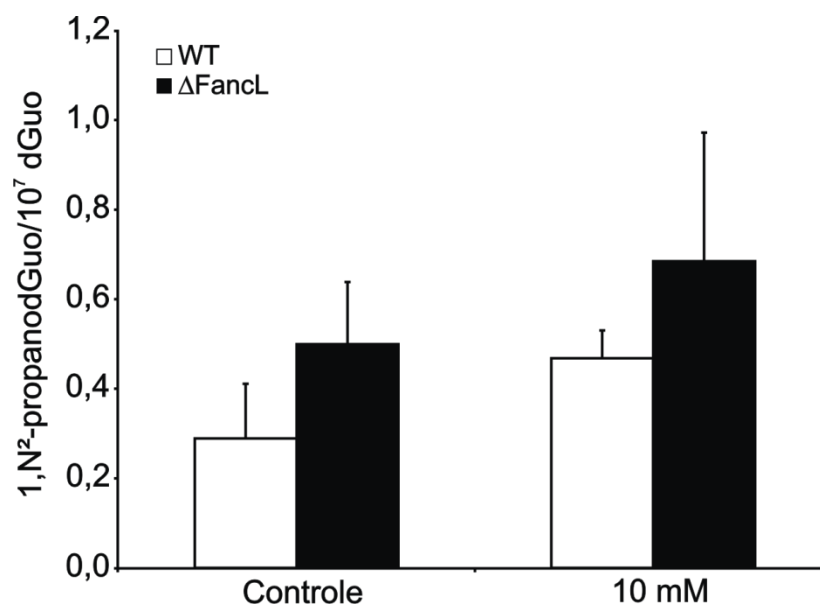


Figura 18 – Níveis de 1,N²-propanodGuo em células DT40 tratadas com 10 mM de acetaldeído – preparado em meio a 4°C –, incubadas por 2 horas, a 37°C, em atmosfera de CO₂. WT – célula parental proficiente em FancL; ΔFancL – célula deficiente de FancL; controle – células mantidas em meio sem acetaldeído sob mesmas condições. Valores apresentam a média ± desvio padrão (n = 2).

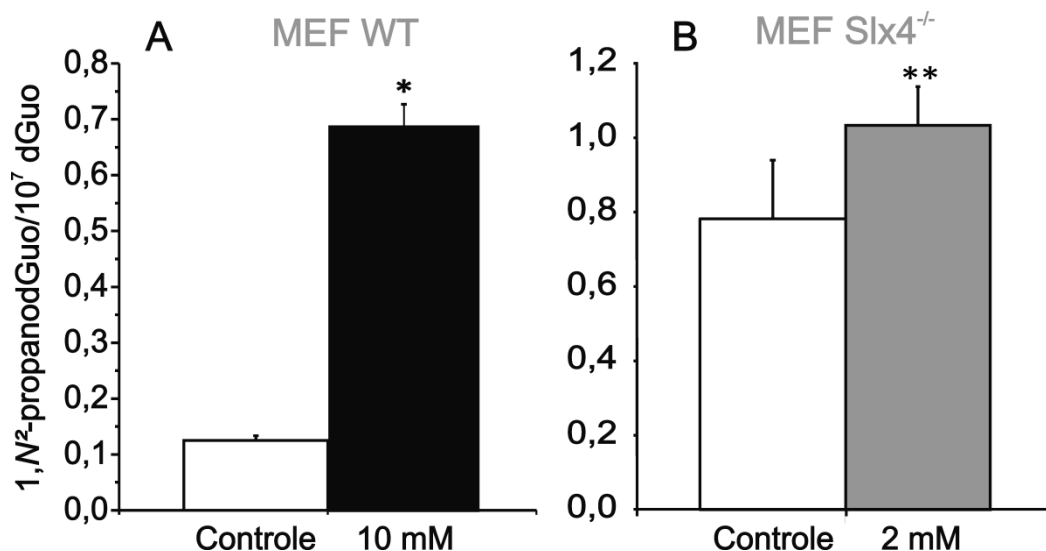


Figura 19 – Níveis de 1,N²-propanodGuo em células MEF incubadas com acetaldeído (AA) – preparado em meio a 4°C –, incubadas por 2 horas, a 37°C, em atmosfera de CO₂. Controle – células mantidas em meio sem AA sob mesmas condições (n = 5). (A) Células selvagens (MEF WT) incubadas com 10 mM de AA. (B) Células deficientes de Slx4 (MEF Slx4^{-/-}) incubadas com 2 mM de AA. Diferença estatisticamente significativa comparado ao controle ao nível de *(p < 0,01) e **(p < 0,05) utilizando teste T.

Vale ressaltar que células deficientes em reparo apresentam níveis basais (controle) de 1,N²-propanodGuo superiores aos de células proficientes nas duas linhagens (Figura 17, Figura 18 e Figura 19), sugerindo acúmulo desta lesão no DNA.

4.1.3. Quantificação de desoxinucleosídeos modificados em ratos modelo de Esclerose Lateral Amiotrófica

Na validação dos desoxinucleosídeos modificados como biomarcador de estresse redox utilizamos um modelo mais complexo do que os modelos celulares de AF e cujas condições experimentais fossem mais controladas do que a urina humana.

Foram avaliados 1,N²-εdGuo e 1,N²-propanodGuo em ratos superexpressando proteína SOD1^{G93A} humana, modelo de Esclerose Lateral

Amiotrófica (ELA). Inicialmente avaliamos os níveis destes adutos em cérebro de animais machos assintomáticos (2 meses) e sintomáticos (4 meses), caracterizados conforme avaliação física e comportamental a ser discutida posteriormente. Foi utilizada a mesma metodologia aplicada para detecção destes adutos no modelo de AF desenvolvida pelo nosso grupo (Garcia et al., 2010). No cromatograma representativo (Figura 20) é possível ver os padrões isotopicamente marcados (100 fmol de cada) e em destaque as transições para 1,*N*²-propanodGuo (B) e 1,*N*²-εdGuo (C), além da detecção UV de dGuo (8,2 min, D).

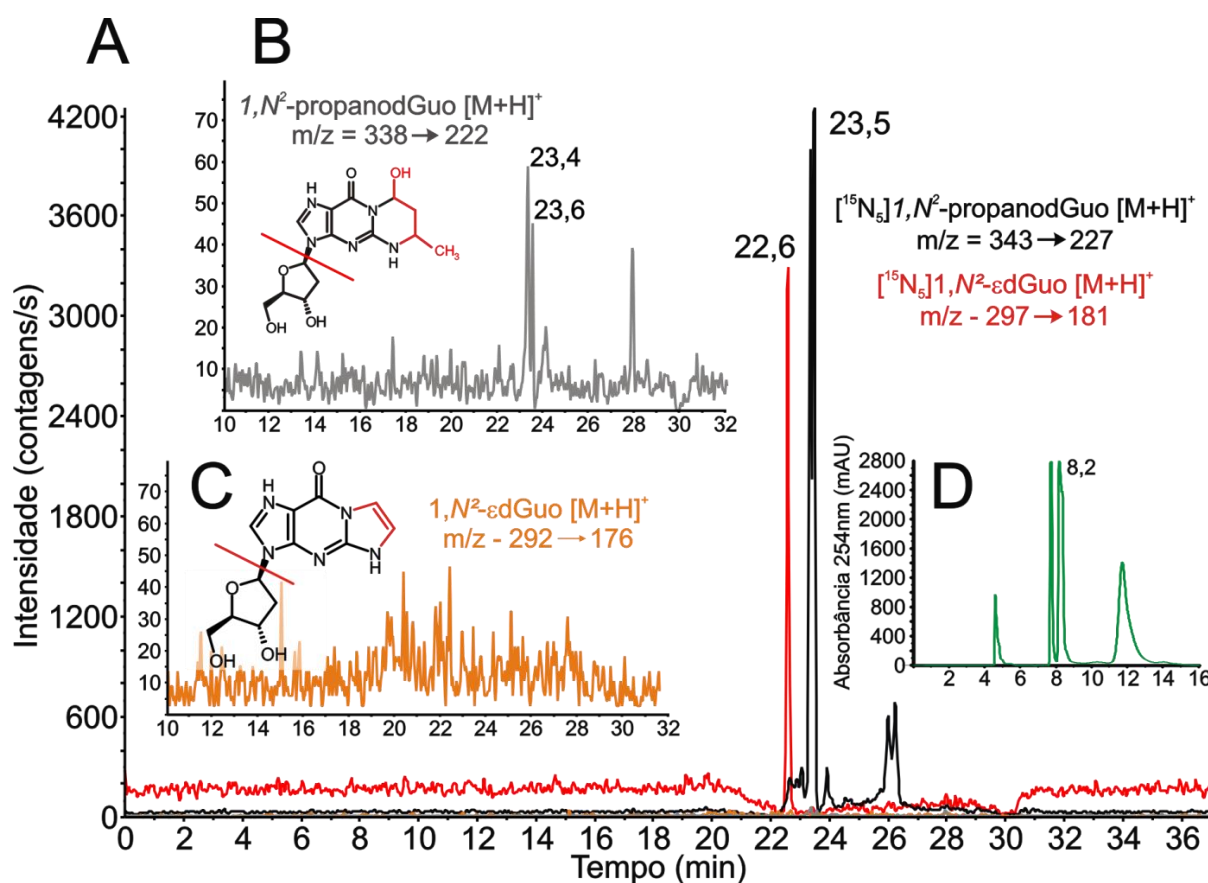


Figura 20 – Cromatograma representativo da análise por HPLC-MS/MS de DNA extraído de cérebro de ratos SOD1^{G93A}. Os cromatogramas indicam o perfil de eluição total (A) com destaque para os padrões internos [¹⁵N₅]1,*N*²-εdGuo (22,6 min, A) e [¹⁵N₅]1,*N*²-propanodGuo (23,3 e 23,5 min) – 100 fmol de cada; os diastereoisômeros de 1,*N*²-propanodGuo (B); 1,*N*²-εdGuo (C); além da detecção UV (254 nm) com pico de dGuo em 8,2 min (D).

Constatamos que os animais modelo de ELA em idades precoces, quando ainda são assintomáticos, apresentam níveis de 1,*N*²-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 deste aduto (Figura 21A). Estes valores são estatisticamente diferentes comparados ao controle.

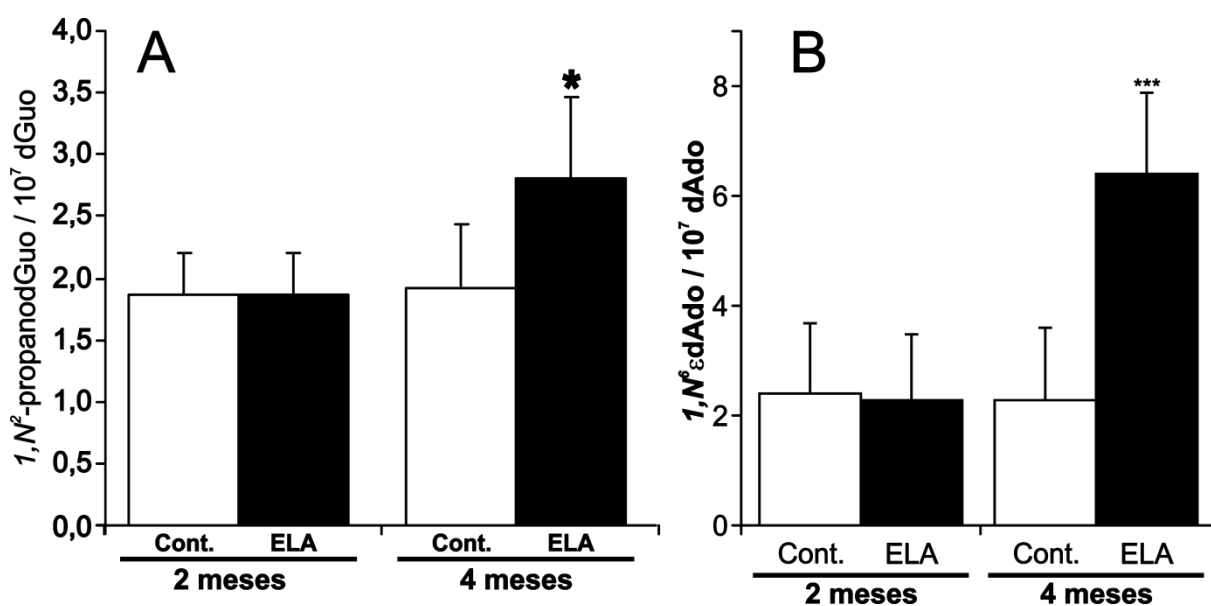


Figura 21 – Níveis de 1,N²-propanodGuo (A) e de 1,N⁶-εdAdo (B) em cérebro de ratos machos assintomáticos (2 meses) e sintomáticos (4 meses) por HPLC-MS/MS em modo SRM (n = 7). Cont. – controle; ELA – modelo de Esclerose Lateral Amiotrófica (SOD1^{G93A}). Significativamente diferente comparado com o controle de mesma idade (*p<0.05; ***p<0,001) utilizando Anova, com Tukey-Kramer como pós-teste.

Neste modelo também não foi possível detectar o aduto 1,N²-εdGuo por essa metodologia em parte das amostras analisadas, conforme exemplificado na Figura 20C. Assim como no modelo de AF, os níveis deste eteno aduto é inferior ao limite de detecção da metodologia empregada; ou inferior ao limite de quantificação impossibilitando a avaliação deste aduto.

Avaliamos também 1,N⁶-eteno-2'-desoxirriboadenosina (1,N⁶-εdAdo) em cérebro de ratos modelo de ELA pela metodologia descrita no item 3.8.4. Assim como observado para 1,N²-propanodGuo (Figura 21A), verificamos aumento nos níveis de

1,N⁶-εdAdo em ratos SOD1^{G93A} sintomáticos (Figura 21B). O nível deste aduto é semelhante entre animais controles e SOD1^{G93A} em idade precoce (2 meses). Os mesmos níveis são observados nos controles em idade de 4 meses, contudo há um aumento de 3 vezes no nível de 1,N⁶-εdAdo em ratos SOD1^{G93A} sintomáticos.

4.2. Avaliação dos ratos transgênicos SOD1^{G93A}: modelo de Esclerose Lateral Amiotrófica

Os ratos SOD1^{G93A} foram pesados a cada dois dias e avaliados física e comportamentalmente a cada quatro dias, a partir de 58 dias de idade até a coleta das amostras e eutanásia. Inicialmente os animais modelo de ELA e os animais controles apresentavam média de peso e desvio padrão similares (Figura 22A). Os animais tiveram ganho de peso semelhante até os 100 dias de idade, aproximadamente. Contudo o desvio padrão do peso dos animais transgênicos foi aumentando gradativamente (Figura 22A). É notório que os ratos SOD1^{G93A} param de ganhar peso e, em seguida, diminuem de peso após os 100 dias de idade (Figura 22A).

Quando analisamos os pesos individualmente verificamos que alguns animais SOD1^{G93A} começam a perder peso em torno de 90 dias de idade, enquanto os controles ainda ganham peso (Figura 22B). O perfil não é homogêneo entre os animais transgênicos: alguns animais só apresentam diminuição de peso aos 140 dias de idade (Figura 22B).

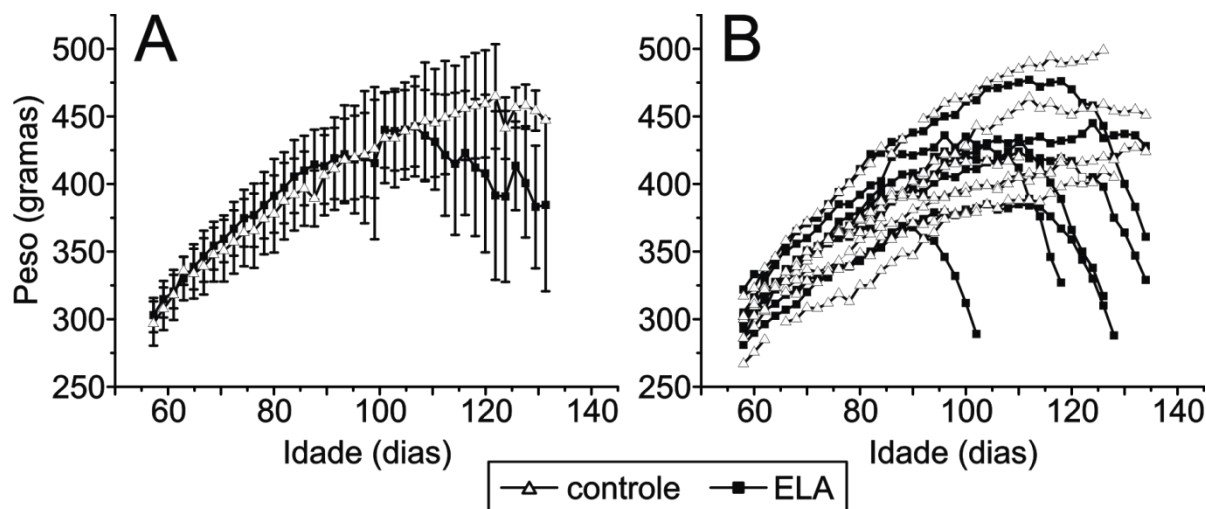


Figura 22 – Avaliação dos pesos dos animais modelo para ELA (n = 6). Apresentado como valores médio por grupo \pm desvio padrão (A), e como valores individuais de cada animal (B).

Os animais foram submetidos à avaliação física e comportamental, onde observamos a perda de força, o aparecimento e a evolução dos sinais e sintomas nos animais transgênicos. Constatamos que o aparecimento de sinais e sintomas ocorre sempre depois de o ganho de peso dos animais $SOD1^{G93A}$ ter cessado (Figura 23). Nos animais controles não foi observada qualquer alteração física ou comportamental.

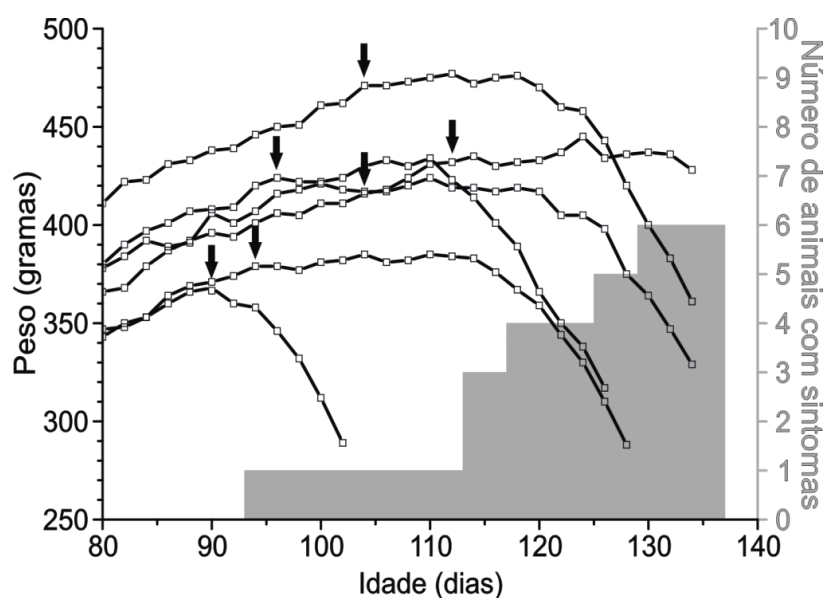


Figura 23 – Curva de peso dos animais $SOD1^{G93A}$ (linhas) comparado ao aparecimento de sintomas (barras cinza). As setas marcam o ponto de início de estabilização de peso dos animais (n = 6).

Os animais SOD1^{G93A} atingem o peso máximo em torno de 106 dias de idade, mantendo o peso estável por alguns dias. Então, os sintomas aparecem em idade aproximada de 116 dias – variando entre 94 a 130 dias. Cerca de uma semana após o aparecimento dos sintomas os animais tem perda de 15 a 20% do peso máximo (Tabela 20).

Tabela 20 – Avaliação dos ratos transgênicos SOD1^{G93A} quanto ao peso, aparecimento de sintomas e ponto de eutanásia (n = 6).

	IDADE (dias)			
	<i>Mínima</i>	<i>Mediana</i>	<i>Máxima</i>	<i>Média ± Desvio</i>
<i>Peso máximo</i>	90	110	118	106 ± 10
<i>Aparecimento de sintomas</i>	94	116	130	116 ± 13
<i>Ponto de eutanásia</i>	112	127,5	136	124 ± 13

4.3. Análise de aldeídos em cérebro e medula de ratos transgênicos SOD1^{G93A}

Com o intuito de avaliar a natureza e identidade dos aldeídos envolvidos na ELA, e testar o potencial destes compostos como biomarcadores de estresse redox, analisamos seis aldeídos – *trans,trans*-deca-2,4-dienal (DDE), *trans,trans*-nona-2,4-dienal (NDE), *trans,trans*-hepta-2,4-dienal (HeptDE), *trans,trans*-hexa-2,4-dienal (HDE), *trans*-hexa-2-enal (HE) e *trans*-4-hidroxi-2(E)-nonenal (HNE) – em cérebro e medula de ratos modelos. Derivados hidrazônicos destes aldeídos foram mensurados por espectrometria de massas acoplada à cromatografia líquida.

Foram avaliados animais em três estágios da doença: (1) assintomáticos – animais com 60 dias de idade; (2) pré-sintomáticos – animais com 90 dias de idade; e (3) sintomáticos – animais com idade entre 110-130 dias.

Por meio de metodologia desenvolvida pelo nosso grupo, fomos capazes de detectar e examinar quatro dos seis aldeídos analisados, a saber: DDE, NDE, HDE e HE. Os aldeídos HeptDE e HNE não foram detectados nas amostras analisadas. Foi feita estimativa dos níveis destes aldeídos através de curvas de calibração construídas a partir da área dos derivados hidrazônicos do respectivo aldeído (Figura 24). As curvas obtidas possuem r^2 acima de 0,9934.

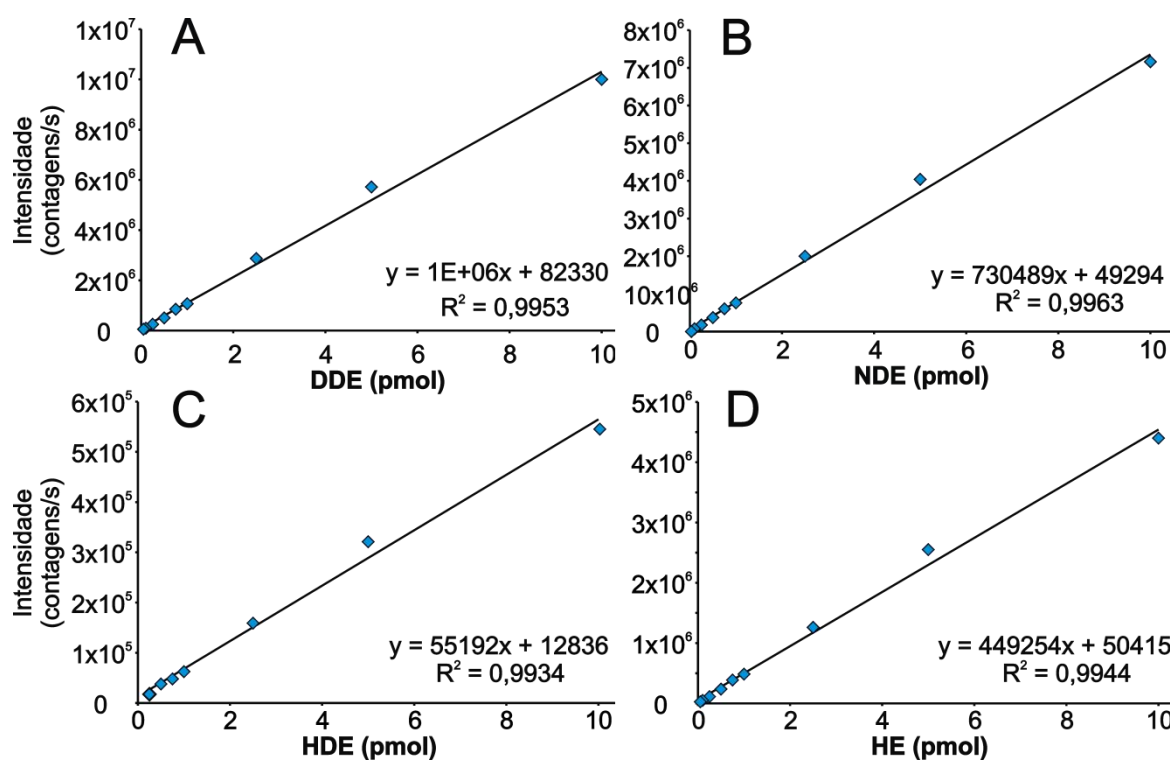


Figura 24 – Curvas de calibração de padrões de hidrazonas de: (A) *trans,trans*-deca-2,4-dienal (DDE); (B) *trans,trans*-nona-2,4-dienal (NDE); (C) *trans,trans*-hexa-2,4-dienal (HDE); e *trans*-hexa-2-enal (HE).

Os valores totais de aldeídos na medula de animais transgênicos são superiores aos de controles aos dois e aos quatro meses de idade (Figura 25A). Nestas idades, os níveis observados são maiores do que os observados em três

meses de idade (Figura 25A). Contudo, não houve alterações estatisticamente significativas para nenhum dos aldeídos e mesmo para total dos aldeídos avaliados nas medulas analisadas (Figura 25).

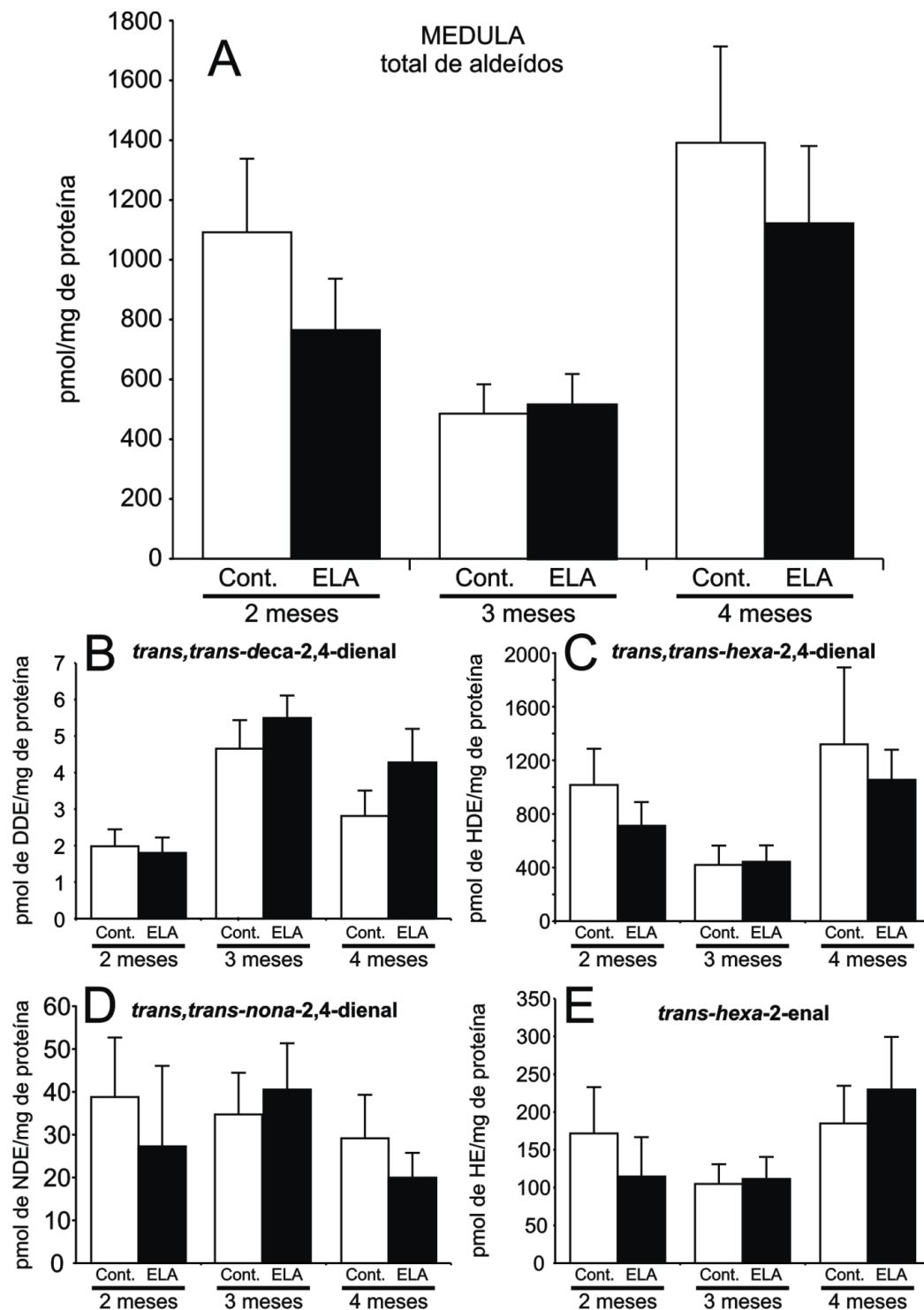


Figura 25 – Níveis de derivados hidrazônicos de aldeídos em medula de ratos transgênicos SOD1^{G93A} comparados com controle (n = 7). Os gráficos apresentam a média e desvio padrão do total dos aldeídos analisados (A), e de *trans,trans-deca-2,4-dienal* (B), *trans,trans-hexa-2,4-dienal* (C), *trans,trans-nona-2,4-dienal* (D) e *trans-hexa-2-enal* (E).

Quando analisamos os mesmo aldeídos em cérebros verificamos aumento significativo dos valores totais dos aldeídos analisados nos animais de dois e quatro meses, em relação ao controle (Figura 26A). Aos três meses os níveis observados são equivalentes. Observa-se que o perfil dos quatro aldeídos avaliados é diferente (Figura 26B – E). Não observamos diferenças entre os níveis de NDE entre os animais controles e SOD1^{G93A} em nenhuma das fases analisadas (Figura 26D). Entretanto os níveis dos aldeídos menores, HE e HDE, elevam-se nos animais modelo de ELA em estágio assintomático, são similares aos controles na fase pré-sintomática, e, novamente, estão significativamente elevados nos animais sintomáticos – cerca de quatro meses (Figura 26C e E). Os valores de DDE encontram-se elevados nos animais pré-sintomáticos e sintomáticos, comparados ao controle (Figura 26B).

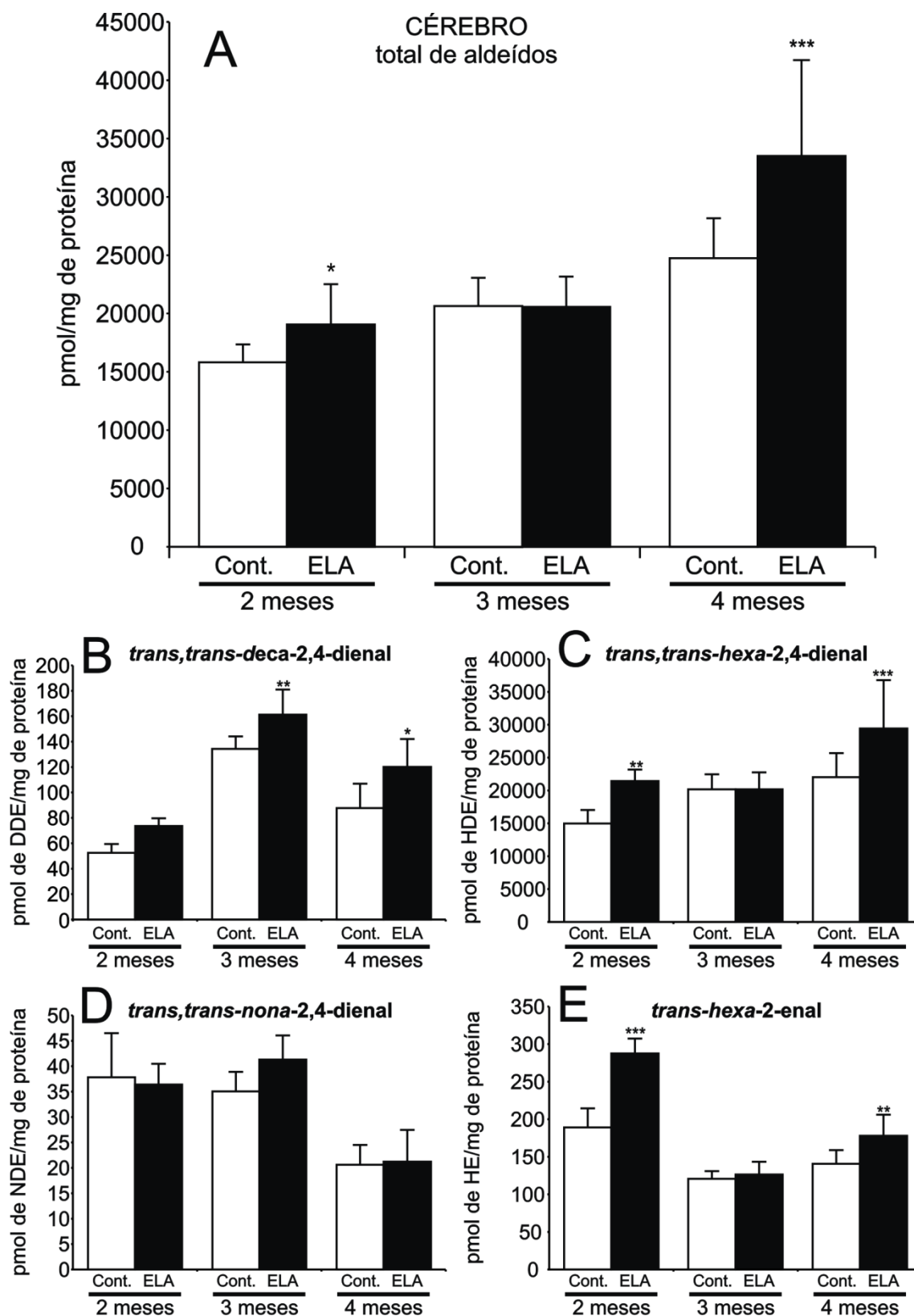


Figura 26 – Níveis de derivados hidrazônicos de aldeídos em cérebro de ratos transgênicos SOD1^{G93A} comparados com controle (n = 7). Os gráficos apresentam a média e desvio padrão do total dos aldeídos analisados (A), e de *trans,trans-deca-2,4-dienal* - DDE (B), *trans,trans-hexa-2,4-dienal* - HDE (C), *trans,trans-nona-2,4-dienal* - NDE (D) e *trans-hexa-2-enal* - HE (D). Significativamente diferente comparado com controle de mesma idade: * p<0,05; ** p< 0,01, ***p<0,001 (ANOVA one way, Tukey-Kramer como pós-teste).

4.4. Análise de glutatona

Avaliamos o estado redox dos animais modelo de ELA pela quantificação do tripeptídeo glutatona na forma reduzida (GSH) e oxidada (GSSG). Foram utilizados dois métodos de HPLC, o primeiro com detecção eletroquímica (item 3.10.1) e o segundo acoplado a espectrometria de massa (item 3.10.2). Foram feitas curvas de calibração com soluções preparadas imediatamente antes do uso. O mesmo foi feito para padrões isotopicamente marcados utilizados para espectrometria de massa. As curvas de detecção eletroquímica foram feitas plotando as áreas obtidas (Figura 27A e B) e as de espectrometria pela razão entre as áreas do analito e do padrão isotopicamente marcado (Figura 27C e D). Todas as curvas apresentaram linearidade maior que 0,9942 (Figura 27).

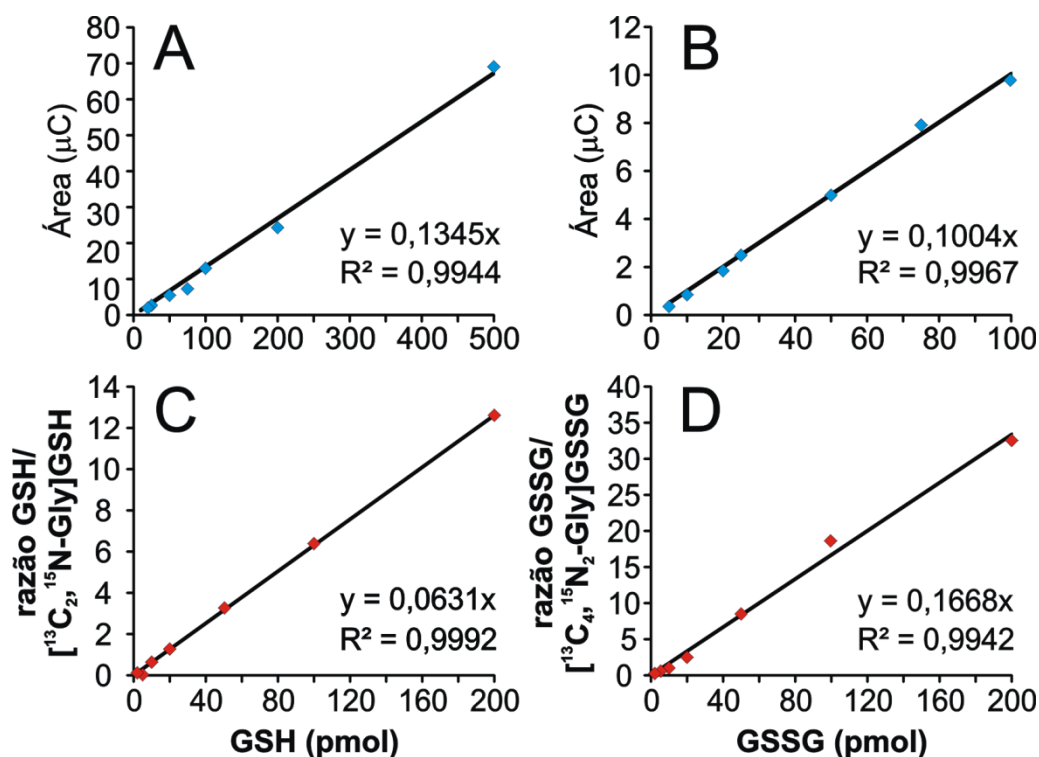


Figura 27 – Curvas de calibração de glutatona reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) por metodologias de HPLC com detecção eletroquímica (A e B, respectivamente) e acoplada à espectrometria de massa (C e D, respectivamente).

Utilizando metodologia de detecção eletroquímica não verificamos diferença significativa entre os níveis de GSH e GSSG em cérebro de ratos sintomáticos, bem como na razão GSH/GSSG (Figura 28A-C). De fato, a razão GSH/GSSG é maior nos ratos transgênicos quando comparados aos controles, porém ocorre grande variação entre os animais sintomáticos (Figura 28A). Vale ressaltar os níveis de GSH e GSSG ligeiramente reduzidos nos animais modelo (Figura 28B e C). O mesmo padrão é observado quando a correção dos valores é feita por grama de tecido analisado (Tabela 21). Verificamos uma diminuição significativa nos níveis totais de glutathiona (GSH + GSSG) nos animais $SOD1^{G93A}$ (Figura 28D).

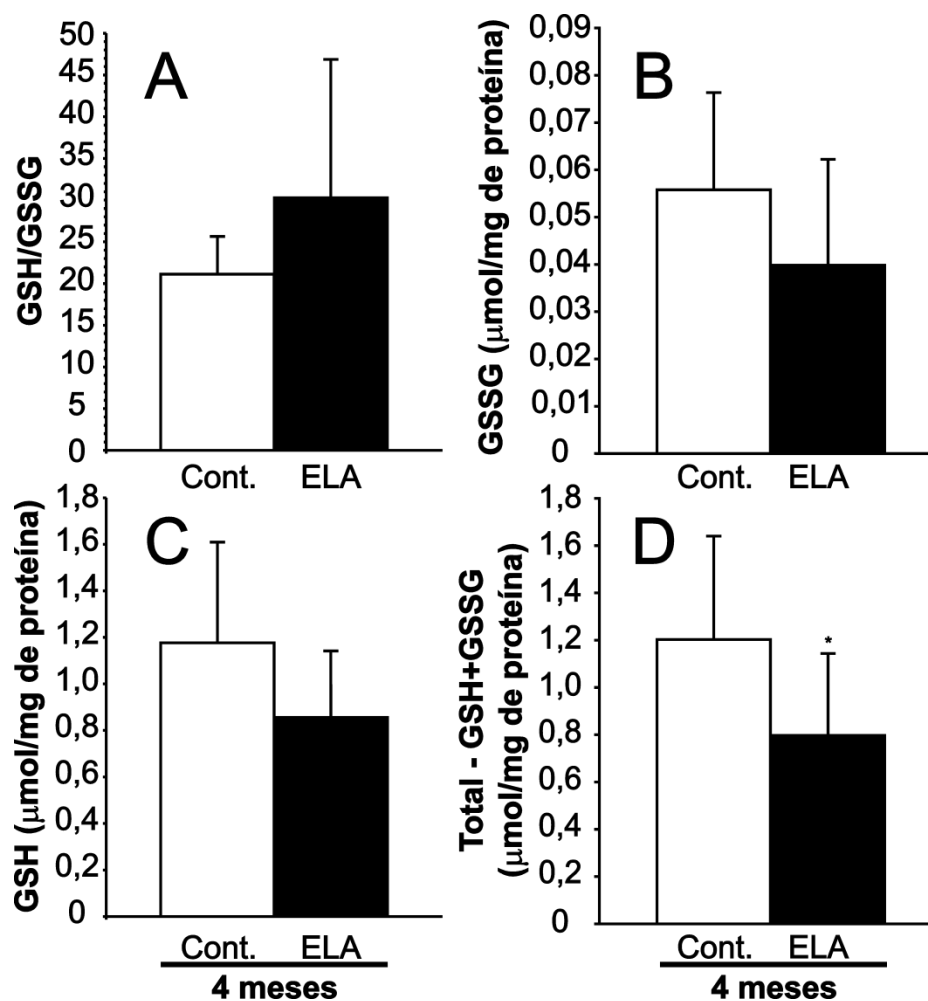


Figura 28 – Dosagem de glutathiona em cérebros de ratos por HPLC com detecção eletroquímica. (A) Razão GSH/GSSG; (B) quantificação de GSSG; (C) quantificação de GSH, (D) total de GSH e GSSG. * $p < 0,05$.

Tabela 21 – Concentração de glutathiona reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) obtida por detecção eletroquímica em cérebro de ratos

	Concentração ($\mu\text{mol/g}$ de tecido)	
	GSH	GSSH
Controle	$0,858 \pm 0,246$	$0,041 \pm 0,014$
ELA	$0,757 \pm 0,153$	$0,031 \pm 0,012$

Desenvolvemos um método de HPLC acoplado a espectrometria de massas utilizando o modo de monitoramento de reações selecionadas (SRM) analisando duas transições para cada molécula, a primeira para quantificação e um segunda para confirmação (Figura 29).

Quando analisamos outro grupo de animais – também sintomáticos – por espectrometria de massas, observamos razões entre a forma reduzida e oxidada semelhantes aos obtidos por detecção eletroquímica (Figura 30A). Contudo, agora as razões entre os animais modelo de ELA e controle são similares, parecendo haver uma tendência de diminuição nos animais sintomáticos.

Na análise por espectrometria de massa igualmente não observamos diferenças entre os níveis de glutathiona reduzida ou oxidada entre animais modelo de ELA e controles (Figura 30B e C), mesmo para os valores totais (GSH + GSSG) (Figura 30D). Contudo, os desvios obtidos – entre 10,4 e 27,2% da média – são menores que os obtidos por detecção eletroquímica – entre 21,4 e 77,8%.

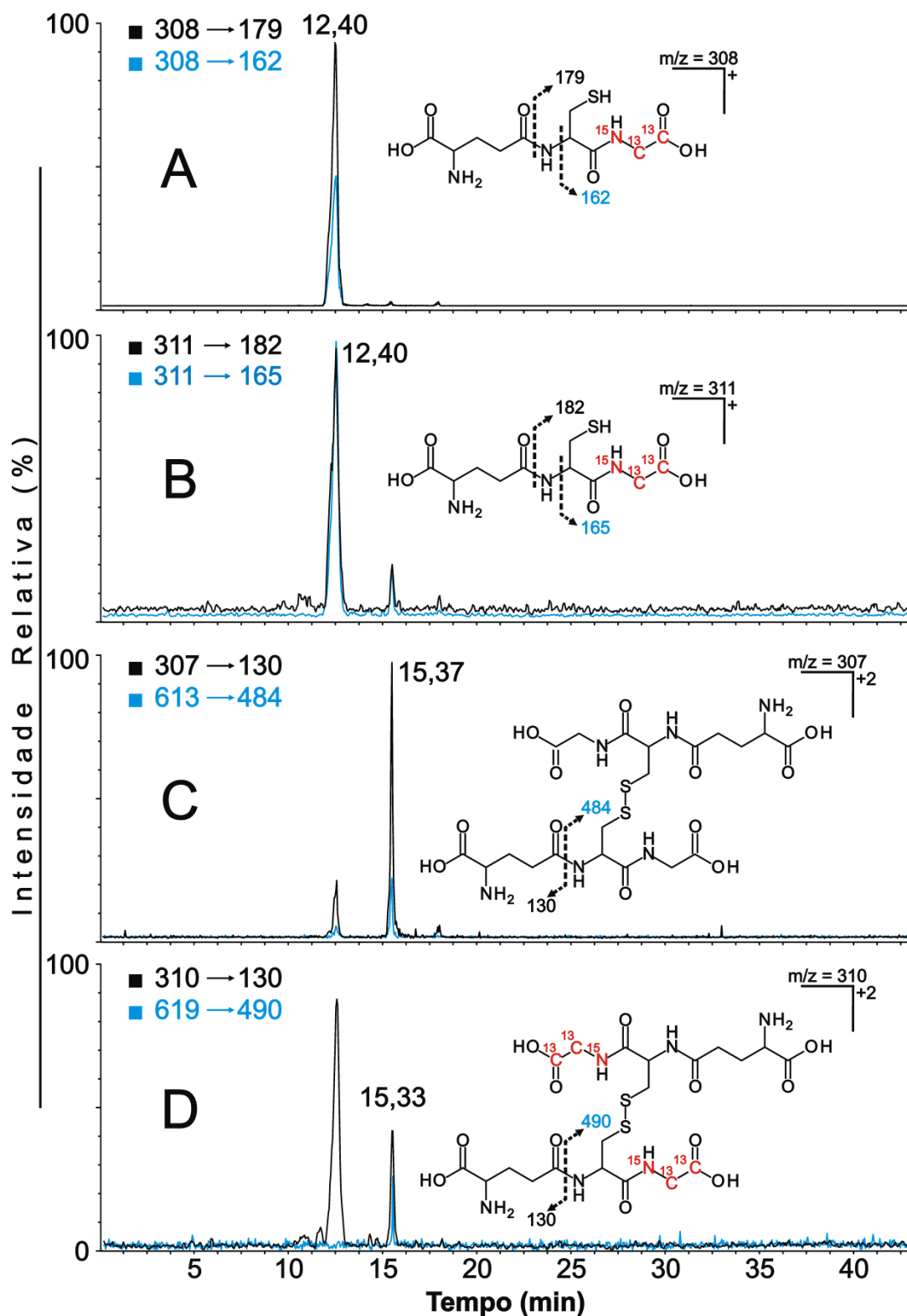


Figura 29 – Análise de glutatona reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) por HPLC-MS em modo SRM em cérebros de ratos sintomáticos. Cromatogramas das transições de GSH (A), [¹³C₂, ¹⁵N-Gly]-GSH (B), GSSG (C) e [¹³C₄, ¹⁵N₂-Gly]-GSSG (D).

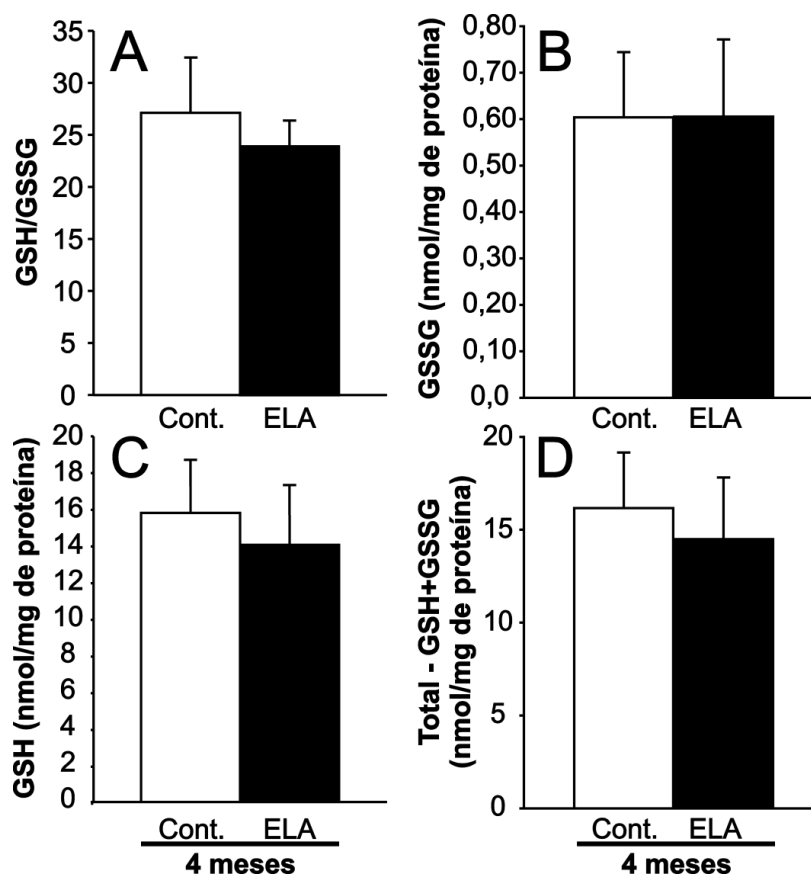


Figura 30 – Dosagem de glutatona em cérebros de ratos por HPLC-MS/MS em modo SRM positivo. (A) Razão GSH/GSSG; (B) quantificação de GSSG; (C) quantificação de GSH; e (D) níveis totais de glutatona – GSH + GSSG.

4.5. Síntese, purificação e caracterização de adutos de glutatona

4.5.1. Síntese, purificação e caracterização do aduto Glutationil-4-hidroxinona-1-ol (GS-HNE)

A síntese do aduto de glutatona (GSH) com *trans*-4-hidroxi-2(E)-nonenal (HNE) foi feita conforme descrito por Falletti (Falletti et al., 2007), com pequenas

modificações. Aproximadamente 5×10^{-5} mols de HNE foram incubados com 20×10^{-5} mols de GSH a 25°C por 1 hora. Após este período não foi observada qualquer alteração visual na solução.

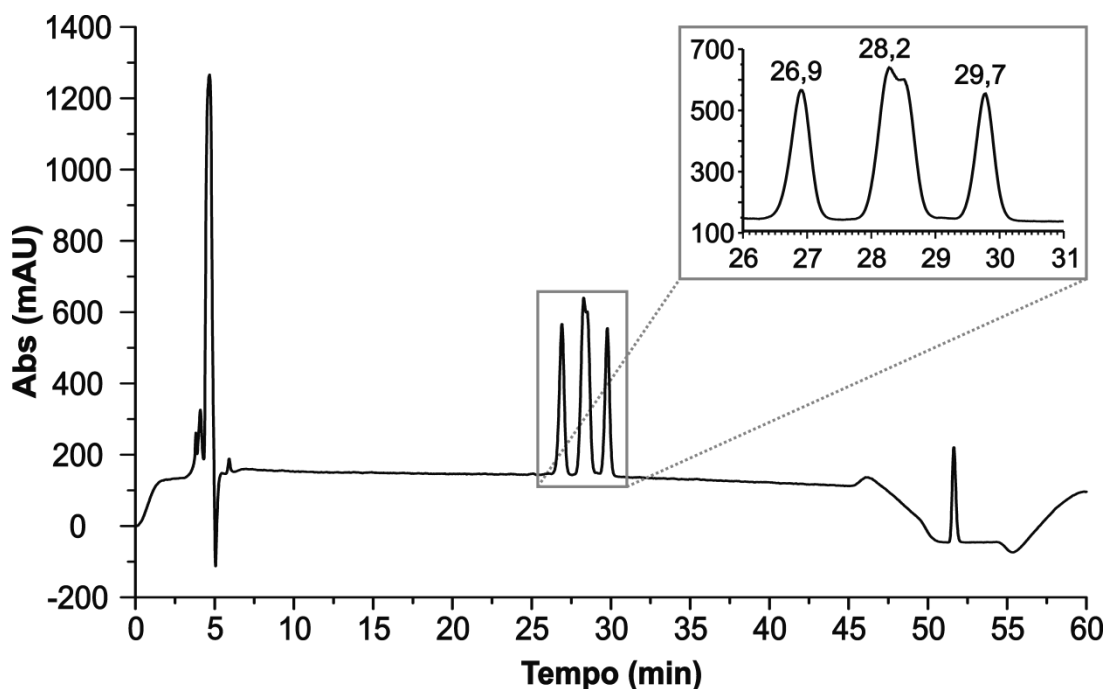


Figura 31 – Cromatograma a 220nm da purificação do aduto glutationil-4-hidroxinona-1-ol.

Para purificar o aduto glutationil-4-hidroxinona-1-ol (GS-HNE) foi desenvolvido método cromatográfico, conforme descrito na Tabela 12. Quando a mistura reacional foi injetada no sistema de HPLC, observou-se três picos cromatográficos de interesse entre 26 e 30 min que foram coletados separadamente (Figura 31). Não foram observados outros picos que pudessem indicar a formação de subprodutos na síntese.

Os eluatos coletados foram liofilizados e o produto obtido pesado, e o rendimento final calculado em 85,5% (Tabela 22).

Tabela 22 – Rendimento obtido na síntese e purificação do aduto glutationil-4-hidroxinona-1-ol (GS-HNE)

	Massa (mg)	Rendimento (%)
<i>Massa Total esperada</i>	<i>23,15</i>	<i>100</i>
Pico 1 (26,9 min)	5,2	22,5
Pico 2 (28,2 min)	10,4	44,9
Pico 3 (29,7 min)	4,2	18,1
<i>Massa total obtida</i>	19,8	85,5

A caracterização de GS-HNE foi feita por espectrometria de massa (MS) e ressonância magnética nuclear (RMN). A análise de MS por injeção direta apresentou um espectro de massas limpo (Figura 32), onde se observa o pico da molécula protonada $[M+H]^+$ $m/z = 464$ e de desidratação $[M+H-H_2O]^+$ $m/z = 446$, conforme descrito por Falletti (Falletti et al., 2007), nas três frações coletadas. Não foram observados picos de impurezas nas frações coletadas.

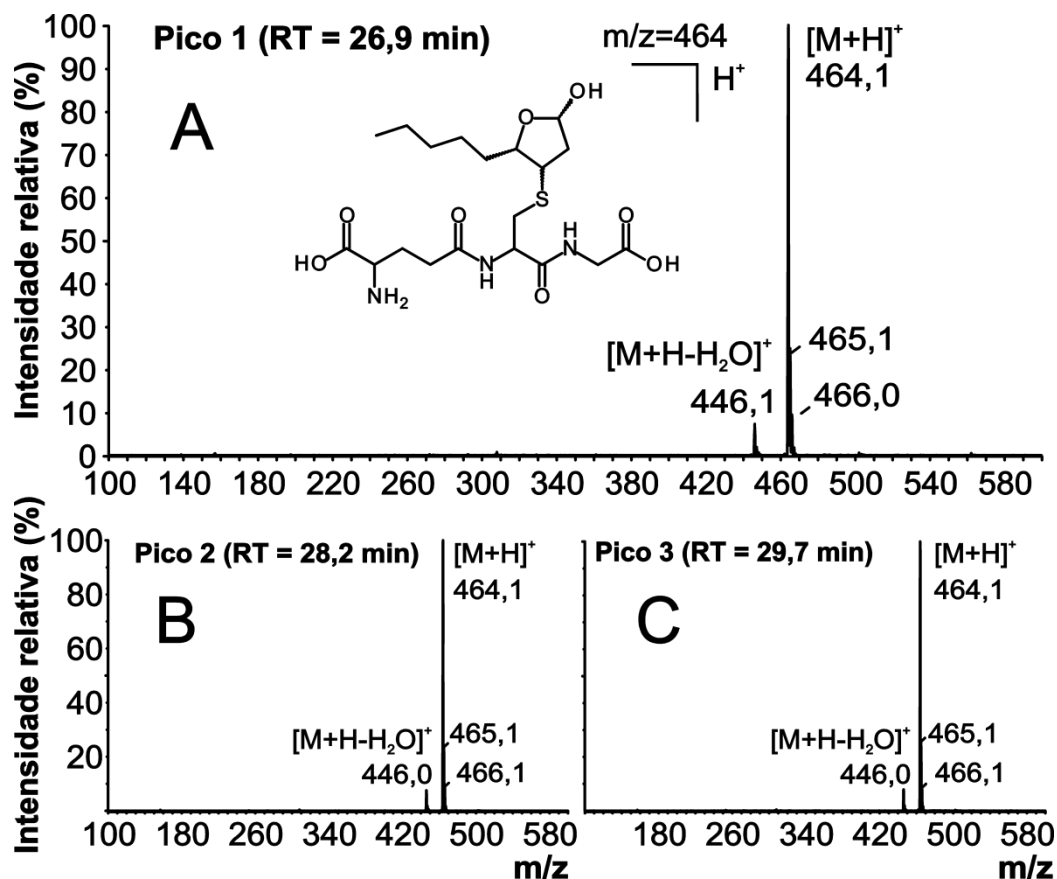


Figura 32 – Espectro de massa obtido por injeção direta das três frações coletadas na purificação do aduto glutationil-4-hidroxinona-1-ol (GS-HNE). Espectros do pico 1 (A), pico 2 (B) e pico 3 (C). RT – tempo de retenção

O perfil de fragmentação da molécula protonada $[M+H]^+$ $m/z = 464$ é característico do aduto GS-HNE (Figura 33) e idêntico nas três frações coletadas. Obtivemos os mesmos íons fragmentos descritos na literatura (Völkel, 2005), como pode ser visto no Esquema 2.

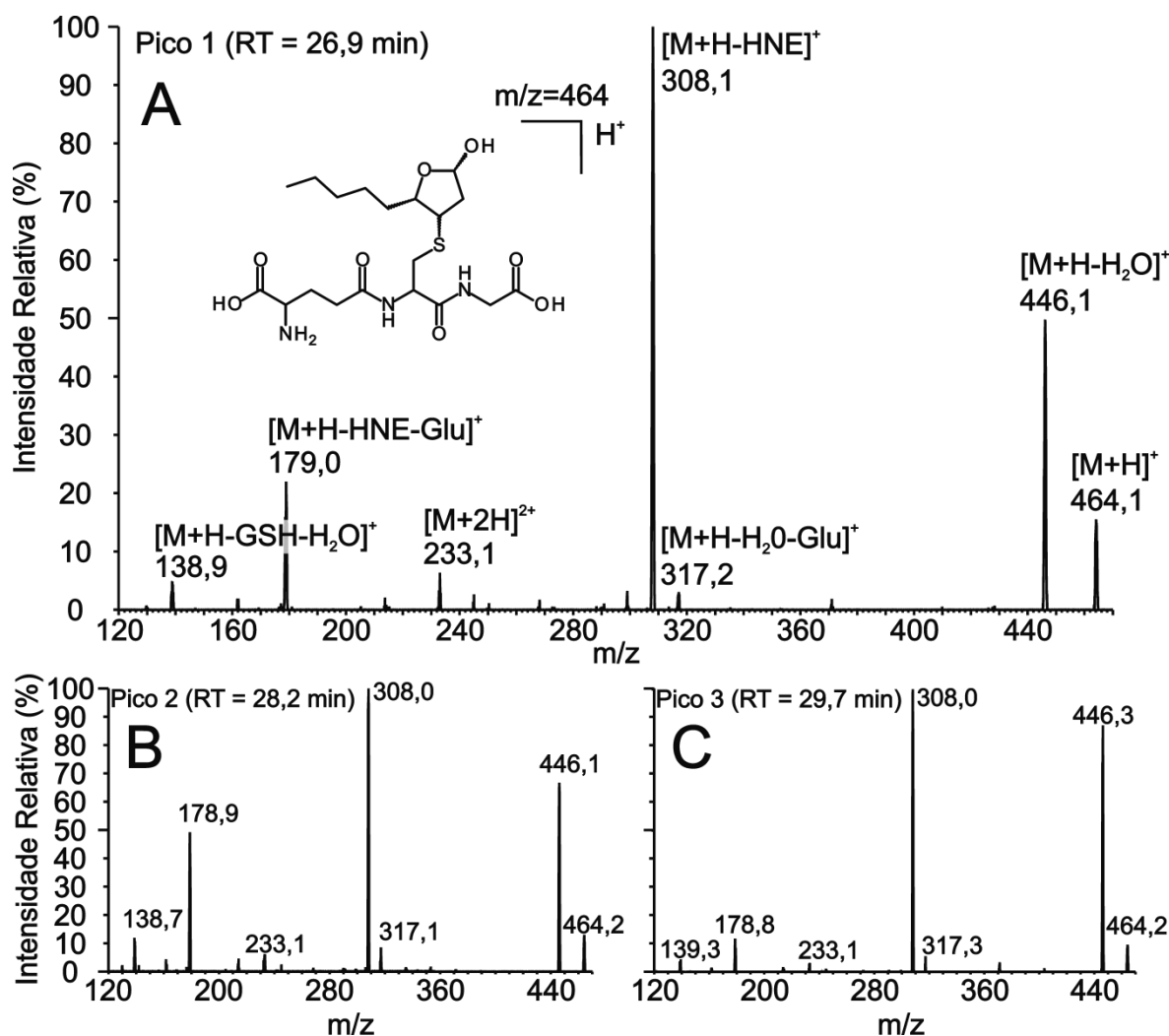
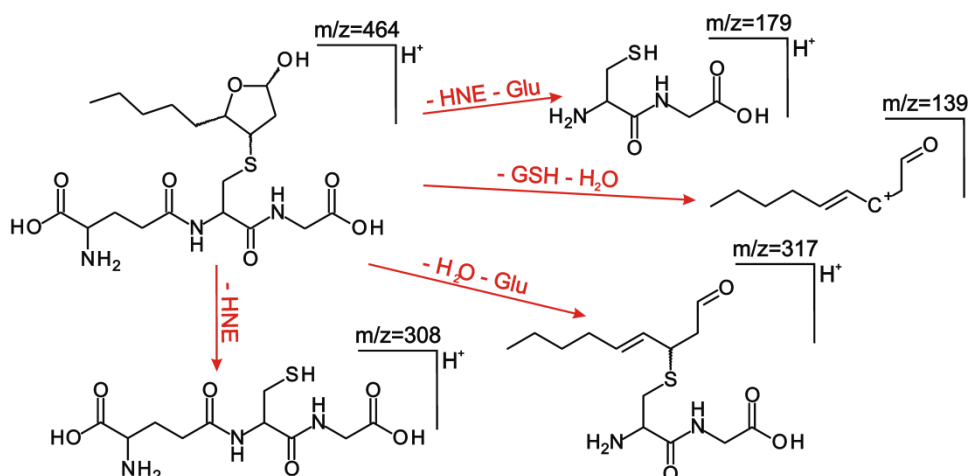


Figura 33 – Espectro de fragmentação da molécula protonada $[M+H]^+$ $m/z = 464$ das três frações purificadas do aduto glutationil-4-hidroxinona-1-ol (GS-HNE). Espectros do pico 1 (A), pico 2 (B) e pico 3 (C).



Esquema 2 – Representação das principais fragmentações do aduto glutationil-4-hidroxinona-1-ol (GS-HNE) por espectrometria de massa com fonte eletrospray (ESI) em modo positivo.

Análises de RMN confirmam a identidade dos três picos. O espectro de RMN de hidrogênio (RMN ^1H) da primeira fração apresenta sinais dos hidrogênios H-3, H-4, H-6 e H-19 em $\delta = 2,19$; 2,57; 4,58 e 0,90 ppm, respectivamente (Figura 34), característicos de GS-HNE (Falletti et al., 2007).

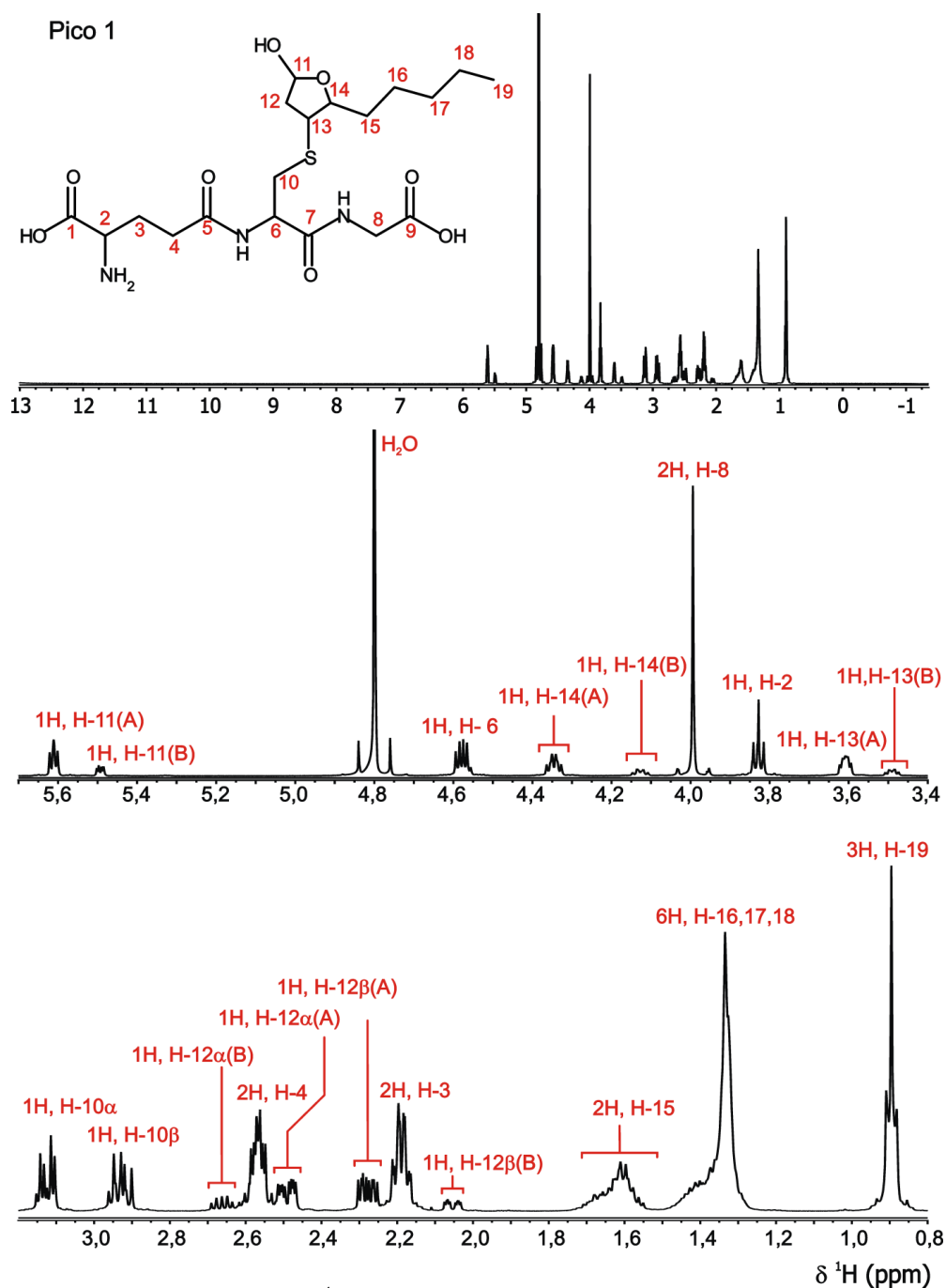


Figura 34 – Espectro RMN ^1H , em D_2O , da primeira fração coletada na purificação do aduto glutationil-4-hidroxinona-1-ol (GS-HNE).

O perfil do espectro indica uma mistura de dois isômeros (A e B). Pela integração de área dos sinais verificamos que a proporção do isômero A em relação ao isômero B é de 3,32, como visto na Tabela 23 que apresenta os deslocamentos químicos e as constantes de acoplamento deste par enantiomérico.

Tabela 23 – Deslocamentos químicos no espectro de RMN ^1H , em D_2O , da primeira fração coletada na purificação do aduto glutationil-4-hidroxinona-1-ol (GS-HNE).

<i>Posição</i>	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	<i>Integração</i> (razão A/B)	<i>Números de</i> <i>H</i>	<i>Multiplicidade</i>	<i>J</i> (Hz)
H-2	3,83	1,05	1	td	6,5; 1,4
H-3	2,19	2,07	2	ddd	14,4; 7,8; 2,2
H-4	2,57	2,02	2	td	7,3; 3,9
H-6	4,58	1,00	1	dt	9,5; 4,8
H-8	3,99	2,01	2	s	-
H-10 α	3,13	0,99	1	dt	14,0; 5,0
H-10 β	2,93	1,00	1	dt	14,0; 8,1
H-11 (A)	5,61	0,73	1	dd	5,3; 4,6
H-11 (B)	5,49	0,22 (3,32)		dd	6,1; 2,6
H-12 α (A)	2,49	0,78	1	ddd	14,4; 5,7; 3,2
H-12 α (B)	2,66	0,29 (2,69)		dt	13,6; 6,7
H-12 β (A)	2,28	0,77	1	ddd	14,3; 6,4; 4,4
H-12 β (B)	2,05	0,24 (3,21)		ddd	14,3; 4,1; 2,8
H-13 (A)	3,64 – 3,58	0,74	1	m	-
H-13 (B)	3,49	0,23 (3,22)		dt	7,0; 4,8
H-14 (A)	4,35	0,75	1	dd	11,5; 6,8
H-14 (B)	4,15 – 4,10	0,24 (3,13)		m	-
H-15	1,74 – 1,54	2,07	2	m	-
H-16,17,18	1,50 – 1,25	6,35	6	m	-
H-19	0,90	3,13	3	t	7,0

Para correta atribuição dos sinais foram feitas análises de RMN ^{13}C (Figura 35), DEPT (Figura 36), correlações heteronucleares bidimensional a curta distância ^1H - ^{13}C – HMQC (Figura 37) e correlações heteronucleares bidimensional a longa distância ^1H - ^{13}C – HMBC (Figura 38) desta fração.

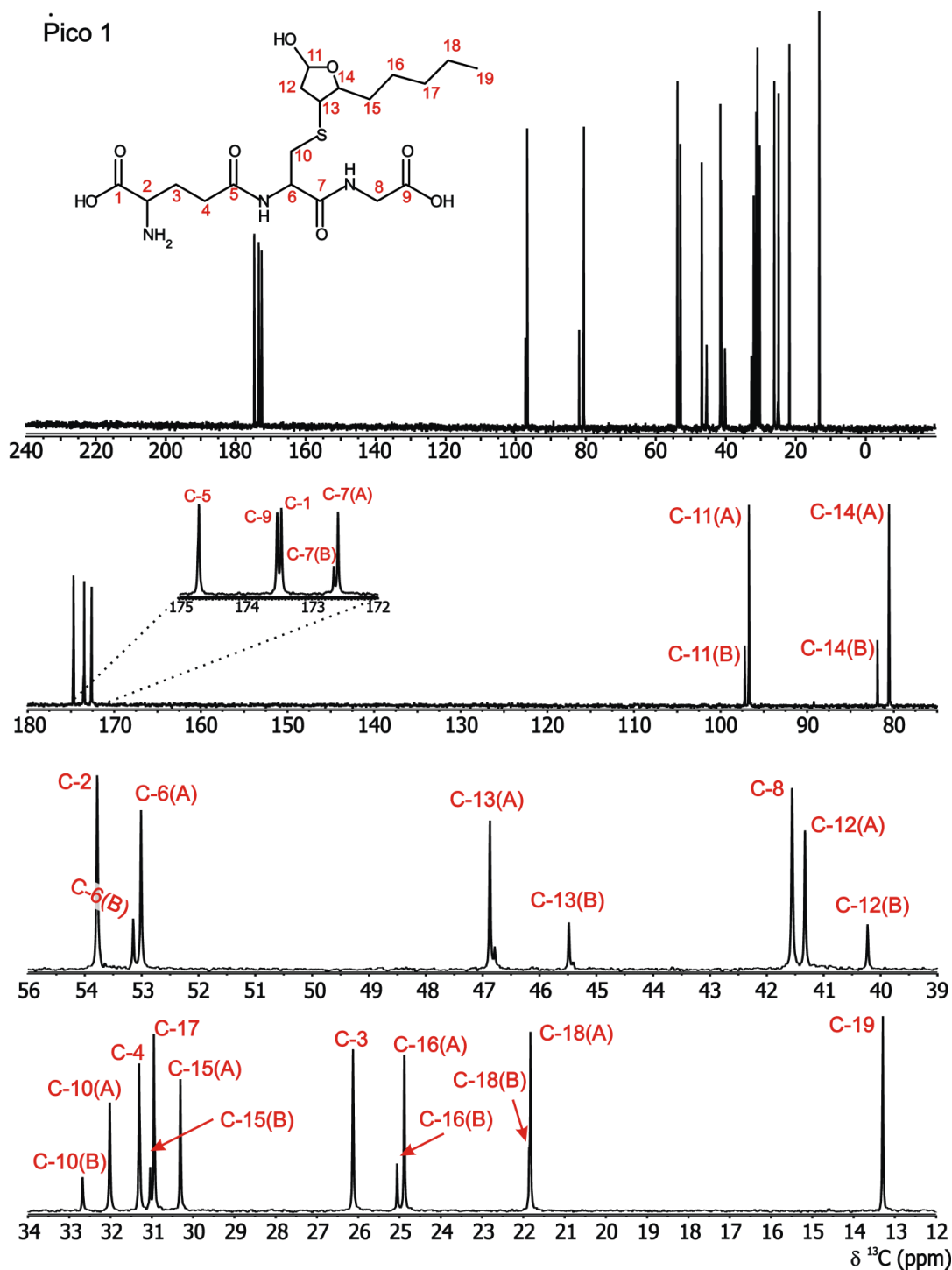


Figura 35 – Espectro RMN ^{13}C , em D_2O , da primeira fração coletada na purificação do aduto glutatíonil-4-hidroxinona-1-ol (GS-HNE).

O espectro de RMN ^{13}C apresentou 29 sinais (Figura 35). Os carbonos C-3 (26,13 ppm) e C-4 (31,31 ppm) foram confirmados pelo acoplamento a curta distância com os prótons H-3 (2,19 ppm) e H-4 (2,57 ppm), respectivamente, e pelos sinais invertidos no espectro DEPT (Figura 36). H-2 em 3,83 ppm acopla a longa distância com C-3 e C-4 (9 e 10, Figura 39). Enquanto C-2 (53,78 ppm) acopla a curta distância com H-2 (21, Figura 37) e a longa com H-3 e H-4 (49 e 50, Figura 40).

Os carbonos da cadeia alifática lateral apareceram em região de campo alto ($\delta < 35$ ppm). C-19 (13,29 ppm) acopla a longa o multipletto entre 1,50 – 1,25 dos prótons H-17 e H-18 (19, Figura 40). O próton H-16, também nesta região, acopla com o carbono C-16 em 24,88 ppm (5, Figura 37).

O próton H-15, atribuído ao multipletto em 1,74 – 1,54 ppm (25 e 32, Figura 40), acopla com os C-15 (A) e (B) em 30,31 e 31,04 ppm (7, Figura 37). Os prótons H-11 dos isômeros apresentam como sinais distintos em 5,49 (B) e 5,61 (A) ppm. Verifica-se ainda os isômeros dos prótons: H-14 (A) em 4,35 ppm e H-14(B) em 4,15 – 4,10 ppm, H-13(A) em 3,64 – 3,58 ppm e H-13(B) em 3,49 ppm (Figura 34). A razão entre os sinais destes prótons é de 3,13 (H-14) e 3,22 (H-13).

Para os prótons H-12 há quatro sinais: H-12 α (A) – 2,49 ppm, H-12 β (A) – 2,28 ppm, H-12 α (B) – 2,66 ppm e H-12 β (B) – 2,05 ppm, sendo a razão calculada entre os isômeros de 2,69, para H α , e 3,21, para H β . Baseado nestes resultados estima-se que o isômero A está $3,11 \pm 0,25$ vezes mais concentrado que o B.

Os sinais dos carbonos C-12, C-13 e C-14 apareceram com deslocamentos diferentes em cada isômero, o que pode ser visto pelo padrão de acoplamento a curta distância (12, 13, 14, 15, 18, 19, 23 e 24, Figura 37). O acoplamento a longa distância ratifica C-12(A) em 41,33 ppm (1, 13 e 15, Figura 39), C-12(B) em 40,23 ppm (2 e 16, Figura 39), C-13(A) em 46,87 ppm (38, 40, 41, 42, 44 e 46, Figura 40), C-13(B) em

45,48 ppm (37, 39, 43 e 45, Figura 40), C-14(A) em 80,54 ppm (52 e 53, Figura 41) e C-14(B) em 81,89 ppm (51 e 54, Figura 41).

Os carbonos quaternários aparecem em campo mais baixo, entre 172 e 175 ppm, visto que não fornecem sinal no espectro DEPT (Figura 36). O carbono C-7 apresentou sinal em 172,61 ppm acoplado com os prótons H-6, H-8, H-10 α e H-10 β (67, 69, 72 e 73, Figura 43). O C-5 em 174,71 ppm, acoplado com H-3, H-4 e H-6 (76, 74 e 68, Figura 43). O C-1 em 173,46 ppm acopla com H-2 e H-3 (71 e 75, Figura 43), e o C-9 em 173,52 acopla com H-8 (70, Figura 43).

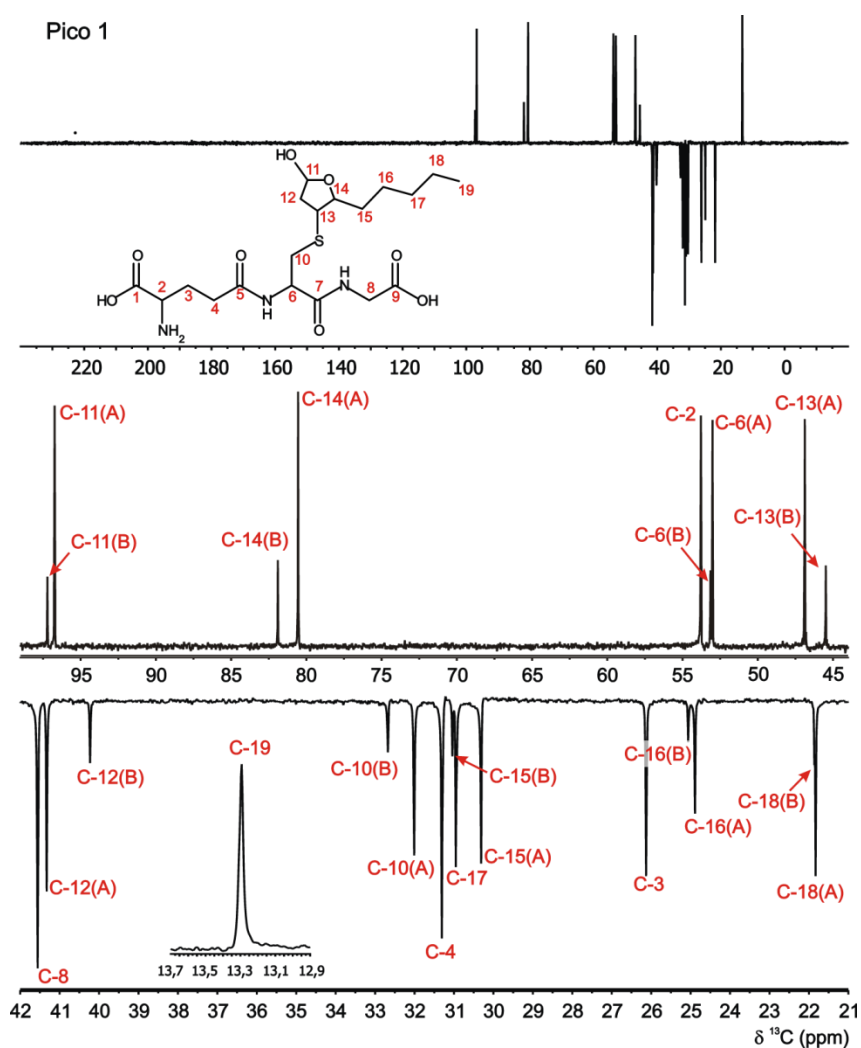


Figura 36 – Espectro DEPT, em D₂O, da primeira fração coletada na purificação do aduto glutatíonil-4-hidroxinona-1-ol (GS-HNE).

Tabela 24 – Deslocamentos químicos no espectro de RMN ^{13}C , em D_2O , da primeira fração coletada na purificação do aduto glutationil-4-hidroxinona-1-ol (GS-HNE).

<i>Posição</i>	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	<i>Tipo</i>
C-1	173,46	C- <u>C</u> OOH
C-2	53,78	HOOC- <u>C</u> (NH ₂)-C
C-3	26,13	C- <u>C</u> H ₂ -C
C-4	31,31	C- <u>C</u> H ₂ -CO
C-5	174,71	C- <u>C</u> O-N
C-6(A)	53,01	HN- <u>C</u> (CH ₂)-CO
C-6(B)	53,15	
C-7(A)	172,61	C- <u>C</u> O-N
C-7(B)	172,67	
C-8	41,56	HN- <u>C</u> H ₂ -COOH
C-9	173,52	C- <u>C</u> OOH
C-10(A)	32,02	C- <u>C</u> H ₂ -S
C-10(B)	32,68	
C-11(A)	96,73	O- <u>C</u> (CH ₂)-O
C-11(B)	97,21	
C-12(A)	41,33	C- <u>C</u> H ₂ -C
C-12(B)	40,23	
C-13(A)	46,87	C- <u>C</u> S-C
C-13(B)	45,48	
C-14(A)	80,54	C- <u>C</u> (CH ₂)-O
C-14(B)	81,89	
C-15(A)	30,31	C- <u>C</u> H ₂ -C
C-15(B)	31,04	
C-16(A)	24,88	C- <u>C</u> H ₂ -C
C-16(B)	25,06	
C-17	30,95	C- <u>C</u> H ₂ -C
C-18(A)	21,83	C- <u>C</u> H ₂ -C
C-18(B)	21,85	
C-19	13,29	C- <u>C</u> H ₃

O próton H-8, atribuído ao singlete em 3,99 ppm, acopla a curta distância com o C-8 em 41,56 ppm (20, Figura 37). Os prótons H-10 também apresentam sinais diferentes para H-10 α , em 3,13 ppm, e H-10 β , em 2,93 ppm. Logo, C-10 aparece em 32,02 ppm (A) e em 32,68 ppm (B) (16 e 17, Figura 37).

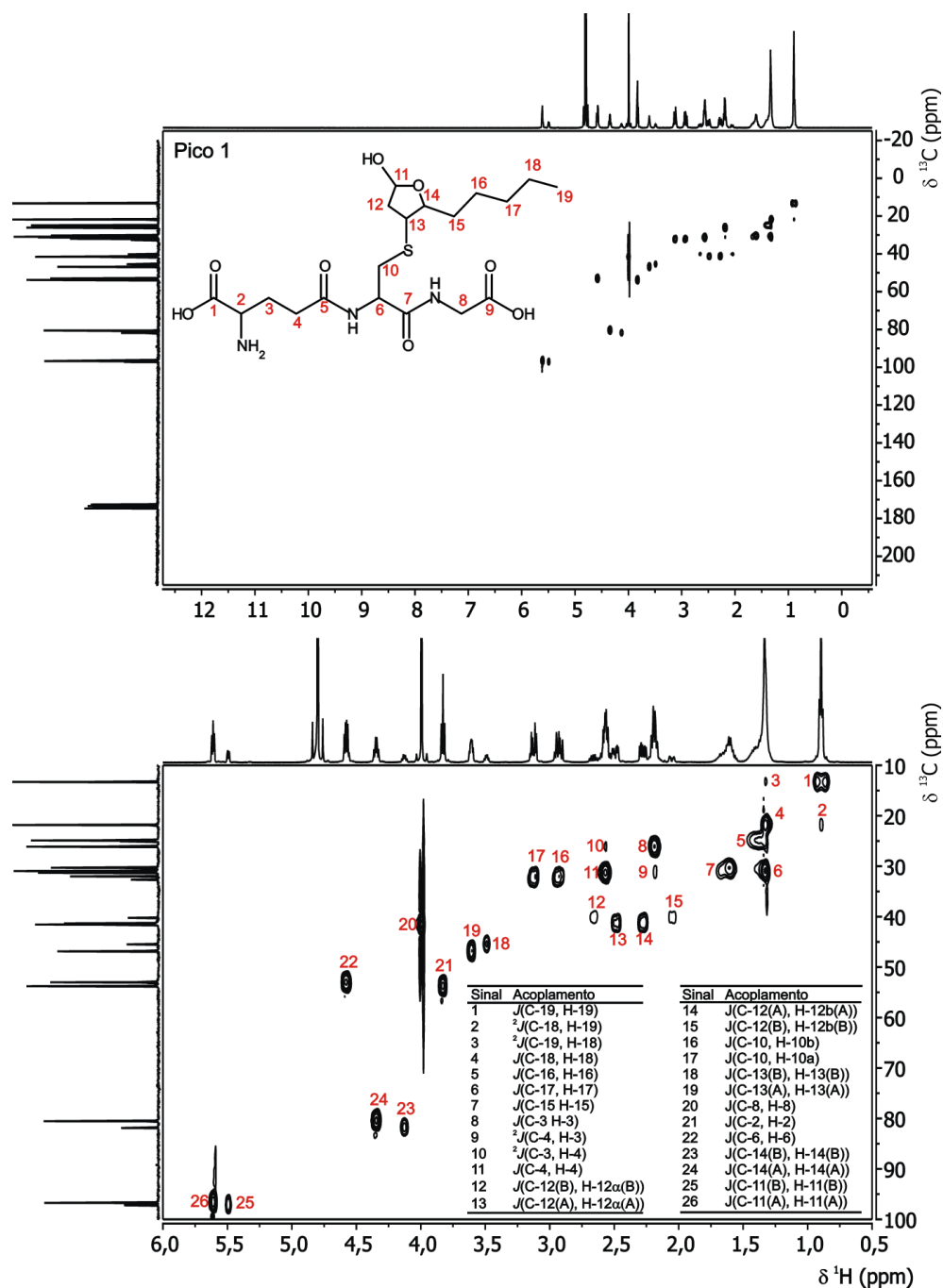


Figura 37 – Espectro de RMN de correlações heteronucleares a curta distância ^1H - ^{13}C (HMQC), em D_2O , da primeira fração coletada na purificação do aduto glutationil-4-hidroxinona-1-ol (GS-HNE).

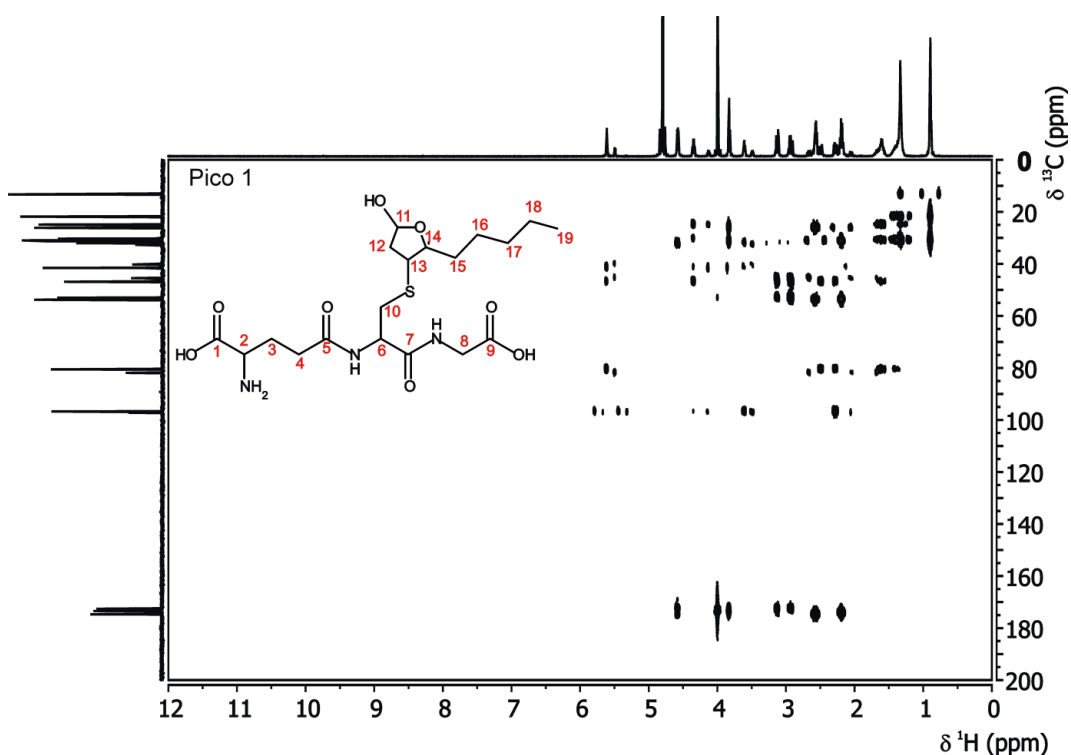


Figura 38 – Espectro de RMN de correlações heteronucleares a longa distância ^1H - ^{13}C (HMBC), em D_2O , da primeira fração coletada na purificação do aduto glutationil-4-hidroxinona-1-ol (GS-HNE).

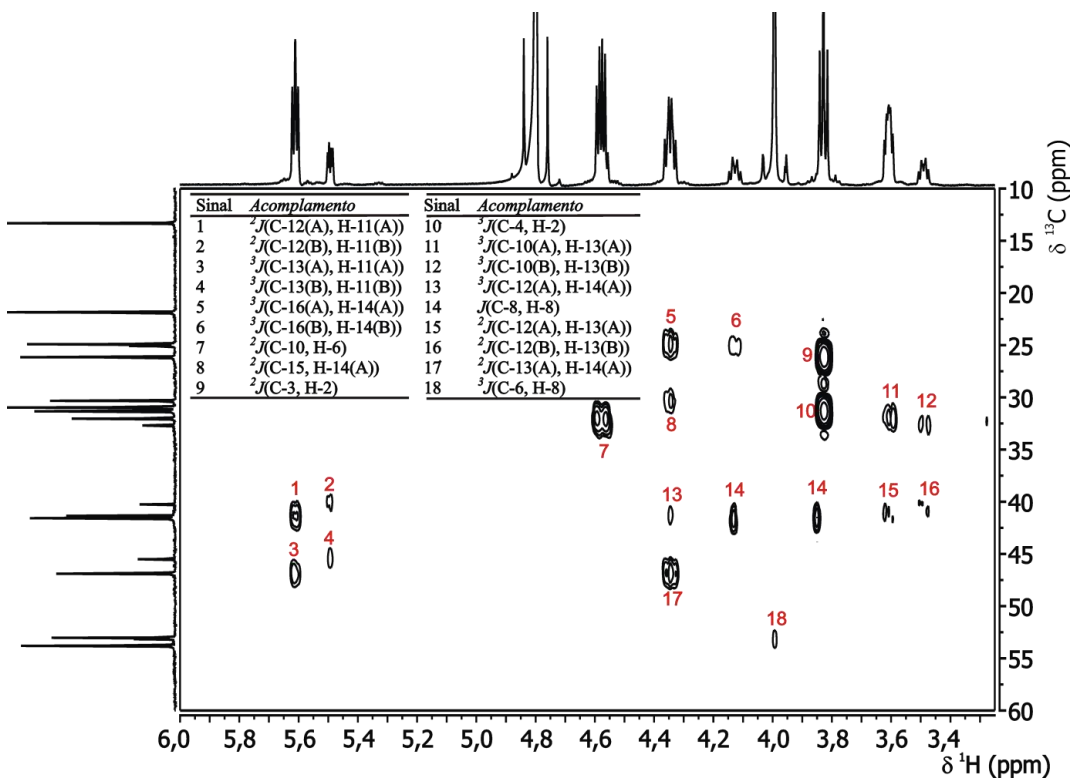


Figura 39 – Região de campo baixo do ^1H e campo alto de ^{13}C do espectro HMBC da primeira fração coletada na purificação do aduto glutationil-4-hidroxinona-1-ol (GS-HNE).

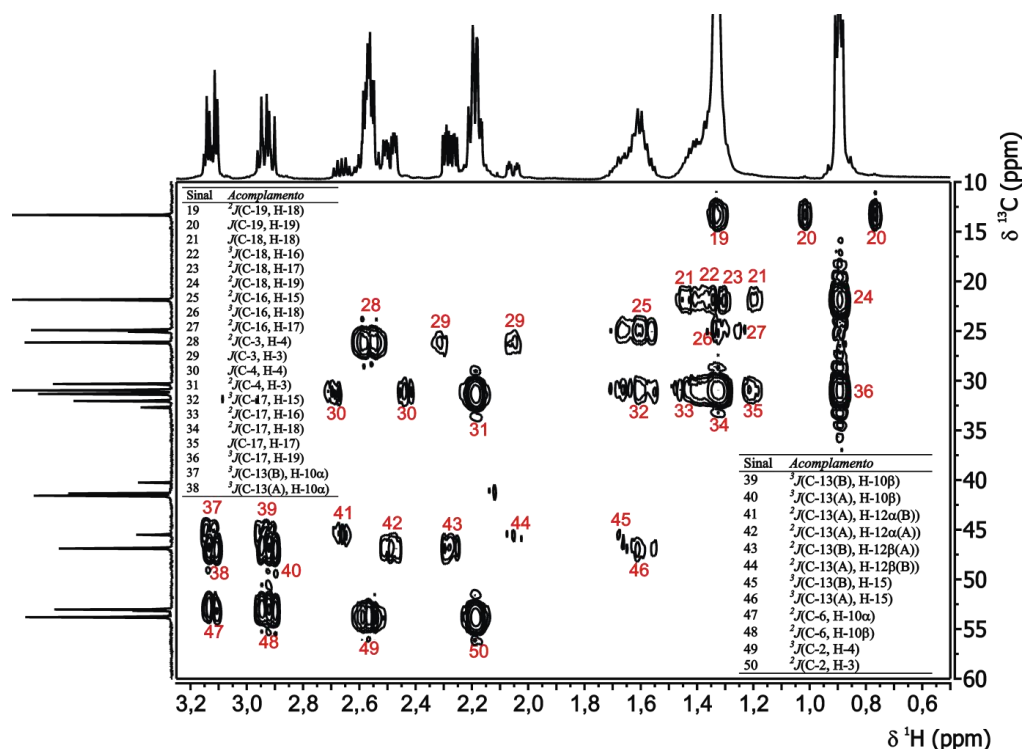


Figura 40 – Região de campo alto do espectro HMBC da primeira fração coletada na purificação do aduto glutationil-4-hidroxinona-1-ol (GS-HNE).

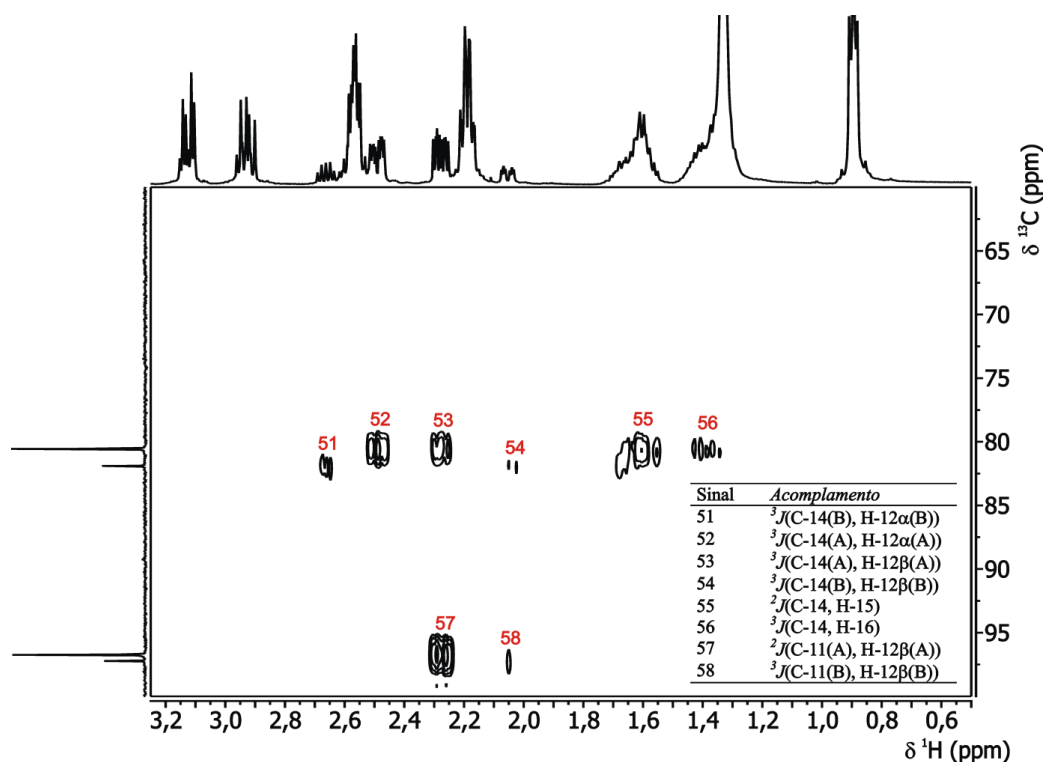


Figura 41 – Região de campo alto de 1H e baixo de ^{13}C do espectro HMBC da primeira fração coletada na purificação do aduto glutationil-4-hidroxinona-1-ol (GS-HNE).

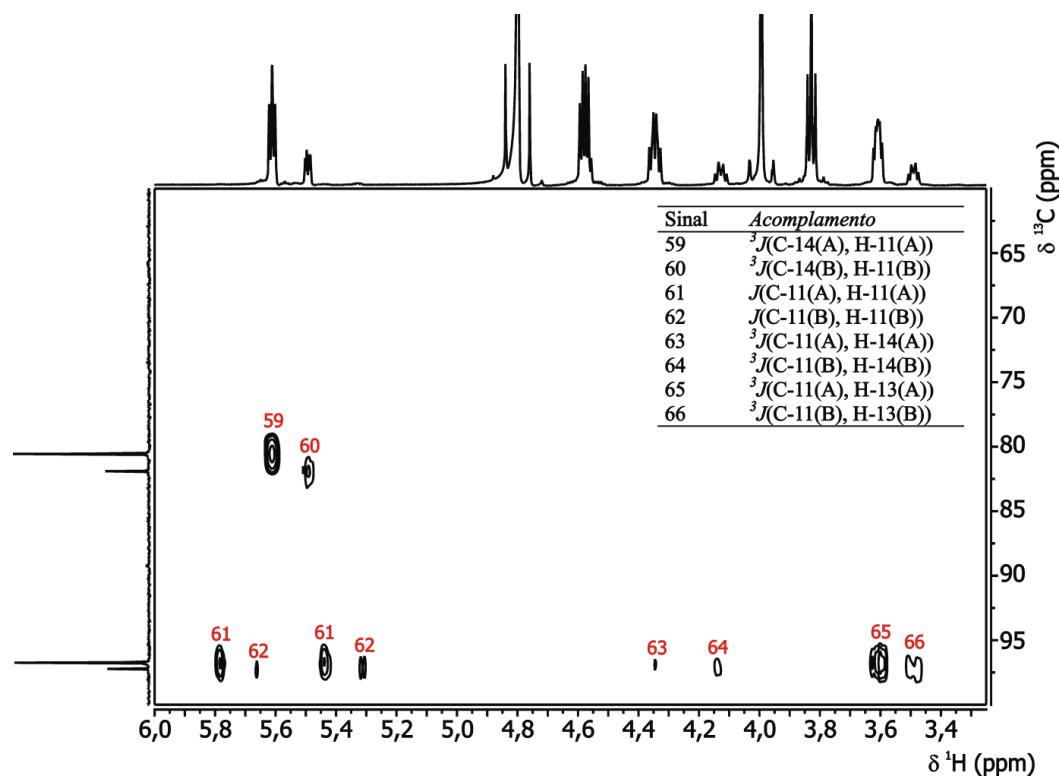


Figura 42 – Região de campo baixo do espectro HMBC da primeira fração coletada na purificação do aduto glutationil-4-hidroxinona-1-ol (GS-HNE).

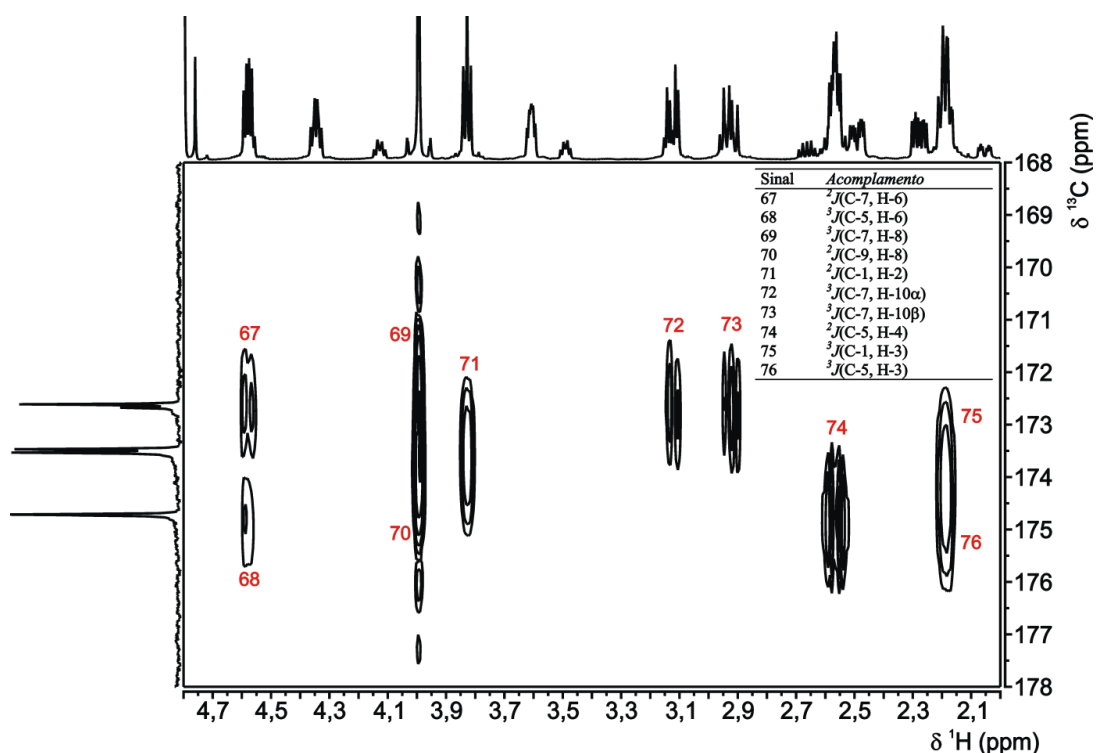


Figura 43 – Região das carbonilas do espectro HMBC da primeira fração coletada na purificação do aduto glutationil-4-hidroxinona-1-ol (GS-HNE).

As atribuições dos sinais para as outras duas frações foram feitas por comparação com o espectro da primeira fração. O espectro de RMN ^1H do pico 2 (Figura 44) demonstra a mistura de 4 isômeros (C a F).

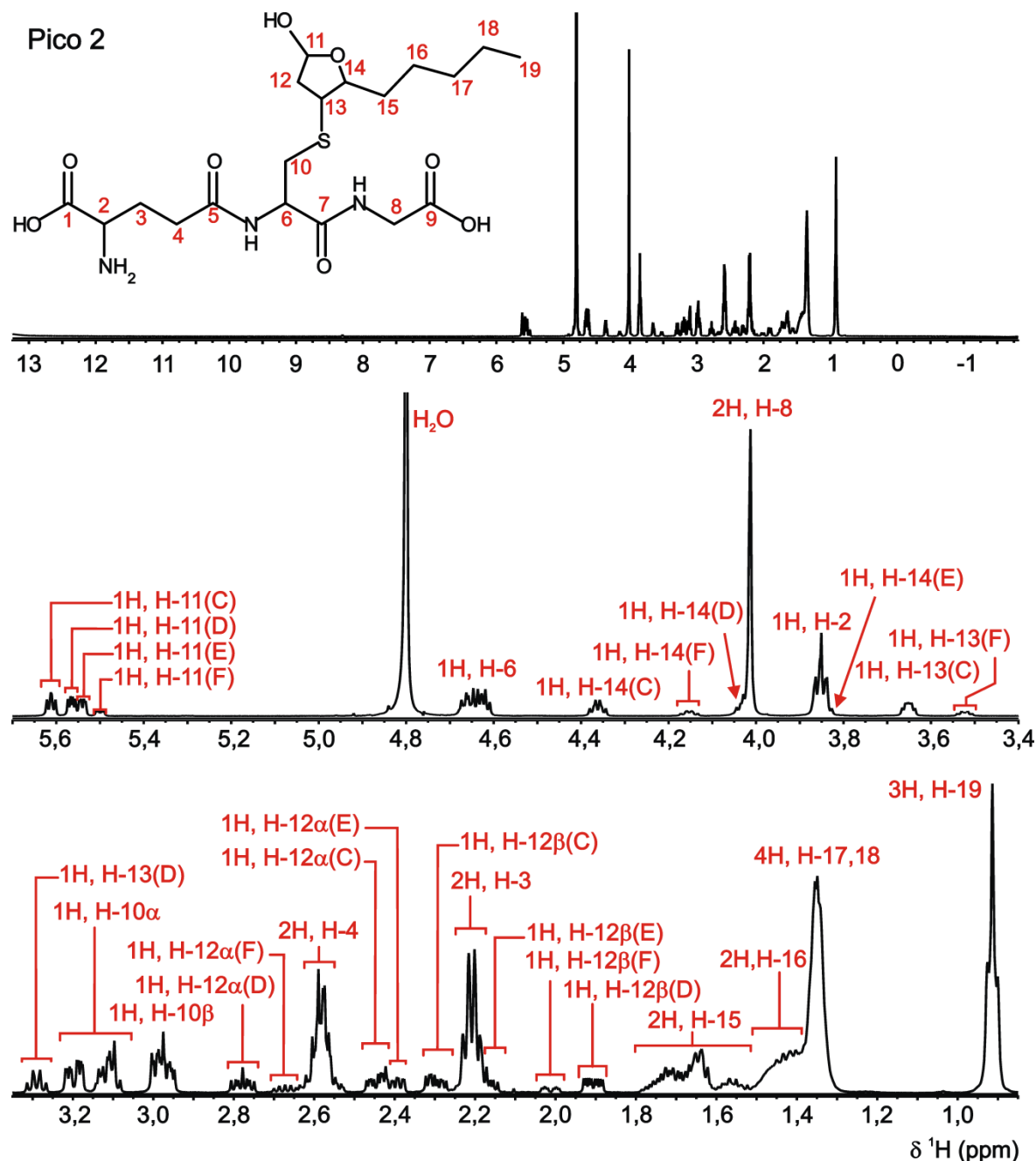


Figura 44 – Espectro RMN ^1H , em D_2O , da segunda fração coletada na purificação do aduto glutationil-4-hidroxinona-1-ol (GS-HNE).

Alguns sinais apresentam multiplicidade diferente (Tabela 25). Pela razão entre a intensidade dos sinais dos isômeros concluímos que, em relação ao isômero F, as concentrações dos isômeros C, D e E são $3,28 \pm 0,28$; $2,70 \pm 0,26$ e $2,20 \pm 0,44$ vezes maior, respectivamente.

Tabela 25 – Deslocamentos químicos no espectro de RMN ^1H , em D_2O , da segunda fração coletada na purificação do aduto glutationil-4-hidroxinona-1-ol (GS-HNE).

Posição	$\delta \text{ } ^1\text{H}$ (ppm)	Integração (razão X/F)	Número de H	Multiplicidade	J (Hz)
H-2	3,88 – 3,82	1,28 ^(a)	1	m	
H-3	2,21	2,07	2	dd	14,2; 6,8
H-4	2,64 – 2,52	2,05	2	m	
H-6	4,64	1,00	1	ddd	18,7; 8,6; 5,3
H-8	4,01	2,01	2	s	
H-10 α	3,20	0,55	1	ddd	14,0; 5,2; 2,0
H-10 α	3,15 – 3,08	0,72 ^(b)		m	
H-10 β	3,01 – 2,94	0,98	1	m	
H-11 (C)	5,63 – 5,59	0,31 (3,4)	1	m	
H-11 (D)	5,56	0,27 (3,0)		dd	5,5; 3,0
H-11 (E)	5,54	0,24 (2,7)		dd	5,3; 1,9
H-11 (F)	5,50	0,09 (1,0)		dd	6,1; 2,7
H-12 α (C)	2,48 – 2,41	0,38 (3,5)	1	m	
H-12 α (D)	2,78	0,29 (2,6)		ddd	14,2; 8,8; 5,6
H-12 α (E)	2,41 – 2,37	0,22 (2,0)		m	
H-12 α (F)	2,70 – 2,64	0,11 (1,0)		m	
H-12 β (C)	2,30	0,33 (3,3)	1	ddd	14,3; 6,5; 4,3
H-12 β (D)	1,91	0,28 (2,8)		ddd	14,0; 6,5; 3,0
H-12 β (E)	2,16	0,19 (1,9)		dd	8,8; 5,1

continua.

Tabela 25 (continuação) – Deslocamentos químicos no espectro de RMN ^1H , em D_2O , da segunda fração coletada na purificação do aduto glutationil-4-hidroxinona-1-ol (GS-HNE).

Posição	δ ^1H (ppm)	Integração (razão X/F)	Número de H	Multiplicidade	J (Hz)
H-12 β (F)	2,01	0,10 (1,0)		ddd	14,2; 4,2; 3,0
H-13 (C)	3,65	0,31 (3,4)		dt	7,8; 4,0
H-13 (D)	3,29	0,26 (2,8)	1	dd	16,2; 7,4
H-13 (E)	(b)	(b)		(b)	(b)
H-13 (F)	3,52	0,09 (1,0)		dt	7,1; 4,9
H-14 (C)	4,36	0,31 (2,8)	1	dd	11,5; 6,8
H-14 (D)	4,03	0,26 (2,3)		dd	6,4; 3,5
H-14 (E)	(a)	(a)		(a)	(a)
H-14 (F)	4,15	0,11 (1,0)		dd	12,3; 6,7
H-15	1,79 – 1,53	2,07	2	m	
H-16	1,51 – 1,38	2,03	2	m	
H-17,18	1,35	4,02	4	d	2,9
H-19	0,91	2,99	3	t	6,4

(a) – sinal de H-2 sobrepõe o sinal de H-14 do isômero E.

(b) – sinal de H-10 α sobrepõe o sinal de H-13 do isômero E

A terceira fração, da mesma forma que as outras duas, é uma mistura de isômeros (G e H) (Figura 45). O espectro é muito semelhante ao da primeira fração, diferindo em alguns deslocamentos dos sinais (Tabela 26).

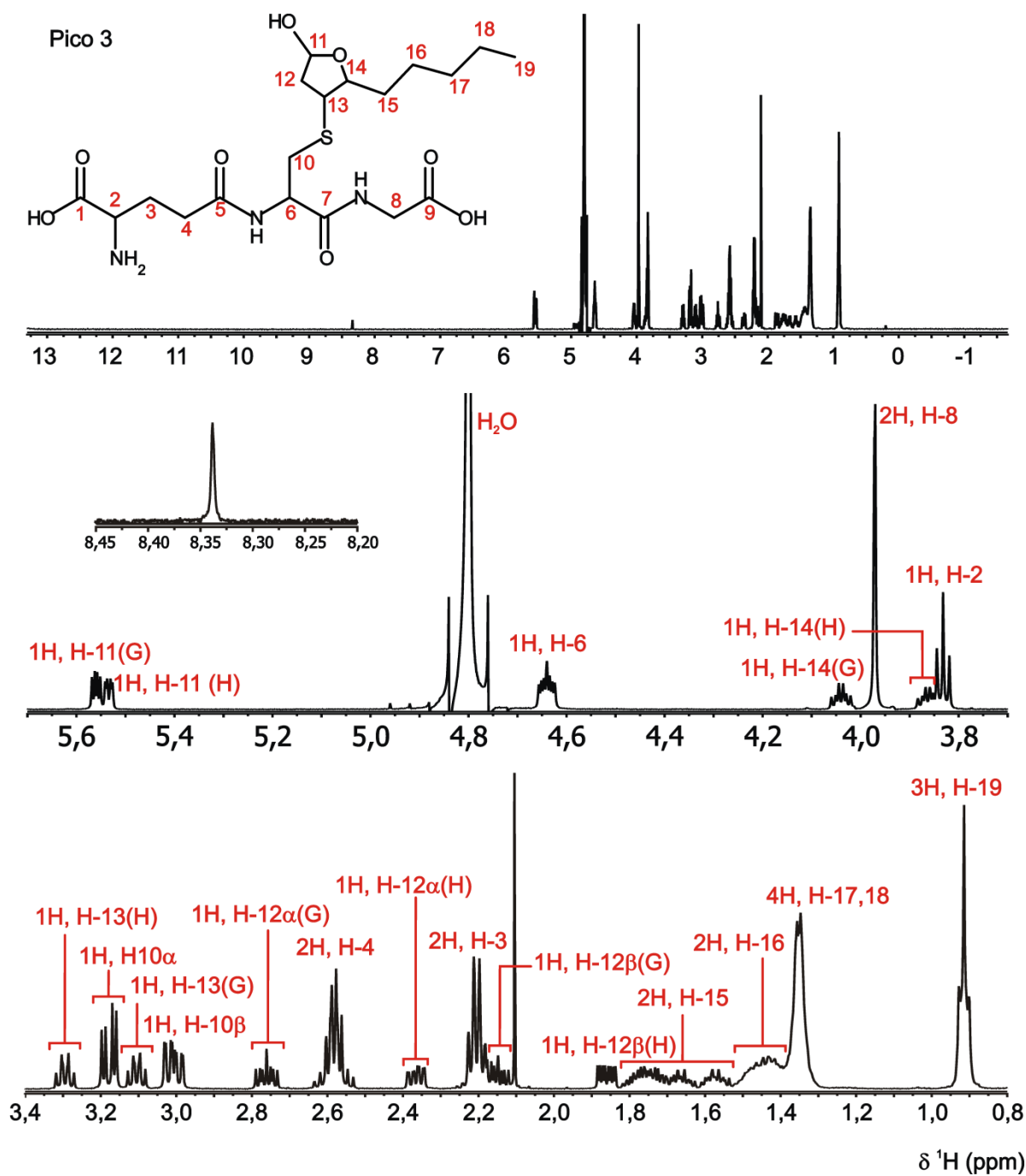


Figura 45 – Espectro RMN ^1H , em D_2O , da terceira fração coletada na purificação do aduto glutationil-4-hidroxinona-1-ol (GS-HNE).

Tabela 26 – Deslocamentos químicos no espectro de RMN ^1H , em D_2O , da terceira fração coletada na purificação do aduto glutationil-4-hidroxinona-1-ol (GS-HNE).

Posição	δ ^1H (ppm)	Integração (razão A/B)	Número de H	Multiplicidade	J (Hz)
H-2	3,83	1,07	1	t	6,3
H-3	2,23 – 2,17	2,03	2	m	
H-4	2,63 – 2,54	2,01	2	m	
H-6	4,64	1,00	1	dd	8,1; 5,2; 2,6
H-8	3,97	1,95	2	s	
H-10 α	3,18	1,00	1	dd	16,3; 7,3
H-10 β	3,01	1,01	1	ddd	14,0; 8,6; 2,1
H-11 (G)	5,56	0,50	1	dd	5,5; 3,0
H-11 (H)	5,53	0,47		dd	5,4; 2,0
H-12 α (G)	2,76	0,54	1	ddd	14,3; 8,8; 5,6
H-12 α (H)	2,37	0,50		ddd	13,6; 7,2; 2,0
H-12 β (G)	2,17 – 2,11	0,51	1	m	
H-12 β (H)	1,86	0,54		ddd	14,0; 6,7; 3,0
H-13 (G)	3,11	0,55	1	dt	8,5; 7,1
H-13 (H)	3,29	0,50		dt	8,9; 7,3
H-14 (G)	4,04	0,54	1	td	7,5; 4,3
H-14 (H)	3,89 – 3,85	0,46		m	
H-15	1,82 – 1,54	2,19	2	m	
H-16	1,53 – 1,39	2,02	2	m	
H-17,18	1,35	4,08	4	dd	4,2; 2,3
H-19	0,91	3,02	3	t	6,7

4.5.2. Determinação dos coeficientes de extinção molar (ϵ) de glutathionil-4-hidroquinona-1-ol

Utilizando 3-trimetilsilil-1-propanosulfonato de sódio (DSS) em três concentrações diferentes obtivemos os espectros de RMN ^1H de três soluções de mesma concentração de GS-HNE. Observamos que a área de um prótons era de 0,9617 (GS-HNE) e 0,3053 (DSS) na solução 1, de 0,9779 (GS-HNE) e 0,9613 (DSS) na solução 2; e de 1,0073 (GS-HNE) e 1,6233 (DSS) na solução 3 (Tabela 27). Pela razão entre as áreas, calculamos a partir das três soluções uma concentração média de $3,10 \pm 0,05$ mM e uma concentração de $18,61 \pm 0,29$ mM na solução mãe (Tabela 27).

Tabela 27 – Cálculo da concentração de glutathionil-4-hidroquinona-1-ol (GS-HNE) por RMN ^1H .

Solução [DSS]	Área do sinal do próton		Razão (GS- HNE/DSS)	[GS-HNE] calculada (mM)	[GS-HNE] solução mãe (mM)
	GS-HNE	DSS			
1 [1mM]	0,9617	0,3053	3,150	3,150	18,90
2 [3mM]	0,9779	0,9613	1,017	3,051	18,31
3 [5mM]	1,0073	1,6233	0,620	3,102	18,61
Média \pm desvio				3,1 \pm 0,1	18,6 \pm 0,3

Foram feitas diluições para 1, 5, 10, 50 e 75 μM a partir da solução mãe, e obtidos os espectros de absorvância de 190 a 240 nm destas soluções (Figura 46).

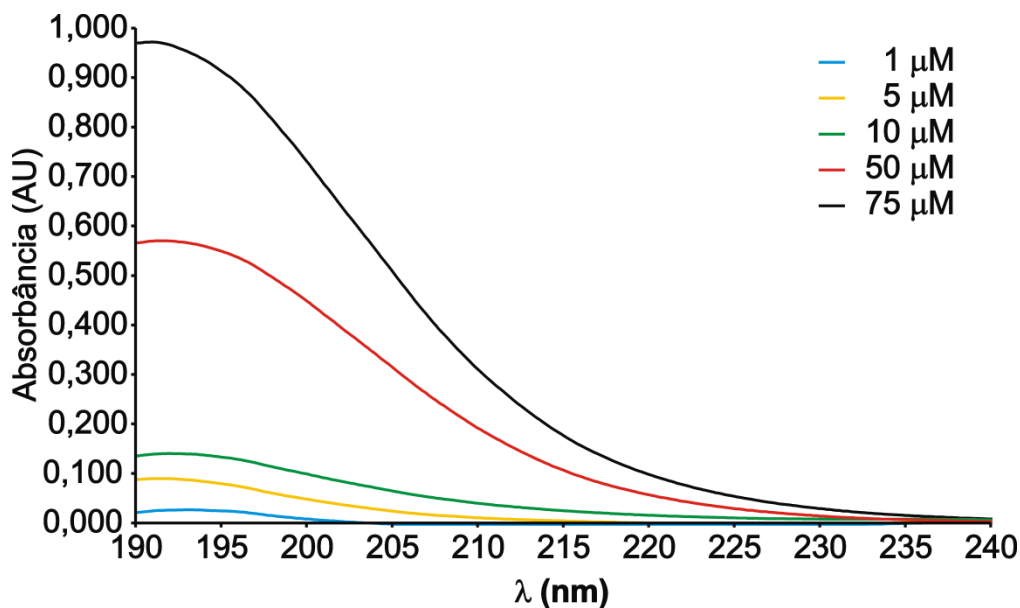


Figura 46 – Espectro de absorção de soluções de diferentes concentrações de glutatiónil-4-hidroxinona-1-ol (GS-HNE).

Determinamos o valor do coeficiente de absorção molar em $\epsilon_{192\text{nm}} = 12.462$ ($\text{mol} \times \text{L}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$) para 192 nm e $\epsilon_{220\text{nm}} = 1.255,3$ ($\text{mol} \times \text{L}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$) para 220 nm, pelo coeficiente angular da equação da reta da absorbância contra as concentrações molares (Figura 47).

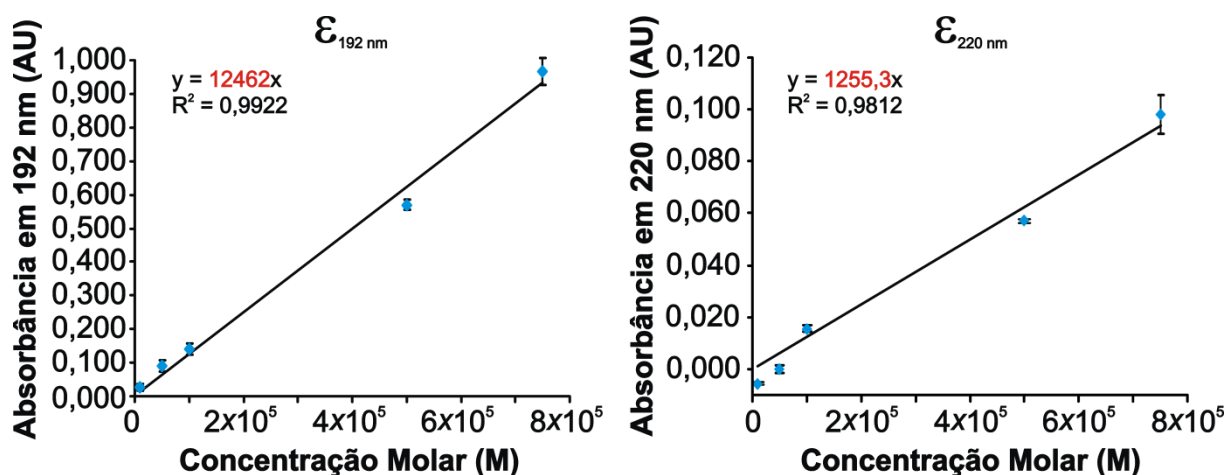


Figura 47 – Curva de concentração molar a 192 e 220 nm de glutatiónil-4-hidroxinona-1-ol (GS-HNE).

4.5.3. Síntese, purificação e caracterização do padrão isotopicamente marcado [$^{13}\text{C}_2$, ^{15}N -glicina]-Glutationil-4-hidroxinona-1-ol

A síntese do aduto isotopicamente marcado [$^{13}\text{C}_2$, ^{15}N -glicina]-Glutationil-4-hidroxinona-1-ol ([$^{13}\text{C}_2$, ^{15}N -Gly]-GS-HNE) foi similar a do padrão não marcado, utilizando [$^{13}\text{C}_2$, ^{15}N -glicina]-glutaciona reduzida. A purificação foi feita de mesma maneira, tendo sido coletadas três frações.

Por análise direta em MS verificamos nas três frações o pico da molécula protonada $[\text{M}+\text{H}]^+$ $m/z = 467$, e do fragmento catiônico $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$ $m/z = 449$ (Figura 48 A, C e E). O perfil de fragmentação da molécula protonada confirma a identidade da molécula. Assim confirmamos que o aduto marcado foi formado e purificado.

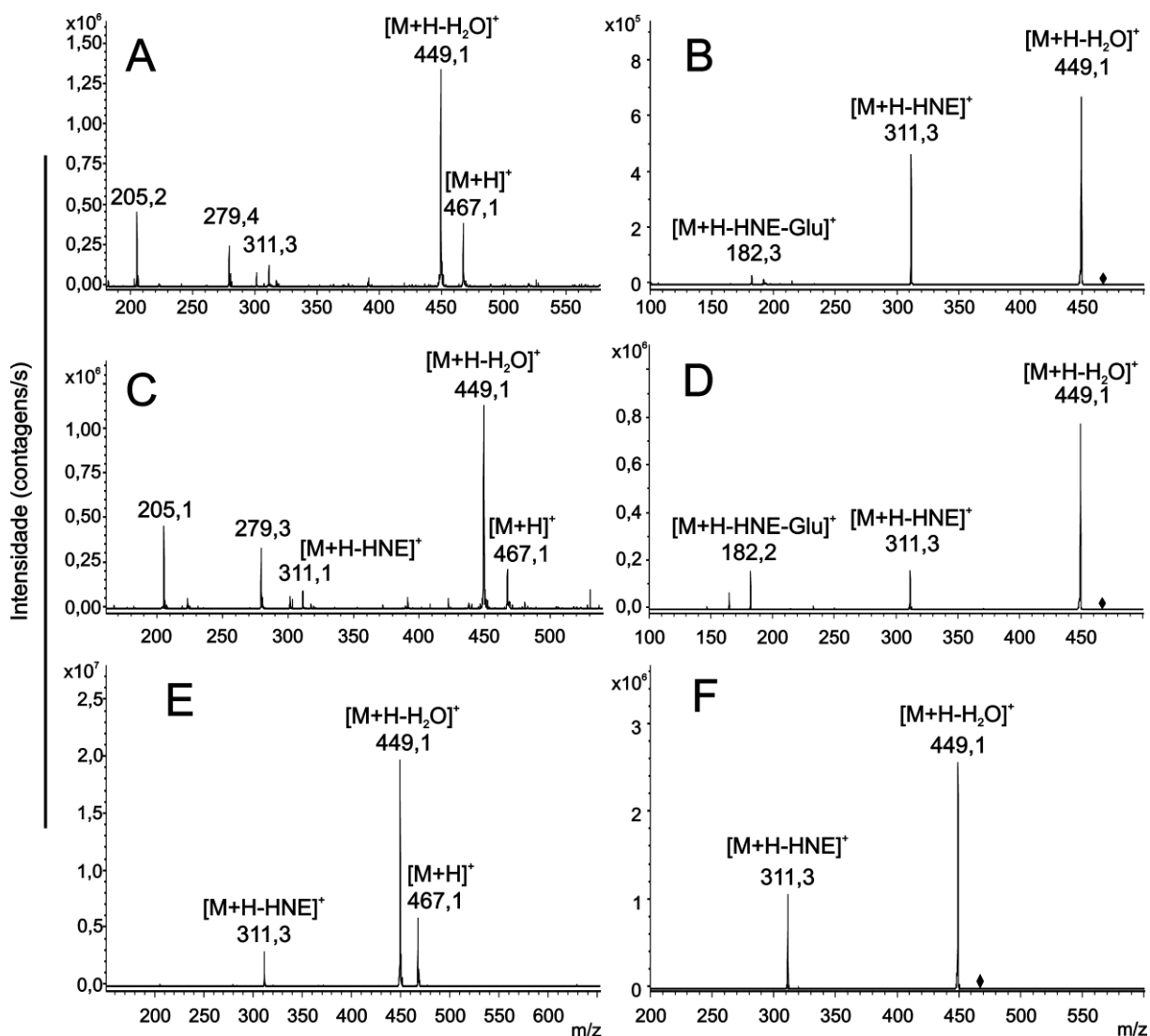


Figura 48 – Análise do aduto $[^{13}\text{C}_2, ^{15}\text{N}\text{-glicina}]$ -glutationil-4-hidroxinona-1-ol por injeção direta em espectrômetro de massas. Espectro de massas do pico 1 (A), pico 2 (C) e pico 3 (E); e espectros de fragmentação da molécula protonada $[\text{M}+\text{H}]^+$ $m/z=467.1$ do pico 1 (B), pico 2 (D) e pico 3 (F).

4.5.4. Síntese, purificação e caracterização do aduto S-(3-hidroxi-1-metilpropil)-glutationa

A síntese do aduto de glutatona (GSH) com crotonaldeído (CRT) foi feita conforme descrito para o aduto GS-HNE, seguido de redução da carbonila aldeídica

com boridreto de sódio. Para purificar o aduto S-(3-hidroxi-1-metilpropil)-glutaciona (GS-HMP) foi desenvolvido método cromatográfico, conforme descrito nos materiais e métodos (3.11.2). Quando a mistura reacional foi injetada no sistema de HPLC, observamos um pico intenso em 7,87 min que foi coletado (Figura 49).

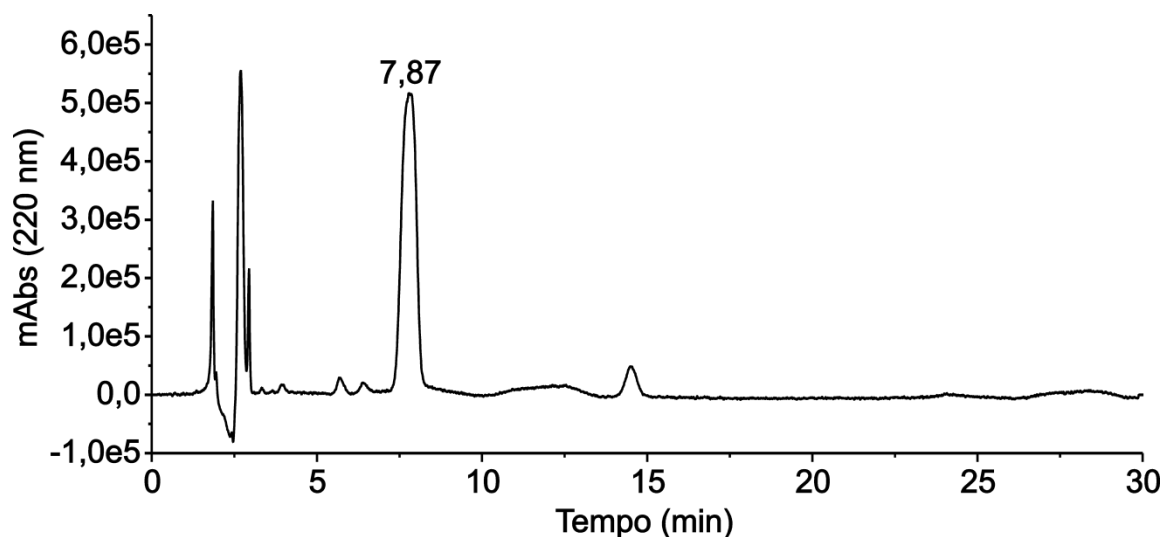


Figura 49 – Cromatograma a 220nm da purificação do aduto S-(3-hidroxi-1-metilpropil)-glutaciona (GS-HMP)

A caracterização de GS-HMP foi feita por espectrometria de massa (MS) e ressonância magnética nuclear (RMN). A análise de MS por injeção direta apresentou um espectro de massas limpo (Figura 50A), onde se observa o pico da molécula protonada $[M+H]^+$ $m/z = 380$ e de perda de glutamato $[M+H-Glu]^+$ $m/z = 251$. Não foram observados picos de impurezas nas frações coletadas. O perfil de fragmentação da molécula protonada $[M+H]^+$ $m/z = 380$ é característico do aduto GS-HMP (Figura 50B)

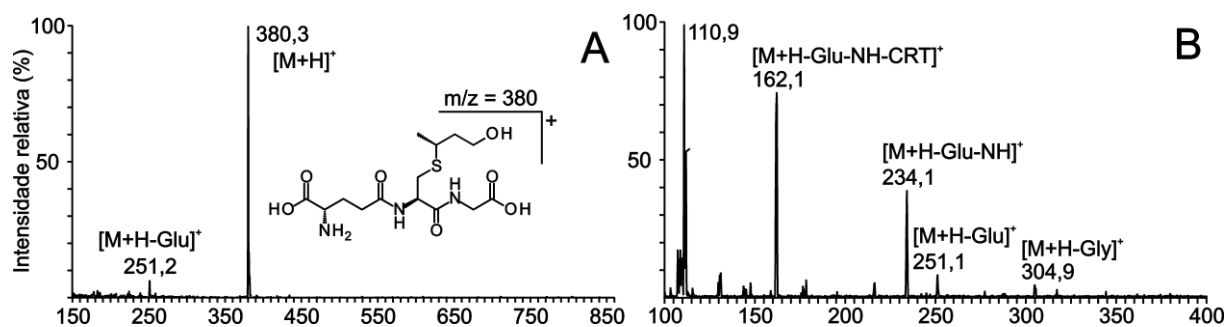


Figura 50 – Espectro de massa obtido por injeção direta das três frações coletadas na purificação do aduto S-(3-hidroxi-1metilpropil)-glutathiona (GS-HMP). Espectro de varredura (A) e de fragmentação da molécula protonada $[M+H]^+$ $m/z = 380$ (B)

Análises de RMN confirmam a identidade do aduto. O espectro de RMN de hidrogênio (RMN 1H) foi atribuído por comparação com o aduto GS-HNE 1 (Figura 51). O padrão de multiplicidade sugere que obtivemos uma mistura de isômeros, por exemplo o tripleto do H-11. Isto seria possível devido a formação de carbono quiral (C-12).

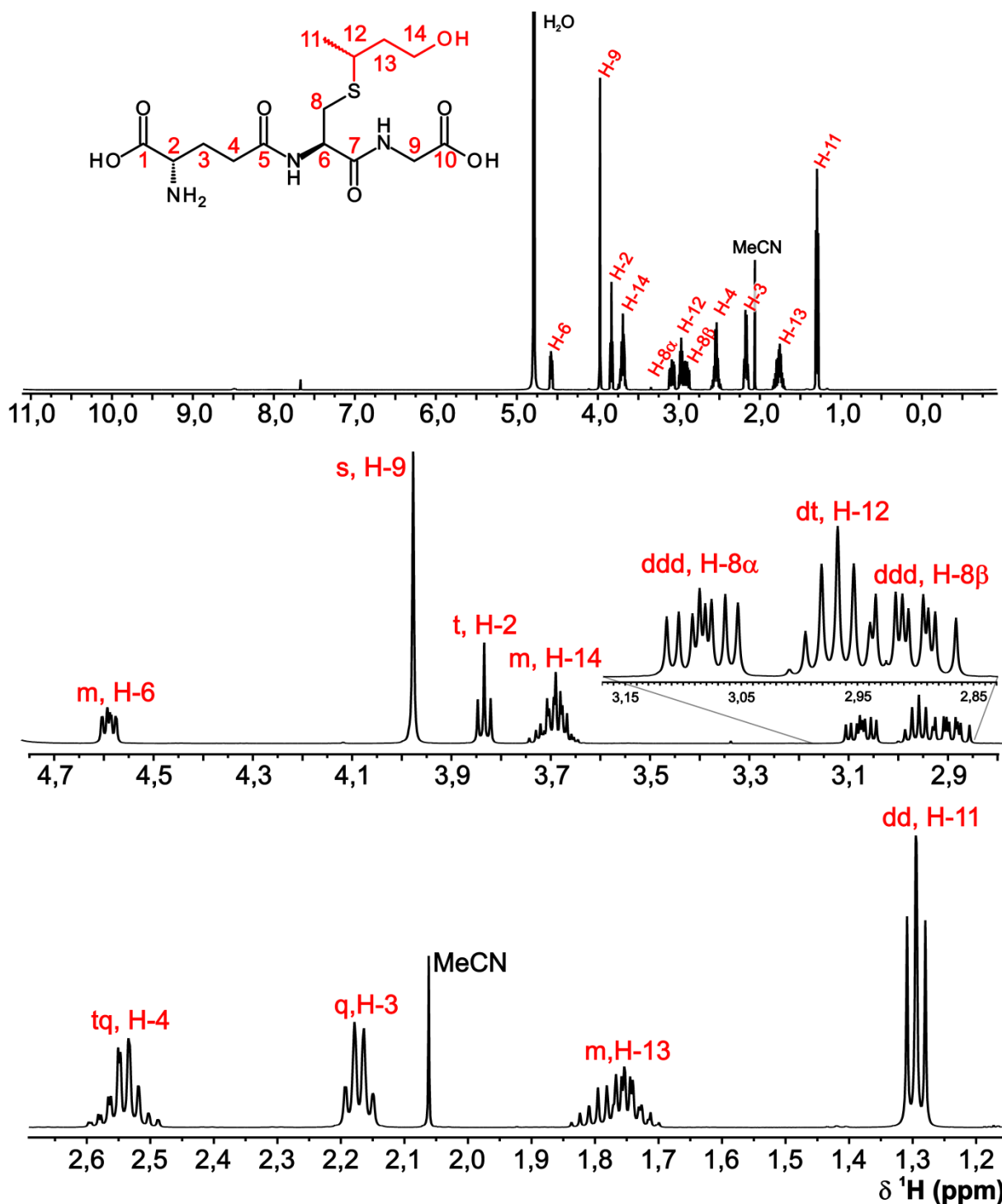


Figura 51 – Espectro RMN ^1H de 500 Hz, em D_2O , do aduto S-(3-hidroxi-1-metilpropil)-glutathiona (GS-HMP). MeCN – acetonitrila.

Para correta atribuição dos sinais foram feitas análises de DEPT (Figura 52). Esta análise confirma a presença de isômeros no padrão purificado pela visualização dos sinais de alguns carbonos deslocados entre os isômeros.

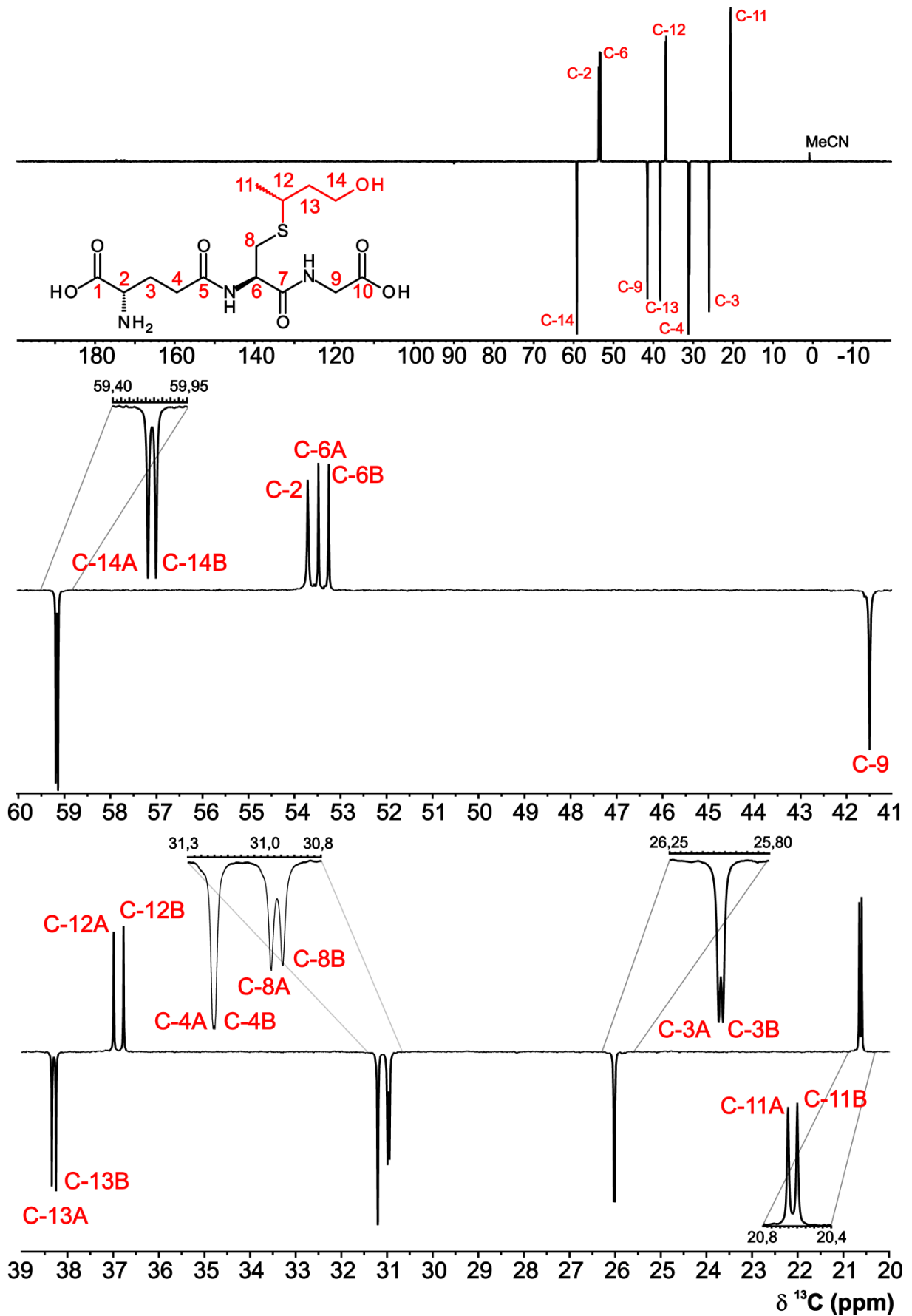


Figura 52 – Espectro de DEPT, em D₂O, do aduto S-(3hidroxi-1metilpropil)-glutaciona (GS-HMP).

4.5.5. Síntese, purificação e caracterização do padrão isotopicamente marcado [$^{13}\text{C}_2$, ^{15}N -glicina]-S-(3-hidroxi-1-metilpropil)- glutationa

A síntese do aduto isotopicamente marcado [$^{13}\text{C}_2$, ^{15}N -glicina]-S-(3-hidroxi-1-metilpropil)-glutationa ([$^{13}\text{C}_2$, ^{15}N -Gly]-GS-HMP) foi similar a do padrão não marcado, utilizando [$^{13}\text{C}_2$, ^{15}N -glicina]-glutationa reduzida. A purificação foi feita de mesma maneira. Por análise direta em MS verificamos o pico da molécula protonada $[\text{M}+\text{H}]^+$ $m/z = 383$ (Figura 53A) com aumento de 3 unidades de massa. O perfil de fragmentação da molécula protonada confirma a identidade da molécula (Figura 53B). Assim confirmamos que o aduto marcado foi formado e purificado.

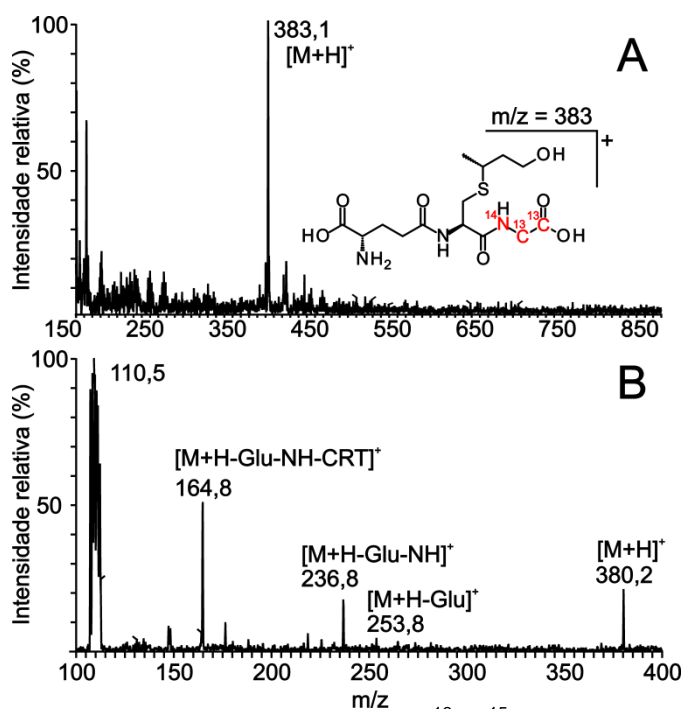


Figura 53 – Análise do aduto [$^{13}\text{C}_2$, ^{15}N -glicina]-S-(3-hidroxi-1-metilpropil)-glutationa por injeção direta em espectrômetro de massas. Espectro de varredura de massas (A) e espectro de fragmentação da molécula protonada $[\text{M}+\text{H}]^+$ $m/z=383$ (B).

4.6. Análise de adutos de glutathiona em cérebro e medula de ratos SOD1^{G93A}

Os adutos de glutathiona (GSH) foram analisados por HPLC-ESI-MS/MS. A quantificação foi feita em cérebro e medula de ratos modelo de ELA em fase assintomática (2 meses de idade) e sintomática (em torno de 4 meses de idade). O método cromatográfico otimizado permitiu a separação dos oito isômeros do aduto glutationil-4-hidroxinona-1-ol em três picos denominados de GS-HNE 1, GS-HNE 2 e GS-HNE 3 conforme a ordem de eluição da coluna cromatográfica (Figura 55).

Foi possível ainda a quantificação concomitante de GSH derivatizada com N-etilmaleimida (NEM) por detecção UV (195 nm); e cisteína – derivatizada com NEM – e GSSG por espectrometria de massa em modo SRM. Não foi possível a detecção de cistina nas amostras. As curvas de calibração para glutathiona (UV_{195 nm}), cisteína (MS) e para GSSG (MS) têm r^2 maior que 0,9924 (Figura 54).

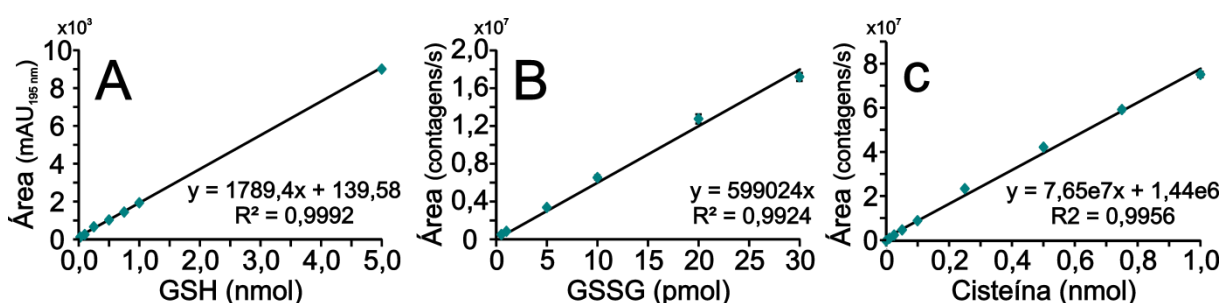


Figura 54 – Curvas de calibração para glutathiona reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) e cisteína. Curva no UV para GSH (A) e de espectrometria de massa em modo SRM para GSSG (B) e cisteína (C).

Com esta metodologia também não observamos alterações do conteúdo de GSH em nenhum dos tecidos, independente da idade (Figura 56A). Observamos

que os animais assintomáticos (2 meses de idade) apresentam níveis de GSSG elevados comparados ao controle de mesma idade e aos animais com quatro meses de idade, não sendo observadas alterações no cérebro (Figura 56B). Chama atenção a razão GSH/GSSG elevada comparada aos experimentos anteriores (Figura 56C). Os níveis de cisteína também são semelhantes entre os animais controles e os animais modelo de ELA nos dois tecidos (Figura 56D).

Foram feitas curvas de calibração contendo as três frações coletadas, em duplicata. Obtivemos valores de r^2 superiores a 0,9865. Para as curvas, os padrões foram solubilizados no tampão utilizado para homogeneização do tecido.

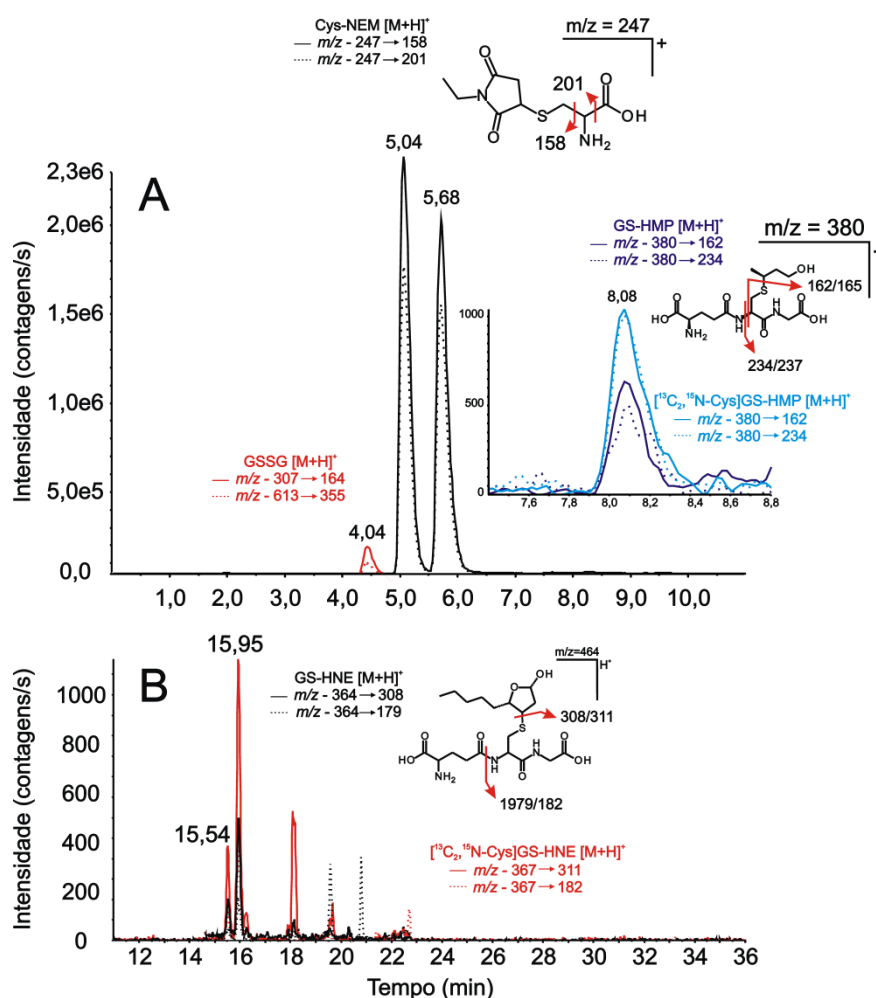


Figura 55 – Cromatograma representativo de análise de adutos de glutatona em cérebro de ratos SOD1^{G93A}. Cromatograma do primeiro período de aquisição (A), com ampliação da região do aduto GS-HMP; e do segundo período de aquisição (B).

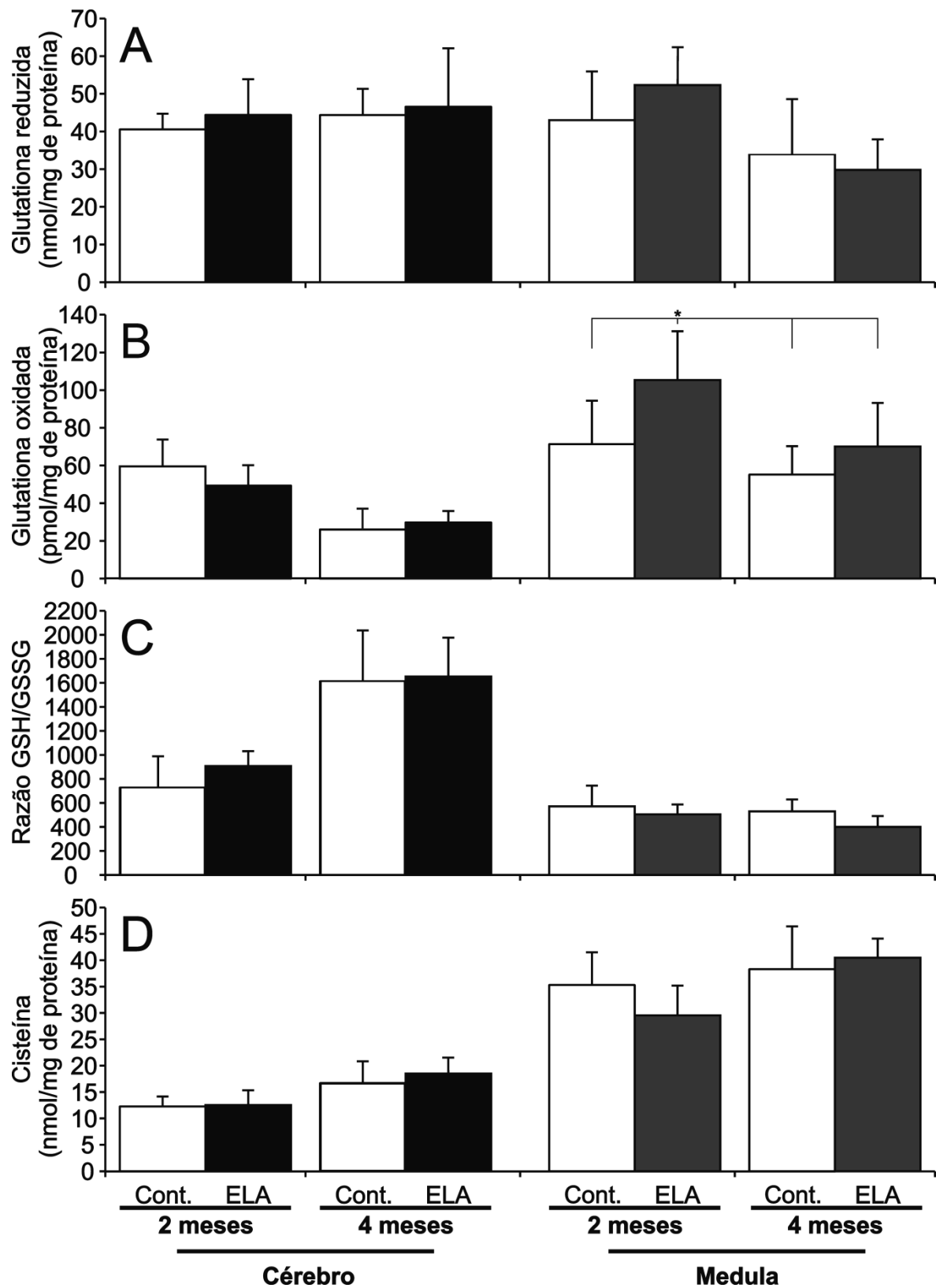


Figura 56- Dosagem de glutatona e cisteína em cérebros e medula de ratos $SOD1^{G93A}$ por HPLC-MS/MS em modo SRM positivo. Níveis de GSH (A), GSSG (B) e cisteína (D) e razão GSH/GSSG (C) em animais assintomáticos (2 meses de idade) e sintomáticos (aproximadamente 4 meses de idade). * Diferença estatisticamente significativa ao nível de $p < 0,05$ para teste de One-way ANOVA, com Tukey-Kramer como pós-teste.

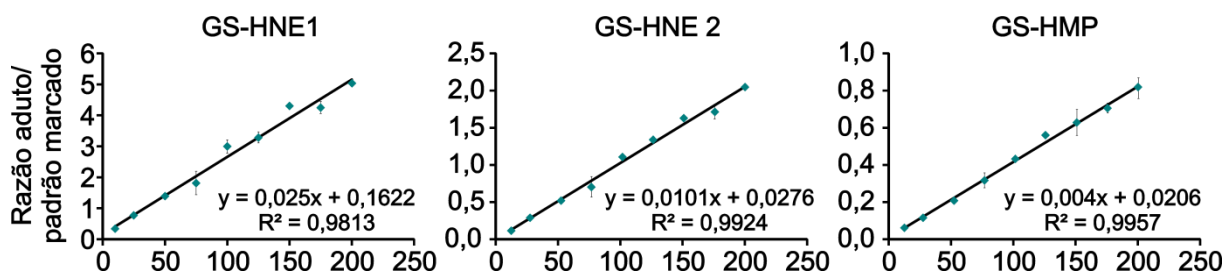


Figura 57- Curvas de calibração para o primeiro par de isômeros do aduto glutationil-4-hidroxinona-1-ol (GS-HNE 1) a eluir da coluna, para os quatro isômeros subsequentes (GS-HNE 2) e para o aduto S-(3hidroxi-1-metilpropil)-glutaciona (GS-HMP).

Nas análises do aduto GS-HNE não foi possível detectar o terceiro pico (GS-HNE 3) na maioria das amostras, seja de cérebro, seja de medula. Nos poucos casos em que foi possível detectar os valores estavam abaixo do limite de detecção (razão sinal/ruído menor que 7).

Os adutos GS-HNE 1 e GS-HNE 2 foram quantificados em ambos os tecidos. Os níveis determinados foram similares para ambos, GS-HNE 1 e GS-HNE 2, entre os animais controles e os animais SOD1^{G93A} tanto em cérebro quanto em medula (Figura 58), não tendo sido observada diferença estatística.

Na mesma análise foi quantificado também o aduto S-(3-hidroxil-1-metilpropil)-glutaciona (GS-HMP). Não verificamos alterações em nenhum dos tecidos nas idades avaliadas (Figura 59). Há uma tendência de aumento nos níveis de GS-HMP no cérebro de animais sintomáticos (aproximadamente 4 meses de idade), contudo os desvios são relativamente altos.

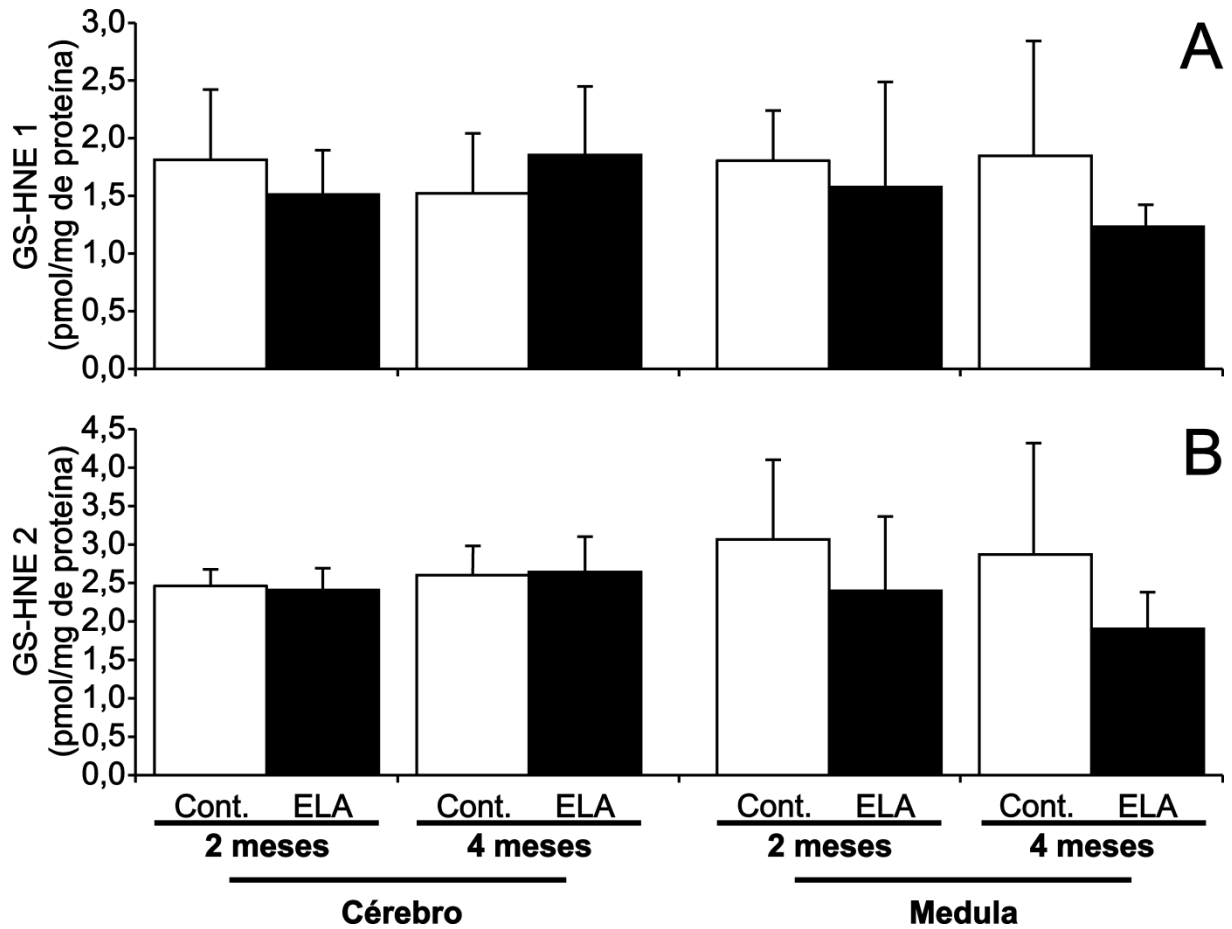


Figura 58- Quantificação do aduto glutationil-4-hidroxi-1-ol em animais modelo de ELA. Níveis de GS-HNE 1 (A) e GS-HNE 2 (B) em cérebro e medula de animais assintomáticos (2 meses de idade) e sintomáticos (aproximadamente 4 meses de idade).

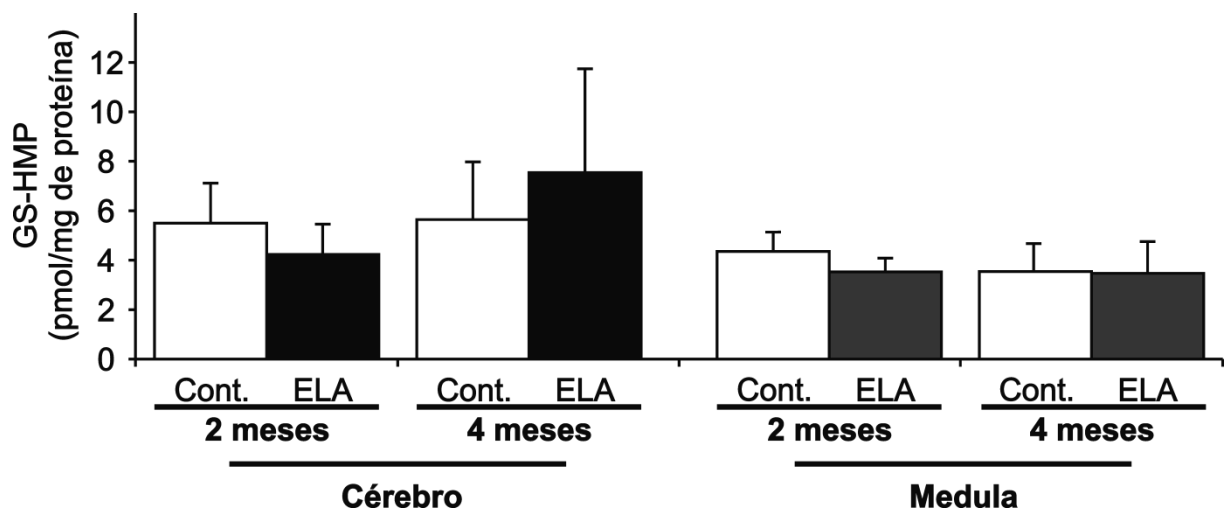


Figura 59- Quantificação do aduto S-(3-hidroxi-1-metilpropil)-glutaciona por HPLC-UV-ESI-MS/MS em modo SRM em ratos SOD^{1G93A} . Análise em cérebro e medula de animais assintomáticos (2 meses de idade) e sintomáticos (aproximadamente 4 meses de idade) modelo de ELA.

5. DISCUSSÃO

Os avanços científicos e tecnológicos têm trazido muita informação sobre a participação de espécies reativas (ERs) em diversos processos fisiológicos, de sinalização e na patogênese de doenças. Contudo, avaliar o estado redox em seres humanos é tarefa extremamente árdua devido às ERs serem reativas e terem curto tempo de meia-vida. O objetivo deste trabalho foi desenvolver métodos acurados e sensíveis de análise de potenciais biomarcadores de estresse redox, isto é: nucleosídeos modificados, aldeídos endógenos e exógenos, glutathiona e produtos de glutathionilação; e avaliá-los em sistemas modelos, celular e animal, e humanos, no caso de um dos biomarcadores.

A dificuldade em quantificar de forma prática e acurada os efeitos de sinalização e/ou dano molecular em sistemas biológicos é o maior problema dentro da área de estudos redox. A participação de intermediários redox, radicalares ou não, na sinalização celular e fisiológica torna importante conhecer marcadores de sinalização redox, bem como métodos de estudá-lo. Por sua vez, biomarcadores de estado redox deve propiciar detecção precoce de fatores de risco, possibilitando intervenções adequadas e incrementando as respostas terapêuticas de uma variedade de doenças.

5.1. Nucleosídeos modificados – 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina, 1,N²-eteno-2'-desoxiguanosina, 1,N⁶-eteno-2'-desoxiadenosina e 1,N²-propano-2'-desoxiguanosina como biomarcadores

No presente apresentamos a avaliação do potencial de desoxinucleosídeos modificados como biomarcadores. Por meio da análise de 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina (8-oxodGuo), 1,N²-eteno-2'-desoxiguanosina (1,N²-εdGuo), 1, N⁶-eteno-2'-desoxiadenosina (1,N⁶-εdAdo) e 1, N²-propano-2'-desoxiguanosina (1,N²-propanodGuo) examinamos a possibilidade de lesões em DNA serem utilizadas como marcadores de exposição a aldeídos. Em nossa abordagem apreciamos exposição tanto a aldeídos exógenos, bem como os produzidos endogenamente em decorrência de estresse redox.

5.1.1. Análise em urina de indivíduos expostos à poluição atmosférica

Em grandes centros urbanos e megalópoles, como a região metropolitana da cidade de São Paulo, a poluição atmosférica é causada majoritariamente por emissões veiculares e industriais. A cidade de São Paulo (SP) possui uma frota de aproximadamente 7,5 milhões de veículos (DETRAN-SP, 2013) que utilizam

combustíveis diversos, como diesel, álcool e gasolina. Esta imensa frota propicia composição atmosférica singular em SP comparada a outras megalópoles.

Acetaldeído (AA) é um poluente amplamente disperso no ambiente. Presente em alimentos, bebidas e fumaça de cigarro, ele é também produzido durante combustão de etanol e diesel (IARC, 1999). A Agência Internacional para Pesquisa sobre Câncer (IARC) considera o AA como agente de alta prioridade para avaliação durante o período de 2010 a 2014 (Ward et al., 2010). Outro poluente ambiental, o crotonaldeído (CRT) é um importante composto industrial. O CRT é formado durante a combustão de matéria vegetal, incluindo tabaco, e está presente em emissões veiculares. Pode ser gerado, ainda, endogenamente, por degradação de lipídios insaturados, além de ser metabólito de N-nitrosopirrolidonas (Humans, 1995). A exposição a CRT ou a AA pode levar a formação de 1,N²-propanodGuo no DNA (Hecht, Mcintee e Wang, 2001; Brooks e Theruvathu, 2005).

Embora evidências apontassem a poluição atmosférica como fator de risco de câncer, somente no final de 2013 foi classificada pela IARC como agente carcinógeno para humanos (Loomis et al., 2013). O risco provavelmente decorre da promoção de lesões no DNA, reconhecido fator mutagênico. Por isso, resolvemos avaliar três tipos de desoxinucleosídeos modificados como biomarcadores de exposição à poluição urbana em humanos.

A matriz biológica escolhida foi urina, por ser de uso regular nos laboratórios de análises clínicas e ter coleta não invasiva. Ademais, poderia ser utilizada em grandes estudos populacionais para a detecção de nucleosídeos modificados. Outra característica favorável é a concentração dos nucleosídeos modificados durante a formação da urina, enquanto a quantidade dos não modificados é reduzida (Cadet e Poulsen, 2010).

Para assegurar a confiabilidade de nossas quantificações avaliamos reprodutibilidade e linearidade do método e a perdas dos analitos de interesse durante o processamento das amostras. Verificamos recuperação superior a 80% dos três tipos de modificações (Tabela 17). A maior variação na recuperação foi observada para 8-oxodGuo, que pode decorrer do baixo potencial de oxidação deste nucleosídeo (Burrows e Muller, 1998). Obtivemos recuperações lineares dentro de uma faixa ampla de concentração (Figura 11). Para 1,N²-propanodGuo e 1,N²-εdGuo é visualmente notória a relação entre a adição de padrão e a detecção (Figura 12).

Atestada a eficiência, eficácia e robustez da metodologia, foi avaliada a excreção dos nucleosídeos modificados em amostras de urina de indivíduos moradores de áreas com elevados índices de poluição atmosférica (SP) versus área com menor índice de poluição (São João da Boa Vista, SJBV).

Nos resultados obtidos não foram observadas alterações nos níveis do aduto exocíclico 1,N²-εdGuo, tão pouco dos níveis de 8-oxodGuo (Figura 15). Contudo, comprovam que indivíduos expostos à poluição atmosférica têm elevado nível de 1,N²-propanodGuo ($p < 0,05$, Figura 14B). Foi observado que apenas cerca de 10% (4/35) das amostras de moradores de SJBV apresentam níveis superiores a 25 fmol de 1,N²-propanodGuo \times mg⁻¹ de creatinina contra 50% das amostras de SP (Figura 14A). Outra característica importante é que as amostras de SP se distribuem até 350 fmol de 1,N²-propanodGuo \times mg⁻¹ de creatinina contrapondo o máximo de 53 nas amostras de SJBV (Figura 14A e Tabela 19).

Fatores fisiológicos, idiosincrasia e diferenças entre os voluntários, como prática de atividade física, idade, estado nutricional, qualidade de vida, estresse, etc. são passíveis de influenciar a formação, metabolismo e excreção do aduto. Isto pode refletir nos resultados obtidos, podendo justificar a dispersão das amostras dos

moradores da cidade de SP. Contudo em nosso estudo não foi possível traçar relação dos resultados obtidos com nenhum dos fatores avaliados, a exemplo da idade e atividade física.

Por outro lado, é bem estabelecida a associação de poluição atmosférica com diversos efeitos adversos na saúde humana e com aumento de mortalidade em diversos grupos de idades variadas (Dockery, 2009). Níveis elevados de formas oxidadas de certas moléculas, como DNA e lipídios, são fortemente associados com exposição a partículas produzidas por combustão, permitindo o uso destas biomoléculas como biomarcadores de dose biológica efetiva (Moller e Loft, 2010). Estudo recente indica elevados níveis de adutos de 2'-desoxiguanosina com malondialdeído (MDA) em DNA extraído de mucosa nasal de crianças de uma cidade industrial italiana (Peluso et al., 2013).

Quando aspirados, agentes alquilantes exógenos podem causar lesão direta do DNA. Em especial, AA e CRT são agentes alquilantes presentes nas emissões veiculares capazes de gerar 1,N²-propanodGuo. O AA, por exemplo, pode formar este aduto por meio de adições sucessiva (Garcia et al., 2011).

Outros agentes podem não atacar diretamente o DNA, mas desencadear processos inflamatórios, gerando inúmeros agentes oxidantes, a exemplo de óxido nítrico e peroxinitrito – eficientes indutores de lesões do tipo 8-oxodGuo (Cadet, Jean et al., 2012). No entanto, não se verifica diferença estatisticamente significativa nos níveis de 1,N²-εdGuo e 8-oxodGuo entre os dois grupos amostrados (Figura 15). Classicamente estes dois tipos de modificações são associadas a processos inflamatórios em diversas situações (Nair, Bartsch e Nair, 2007; Blair, 2008; Arab et al., 2009; Nair et al., 2010). Logo, concentrações urinárias semelhantes entre os

grupos reforça a hipótese de que 1,N²-propanodGuo observado em moradores de SP decorre da exposição a poluentes e não de processos inflamatórios.

A presença de desoxinucleosídeos modificados na urina é atribuída principalmente ao reparo de DNA, apoptose e reações do pool de desoxirribonucleosídeos (Nair et al., 2010). A presença de 8-oxodGuo mais especificamente tem sido atribuída à degradação de derivados di- e trifosfato de 8-oxodGuo pela família de hidrolases Nudix (Evans, Saparbaev e Cooke, 2010). O reparo por excisão de base (BER) é a mais importante rota de remoção de lesões oxidadas do DNA, entretanto evidências indicam que reparo por excisão de nucleotídeo (NER) também é responsável por reparar 2'-desoxinucleosídeos oxidados, como 8-oxodGuo, que são subseqüentemente excretados na urina (Cooke et al., 2005; Berra et al., 2013).

Diversos mecanismos parecem estar envolvidos na remoção de adutos exocíclicos incluindo BER, NER, *mismatch repair* e processos de reparo mediados por proteínas da família AlkB (Hang, 2004; Obtulowicz et al., 2010). Adutos de DNA formado por crotonaldeído (CRT) e acetaldeído (AA) são reparados principalmente através de recombinação homóloga e NER (Brooks e Theruvathu, 2005; Mechilli et al., 2008).

Contudo, a remoção de 1,N²-εdGuo é feito principalmente por BER. Como neste caso a base modificada é liberada da desoxirribose, os adutos assim removidos não podem ser detectados por nossa metodologia, o que pode em parte justificar a baixa detecção de 1,N²-εdGuo nas amostras.

A mutagenicidade da fração rica em compostos carbonílicos de extratos orgânicos coletados do ar de São Paulo (Spinosa De Martinis et al., 1999) já foi descrita, entretanto, pela primeira vez, demonstramos que 1,N²-propanodGuo está

elevado em pessoas exposta a poluição atmosférica. AA e CRT atmosféricos induzem a formação deste aduto, que em células humanas é reconhecido indutor de transversões GC → TA e inibidor da replicação do DNA (Stein et al., 2006). Deste modo, concluímos que os níveis urinários de 1,N²-propanodGuo podem ser potencialmente utilizados como adequado biomarcador para monitorar exposição à AA/CRT. Os níveis deste aduto podem ser detectados com alta eficiência, especificidade e sensibilidade usando a metodologia por HPLC-MS desenvolvida. A investigação mais ampla dos níveis de 1,N²-propanodGuo em urina humana pode prover importante informação para o desenvolvimento de políticas públicas adequadas para a promoção da saúde da população urbana contra os efeitos da poluição atmosférica.

5.1.2. Quantificação de adutos de DNA em modelo de Anemia de Fanconi

A formação do aduto 1,N²-propanodGuo em células, via reação de DNA com acetaldeído (AA) foi demonstrada pelo nosso grupo (Garcia et al., 2011). Esse aduto é capaz de formar ligações cruzadas entre as fitas de DNA e entre DNA e proteínas (Cho et al., 2006). Sendo FancL e Slx4 proteínas envolvidas na preservação de integridade genômica, por meio de reparo de alguns tipos de danos ao DNA – particularmente os *crosslink* interfitas (Joenje, 2011), é esperado que células deficientes destas proteínas acumulem 1,N²-propanodGuo após tratamento com AA.

Assim, a sensibilidade destas células ao AA demonstrada pelo grupo do professor Patel (Langevin et al., 2011) decorre, possivelmente, do acúmulo destas lesões.

Assim, para validar adutos de DNA como biomarcadores de estresse redox, avaliamos 1,*N*²-propano-2'-desoxiguanosina (1,*N*²propanodGuo) e 1,*N*²-eteno-2'-desoxiguanosina (1,*N*²εdGuo) em modelos de Anemia de Fanconi (AF). Em colaboração com o grupo do professor KJ Patel do *MRC Laboratory of Molecular Biology*, Cambridge, UK, utilizamos duas linhagens celulares deficientes em reparo de ligação cruzada (*crosslink*) no DNA.

A primeira linhagem: linfócitos de galinha (DT40) deficientes de proteína FancL. Esta proteína possui atividade E3 ubiquitina-ligase (Cole, Lewis e Walden, 2010; Garner e Smogorzewska, 2011) responsável pela ubiquitinação do heterodímero ID – FANCD2 e FANCI – e consequente regulação da via (Kim e D'andrea, 2012). Uma característica importante nestas células é que são cultivadas em suspensão. Assim, os tratamentos foram feitos em suspensão; e as células tratadas foram sedimentadas por centrifugação para extração de DNA. As implicações destes fatos serão discutidas oportunamente.

A outra linhagem, de fibroblastos embrionários de camundongos (MEF), não expressam a proteína Slx4 ou FancP. Acredita-se que esta proteína seja importante, se não fundamental, na etapa de excisão das fitas. Os MEFs, ao contrário das células DT40, foram cultivados aderidos.

Inicialmente comparamos células DT40 deficientes (Δ FancL) e proficientes (WT) tratadas com concentrações crescentes de AA (Figura 16). Não verificamos resposta concentração-dependente – os níveis de 1,*N*²propanodGuo em células incubadas com 1 mM de AA não é superior aos de células incubadas com 0,25 mM –, embora o tratamento tenha aumentado os níveis do aduto em relação ao controle.

Também chama atenção a grande variação nos níveis do aduto em células DT40 Δ FancL incubadas com 4 mM de AA. Dada a extrema volatilidade e a alta reatividade do AA, a evaporação superficial pode ter diminuído a concentração superficial, formando um gradiente no meio.

Crescendo em suspensão, as linhagens linfocitárias poderiam estar expostas a concentrações heterogêneas de AA e oxigênio a depender da proximidade ou não da superfície de contato com ar – espera-se que na superfície a concentração de AA seja menor e de oxigênio maior. O desvio pode decorrer ainda de morte celular, visto a extração de DNA partir de um pool de células lesionadas e mortas sedimentadas por centrifugação. Células mortas perdem controle de permeabilidade e seletividade de membranas, deixando o DNA mais suscetível a ser lesionado e/ou degradado.

Resolvemos então utilizar linhagem de células embrionárias de camundongos (MEF) deficientes de outra proteína da via de reparo de ligações cruzadas ($Slx4^{-/-}$). Como estas crescem aderidas, ficariam no mesmo microambiente, à mesma distância da superfície, garantindo concentrações homogêneas de AA e oxigênio. Ademais, as células que morressem com tratamento perderiam aderência e ficariam dispersas no meio que ao ser removido nos deixaria apenas com as células vivas.

As células MEF tratadas com AA acumulam 1, N^2 -propanodGuo (Figura 17). Aparentemente, há maior tendência de acúmulo nas células deficientes na via de reparo AF, similar ao observado nas células DT40 (Figura 16). Todavia os desvios foram elevados e, sobretudo, as respostas foram semelhantes em todas as três concentrações de AA testadas. Outro fator parece ser responsável pela imprecisão e pela resposta constante.

Por isso, reajustamos as condições de tratamento. Decidimos preparar a solução de AA em meio gelado (4°C) ao invés de pré-aquecido a 37°C como usualmente é feito. Após remoção do meio antigo, AA foi adicionado em meio de cultura novo e gelado (4°C), em frasco fechado. Depois de homogeneizado o meio contendo AA foi distribuído nas garrafas. Esperávamos assim reduzir a evaporação e o tempo em que o AA poderia ser sequestrado por outros compostos. As garrafas fechadas foram então incubadas a 37°C por duas horas sob atmosfera de CO₂.

Inicialmente células DT40 foram incubadas como supracitado. Obtivemos uma melhora sensível na resposta do controle: as células deficientes em reparo apresentam níveis aumentados do aduto (Figura 18). Observamos também aumento de 1,N²-propanodGuo nas células incubadas com AA. Todavia não verificamos diferença significativa entre as células tratadas e o controle.

Com as modificações feitas no tratamento também obtivemos resultados consistentes em MEFs. Inicialmente, células selvagens (MEF WT) foram incubadas com 10 mM de AA (Figura 19A). A resposta ao tratamento foi satisfatória, mostrando acúmulo significativo ($p < 0,01$) de lesões do tipo 1,N²-propanodGuo. Houve aumento de 5 vezes nos níveis do aduto e redução do desvio.

Com condições de tratamento estabelecidas prosseguimos com células deficientes em Slx4 (MEF Slx4^{-/-}). Observamos diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) quando incubamos MEF Slx4^{-/-} com 2 mM de AA (Figura 19B). Estas células deficientes em reparo de *crosslink* apresentam acúmulo significativo de aduto quando incubadas com 2 mM de AA.

Observamos ainda que níveis basais (controles) de 1,N²-propanodGuo são maiores nas células deficientes em reparo (DT40- Δ FancL – Figura 18 – e MEF Slx4^{-/-}

– Figura 19) comparados com as células parentais (DT40 WT e MEF WT, respectivamente).

Este aduto é reparado principalmente através de recombinação homóloga e NER (Brooks e Theruvathu, 2005; Mechilli et al., 2008). Embora, via NER, sejam proficientes em reparar 1,N²-propanodGuo aduto na sua forma cíclica, os níveis basais das células deficientes em reparo são comparáveis aos níveis de células parentais incubadas com 10 mM (Figura 18 e Figura 19). Isto comprova a dificuldade destas células em lidar com 1,N²-propanodGuo, provavelmente em sua forma aberta capaz de formar ligações cruzadas (Cho et al., 2006).

A sensibilidade a AA destas células era conhecida, contudo não havia provas de que fosse promovida por interação direta de AA com bases do DNA ou indiretamente. Os dados obtidos demonstram que alquilação direta do DNA é um importante fator, em específico a formação de 1,N²-propanodGuo.

Não foi possível detectar o aduto 1,N²-εdGuo nos modelos de AF estudados. Os níveis deste aduto estão provavelmente abaixo do limite de detecção do método. Eteno adutos cíclicos, ao contrário de 1,N²-propanodGuo, não são formados por ataque direto do AA ao DNA, mas por aldeídos insaturados epoxidados formados por processos de peroxidação lipídica. Além disso, este aduto não é descrito como capaz de formar ligações cruzadas. Reparado especificamente por APNG e uracila-DNA-glicosilase (UDG) (Singer e Hang, 1999), este aduto deve ser removido do DNA de forma similar entre as células modelo de AF e as parentais.

Dados da literatura sugeriam que danos ao DNA mediados por AA contribuíssem para distúrbios hematopoiéticos e elevado risco de câncer (Langevin et al., 2011). Entretanto é a primeira vez que é obtido prova direta de acúmulo de 1,N²-propanodGuo. Este aduto capaz de formar *crosslink* interfitas pode, portanto,

ser potencial mediador dos problemas observados em pacientes de Anemia de Fanconi. Devido à importância dos dados obtidos, esses estudos estão sendo ampliados pelo nosso grupo de pesquisa.

5.1.3. Quantificação de 2'-desoxirribonucleosídeos modificados em ratos modelo de Esclerose Lateral Amiotrófica

Previamente nosso grupo demonstrou que o DNA sofre oxidação promovida pelo sistema Cu,Zn-SOD/H₂O₂ e Cu,Zn-SOD/H₂O₂/HCO₃⁻, gerando 8-oxodGuo e eteno adutos de DNA *in vitro* (Barbosa et al., 2009) e que SOD1 com substituição da glicina 93 por alanina (SOD1^{G93A}) está associada ao DNA em células que expressam esta forma da enzima (Barbosa et al., 2010). Por isso, utilizamos modelo animal de Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA) para avaliar desoxinucleosídeos modificados como possíveis biomarcadores de estresse redox. É um modelo mais complexo do que os celulares. Além do mais, as variáveis são mais bem controladas e/ou avaliadas comparadas a experimentos utilizando amostras humanas.

Deste modo, avaliamos em cérebros de animais modelo de ELA a formação de 1,N²-eteno-2'-desoxiguanosina (1,N²-εdGuo) e 1,N²-propano-2'-desoxiguanosina (1,N²-propanodGuo) utilizando metodologia desenvolvida em nosso laboratório (Garcia et al., 2010) e 1,N⁶-eteno-2'-desoxiadenosina (1,N⁶-εdAdo) utilizando metodologia descrita no item 3.8.4.

Pela primeira metodologia, os níveis de $1,N^2$ -propanodGuo observados são semelhantes em animais assintomáticos e controles – 2 meses (Figura 21A). Nesta fase, a expressão da SOD1^{G93A} humana não deve ocasionar lesão ao DNA dos ratos ou os danos são eficientemente reparados, evitando o acúmulo. Contudo, com o surgimento de sintomas (em torno de 4 meses), os animais SOD1^{G93A} acumulam esta lesão, o que não ocorre em animais controles de mesma idade (Figura 21A).

A formação do $1,N^2$ -propanodGuo observado pode estar sendo promovida por crotonaldeído (CRT) gerado endogenamente em processos de peroxidação lipídica. Pode ainda resultar de processos oxidativos promovidos por cobre que pode estar sendo liberado do sítio ativo da enzima SOD1^{G93A}, como previamente mostrado pelo nosso grupo (Barbosa et al., 2009). Os íons de cobre liberados tem alta afinidade pelo DNA (Sagripanti, Goering e Lamanna, 1991) e pode promover a formação de radical hidroxila próximo ao DNA. Além do ataque direto que pode ocorrer, o radical hidroxila pode modificar outras biomoléculas e os produtos desta modificação podem em muitos casos promover lesões no DNA, como ocorre com os produtos de peroxidação lipídica.

Não foi possível avaliar a relação de $1,N^2$ - ϵ dGuo com o aparecimento dos sintomas. O referido aduto foi detectado somente em parte das amostras analisadas, e em níveis inferiores ao limite de quantificação do método.

A hipótese atualmente melhor aceita para os casos de ELA relacionados a SOD1 é de ganho de função tóxica da enzima modificada (Cozzolino et al., 2012). Apesar disso, não existem argumentos contundentes para a morte preferencial de neurônios motores. Os altos níveis de propano adutos em tecidos ricos em lipídios, como o cérebro (De Bont e Van Larebeke, 2004), podem estar relacionados a esta seletividade. A enzima modificada pode induzir danos ao DNA em diversos órgãos,

mas o conteúdo lipídico cerebral pode atuar potencializando a peroxidação lipídica ocasionando o acúmulo de $1,N^2$ -propanodGuo observado. O metabolismo neuronal é potencialmente comprometido podendo levar a morte celular.

Para melhor avaliar o modelo, resolvemos analisar $1,N^6$ - ϵ dAdo nas mesmas amostras. Assim como o propano aduto analisado, $1,N^6$ - ϵ dAdo não apresenta alteração em animais transgênicos assintomáticos (2 meses) quando comparado ao controle (Figura 21B). Os animais SOD1^{G93A} sintomáticos apresentam níveis 3 vezes maiores de $1,N^6$ - ϵ dAdo em relação ao controle.

Assim como $1,N^2$ -propanodGuo, $1,N^6$ - ϵ dAdo pode ser formado pela reação das bases com aldeídos gerados endogenamente, ou mesmo exógenos. O cérebro, rico em lipídios, é um tecido altamente propício à formação de aldeídos quando ocorre desbalanço, mesmo que rápidos e transientes. Uma vez iniciada a peroxidação lipídica, ela pode se autossustentar por longo período gerando grande quantidade de aldeídos. Por outro lado, 8-oxodGuo não é formado por reação direta com aldeídos, não sendo neste sentido influenciada pelo conteúdo lipídico tecidual.

Nossos dados sugerem que a enzima SOD1 humana modificada tem função tóxica. A expressão desta em ratos Sprague-Dawley parece desencadear processo de peroxidação lipídica aumentando os níveis de aldeídos em tecido neuronal.

5.2. Avaliação dos ratos transgênicos SOD1^{G93A}: modelo de Esclerose Lateral Amiotrófica

O modelo de ratos transgênicos utilizado caracteristicamente apresenta fraqueza inicial em um dos membros pélvicos, que progride para o outro membro pélvico e posteriormente para os membros torácicos, como descrito por Howland (Howland et al., 2002). Por se tratar de um modelo recente, desenvolvido há pouco mais de dez anos, as avaliações de estágio e de progressão da doença nestes animais têm sido feitas de forma subjetiva e heterogênea.

Devido à necessidade de estabelecer critérios objetivos de avaliação da progressão clínica neste modelo, alguns grupos vêm propondo critérios para análise. O primeiro grupo a propor um conjunto de critérios objetivos para avaliação deste modelo foi o de Okano (Matsumoto et al., 2006), que publicou uma escala (com níveis de 0 a 5) baseada em reflexos de endireitamento, na capacidade de levantar na caixa e na presença ou não de algum déficit funcional motor. Esta escala, embora ainda dependente de parâmetros subjetivos, permite estratificar animais quanto ao estágio do comprometimento motor a que estão sujeitos. Neste trabalho é proposta também a utilização da variação de peso como método preditivo do início da doença.

Posteriormente outros parâmetros foram utilizados para avaliações, como força de preensão, equilíbrio em rotarod, e outros reflexos (Filali, Lalonde e Rivest, 2011; Seo et al., 2011). Mais recentemente, um trabalho mostrou o uso de um sistema computadorizado capaz de analisar diversos parâmetros de marcha, provendo maior acurácia e sensibilidade de avaliação (Mancuso et al., 2011).

Para melhor padronização do modelo em nosso laboratório, e para uma melhor caracterização dos animais assintomáticos e sintomáticos definimos critérios e metodologia para avaliação dos animais SOD1^{G93A} e os controles. Baseados principalmente no trabalho de Matsumoto (Matsumoto et al., 2006) e na escala de avaliação de lesão medular de Basso, Beattie e Bresnahan (Basso, Beattie e Bresnahan, 1995) criamos uma ficha de avaliação para utilizarmos em nossos animais (APÊNDICE A).

Em nossa avaliação consideramos o aparecimento de sinais e sintomas o comprometimento de movimento de algum membro – torácico ou pélvicos (valor 0 ou S) ou a alteração em pelo menos dois dos seguintes campos (em parênteses o valor considerado normal): tempo de suspensão (>5); inclinação (>80) e tempo no plano inclinado (>5); endireitamento em 30 segundos (S); arrastando parte do corpo (N); cauda arrastando (N); torção do corpo (0).

Como descrito por Matsumoto, em nossa avaliação de peso dos animais foi possível detectar um patamar no peso dos animais SOD1^{G93A} que antecede o aparecimento de sinais e sintomas, e uma perda de peso concomitante com o aparecimento dos sintomas (Figura 22). Entretanto, a análise do conjunto de dados de cada grupo mascara as diferenças entre os animais controles e doentes (Figura 23A). Quando os dados de cada animal são plotados individualmente é nítido o perfil de estabilização e queda de peso (Figura 23B). Decorre que devido à dispersão entre a idade de aparecimento dos sintomas, a análise individual do animal é mais informativa do estado físico dos animais, o mesmo não ocorrendo para a análise do grupo.

Os resultados obtidos em nossa avaliação são semelhantes com os descritos na literatura para o modelo. O aparecimento dos sintomas

(aproximadamente 116 dias, Tabela 20) foi praticamente o mesmo descrito por Howland – 115 dias (Howland et al., 2002). O peso máximo, assim como Matsumoto (Matsumoto et al., 2006), foi observado em torno de 106 dias, período em que se inicia a perda neuronal motora nos animais (Howland et al., 2002). Desta forma, o método que utilizamos para avaliar os animais nos permitiu correlacionar os estágios de desenvolvimento da doença dos animais avaliados com animais avaliados por outros grupos, o que nos dá maior liberdade ao correlacionar nossos dados com os dados destes grupos.

Baseados nestes resultados, dividimos os animais avaliados em: (1) grupo assintomático – animais com 2 meses ou 60 dias de idade cujos parâmetros avaliados estão normais e semelhantes aos controles ; (2) grupo pré-sintomático – animais com 3 meses ou 90 dias de idade que não apresentam sintomas, mas estão na eminência de; e (3) grupo sintomáticos – animais com “4 meses” ou cerca de 116 dias de idade cujos sintomas são notórios e apresentam perda de peso entre 15 e 20% do peso máximo.

5.3. Análise de aldeídos em cérebro e medula de ratos transgênicos SOD1^{G93A}

Importantes componentes celulares, os fosfolipídios desempenham uma grande variedade de funções, como formação de membranas bilamelares, reserva de energia, e precursores de moléculas com função de segundo mensageiro. O papel na sinalização celular e na fisiologia tecidual é conhecido para uma variedade

de doenças e desordens neurológicas nas quais o metabolismo de lipídios está alterado (Wenk, 2005). Estas alterações ganham relevo no sistema nervoso central em razão da alta concentração de lipídios no tecido nervoso, superada apenas no tecido adiposo (Adibhatla e Hatcher, 2007). A presença de ácidos graxos poli-insaturados, especialmente o ácido docosahexaenóico (DHA), no tecido nervoso o torna bastante susceptível à peroxidação lipídica. Quando da lesão de membranas, são gerados hidroperóxidos que decompostos dão origem a aldeídos altamente citotóxicos, especialmente os α,β -insaturados.

Aldeídos têm sido implicados na Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA). Alguns trabalhos demonstraram aumento de aldeídos em líquido cefalorraquidiano de pacientes (Simpson et al., 2004; Siciliano et al., 2007). Também foi descrita, em pacientes (Shibata et al., 2004) e em animais modelo de ELA (Perluigi et al., 2005), a capacidade de determinados aldeídos em promover modificações proteicas. Entretanto, até o momento não se investigou a existência de algum aldeído, ou grupo de aldeídos, gerado preferencialmente nesta doença. A dificuldade de detecção dos aldeídos – altamente reativos e em baixas concentrações – e os cuidados necessários para manipular amostra biológica – tão complexa que facilmente gera artefatos que dificultam e/ou impedem a detecção e quantificação de aldeídos envolvidos no processo patológico – são alguns dos motivos de pouco ter sido feito neste campo de lipidômica, para ELA e para outras doenças (Berliner e Zimman, 2007).

Com o intuito de avaliar a natureza e identidade dos aldeídos envolvidos em ELA e o potencial desta classe de compostos como biomarcadores de estresse redox, analisamos seis aldeídos em cérebro e em medula de ratos modelo desta doença. Optamos por analisar os derivados hidrazônicos dos aldeídos, um método

de derivatização clássico, por espectrometria de massas. Desenvolvemos metodologia de HPLC-MS/MS para estas análises, visto esta técnica ter sido pouco utilizada para avaliar derivados hidrazônicos de aldeídos em amostras biológicas (Andreoli et al., 2003; Duan, Zhong e Chen, 2008).

Avaliamos ratos em diferentes estágios para tentar compreender as fases e o progresso da neurodegeneração. Considerando que na avaliação física e comportamental que fizemos nos animais observamos o aparecimento dos sintomas em torno de 116 dias – em acordo com o descrito (Howland et al., 2002) –, resolvemos avaliar os aldeídos em três estágios, a saber: assintomáticos – animais com 60 dias de idade, pré-sintomáticos – animais com 90 dias de idade, e sintomáticos – animais com idade entre 110-130 dias.

Pela metodologia que desenvolvemos fomos capazes de detectar e quantificar quatro dos seis aldeídos analisados: *trans,trans*-deca-2,4-dienal (DDE), *trans,trans*-nona-2,4-dienal (NDE), *trans,trans*-hexa-2,4-dienal (HDE) e *trans*-hexa-2-enal (HE). Estimamos a quantidade de aldeídos através de curvas de calibração construídas a partir da área dos derivados hidrazônicos (Figura 24).

A análise feita na medula destes animais não apresentou alteração significativa em nenhum destes aldeídos (Figura 25). Entretanto, há variação nos resultados obtidos. Esses desvios podem ser decorrentes de variações inerentes aos animais. Regiões específicas da medula podem estar preferencialmente afetadas, podendo a região afetada variar entre os animais. Portanto, a análise global feita pode ter mascarado alterações. Estudos detalhados observando-se as regiões medulares separadamente podem ser de grande valia para compreender a formação destes aldeídos em ELA.

Nas análises do cérebro verificamos aumento significativo, em relação ao controle, da quantidade total dos aldeídos analisados nos animais de dois e quatro meses (Figura 26A). O aumento em ratos assintomáticos sugere que ocorre algum desequilíbrio oxidativo nesta fase; podendo desencadear eventos que levem à degeneração neuronal. Contudo, não verificamos alterações dos aldeídos aos três meses. Possivelmente o organismo destes animais esteja respondendo ao estresse redox existente reestabelecendo uma condição homeostásica. Porém, lesões secundárias podem ocorrer e sobrepular os mecanismos de defesa ativados, o que levaria a danos extensos que resultariam em sinais e sintomas notórios. Possivelmente é o que promove o aparecimento dos sintomas e as alterações nos níveis dos aldeídos aos quatro meses de idade no modelo utilizado.

Analisados individualmente, constatamos que existe um perfil diferenciado entre aldeídos (Figura 26B-D). Os níveis de NDE nos animais transgênicos não sofrem alteração significativa em nenhuma das idades analisadas em relação ao controle, embora haja tendência de aumento aos três meses de idade.

A elevação dos níveis de HE e HDE no estágio assintomático indica uma possível participação destes aldeídos em mecanismos iniciais da doença (Figura 26C e E). Em fase pré-sintomática os níveis destes dois aldeídos são equiparáveis nos dois grupos. Por outro lado, DDE tem níveis significativamente elevados nos ratos SOD1^{G93A} frente aos controles, apontando um papel para este aldeído de dez carbonos em processos secundários de causa e/ou consequência da doença.

O grupo do Prof. Dr. Terao avaliou o perfil de decomposição dos ácidos linoleico, araquidônico e docososaenóico, caracterizando pelo menos 33 aldeídos (Kawai, Y., Takeda, S. e Terao, J., 2007). Entre estes, foi demonstrado que o DDE é formado a partir de hidroperóxidos de ácido linoleico, que é abundante no cérebro.

A neuroinflamação que ocorre nos animais modelo e em pacientes de ELA (Nagai et al., 2001; Howland et al., 2002) acarreta peroxidação lipídica acentuada, gerando grande quantidade de hidroperóxidos. A formação e decomposição de hidroperóxidos do ácido linoleico nos estágios avançados da doença estão de acordo com o aumento de DDE observado nos ratos SOD1^{G93A}.

Estes resultados apontam o cérebro como foco primário de neurodegeneração em ELA. Parece haver um desequilíbrio redox no cérebro, provavelmente no córtex motor, que levaria a morte celular. Somente após este evento haveria degeneração anterógrada de neurônios motores medulares. Aparentemente existe ao longo da evolução da doença perfil diferenciado de geração de aldeídos: em fases iniciais estariam envolvidos aldeídos com menor número de carbonos e em estágios mais avançados aldeídos de cadeias maiores teriam maior contribuição.

É possível que a análise dos produtos de metabolização endógena destes aldeídos possa ser utilizada como parâmetro de avaliação de estágio de evolução da doença, podendo ser um dos primeiros biomarcadores de monitoração da terapêutica de pacientes com ELA.

Chamou-nos atenção o fato de não havermos detectado HNE em nossas análises, embora já tenha sido detectado em líquido cefalorraquidiano de pacientes (Simpson et al., 2004; Siciliano et al., 2007). Este fato, possivelmente, deve estar relacionado com a alta reatividade deste aldeído, que pode reagir facilmente com diversas biomoléculas, a exemplo das modificações promovidas por HNE em ELA detectadas em análises proteômicas (Pedersen et al., 1998; Perluigi et al., 2005).

Considerando que líquido cefalorraquidiano não apresenta sistemas antioxidantes tão efetivos quanto os celulares, a exemplo do sistema de glutathione

que é citosólico, é possível que a detecção direta do HNE não seja a melhor opção para quantificá-lo em nossas amostras. Análise do aduto de HNE com glutathiona (GSH) e/ou de seus derivados mercaptúricos é, ao que parece, a melhor opção para avaliar alterações e quantificar este aldeído, visto a conjugação com GSH ser importante mecanismo de detoxificação deste tipo de aldeído.

5.4. Análise de glutathiona

O tripeptídeo glutathiona tem importante papel na defesa antioxidante e manutenção do equilíbrio redox, especialmente no sistema nervoso central (Kosower e Kosower, 1978; Dringen, 2000; Aoyama, Watabe e Nakaki, 2008). Concentrações citosólicas de glutathiona próximas a 10 mM (Ostergaard, Tachibana e Winther, 2004) mantêm o equilíbrio redox por meio de sistema tamponante redox GSH/GSSG. Recentemente foi demonstrado em *Saccharomyces cerevisiae* que este sistema tamponante é finamente regulado por sequestro de GSSG em vacúolos e por múltiplos sistemas redutores de GSSG, como glutathiona redutase (Gpx), tiorredoxina (Trx) e glutarredoxina (Grx) (Morgan *et al.*, 2013). Estima-se uma relação GSH/GSSG citosólicas de 50.000, maior que estimativas baseadas no conteúdo total de glutathiona – de 30 a 100 (Winther e Jakob, 2013). GSH serve ainda como fonte de prótons para redução de peróxidos catalisada por Gpx, incluso peróxidos lipídicos que dão origem a aldeídos.

Para entender o papel de aldeídos – e seus metabólitos – em ELA e avaliar o potencial de adutos de glutathionilação como biomarcadores de estresse redox, nós

avaliamos a quantidade deste peptídeo, em sua forma reduzida (GSH) e oxidada (GSSG), e a razão GSH/GSSG.

Garantir a manutenção do estado tiol-dissulfeto durante a manipulação da amostra é ponto crítico em análises de glutathiona. GSH sofre auto-oxidação em pH maior que 7, além de ser enzimaticamente metabolizada – mediada inicialmente por γ -glutamyl-transpeptidases (GGTs), que têm atividade máxima em pH neutro (Monostori et al., 2009). Uma solução é acidificar o meio, inibindo auto-oxidação e inativando enzimas. Concomitantemente, a acidificação desproteíniza a amostra, essencial na determinação de GSH e GSSG (Hansen e Winther, 2009).

Para análises de HPLC com detecção eletroquímica, cérebro de ratos sintomáticos – aproximadamente quatro meses de idade – foi homogeneizado em fosfato de sódio 25 mM com 25 μ M de ácido octassulfônico e 1% de acetonitrila. O pH próximo a 2 desta solução mantém o estado redox tiol-dissulfeto da amostra. Foi ainda adicionado ácido metafosfórico 5% para melhor desproteínização da amostra.

As amostras assim preparadas apresentaram razão GSH/GSSG semelhante à relatada por Pu e col. utilizando mesma técnica (Pu, Kamendulis e Klaunig, 2009) (Figura 28, A), apesar dos altos desvios em nossas amostras. A quantificação de GSH e GSSG corrigida por grama de tecido (Tabela 21) também se assemelha à relatada por outros grupos (Zhu, Carvey e Ling, 2006; Sener et al., 2007; Ersahin et al., 2009; Toklu et al., 2009). Contudo, a normalização de GSH e GSSG por mg de proteína é mais acurada. Nossos resultados assim apresentados (Figura 28B e C) apresentam valores elevados comparados a outros trabalhos (Manikandan et al., 2006; Konyalioglu, Durmaz e Yalcin, 2007).

De fato, não verificamos alteração significativa entre os animais controles e sintomáticos, nem na razão GSH/GSSG, nem nas quantidades de GSH e GSSG,

independentemente da normalização utilizada. Entretanto parece existir tendência de diminuição tanto de GSH como de GSSG nos animais doentes.

Todavia, se analisarmos o conteúdo total de glutathiona (quantidade de GSH somada a de GSSG) verificamos diminuição significativa nos animais SOD1^{G93A} (Figura 28D). A priori, imagina-se que exista redução na síntese de glutathiona, ou o consumo está além da capacidade de síntese. Sabendo que nestes animais há aumento de aldeídos α,β -insaturados parece haver consumo de glutathiona em mecanismos de detoxificação. De fato, a depleção de GSH neuronal por aldeídos foi demonstrada *in vitro* (Long et al., 2008).

Um segundo grupo independente de animais sintomáticos foi analisado por HPLC acoplado a espectrometria de massa. Espectrômetros de massa (MS) são mais sensíveis, específicos e fornecem informação estrutural – pelo perfil de fragmentação observado. Por sua vez, análises eletroquímicas detectam qualquer molécula que sofra oxidação ou redução no potencial aplicado. Outra desvantagem na análise eletroquímica é a instabilidade cromatográfica ao longo das análises devido ao fenômeno de pareamento iônico, necessitando cuidados – como lavagem da coluna entre injeções subsequentes – para garantir repetibilidade ao ensaio. Isto acarreta maior tempo de análise e menor reprodutibilidade e confiabilidade.

Para as análises desenvolvemos um método de HPLC-ESI-MS/MS utilizando o monitoramento de reações selecionadas (SRM), que proporciona maior sensibilidade. A utilização de padrão interno isotopicamente marcado e a avaliação de duas transições de SRM para cada molécula – a primeira para quantificação e uma segunda para confirmação (Figura 29) – nas análises de MS permitiram quantificação inequívoca do analito de interesse. De fato, as análises por MS mostraram-se mais confiáveis, apresentando menores desvios. Enquanto na

espectrometria de massas obtivemos desvios de 10,4 a 27,2% da média, na detecção eletroquímica obtivemos valores de 21,4 a 77,8%.

Nesta análise, a razão GSH/GSSG obtida é muito semelhante à obtida anteriormente e condizente com dados da literatura (Pu, Kamendulis e Klaunig, 2009). Novamente, parece haver tendência de diminuição nos animais modelo de ELA (Figura 30). Embora não haja uma padronização na apresentação dos dados, os níveis de GSSG (Figura 30B) e GSH (Figura 30C) obtidos são comparáveis aos níveis relatados em cérebro de ratos (Ates et al., 2009; Chen et al., 2013) e em modelos celulares de ELA (Muyderman et al., 2009; Tartari et al., 2009). Não houve, contudo diferença estatística, mesmo nos níveis totais – GSH + GSSG (Figura 30D).

Conforme previamente discutido, parece haver consumo de glutathione em mecanismos de detoxificação. Contudo, não houve alteração significativa na razão GSH/GSSG, sugerindo mecanismos compensatórios eficientes pra manter os níveis de glutathione em condições normais. De fato, Poot e col. (Poot et al., 1987) observaram que fibroblastos expostos ao HNE têm perda transiente de glutathione intracelular que é restaurada em poucas horas, e correspondia após 24 horas ao dobro do nível encontrado anteriormente. E mais importante, foi demonstrado existir maquinaria responsável por compartimentaliza GSSG e garantir estado redox citosólico adequado (Morgan et al., 2013).

Neste sentido a quantificação dos adutos de glutathione nos ajudaria a elucidar se de fato a glutathione está sendo consumida nos animais modelos e também dará informações sobre a geração de aldeídos α,β -insaturados em ELA.

5.5. Síntese, purificação e caracterização de adutos de glutathiona

Glutathiona, L- γ -glutamil-L-cisteinilglicina, é o principal tiol não proteico envolvido na defesa celular antioxidante. Devido ao seu grupo tiol livre, altamente nucleofílico, a forma reduzida (GSH) reage eficientemente com aldeídos α,β -insaturados, como o HNE (Esterbauer, Schaur e Zollner, 1991).

A principal via de detoxificação de aldeídos α,β -insaturados, em especial hidroxi e oxoalcenais, é a conjugação com GSH (Blair, 2010). De fato, a conjugação com GSH é considerada a rota primária da detoxificação de aldeídos, seguida por modificações de oxido-redução, e por último, pela formação de ácidos mercaptúricos (Alary, Guéraud e Cravedi, 2003; Awasthi, Ansari e Awasthi, 2005). No processo de conjugação a dupla ligação é reduzida pela ligação entre o carbono β do aldeído e o enxofre da GSH. A glutathionilação é um processo espontâneo que ocorre de 300 a 600 vezes mais rápido quando catalisada pela enzima glutathiona-S-transferase (GST) (Esterbauer, Schaur e Zollner, 1991).

Sendo aldeídos clássicos produtos gerados em estresse redox, os adutos de glutathiona apresentam elevado potencial como biomarcador de estresse redox. A síntese, purificação e caracterização dos padrões desses adutos possibilita analisá-los em tecido de ratos modelo de ELA por metodologia baseada em HPLC-MS/MS.

5.5.1. Síntese, purificação e caracterização do aduto

Glutationil-4-hidroxinona-1-ol (GS-HNE)

A presença de hidroxila na posição alfa da dupla ligação torna o HNE mais eletrofílico (Schaur, 2003). A conjugação de HNE com GSH, catalisada pela enzima GST, ocorre via reação de adição de Michael (Carini, Aldini e Facino, 2004). O produto formado sofre um rearranjo intramolecular formando um hemiacetal cíclico (Schauenstein, Dorner e Sonnenbichler, 1968; Esterbauer, 1970). Na forma cíclica o produto GS-HNE apresenta 3 carbonos assimétricos (Figura 60) e, por conseguinte, 8 isômeros.

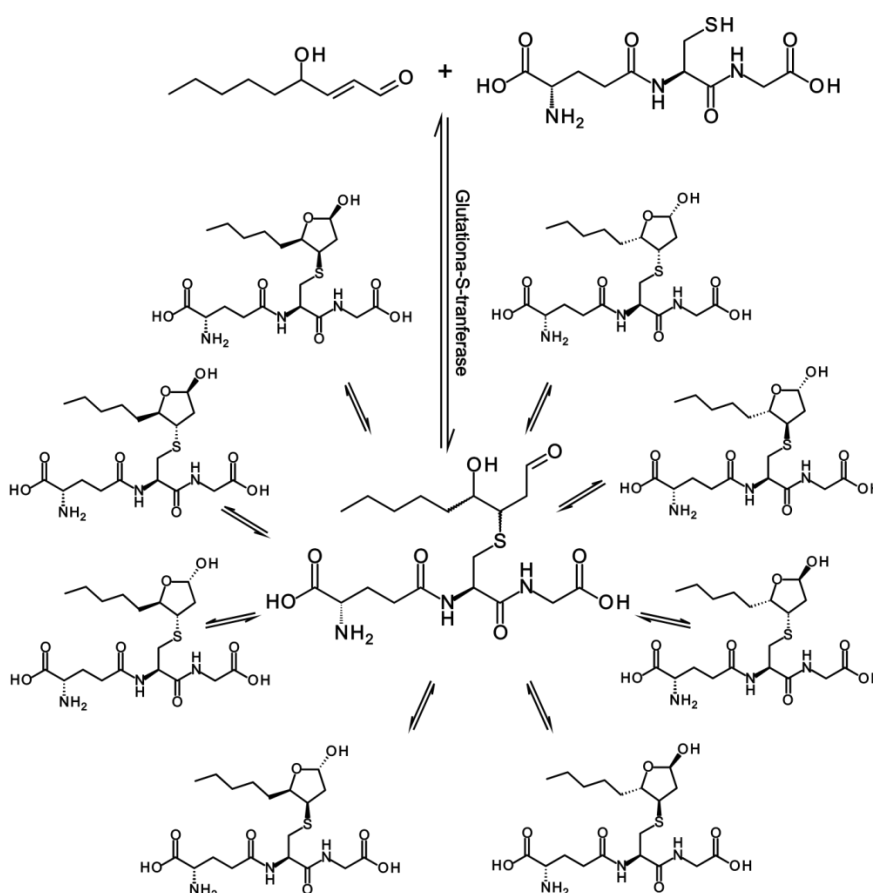


Figura 60 – Reação de *trans*-4-hidroxi-2(E)-nonenal com glutatona reduzida. Reação de adição 1,4 seguida por ciclização intramolecular formando Glutationil-4-hidroxinona-1-ol (GS-HNE)

A elevada instabilidade e reatividade de HNE, que dificulta a detecção e quantificação direta deste, e níveis alterados do aldeído em pacientes com ELA (Simpson et al., 2004; Siciliano et al., 2007), conferem à análise de glutathionil-4-hidroxi-3-penteno-2,5-dione (GS-HNE) em animais SOD1^{G93A} importante papel para o entendimento de mecanismos da doença.

Para isso, o padrão GS-HNE foi sintetizado, purificado e caracterizado. A síntese foi feita de acordo com metodologia já descrita (Falletti et al., 2007). Contudo, desenvolvemos método para a purificação do aduto. Objetivando análises por HPLC-MS/MS, não utilizamos tampão como fase móvel, pois sais dificultam a ionização do analito e, como ocorre deposição no equipamento, também diminuem a sensibilidade. Utilizamos ácido fórmico, volátil e que não se deposita nos componentes do espectrômetro. Ademais, ácidos podem facilmente doar prótons para os analitos que adquirem carga positiva e são mais bem analisados no MS.

Obtivemos excelente condição cromatográfica onde os oito isômeros separam-se em três picos (Figura 31, 26 a 30 min). O perfil cromatográfico indicava misturas de 2 enantiômeros, para os picos 1 (26,9 minutos) e 3 (29,7 minutos), e de 4 diastereoisômeros, para o pico 2 (28,2 minutos) que apresenta uma leve duplicação sugerindo coeluição de dois picos com dois enantiômeros cada (Figura 31).

Considerando que o HNE foi o reagente limitante, esperava-se obter 5×10^{-5} mols de GS-HNE (23,15 mg) – considerando rendimentos de 100% na hidrólise de HNE-DMA e na síntese do aduto. Ao invés obtivemos um rendimento de 19,8 mg, confirmando que com este método obtivemos um rendimento final extremamente alto (85,5%, Tabela 22) e de alta pureza (conforme constatado por MS e RMN).

Por injeção direta em espectrômetro de massas observamos o pico da molécula protonada $[M+H]^+$ $m/z = 464$ e da desidratação $[M+H-H_2O]^+$ $m/z = 446$ – conforme descrito por Falletti (Falletti et al., 2007) – nas três frações coletadas (Figura 32). Não existiam outros picos, comprovando a pureza dos produtos obtidos. Para garantir a identificação inequívoca do íon $[M+H]^+$ $m/z = 464$ como GS-HNE, fizemos a fragmentação para avaliar o perfil de fragmentação (Figura 33). O perfil foi idêntico nas três frações e é característico do aduto GS-HNE (Volkel et al., 2005).

Contudo a análise por MS não é suficiente para confirmar a estrutura molecular, a pureza e principalmente a mistura de diastereoisômeros proposta. As análises de RMN 1H confirmaram a identidade e a pureza de GS-HNE (Figura 34, Figura 44 e Figura 45).

No espectro de RMN 1H da primeira fração (Figura 34) verifica-se uma mistura de dois isômeros, provavelmente um par de enantiômeros que genericamente denominamos A e B. Como o aduto GS-HNE apresenta anel heteroatômico de cinco átomos que lhe confere rigidez, os hidrogênios vicinais *cis* ou *trans* deixam de ser equivalente dada a diferença no ângulo diedro. Além disso, os hidrogênios de um grupamento metileno separados de um dos centros quirais do anel por até sete ligações não são equivalentes, ou mesmo, pode ocorrer acoplamento hidrogênio-hidrogênio a uma distância maior do que a normalmente prevista, de três ligações. Assim, diferenças no deslocamento químico e na constante de acoplamento são esperadas (Tabela 23).

A análise direta do espectro de RMN 1H não permitiu atribuição completa dos sinais, e assim caracterizar o aduto. Para fazer estas atribuições foram feitas análises de RMN ^{13}C (Figura 35), DEPT (Figura 36), correlações heteronucleares

bidimensional a curta distância $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ – HMQC (Figura 37) e correlações heteronucleares bidimensional a longa distância $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ – HMBC (Figura 38).

As análises de HMQC e HMBC permitiram identificar carbonos e hidrogênios ligados diretamente (curta distância) ou que estão separados por 3 ligações (longa distância). Assim, conhecidos o sinal dos hidrogênios H-3 (2,19 ppm) e H-4 (2,57 ppm), pudemos definir os carbonos C-3 (26,13) e C-4 e (31,31) ppm aos quais estão ligados diretamente (8 e 11, Figura 37). Como estes carbonos acoplam a longa distância com o próton em 3,83 ppm (9 e 10, Figura 39), este sinal corresponde ao H-2. Este raciocínio foi utilizado para atribuição dos sinais nos espectros de hidrogênio (Figura 34), carbono (Figura 35), DEPT (Figura 36), HMBC (Figura 37) e HMQC (Figura 38).

Assim verificamos que o carbono C-18 apresentou “desdobramento” do sinal, decorrente do fato de grupos diastereotópicos (ligados a um carbono quiral) terem diferentes deslocamentos químicos no espectro de RMN, como discutido para o espectro de RMN ^1H . Da mesma forma, este efeito pode ser observado quando o grupamento e o centro quiral estão separados por até sete ligações (Silverstain, Bassler e Morril, 1994). De fato, no espectro de carbono houve diferença de deslocamento entre os sinais de dez carbonos (C-6 e C-7, C-10 a C-16 e C-18).

Os efeitos do centro quiral foram notórios nos hidrogênios e nos carbonos da estrutura do anel. Os prótons H-11 tiveram sinais distintos na região de campo baixo, 5,61 e 5,49 ppm, para os isômeros A e B, respectivamente. Pela integração destes sinais verificamos que a proporção do isômero A em relação ao isômero B é de 3,32. O mesmo “desdobramento” é visto para o carbono C-11 (25 e 26, Figura 37). Para H-13 e H-14 vimos também sinais diferentes para cada isômero: H-14 (A) em 4,35 ppm e H-14(B) em 4,15 – 4,10 ppm, H-13(A) em 3,64 – 3,58 ppm e H-13(B)

em 3,49 ppm. A razão de área entre os sinais destes prótons é de 3,13 (H-14) e 3,22 (H-13).

Para os prótons H-12 há uma particularidade, pois os H-12 do mesmo isômero são diastereotópicos devido à rigidez do anel que promove diferenças no ângulo diedro. Em nosso espectro vemos quatro sinais de prótons H-12, referentes aos prótons H-12 α (A) – 2,49 ppm, H-12 β (A) – 2,28 ppm, H-12 α (B) – 2,66 ppm e H-12 β (B) – 2,05 ppm, sendo a razão calculada entre os isômeros de 2,69, para H α , e 3,21, para H β . Com base nestes resultados podemos estimar que o isômero A está $3,11 \pm 0,25$ vezes mais concentrado que o isômero B.

Cabe ressaltar que os prótons H-10 se comportam semelhantemente aos H-12 apresentando sinais diferentes para H-10 α , em 3,13 ppm, e H-10 β , em 2,93 ppm.

Os sinais no campo mais baixo, entre 172 e 175 ppm (Tabela 24), foram atribuídos aos carbonos quaternários, visto que no espectro DEPT não fornecem sinal (Figura 36). Pelo padrão de acoplamento foram determinados dentre estes os carbonos C-7 (172,61 ppm), C-5 (174,71 ppm), C-1 (173,46 ppm) e C-9 (173,52 ppm) - Figura 43.

Atribuídos todos os sinais nos espectros de próton e carbono, e feitas todas as correlações de sinais nos experimentos de duas dimensões, analisamos as demais frações. As análises de RMN ^1H das duas outras frações apresentaram espectros com o mesmo perfil da primeira fração. Nestes casos a interpretação e as atribuições foram feitas por comparação com o espectro da primeira fração.

O espectro do pico 2 (Figura 44) demonstra que trata-se de uma mistura de 4 isômeros, como esperado pelo perfil cromatográfico de purificação. Isto pôde ser facilmente percebido ao observarmos quatro sinais referentes ao H-11 de cada isômero na região de campo baixo.

Os sinais dos prótons H-2, H-3, H-4, H-6, H-8, H-15 e H-19 foram atribuídos em comparação com o espectro do pico 1, embora a multiplicidade de alguns sinais esteja alterada (Tabela 25). Outros sinais, especialmente os duplicados devido à isomeria, foram atribuídos tanto por comparação quanto por análise da área do sinal. A integração dos sinais nos permitiu observar ainda que alguns sinais estão sobrepostos, caso do próton H-14(E) sobreposto pelo próton H-2, e do H-13(E) sobreposto pelo H-10 α . Uma observação mais criteriosa nos mostra que o H-10 α dos isômeros tem deslocamento diferente, porém não foi possível deduzir com certeza qual ou quais isômeros têm sinal em 3,20 ppm sobrepondo H-13(E), e quais o tem em 3,15 – 3,08 ppm. Outro ponto que vale ressaltar é a pronunciada diferença de deslocamento de H-16 em relação a H-17 e H-18. Pela razão entre a intensidade dos sinais dos isômeros pudemos concluir que, em relação ao isômero F, as concentrações dos isômeros C, D e E são $3,28 \pm 0,28$, $2,70 \pm 0,26$ e $2,20 \pm 0,44$ vezes maiores, respectivamente.

A terceira fração também é mistura de isômeros. No espectro de RMN ^1H (Figura 45) é nítido os sinais referentes aos prótons H-11(G) e H-11(H). Como na primeira fração, temos uma mistura de enantiômeros, sendo os espectros muito semelhantes (Tabela 26).

Interessantemente este espectro apresenta um duplete intenso em 2,1 ppm, provavelmente referente aos prótons da amina do carbono C-2, e um intenso singlete em 8,34 ppm, que aparece fracamente nas demais frações, que deve ser dos hidrogênios amídicos. Os prótons de amidas, álcoois e ácidos normalmente não são observados no espectro de RMN devido à troca por deutério. Os isômeros desta fração, ou pelo menos um deles, possivelmente tem uma conformação espacial que dificulta esta troca, seja por impedimento estérico, seja por estabilização através de

ligações de hidrogênios. Uma atribuição definitiva, entretanto, não é possível baseado somente nos dados obtidos nestes experimentos.

Com estes experimentos pudemos fazer as atribuições de sinais a todos os prótons da molécula. Embora em nossos experimentos não seja possível precisar o padrão de acoplamento para todos os prótons em todos os isômeros, fomos capazes de comprovar a identidade molecular e estrutural das frações coletadas como sendo do aduto de glutathiona com o aldeído *trans*-4-hidroxi-2-nonenal. Pudemos também confirmar que o aduto GS-HNE está elevadamente puro, dado que não são vistos sinais de compostos contaminantes nem por espectrometria de massas nem por ressonância magnética nuclear.

5.5.2. Determinação dos coeficientes de extinção molar (ϵ) de glutathionil-4-hidroxinona-1-ol

Tendo certeza de que as frações coletadas eram os isômeros de GS-HNE e garantida a pureza das frações, tornou-se necessário calcular as concentrações das soluções do aduto. Uma forma seria pesar o sólido (GS-HNE) e solubilizá-lo em volume conhecido de solvente. Rejeitamos essa alternativa devido à pequena quantidade do aduto obtida, em torno de 5-10 mg em cada fração, comprometer a exatidão da pesagem. Um método eficiente é o cálculo por RMN ^1H , utilizando um padrão interno de concentração conhecida. Considerando custo, facilidade, agilidade e acessibilidade, a melhor técnica é a análise espectrofotométrica. Entretanto é necessário o valor do coeficiente de extinção molar (ϵ) do aduto GS-HNE. A

determinação deste coeficiente foi feita então conforme metodologia descrita (item 3.11.4).

Inicialmente calculamos a área de sinal de um próton no aduto e no DSS em cada espectro de RMN ^1H (Tabela 27). Considerando a razão entre a intensidade de sinais, inferimos a razão GS-HNE/DSS em cada solução. Multiplicando a razão pela concentração de DSS na solução, calculamos a média da concentração do aduto nas três soluções em $3,10 \pm 0,05$ mM, e uma concentração de $18,61 \pm 0,29$ mM na solução mãe, da qual fizemos as diluições (Tabela 27).

A partir da solução mãe, fizemos diluições para 1, 5, 10, 50 e 75 μM e as analisamos espectrofotometricamente na região de 190 a 240 nm (Figura 46). A partir dos valores de absorvância destas soluções em 192 nm – comprimento de maior absorção – e 220 nm – comprimento normalmente acompanhado durante separação cromatográfica – plotados contra as concentrações molares, calculamos curva de concentração onde o coeficiente angular da equação da reta corresponde ao valor do ϵ (Figura 47). Desta forma determinamos o valor do coeficiente em $\epsilon_{192\text{nm}} = 12.462$ ($\text{mol} \times \text{L}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$) para 192 nm e $\epsilon_{220\text{nm}} = 1.255,3$ ($\text{mol} \times \text{L}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$) para 220 nm.

5.5.3. Síntese, purificação e caracterização do padrão S-(3-hidroxi-1-metilpropil)-glutathiona (GS-HMP)

O aduto S-(3-hidroxi-1-metilpropil)-glutathiona foi sintetizado com a mesma metodologia utilizada para o aduto GS-HNE, seguido de redução da carbonila

aldeídica, para aumentar a estabilidade do aduto. Sem esta etapa de redução a carbonila, que neste aduto não cicliza, fica disponível para reagir, especialmente com a amina do ácido glutâmico do aduto podendo formar dímeros ou ciclizar. Ademais a redução deste aduto ocorre *in vivo* (Kuiper et al., 2008) é uma das vias de detoxificação de crotonaldeído, possibilitando assim a análise de um produto mais estável.

O produto foi purificado e a caracterização feita por MS e RMN comprovou a pureza de GS-HPM. Pelos espectros de RMN observamos que obtivemos uma mistura de isômeros gerados pela formação do carbono assimétrico ligado ao enxofre da cisteína.

O padrão de multiplicidade de diversos hidrogênios (Figura 51) e o desdobramento de sinais de carbono no espectro de DEPT (Figura 52) comprova que os dois isômeros coeluíram no pico coletado. O espectro de massas confirma tratar-se de um único composto com relação massa carga $m/z = 380$ (Figura 50).

5.6. Análise de adutos de glutathiona em cérebro e medula de ratos SOD1^{G93A}

As elevadas concentrações de GSH provê largo excesso em reações com compostos eletrofílicos, que é potencializado pela ampla variedade de glutathiona-S-transferases (GST) intracelulares que facilitam a detoxificação destes compostos através da formação de adutos de glutathiona (Blair, 2010). Aldeídos α,β -insaturados

gerados por peroxidação lipídica são compostos eletrofílicos bifuncionais detoxificados por este processo (Esterbauer, Schaur e Zollner, 1991; Oakley, 2011).

Sendo uma reação reversível a “detoxificação” pode vir a servir como “carreadora” de aldeídos (Gueraud et al., 2010), garantindo que estes compostos se difundam e possam interagir com biomoléculas numa extensão espacial bem maior que seus precursores e, principalmente, que as espécies reativas.

Assim, analisamos concomitantemente por HPLC-UV-ESI-MS/MS os níveis de glutatona e cisteína, reduzidas e oxidadas, e dos adutos GS-HNE e GS-HMP. Verificamos níveis de GSH elevados (aproximadamente o dobro) e reduzidos de GSSG, comparados às nossas análises por HPLC-MS (Figura 30B e C, e Figura 56A e B). Conforme discutido, a análise de glutatona não é trivial sendo influenciada por diversos fatores, a exemplo do pH do tampão utilizado no preparo das amostras. De fato o sistema tampão GSH/GSSG é finamente regulado (Morgan et al., 2013), e a maioria dos dados existentes são erroneamente avaliados por não considerar a complexidade deste sistema. A razão GSH/GSSG observada (Figura 56C), embora baixa, reflete melhor o estado redox citoplasmático esperado de 50.000:1 (Morgan et al., 2013).

Devemos considerar que nestas análises os grupos tios foram protegidos pela reação com N-etilmaleimida (NEM), o que evita que GSH seja consumida por reação com compostos eletrofílicos. Conforme demonstrado por Esterbauer a reação com aldeídos é um processo espontâneo (Esterbauer, Schaur e Zollner, 1991). A destruição das estruturas celulares promove a liberação e até mesmo a geração de compostos capazes de reagir com o grupo tiol de GSH. Parte pode ainda ser oxidado. A proteção de GSH com NEM seria então mais eficiente em evitar o

consumo de GSH e a oxidação do que a simples acidificação do meio, o que de fato demonstram nossos dados.

Embora avaliados, os níveis de cistina não foram detectados. Contudo a forma reduzida, cisteína, que também atua como tampão redox de maneira similar a GSH foi detectada e quantificada. Bem como GSH, não há perturbação nos níveis de Cys nos animais modelo de ELA (Figura 56D). Chama atenção os níveis elevados na medula em comparação com o cérebro, sugerindo uma diferença de papel de Cys nestes dois órgãos.

Outro fato que chama atenção é aumento de GSSG em medula de ratos SOD1^{G93A} assintomáticos (2 meses de idade, Figura 56B). Parece haver um desbalanço redox, que acionando o sistema GSH/GSSG aumenta os níveis de GSSG sem, no entanto, alterar a razão do sistema tamponante. Isto sugere que o tecido está sendo estressado, mas os sistemas antioxidantes conseguem evitar injúria tecidual, como observado pelos níveis de aldeídos neste tecido.

Por outro lado, verificamos níveis alterados de alguns aldeídos α,β -insaturados em cérebro nos animais modelo de ELA em diferentes estágios da doença. Contudo, um aldeído amplamente estudado e implicado em diversos processos degenerativos, o HNE, não foi detectado. De tal modo, o estudo do aduto GS-HNE se apresentou como alternativa para avaliar a formação deste aldeído nos animais modelo e mensurar o potencial deste aldeído como biomarcador. Inclusive, HPLC-SRM/MS em modo positivo tem sido extensivamente utilizado para detecção de adutos de glutathiona como biomarcadores em cultura celular e órgão perfundido (Blair, 2010).

Em nossas análises por HPLC-ESI-MS/MS, foi possível quantificar este aduto observando que não há variação nos níveis de GS-HNE em animais modelo

de ELA, sejam eles assintomáticos, sejam eles sintomáticos (Figura 58). Isto, contudo, não exclui o HNE de ser utilizado como biomarcador de estresse redox.

Porquanto, aldeídos glutationilados estão sujeitos a reduções – mediadas por aldocolo redutases da família 1C – e a oxidações – por ação de aldeído desidrogenases – (Burczynski et al., 2001; Alary, Gueraud e Cravedi, 2003; Xie et al., 2013), evitando que a formação do aduto sirva para translocar o aldeído na célula.

Embora existam estudos com GS-HNE sendo utilizado como biomarcador de estresse redox em modelos animais (Volkel et al., 2005) e em doença de Alzheimer (Volkel et al., 2006), a análise dos derivados oxidados e/ou reduzidos pode ser mais informativa. Evidentemente, estudos com GS-HNE são de grande valia na compreensão do papel de HNE em processos patológicos como já demonstrado em alguns trabalhos (Carini, Aldini e Facino, 2004).

Outro fator a ser considerado é que os produtos de conjugação com glutathione são ativamente transportados para o meio extracelular (Deeley, Westlake e Cole, 2006; Awasthi et al., 2007; Awasthi et al., 2009; Hillgren et al., 2013). No meio extracelular são rapidamente metabolizados por gama-glutamyl-transferase, enzima presente na superfície da membrana plasmática e no plasma (Lee e Jacobs, 2009). Assim atingem a corrente sanguínea e são transportados até os rins, onde são metabolizados a derivados mercaptúricos – conjugados de N-acetilcisteína - e excretados na urina. Estes derivados mercaptúricos podem ser utilizados como biomarcadores de formação de adutos de glutathione endógenos (Blair, 2006). De fato, as formas mercaptúricas têm sido usadas como biomarcador de exposição a agentes exógenos (Hecht, 2002; Anders, 2008) e endógenos (Kuiper et al., 2008; Stevens e Maier, 2008).

Merece destaque em nossos resultados o fato de GS-HNE 3 não ter sido detectado na maioria das amostras, e em muito baixa intensidade em algumas amostras. É descrito que o ácido 13(S)-hidroperoxieicosatetraenoico, um produto de metabolismo do ácido linoleico mediado pela 15-lipoxigenase, sofre decomposição oxidativa enantioseletiva gerando 4(S)-HNE (Schneider et al., 2001). Isto sugere que através do monitoramento específico dos diastereoisômeros do aduto GS-HNE seria possível distinguir entre a via enzimática da peroxidação lipídica –quiral – e a via não enzimática mediada por espécies reativas – racêmica. Não é possível creditar à peroxidação lipídica enzimática o fato de não termos detectados GS-HNE 3, visto não termos a caracterização quiral de dos padrões. Pensando que quantificamos os níveis basais destes isômeros (GS-HNE 1 e 2), Pensando que quantificamos os níveis basais destes isômeros (GS-HNE 1 e 2), é plausível que estes níveis sejam decorrentes de metabolismo enzimático basal. A caracterização quiral precisa ser feita para podermos inferir sobre a via de origem do HNE analisado.

Semelhantemente os resultados obtidos para o aduto S-(3-hidroxi-1-metilpropil)-glutathiona (GS-HMP) não demonstra alteração nos níveis deste aduto no modelo estudado. Embora pareça haver aumento do nível deste aduto em cérebro de animais sintomáticos, o perfil não apresenta diferença estatisticamente significativa. É possível que este aduto esteja sendo rapidamente detoxificado e excretado das células, como discutido previamente. Ademais, os aumentos nos níveis de 1,N²-propanodGuo, aduto que pode ser gerado a partir de CRT, indica a existência pelo menos dois quadros. É possível que este aldeído não esteja sendo eficientemente detoxificado, gerando lesões em biomoléculas. Ou, o que parece ser um quadro mais realista, os mecanismos de detoxificação de aldeídos podem estar induzidos promovendo a rápida detoxificação, excreção e metabolização.

Baseado nos resultados observados, podemos concluir que a análise dos produtos reduzidos e oxidados, e principalmente dos derivados mercaptúricos precisam ser feitas para que possamos confirmar o potencial destes compostos como biomarcadores de estresse redox.

6. CONCLUSÕES

A sinalização redox tem sido estudada em diversos processos fisiopatológicos; e os danos em proteínas e em DNA associados a estresse redox vêm sendo relacionados à carcinogênese, envelhecimento e a disfunções variadas. Contudo, existe ainda grande dificuldade em quantificar estes efeitos em sistemas biológicos. Determinar o status de estresse redox em humanos é tarefa árdua, pois os radicais livres são reativos e efêmeros. A necessidade de marcadores de estresse redox robustos é ressaltada por dois fatores. O primeiro é a posição de destaque que espécies reativas têm por estar envolvidas em diversos processos. O segundo é a emergente necessidade de estabelecer biomarcadores sensíveis que permitam terapias precoces, seguras e eficazes (Woosley, 2013).

Neste trabalho evidenciamos que adutos exocíclicos de DNA possuem grande potencial como biomarcadores. A análise de 1,N²-propanodGuo em urina de moradores da cidade de São Paulo (SP) demonstrou que 1,N²-propanodGuo é um potencial biomarcador de exposição à poluição atmosférica, sendo de grande valia para estudos epidemiológicos de poluição, especialmente se associado a outros marcadores (Garcia *et al.*, 2013). Os níveis aumentados deste reconhecido indutor de transversões GC → TA (Yang, I.-Y. *et al.*, 2002; Wang, H.-T. *et al.*, 2009) ajuda a esclarecer o mecanismo de mutagenicidade da fração rica em compostos carbonílicos de extratos orgânicos coletados no ar de SP (Spinosa De Martinis *et al.*, 1999).

Além disso, pela primeira vez demonstramos que células deficientes na via de reparo de Anemia de Fanconi (AF) tratadas com acetaldeído (AA) acumulam

1,*N*²-propanodGuo, confirmando a dificuldade destas células em lidar com esta lesão. Não detectamos 1,*N*²- ϵ dGuo, indicando que o aduto observado não deve ser gerado via peroxidação lipídica, mas do ataque direto de poluentes ao DNA. Este aduto capaz de formar *crosslink* interfitas pode ser, portanto indicado como mediador dos fenótipos observados em pacientes de AF (Langevin *et al.*, 2011).

Constatamos também que ratos modelo de Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA) apresentam níveis aumentados de 1,*N*²-propanodGuo e 1,*N*⁶- ϵ dAdo em tecido nervoso. A expressão da enzima SOD1^{G93A} é capaz de induzir danos ao DNA em diversos órgãos, mas o conteúdo lipídico cerebral parece atuar incrementando a extensão da peroxidação lipídica. Além disso, como 8-oxodGuo não é formada por reação direta com aldeídos, os níveis deste aduto mantiveram-se inalterados. Contudo, nossos resultados corroboram as evidências preditas, uma vez que o metabolismo neuronal é potencialmente comprometido pelo acúmulo de adutos de DNA, podendo levar a morte neuronal característica de ELA.

A análise de adutos específicos e/ou caracterização do perfil de adutos é uma ferramenta com amplo potencial de aplicação em diagnóstico, prognóstico e acompanhamento terapêutico. Determinar concentrações basais e tóxicas pode fornecer valiosas informações sobre mecanismos patológicos, ajudando no aprimoramento de terapias e avaliações clínicas.

Em nossas análises verificamos alterações no perfil de peroxidação lipídica em ELA. Os resultados demonstram variações de determinados aldeídos ao longo do desenvolvimento da doença. Isto permite o direcionamento dos estudos de modificações no DNA e em proteínas neste modelo, podendo esta estratégia ser aplicada a diversos modelos. De fato a metodologia de HPLC-MS/MS de

quantificação de aldeídos aqui apresentada é de grande importância por corroborar com os recentes avanços na área de lipidômica.

Para avaliar o potencial de adutos de glutathionilação como biomarcadores de estresse redox, avaliamos o sistema tampão redox glutathiona. Verificamos que a metodologia empregada tem grande impacto nos níveis observados. Demonstramos que espectrometria de massas, técnica altamente sensível e específica, é mais precisa que a detecção eletroquímica na determinação deste tampão. A proteção do grupo tiol permite obter visão mais fidedigna da razão GSH/GSSG citoplasma. A avaliação de tióis em sistemas biológicos deve ser realizada com extrema cautela dada à extrema complexidade e sofisticação deste sistema antioxidante.

Desenvolvemos metodologia extremamente sensível e específica baseada em HPLC-UV/Vis-ESI-MS/MS para análise concomitante de GSH, GSSG, cisteína, cistina, e dos adutos GS-HNE 1, GS-HNE 2, GS-HNE 3 e GS-HMP, com potencial para avaliar outros adutos de glutathionilação de aldeídos. A avaliação de adutos de glutathiona e de seus produtos de metabolização em tecidos, especialmente no sangue, tem alto potencial como biomarcador redox.

Desta forma, o estabelecimento de biomarcadores de estresse redox necessita de escolha cuidadosa da metodologia a ser empregada. Os dados obtidos precisam ser exaustivamente analisados a fim de se obter conclusões acertadas. As análises assim norteadas permitem que por meio da avaliação dos danos em biomoléculas e dos produtos de detoxificação das espécies reativas ou dos produtos de reparo/detoxificação dos danos por elas gerados, o estabelecimento de biomarcadores cada vez mais específicos (Figura 61).

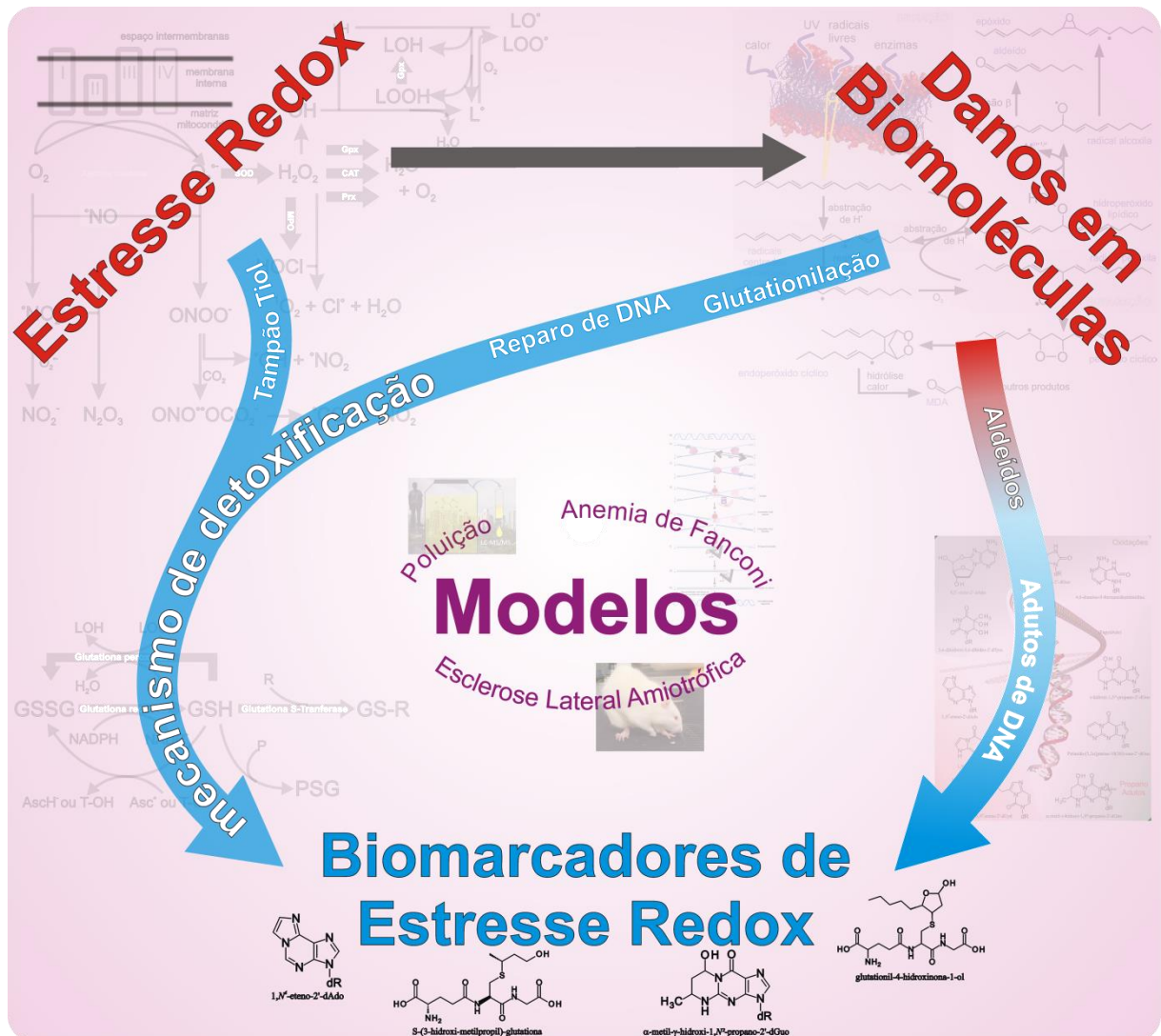


Figura 61 – Biomarcadores redox: quantificação prática e acurada para avaliação do status redox em sistemas biológicos.

7. REFERÊNCIAS

ABOU EZZI, S.; URUSHITANI, M.; JULIEN, J.-P. Wild-type superoxide dismutase acquires binding and toxic properties of ALS-linked mutant forms through oxidation. **J. Neurochem.**, v. 102, n. 1, p. 170-178, 2007.

ADIBHATLA, R. M.; HATCHER, J. F. Role of Lipids in Brain Injury and Diseases. **Future Lipidol.**, v. 2, n. 4, p. 403-422, 2007.

AKKARI, Y. M. N. et al. The 4N cell cycle delay in Fanconi anemia reflects growth arrest in late S phase. **Mol. Genet. Metab.**, v. 74, n. 4, p. 403-412, 2001.

AL-CHALABI, A. et al. Deletions of the heavy neurofilament subunit tail in amyotrophic lateral sclerosis. **Hum. Mol. Genetics**, v. 8, n. 2, p. 157-164, 1999

_____. The genetics and neuropathology of amyotrophic lateral sclerosis. **Acta Neuropathologica**, v. 124, n. 3, p. 339-352, 2012.

AL-SAIF, A.; AL-MOHANNA, F.; BOHLEGA, S. A mutation in sigma-1 receptor causes juvenile amyotrophic lateral sclerosis. **Annals of Neurology**, v. 70, n. 6, p. 913-919, 2011.

ALARY, J.; GUERAUD, F.; CRAVEDI, J. P. Fate of 4-hydroxynonenal in vivo: disposition and metabolic pathways. **Mol Aspects Med.**, v. 24, n. 4-5, p. 177-187, 2003.

ALTER, B. P. et al. Fanconi anemia - Adult head and neck cancer and hematopoietic mosaicism. **Arch. Otolaryng. -Head & Neck Surg.**, v. 131, n. 7, p. 635-639, 2005.

ALTER, B. P.; KUPFER, G. Fanconi Anemia. In: PAGON, R. A.; BIRD, T. D., et al (Ed.). **GeneReviews**. Seattle (WA): University of Washington, Seattle, 1993.

ANDERS, M. W. Chemical toxicology of reactive intermediates formed by the glutathione-dependent bioactivation of halogen-containing compounds. **Chem. Res. Toxicol.**, v. 21, n. 1, p. 145-159, 2008.

ANDREOLI, R. et al. Determination of patterns of biologically relevant aldehydes in exhaled breath condensate of healthy subjects by liquid chromatography/atmospheric chemical ionization tandem mass spectrometry. **Rapid Commun. Mass Spectrom.**, v. 17, n. 7, p. 637-45, 2003.

AOYAMA, K.; WATABE, M.; NAKAKI, T. Regulation of neuronal glutathione synthesis. **J. Pharmacol. Sci.**, v. 108, n. 3, p. 227-38, 2008.

ARAB, K. et al. Typical signature of DNA damage in white blood cells: a pilot study on etheno adducts in Danish mother-newborn child pairs. **Carcinogenesis**, v. 30, n. 2, p. 282-285, 2009.

ASH, P. E. A. et al. Neurotoxic effects of TDP-43 overexpression in C-elegans. **Hum. Molec. Genetics**, v. 19, n. 16, p. 3206-3218, 2010.

ATES, B. et al. Determination of glutathione disulfide levels in biological samples using thiol-disulfide exchanging agent, dithiothreitol. **Biomed. Chromat.**, v. 23, n. 2, p. 119-123, 2009.

ATKINSON, A. J. et al. Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework. **Clin. Pharm. & Therap.**, v. 69, n. 3, p. 89-95, 2001.

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

_____. Fanconi anemia and its diagnosis. **Mut. Res. –Fund. and Mol. Mech. of Mut.**, v. 668, n. 1-2, p. 4-10, 2009.

AUGUSTO, O. et al. Nitrogen dioxide and carbonate radical anion: Two emerging radicals in biology. **Free Rad. Biol. Med.**, v. 32, n. 9, p. 841-859, 2002.

AWANO, T. et al. Genome-wide association analysis reveals a SOD1 mutation in canine degenerative myelopathy that resembles amyotrophic lateral sclerosis. **PNAS**, v. 106, n. 8, p. 2794-2799, 2009.

AWASTHI, Y. C.; ANSARI, G. A.; AWASTHI, S. Regulation of 4-hydroxynonenal mediated signaling by glutathione S-transferases. **Methods Enzymol.**, v. 401, p. 379-407, 2005.

AWASTHI, Y. C. et al. Physiological and pharmacological significance of glutathione-conjugate transport. **J. Toxicol. Environm. Health-Part B-Crit. Reviews**, v. 12, n. 7, p. 540-551, 2009.

_____. The non-ABC drug transporter RLIP76 (RALBP-1) plays a major role in the mechanisms of drug resistance. **Curr. Drug Metabolism**, v. 8, n. 4, p. 315-323, 2007.

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.

BAKKER, S. T.; DE WINTER, J. P.; TE RIELE, H. Learning from a paradox: recent insights into Fanconi anaemia through studying mouse models. **Disease Models & Mechanisms**, v. 6, n. 1, p. 40-47, 2013.

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.

_____. DNA oxidation, strand-breaks and etheno-adducts formation promoted by Cu, Zn-superoxide dismutase-H₂O₂ in the presence and absence of bicarbonate. **Dalton Trans.**, n. 8, p. 1450-9, 2009.

BARTSCH, H. et al. Formation, detection, and role in carcinogenesis of ethenobases in DNA. **Drug Metab. Reviews**, v. 26, n. 1-2, p. 349-371, 1994.

BASSO, D. M.; BEATTIE, M. S.; BRESNAHAN, J. C. A. Sensitive and reliable locomotor rating-scale for open-field testing in rats. **J. Neurotr.**, v. 12, n. 1, p. 1-21, 1995.

BEAL, M. F. et al. Increased 3-nitrotyrosine in both sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. **Ann. Neurol.**, v. 42, n. 4, p. 644-54, 1997.

BELLINGHAM, M. C. A Review of the Neural Mechanisms of Action and Clinical Efficiency of Riluzole in Treating Amyotrophic Lateral Sclerosis: What have we Learned in the Last Decade? **CNS Neurosci. & Therap.**, v. 17, n. 1, p. 4-31, 2011.

BELZIL, V. V.; ROULEAU, G. A. Familial ALS: less common than we think? **J. Neurol. Neurosurgery and Psychiatry**, v. 83, n. 12, p. 1133-1133, 2012.

BERDYSHEV, E. V. Mass spectrometry of fatty aldehydes. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1811, n. 11, p. 680-693, 2011

BERLINER, J. A.; ZIMMAN, A. Future of toxicology - lipidomics, an important emerging area for toxicologists: focus on lipid oxidation products. **Chem. Res. Toxicol.**, v. 20, n. 6, p. 849-53, 2007

BERQUIST, B. R.; WILSON, D. M., III. Pathways for repairing and tolerating the spectrum of oxidative DNA lesions. **Cancer Letters**, v. 327, n. 1-2, p. 61-72, 2012

BERRA, C. M. et al. Nucleotide excision repair activity on DNA damage induced by photoactivated methylene blue. **Free Rad. Biol. Med.**, v. 61, p. 343-356, 2013

BERTRAM, C.; HASS, R. Cellular responses to reactive oxygen species-induced DNA damage and aging. **Biol. Chem.**, v. 389, n. 3, p. 211-220, 2008

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

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

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

BOCCI, V.; VALACCHI, G. Free Radicals and Antioxidants: How to Reestablish Redox Homeostasis in Chronic Diseases? **Curr. Med. Chem.**, v. 20, n. 27, p. 3397-3415, 2013

BOGLIOLO, M. et al. Mutations in ERCC4, Encoding the DNA-Repair Endonuclease XPF, Cause Fanconi Anemia. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 92, n. 5, p. 800-806, 2013

BOILLEE, S.; VANDE VELDE, C.; CLEVELAND, D. W. ALS: A disease of motor neurons and their nonneuronal neighbors. **Neuron**, v. 52, n. 1, p. 39-59, 2006

BORCHELT, D. R. et al. Superoxide-Dismutase-1 With Mutations Linked To Familial Amyotrophic-Lateral-Sclerosis Possesses Significant Activity. **PNAS**, v. 91, n. 17, p. 8292-8296, 1994

BOSCO, D. A. et al. Wild-type and mutant SOD1 share an aberrant conformation and a common pathogenic pathway in ALS. **Nature Neurosci.**, v. 13, n. 11, p. 1396-U133, 2010

BRASIL. **Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Portaria nº 496:** 23 de dezembro 2009. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas - Esclerose Lateral Amiotrófica. **2009.**

BRIDGE, W. L. et al. The BRIP1 helicase functions independently of BRCA1 in the Fanconi anemia pathway for DNA crosslink repair. **Nature Genet.**, v. 37, n. 9, p. 953-957, 2005

BROMBACHER, S.; OEHME, M.; BEUKES, J. A. HPLC combined with multiple mass spectrometry (MSn): an alternative for the structure elucidation of compounds and artefacts found in smog chamber samples. **J. Environm. Monit.**, v. 3, n. 3, p. 311-6, 2001

BROOKS, B. R. et al. El Escorial revisited: Revised criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. **Amy. Lat. Sclerosis**, v. 1, n. 5, p. 293-299, 2000

BROOKS, P. J.; THERUVATHU, J. A. DNA adducts from acetaldehyde: implications for alcohol-related carcinogenesis. **Alcohol**, v. 35, n. 3, p. 187-193, 2005

BROOKS, P.J. et al. The alcohol flushing response: an unrecognized risk factor for esophageal cancer from alcohol consumption. **PLoS Med**, v. 6, p. e 50, 2009.

BRUIJN, L. I. et al. ALS-linked SOD1 mutant G85R mediates damage to astrocytes and promotes rapidly progressive disease with SOD1-containing inclusions. **Neuron**, v. 18, n. 2, p. 327-338, 1997

BURCHAM, P. C. Internal hazards: baseline DNA damage by endogenous products of normal metabolism. **Mut. Res. –Genetic. Toxicol. Environm. Mutagenesis**, v. 443, n. 1-2, p. 11-36, 1999

BURCZYNSKI, M. E. et al. The reactive oxygen species- and Michael acceptor-inducible human aldo-keto reductase AKR1C1 reduces the alpha,beta-unsaturated aldehyde 4-hydroxy-2-nonenal to 1,4-dihydroxy-2-nonenone. **J. Biol. Chem.**, v. 276, n. 4, p. 2890-2897, 2001

BURROWS, C. J.; MULLER, J. G. Oxidative nucleobase modifications leading to strand scission. **Chem. Reviews**, v. 98, n. 3, p. 1109-1151, 1998

CADET, J.; DOUKI, T.; RAVANAT, J.-L. Oxidatively generated base damage to cellular DNA. **Free Rad. Biol. Med.**, v. 49, n. 1, p. 9-21, 2010

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

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

_____. Biologically relevant oxidants and terminology, classification and nomenclature of oxidatively generated damage to nucleobases and 2-deoxyribose in nucleic acids. **Free Rad. Research**, v. 46, n. 4, p. 367-381, 2012.

CADET, J.; POULSEN, H. Measurement of oxidatively generated base damage in cellular DNA and urine. **Free Rad. Biol. Med.**, v. 48, n. 11, p. 1457-1459, 2010

CARINI, M.; ALDINI, G.; FACINO, R. M. Mass spectrometry for detection of 4-hydroxy-trans-2-nonenal (HNE) adducts with peptides and proteins. **Mass Spectr. Reviews**, v. 23, n. 4, p. 281-305, 2004

CARVALHO, V. M. et al. Novel 1,N-6-etheno-2'-deoxyadenosine adducts from lipid peroxidation products. **Chem. Res. Toxicol.**, v. 13, n. 5, p. 397-405, 2000

_____. Formation of 1,N-6-etheno-2'-deoxyadenosine adducts by trans,trans-2,4-decadienal. **Chem. Res. Toxicol.**, v. 11, n. 9, p. 1042-1047, 1998

CHARCOT, J.; JOFFROY, A. Deux cas d'atrophie musculaire progressive avec lésions de la substance grise et de faisceaux antérolatéraux de la moelle épinière. **Arch. Physiol. Neurol. Path.**, v. 2, p. 744-754, 1869.

CHEAH, B. C. et al. Riluzole, Neuroprotection and Amyotrophic Lateral Sclerosis. **Current Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 18, p. 1942-1959, 2010

CHEN, G.-H. et al. Effects of water extract from anaerobic fermented *Toona sinensis* Roemor on the expression of antioxidant enzymes in the Sprague-Dawley Rats. **J. of Funct. Foods**, v. 5, n. 2, p. 773-780, 2013

CHEN, Y. Z. et al. DNA/RNA helicase gene mutations in a form of juvenile amyotrophic lateral sclerosis (ALS4). **Am. J. Hum. Genetics**, v. 74, n. 6, p. 1128-1135, 2004

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

_____. The vinyl-chloride dna derivative n2,3-ethenoguanine produces G- A transitions in *Escherichia-coli*. **PNAS**, v. 88, n. 22, p. 9974-9978, 1991

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

_____. Global epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis: a systematic review of the published literature. **J. Neurol.**, v. 259, p. S51-S52, 2012

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

CHOW, C. Y. et al. Deleterious Variants of FIG4. a Phosphoinositide Phosphatase, in Patients with ALS. **Am. J. Hum. Genetics**, v. 84, n. 1, p. 85-88, 2009

CIRCU, M. L.; AW, T. Y. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. **Free Rad. Biol. Med.**, v. 48, n. 6, p. 749-762, 2010

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

CLETON-JANSEN, A. M. et al. Mutation analysis of the Fanconi anaemia A gene in breast tumours with loss of heterozygosity at 16q24.3. **Brit. J. Cancer**, v. 79, n. 7-8, p. 1049-1052, 1999

COLE, A. R.; LEWIS, L. P. C.; WALDEN, H. The structure of the catalytic subunit FANCL of the Fanconi anemia core complex. **Nature Struc. Mol. Biol.**, v. 17, n. 3, p. 294-U54, 2010

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

CONTESTABILE, A. Amyotrophic Lateral Sclerosis: From Research to Therapeutic Attempts and Therapeutic Perspectives. **Curr. Med. Chem.**, v. 18, n. 36, p. 5655-5665, 2011

COOKE, M. S. et al. DNA repair is responsible for the presence of oxidatively damaged DNA lesions in urine. **Mut. Res. – Fund. Mol. Mech. Mutagen.**, v. 574, n. 1-2, p. 58-66, 2005

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

COZZOLINO, M. et al. Amyotrophic Lateral Sclerosis: New Insights into Underlying Molecular Mechanisms and Opportunities for Therapeutic Intervention. **Antioxid. Redox Signal.**, v. 17, n. 9, p. 1277-1330, 2012

CRISTINI, J. Misdiagnosis and missed diagnoses in patients with ALS. **JAAPA**, v. 19, n. 7, p. 29-35, 2006

CROSSAN, G. P.; PATEL, K. J. The Fanconi anaemia pathway orchestrates incisions at sites of crosslinked DNA. **J. Pathol.**, v. 226, n. 2, p. 326-337, 2012

CROSSAN, G. P. et al. Disruption of mouse Slx4, a regulator of structure-specific nucleases, phenocopies Fanconi anemia. **Nature Genetics**, v. 43, n. 2, p. 147-U99, 2011

CROW, J. P. et al. Manganese porphyrin given at symptom onset markedly extends survival of ALS mice. **Ann. Neurol.**, v. 58, n. 2, p. 258-65, 2005

D'ANDREA, A. D. MECHANISMS OF DISEASE Susceptibility Pathways in Fanconi's Anemia and Breast Cancer. **New Eng. J. Med.**, v. 362, n. 20, p. 1909-1919, 2010

DE BONT, R.; VAN LAREBEKE, N. Endogenous DNA damage in humans: a review of quantitative data. **Mutagenesis**, v. 19, n. 3, p. 169-185, 2004

DE CARVALHO, M. et al. Electrodiagnostic criteria for diagnosis of ALS. **Clin. Neurophysiology**, v. 119, n. 3, p. 497-503, 2008

DE GROOT, I. J. M. et al. Cross-sectional and longitudinal correlations between disease progression and different health-related quality of life domains in persons with amyotrophic lateral sclerosis. **Amy. Lat. Scle.**, v. 8, n. 6, p. 356-361, 2007

DE LOS SANTOS, C.; ZALIZNYAK, T.; JOHNSON, F. NMR characterization of a DNA duplex containing the major acrolein-derived deoxyguanosine adduct γ -OH-1,N²-propano-2'-deoxyguanosine. **J. Biol. Chem.**, v. 276, n. 12, p. 9077-9082, 2001

DE SILVA, I. U. et al. Defining the roles of nucleotide excision repair and recombination in the repair of DNA interstrand cross-links in mammalian cells. **Mol. Cel. Biol.**, v. 20, n. 21, p. 7980-7990, 2000

DE WINTER, J. P. et al. The Fanconi anaemia gene FANCF encodes a novel protein with homology to ROM. **Nature Genetics**, v. 24, n. 1, p. 15-16, 2000

DEELEY, R. G.; WESTLAKE, C.; COLE, S. P. C. Transmembrane transport of endo- and xenobiotics by mammalian ATP-binding cassette multidrug resistance proteins. **Physiolog. Reviews**, v. 86, n. 3, p. 849-899, 2006

DEJESUS-HERNANDEZ, M. et al. Expanded GGGGCC Hexanucleotide Repeat in Noncoding Region of C9ORF72 Causes Chromosome 9p-Linked FTD and ALS. **Neuron**, v. 72, n. 2, p. 245-256, 2011

DEMUTH, I. et al. Spectrum of mutations in the Fanconi anaemia group G gene, FANCG/XRCC9. **Eur. J. Hum. Gen.**, v. 8, n. 11, p. 861-868, 2000

DENG, H.-X. et al. Mutations in UBQLN2 cause dominant X-linked juvenile and adult-onset ALS and ALS/dementia. **Nature**, v. 477, n. 7363, p. 211-U113, 2011

DETRAN-SP. :: DETRAN-SP :: DEPARTAMENTO ESTADUAL DE TRÂNSITO DE SÃO PAULO. 2013. Disponível em: < <http://www.detran.sp.gov.br/> >. Acesso em: 11 de novembro de 2013.

DIETRICH-NETO, F. et al. Amyotrophic lateral sclerosis in Brazil - 1998 National Survey. **Arq. Neuro-Psiq.**, v. 58, n. 3A, p. 607-615, 2000

DIMOS, J. T. et al. Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. **Science**, v. 321, n. 5893, p. 1218-1221, 2008

DIZDAROGLU, M. Oxidatively induced DNA damage: Mechanisms, repair and disease. **Cancer Lett.**, v. 327, n. 1-2, p. 26-47, 2012

DOCKERY, D. W. Health Effects of Particulate Air Pollution. **Ann. Epid.**, v. 19, n. 4, p. 257-263, 2009

DOMINGUES, R. M. et al. Lipoxidation adducts with peptides and proteins: Deleterious modifications or signaling mechanisms? **J. Prot.**, 2013

DOSANJH, M. K. et al. All four known cyclic adducts formed in DNA by the vinyl chloride metabolite chloroacetaldehyde are released by a human DNA glycosylase. **PNAS**, v. 91, n. 3, p. 1024-81, 1994

DRINGEN, R. Metabolism and functions of glutathione in brain. **Prog. Neurobiol.**, v. 62, n. 6, p. 649-71, 2000

DU, T. et al. Neurotoxicity from glutathione depletion is mediated by Cu-dependent p53 activation. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 44, n. 1, p. 44-55, 2008

DUAN, X.; ZHONG, D.; CHEN, X. Derivatization of beta-dicarbonyl compound with 2,4-dinitrophenylhydrazine to enhance mass spectrometric detection: application in quantitative analysis of houttuynin in human plasma. **J. Mass Spectrom.**, v. 43, n. 6, p. 814-24, 2008

EATON, D. L.; BAMMLER, T. K. Concise review of the glutathione S-transferases and their significance to toxicology. **Toxicol. Sci.**, v. 49, n. 2, p. 156-164, 1999

EDER, E.; BUDIAWAN. 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

EGGINK, M. et al. Development of a Selective ESI-MS Derivatization Reagent: Synthesis and Optimization for the Analysis of Aldehydes in Biological Mixtures. **Ana. Chem.**, v. 80, n. 23, p. 9042-9051, 2008

EKEGREN, T.; HANRIEDER, J.; BERGQUIST, J. Clinical perspectives of high-resolution mass spectrometry-based proteomics in neuroscience - Exemplified in amyotrophic lateral sclerosis biomarker discovery research. **J. Mass Spectr.**, v. 43, n. 5, p. 559-571, 2008

ELAM, J. S. et al. An alternative mechanism of bicarbonate-mediated peroxidation by copper-zinc superoxide dismutase - Rates enhanced via proposed enzyme-associated peroxy carbonate intermediate. **J. Biol. Chem.**, v. 278, n. 23, p. 21032-21039, 2003

ELDEN, A. C. et al. Ataxin-2 intermediate-length polyglutamine expansions are associated with increased risk for ALS. **Nature**, v. 466, n. 7310, p. 1069-U77, 2010

ELLIS, E. M. Reactive carbonyls and oxidative stress: Potential for therapeutic intervention. **Pharm. Therap.**, v. 115, n. 1, p. 13-24, 2007

EPA, O., OAQPS. Particulate Matter (PM). 2014. Disponível em: < <http://www.epa.gov/pm/> >. Acesso em: 02 de janeiro de 2014.

ERSAHIN, M. et al. Melatonin reduces experimental subarachnoid hemorrhage-induced oxidative brain damage and neurological symptoms. **J. Pineal. Res.**, v. 46, n. 3, p. 324-32, 2009

ESTERBAUER, H. Kinetics of reaction of sulfhydryl compounds with alpha,beta-unsaturated aldehydes in an aqueous system. **Monatshefte Fur Chemie**, v. 101, n. 3, p. 782-&, 1970

ESTERBAUER, H.; SCHAUR, R. J.; ZOLLNER, H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 11, n. 1, p. 81-128, 1991.

ESTES, P. S. et al. Wild-type and A315T mutant TDP-43 exert differential neurotoxicity in a Drosophila model of ALS. **Hum. Mol. Gen.**, v. 20, n. 12, p. 2308-2321, 2011

EVANS, M. D.; SAPARBAEV, M.; COOKE, M. S. DNA repair and the origins of urinary oxidized 2'-deoxyribonucleosides. **Mutagenesis**, v. 25, n. 5, p. 433-442, 2010

FALLETTI, O. et al. Trapping of 4-hydroxynonenal by glutathione efficiently prevents formation of DNA adducts in human cells. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 42, n. 8, p. 1258-69, 2007

FALLETTI, O.; DOUKI, T. Low glutathione level favors formation of DNA adducts to 4-hydroxy-2(E)-nonenal, a major lipid peroxidation product. **Chem. Res. Toxicol.**, v. 21, n. 11, p. 2097-105, 2008

FDA, U. Innovation or stagnation: challenge and opportunity on the critical path to new medical products. **Rockville (MD): US FDA**, 2004.

FEIGUIN, F. et al. Depletion of TDP-43 affects Drosophila motoneurons terminal synapsis and locomotive behavior. **Febs Letters**, v. 583, n. 10, p. 1586-1592, 2009

FEKAIRI, S. et al. Human SLX4 Is a Holliday Junction Resolvase Subunit that Binds Multiple DNA Repair/Recombination Endonucleases. **Cell**, v. 138, n. 1, p. 78-89, 2009

FERNANDES, P. H. et al. Mammalian cell mutagenesis of the DNA adducts of vinyl chloride and crotonaldehyde. **Environm. Mol. Mut.**, v. 45, n. 5, p. 455-459, 2005

FERRANTE, R. J. et al. Evidence of increased oxidative damage in both sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. **J. Neurochem.**, v. 69, n. 5, p. 2064-74, 1997

_____. Therapeutic efficacy of EGb761 (Gingko biloba extract) in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. **J. Mol. Neurosci.**, v. 17, n. 1, p. 89-96, 2001

FERREIRA, V. et al. Critical aspects of the determination of pentafluorobenzyl derivatives of aldehydes by gas chromatography with electron-capture or mass spectrometric detection - Validation of an optimized strategy for the determination of oxygen-related odor-active aldehydes in wine. **J. Chrom. A**, v. 1122, n. 1-2, p. 255-265, 2006

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

FGA, S. P.; LIMA, J. M. B. D.; ALVARENGA, R. P. Epidemiologia da esclerose lateral amiotrófica - Europa/América do Norte/América do Sul/Ásia: discrepâncias e similaridades: revisão sistemática da literatura. **Rev. bras. neurol**, v. 45, n. 2, p. 5-10, 2009

FIALA, E.; CONAWAY, C.; MATHIS, J. Oxidative Dna And Rna Damage In The Livers Of Sprague-Dawley Rats Treated With The Hepatocarcinogen 2-Nitropropane. **Cancer Res.**, p. 5518-5522, OCT 15 1989

FILALI, M.; LALONDE, R.; RIVEST, S. Sensorimotor and cognitive functions in a SOD1G37R transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. **Behav. Brain Res.**, v. 225, n. 1, p. 215-221, 2011

FISHER, L. A.; BESSHO, M.; BESSHO, T. Processing of a psoralen DNA interstrand cross-link by XPF-ERCC1 complex in vitro. **J. Biol. Chem.**, v. 283, n. 3, p. 1275-1281, 2008

FORMAN, H. J. Reactive oxygen species and alpha,beta-unsaturated aldehydes as second messengers in signal transduction. **Oxid. /Nitros. Stress and Dis.**, v. 1203, p. 35-44, 2010

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

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

FUKUI, K. DNA mismatch repair in eukaryotes and bacteria. **J. Nucleic Acids**, v. 2010, 2010.

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

_____. 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.

_____. 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.

GARCIA-HIGUERA, I. et al. Fanconi anemia proteins FANCA, FANCC, and FANCG/XRCC9 interact in a functional nuclear complex. **Mol. Cell. Biol.**, v. 19, n. 7, p. 4866-4873, 1999

_____. Interaction of the fanconi anemia proteins and BRCA1 in a common pathway. **Mol. Cell**, v. 7, n. 2, p. 249-262, 2001

GARNER, E.; SMOGORZEWSKA, A. Ubiquitylation and the Fanconi anemia pathway. **Febs Letters**, v. 585, n. 18, p. 2853-2860, 2011

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

GIBSON, S. B.; BROMBERG, M. B. Amyotrophic Lateral Sclerosis: Drug Therapy from the Bench to the Bedside. **Seminars in Neurology**, v. 32, n. 3, p. 173-178, Jul 2012.

GIDALEVITZ, T. et al. Destabilizing Protein Polymorphisms in the Genetic Background Direct Phenotypic Expression of Mutant SOD1 Toxicity. **Plos Genetics**, v. 5, n. 3, 2009

GITCHO, M. A. et al. TDP-43 A315T mutation in familial motor neuron disease. **Ann. Neurol.**, v. 63, n. 4, p. 535-538, 2008

GOODSAID, F.; PAPALUCA, M. Evolution of biomarker qualification at the health authorities. **Nature Biotech.**, v. 28, n. 5, p. 441-443, 2010

GREEN, A. M.; KUPFER, G. M. Fanconi Anemia. **Hematol. –Onc. Clin. North Am.**, v. 23, n. 2, p. 193-+, 2009

GREENWAY, M. J. et al. ANG mutations segregate with familial and 'sporadic' amyotrophic lateral sclerosis. **Nature Genetics**, v. 38, n. 4, p. 411-413, 2006

GROS-LOUIS, F. et al. A frameshift deletion in peripherin gene associated with amyotrophic lateral sclerosis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 44, p. 45951-45956, 2004

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

GUICHARDANT, M.; LAGARDE, M. Analysis of biomarkers from lipid peroxidation: A comparative study. **Eur. J. Lipid Sci. Techn.**, v. 111, n. 1, p. 75-82, 2009

GURNEY, M. E. et al. Motor-Neuron Degeneration In Mice That Express A Human Cu,Zn Superoxide-Dismutase Mutation. **Science**, v. 264, n. 5166, p. 1772-1775, 1994

HADANO, S. et al. A gene encoding a putative GTPase regulator is mutated in familial amyotrophic lateral sclerosis 2. **Nature Genetics**, v. 29, n. 2, p. 166-173, 2001

HALL, A. G. Review: The role of glutathione in the regulation of apoptosis. **Eur. J. Clin. Invest.**, v. 29, n. 3, p. 238-45, 1999

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

HANADA, K. et al. The structure-specific endonuclease Mus81-Eme1 promotes conversion of interstrand DNA crosslinks into double-strands breaks. **Embo Journal**, v. 25, n. 20, p. 4921-4932, 2006

HANG, B. Repair of exocyclic DNA adducts: rings of complexity. **Bioessays**, v. 26, n. 11, p. 1195-1208, 2004

HANSEN, R. E.; WINTHER, J. R. An introduction to methods for analyzing thiols and disulfides: Reactions, reagents, and practical considerations. **Anal. Biochem.**, v. 394, n. 2, p. 147-58, 2009

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

HILLESTROM, P. R. et al. Quantification of 1,N⁶-etheno-2'-deoxyadenosine in human urine by column-switching LC/APCI-MS/MS. **Free Rad. Biol. Med.**, v. 36, n. 11, p. 1383-1392, 2004

HILLGREN, K. M. et al. Emerging Transporters of Clinical Importance: An Update From the International Transporter Consortium. **Clin. Pharm. Therap.**, v. 94, n. 1, p. 52-63, 2013

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

HOEIJMAKERS, J. H. J. DNA Damage, Aging, and Cancer. (vol 361, pg 1475, 2009). **New Eng. J. Med.**, v. 361, n. 19, p. 1914-1914, 2009

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.

HOWLETT, N. G. et al. Biallelic inactivation of BRCA2 in Fanconi anemia. **Science**, v. 297, n. 5581, p. 606-609, 2002

HUANG, H. et al. gamma-Hydroxy-1,N²-propano-2'-deoxyguanosine DNA Adduct Conjugates the N-Terminal Amine of the KWKK Peptide via a Carbinolamine Linkage. **Chem. Res. Toxicol.**, v. 24, n. 7, p. 1123-1133, 2011

HUANG, M. et al. Human MutS and FANCM complexes function as redundant DNA damage sensors in the Fanconi Anemia pathway. **DNA Repair**, v. 10, n. 12, p. 1203-1212, 2011

HUMANS, I. W. G. O. T. E. O. C. R. T. **Dry cleaning, some chlorinated solvents and other industrial chemicals.** IARC, 1995. ISBN 9283212630.

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

_____. **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.

JACOBSEN, J. P. et al. Monoaminergic dysregulation in glutathione-deficient mice: possible relevance to schizophrenia? **Neuroscience**, v. 132, n. 4, p. 1055-72, 2005.

JEWETT, S. L. et al. A new look at a time-worn system: Oxidation of CuZn-SOD by H₂O₂. **Free Rad. Biol. Med.**, v. 26, n. 7-8, p. 905-918, 1999

JIAN, W. et al. A novel 4-oxo-2(E)-nonenal-derived endogenous thiadiazabicyclo glutathione adduct formed during cellular oxidative stress. **Chem. Res. Toxicol.**, v. 20, n. 7, p. 1008-18, 2007

JOENJE, H. METABOLISM Alcohol, DNA and disease. **Nature**, v. 475, n. 7354, p. 45-46, 2011

JOHNSON, J. O. et al. Exome Sequencing Reveals VCP Mutations as a Cause of Familial ALS. **Neuron**, v. 68, n. 5, p. 857-864, 2010

JONES, M. J. K.; HUANG, T. T. The Fanconi anemia pathway in replication stress and DNA crosslink repair. **Cel. Mol. Life Sci.**, v. 69, n. 23, p. 3963-3974, 2012

JONSSON, P. A. et al. Disulphide-reduced superoxide dismutase-1 in CNS of transgenic amyotrophic lateral sclerosis models. **Brain**, v. 129, p. 451-464, 2006

KABASHI, E. et al. Gain and loss of function of ALS-related mutations of TARDBP (TDP-43) cause motor deficits in vivo. **Hum. Mol. Gen.**, v. 19, n. 4, p. 671-683, 2010

_____. TARDBP mutations in individuals with sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. **Nature Genetics**, v. 40, n. 5, p. 572-574, 2008

KASAI, H.; NISHIMURA, S. Hydroxylation of deoxyguanosine at the C-8 position by ascorbic-acid and other reducing agents. **Nuc. Acids Res.**, v. 12, n. 4, p. 2137-2145, 1984

KASS, E. M.; JASIN, M. Collaboration and competition between DNA double-strand break repair pathways. **Febs Letters**, v. 584, n. 17, p. 3703-3708, 2010

KAWAI, Y.; TAKEDA, S.; TERAOKA, J. Lipidomic analysis for lipid peroxidation-derived aldehydes using gas chromatography-mass spectrometry. **Chem. Res. Toxicol.**, v. 20, n. 1, p. 99-107, 2007

KEE, Y.; D'ANDREA, A. D. Molecular pathogenesis and clinical management of Fanconi anemia. **J. Clin. Inv.**, v. 122, n. 11, p. 3799-3806, 2012

KEMP, M.; GO, Y.-M.; JONES, D. P. Nonequilibrium thermodynamics of thiol/disulfide redox systems: A perspective on redox systems biology. **Free Rad. Biol. Med.**, v. 44, n. 6, p. 921-937, 2008

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

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

KIM, Y. et al. Mutations of the SLX4 gene in Fanconi anemia. **Nature Genetics**, v. 43, n. 2, p. 142-U91, 2011

_____. Regulation of multiple DNA repair pathways by the Fanconi anemia protein SLX4. **Blood**, v. 121, n. 1, p. 54-63, 2013

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

KNIPSCHEER, P. et al. The Fanconi Anemia Pathway Promotes Replication-Dependent DNA Interstrand Cross-Link Repair. **Science**, v. 326, n. 5960, p. 1698-1701, 2009

KOCHETKO.NK; SHIBAEV, V. N.; KOST, A. A. New Reaction Of Adenine And Cytosine Derivatives, Potentially Useful For Nucleic Acids Modification. **Tetrahedron Letters**, n. 22, p. 1993-&, 1971

KOLLIKER, S.; OEHME, M.; DYE, C. Structure Elucidation of 2,4-Dinitrophenylhydrazone Derivatives of Carbonyl Compounds in Ambient Air by HPLC/MS and Multiple MS/MS Using Atmospheric Chemical Ionization in the Negative Ion Mode. **Anal. Chem.**, v. 70, n. 9, p. 1979-85, 1998

KONYALIOGLU, S.; DURMAZ, G.; YALCIN, A. The potential antioxidant effect of raloxifene treatment: a study on heart, liver and brain cortex of ovariectomized female rats. **Cell Biochem. Funct.**, v. 25, n. 3, p. 259-66, 2007

KOSOWER, N. S.; KOSOWER, E. M. The glutathione status of cells. **Int. Rev. Cytol.**, v. 54, p. 109-60, 1978.

KOSUGE, Y. et al. Characterization of chronic glutamate-mediated motor neuron toxicity in organotypic spinal cord culture prepared from ALS model mice. **Neuroscience Letters**, v. 454, n. 2, p. 165-169, 2009

KRATZ, K. et al. Deficiency of FANCD2-Associated Nuclease KIAA1018/FAN1 Sensitizes Cells to Interstrand Crosslinking Agents. **Cell**, v. 142, n. 1, p. 77-88, 2010

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

KUIPER, H. C. et al. Quantitation of mercapturic acid conjugates of 4-hydroxy-2-nonenal and 4-oxo-2-nonenal metabolites in a smoking cessation study. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 48, n. 1, p. 65-72, 2010

_____. Mercapturic acid conjugates of 4-hydroxy-2-nonenal and 4-oxo-2-nonenal metabolites are in vivo markers of oxidative stress. **J. Biol. Chem.**, v. 283, n. 25, p. 17131-17138, 2008

KUTLER, D. I. et al. A 20-year perspective on the International Fanconi Anemia Registry (IFAR). **Blood**, v. 101, n. 4, p. 1249-1256, 2003

KWIATKOWSKI, T. J., JR. et al. Mutations in the FUS/TLS Gene on Chromosome 16 Cause Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis. **Science**, v. 323, n. 5918, p. 1205-1208, 2009

LACOMBLEZ, L. et al. Dose-ranging study of riluzole in amyotrophic lateral sclerosis. **Lancet**, v. 347, n. 9013, p. 1425-1431, 1996

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

LANGOUET, S. et al. Misincorporation of nucleotides opposite five-membered exocyclic ring guanine derivatives by Escherichia coli polymerases in vitro and in vivo: 1,N-2-ethenoguanine, 5,6,7,9-tetrahydro-9-oxoimidazo 1,2-alpha purine, and 5,6,7,9-tetrahydro-7-hydroxy-9-oxoimidazo 1,2-alpha purine, and 5,6,7,9-tetrahydro-7-hydroxy-9-oxoimidazo 1,2-alpha purine. **Biochemistry**, v. 37, n. 15, p. 5184-5193, 1998

LANGOUET, S.; MULLER, M.; GUENGERICH, F. P. Misincorporation of dNTPs opposite 1,N-2-ethenoguanine and 5,6,7,9-tetrahydro-7-hydroxy-9-oxoimidazo 1,2-alpha purine in oligonucleotides by Escherichia coli polymerases I exo(-) and II exo(-), T7 polymerase exo(-), human immunodeficiency virus-1 reverse transcriptase, and rat polymerase beta. **Biochemistry**, v. 36, n. 20, p. 6069-6079, 1997

LEE, D.-H.; JACOBS, D. R., JR. Is serum gamma-glutamyltransferase a marker of exposure to various environmental pollutants? **Free Rad. Res.**, v. 43, n. 6, p. 533-537, 2009

LEE, M. et al. Effect of overexpression of wild-type and mutant Cu/Zn-superoxide dismutases on oxidative damage and antioxidant defences: relevance to Down's syndrome and familial amyotrophic lateral sclerosis. **J. Neurochem.**, v. 76, n. 4, p. 957-65, 2001

LEMMENS, R. et al. Overexpression of mutant superoxide dismutase 1 causes a motor axonopathy in the zebrafish. **Hum. Mol. Gen.**, v. 16, n. 19, p. 2359-2365, 2007

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

LEUNG, C. L. et al. A pathogenic peripherin gene mutation in a patient with amyotrophic lateral sclerosis. **Brain Pathology**, v. 14, n. 3, p. 290-296, 2004

LEVINE, R. L. et al. Mutagenesis induced by a single 1,N-6-ethenodeoxyadenosine adduct in human cells. **Cancer Res.**, v. 60, n. 15, p. 4098-4104, 2000

LILI, L. et al. Analysis of volatile aldehyde biomarkers in human blood by derivatization and dispersive liquid-liquid microextraction based on solidification of floating organic droplet method by high performance liquid chromatography. **J. Chrom. A**, v. 1217, n. 16, p. 2365-70, 2010

LILLIG, C. H.; BERNDT, C.; HOLMGREN, A. Glutaredoxin systems. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1780, n. 11, p. 1304-17, 2008

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

LONG, D. T. et al. Mechanism of RAD51-Dependent DNA Interstrand Cross-Link Repair. **Science**, v. 333, n. 6038, p. 84-87, 2011

LONG, E. K. et al. Trans-4-hydroxy-2-hexenal is a neurotoxic product of docosahexaenoic (22:6; n-3) acid oxidation. **J. Neurochem**, v. 105, n. 3, p. 714-24, 2008

LONG, E. K.; ROSENBERGER, T. A.; PICKLO, M. J. Ethanol withdrawal increases glutathione adducts of 4-hydroxy-2-hexenal but not 4-hydroxyl-2-nonenal in the rat cerebral cortex. **Free Rad. Biol. Med.**, v. 48, n. 3, p. 384-390, 2010

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

LOTENFOE, J. R. et al. Expression cloning of a cDNA for the major Fanconi anaemia gene, FAA. **Nature Genetics**, v. 14, n. 3, p. 320-323, 1996

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

LOUREIRO, A. P. M. et al. Structural characterization of diastereoisomeric ethano adducts derived from the reaction of 2'-deoxyguanosine with *trans,trans*-2,4-decadienal. **Chem. Res. Toxicol.**, v. 17, n. 5, p. 641-649, 2004

_____. *Trans,trans*-2,4-Decadienal-induced 1,N(2)-etheno-2'-deoxyguanosine adduct formation. **Chem. Res. Toxicol.**, v. 13, n. 7, p. 601-609, 2000.

_____. Development of an on-line liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry assay to quantitatively determine 1,N(2)-etheno-2'-deoxyguanosine in DNA. **Chem. Res. Toxicol.**, v. 15, n. 10, p. 1302-1308, 2002

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

MACKAY, C. et al. Identification of KIAA1018/FAN1, a DNA Repair Nuclease Recruited to DNA Damage by Monoubiquitinated FANCD2. **Cell**, v. 142, n. 1, p. 65-76, 2010

MADUKURI, L. et al. In Vitro Bypass of the Major Malondialdehyde- and Base Propenal-Derived DNA Adduct by Human Y-family DNA Polymerases kappa, iota, and Rev1. **Biochemistry**, v. 49, n. 38, p. 8415-8424, 2010

MANCUSO, R. et al. Evolution of gait abnormalities in SOD1G93A transgenic mice. **Brain Res.**, v. 1406, n. 0, p. 65-73, 2011.

MANIKANDAN, S. et al. Effects of chronic noise stress on spatial memory of rats in relation to neuronal dendritic alteration and free radical-imbalance in hippocampus and medial prefrontal cortex. **Neurosci. Lett.**, v. 399, n. 1-2, p. 17-22, 2006

MANKAD, A. et al. Natural gene therapy in monozygotic twins with Fanconi anemia. **Blood**, v. 107, n. 8, p. 3084-3090, 2006

MARNETT, L. J.; RIGGINS, J. N.; WEST, J. D. Endogenous generation of reactive oxidants and electrophiles and their reactions with DNA and protein. **J. Clin. Inv.**, v. 111, n. 5, p. 583-593, 2003

MARUYAMA, H. et al. Mutations of optineurin in amyotrophic lateral sclerosis. **Nature**, v. 465, n. 7295, p. 223-U109, 2010

MATSUMOTO, A. et al. Disease progression of human SOD1 (G93A) transgenic ALS model rats. **J. Neurosci. Res.**, v. 83, n. 1, p. 119-133, 2006

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

MCKAY, J.D. et al. A genome-wide association study of upper aerodigestive tract cancers conducted within the INHANCE Consortium. **PLoS Genet.**, v. 7, p. e1001333, 2011.

MECHILLI, M. et al. DNA repair deficiency and acetaldehyde-induced chromosomal alterations in CHO cells. **Mutagenesis**, v. 23, n. 1, p. 51-56, 2008

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

MEDINAS, D. B. et al. The carbonate radical and related oxidants derived from bicarbonate buffer. **Iubmb Life**, v. 59, n. 4-5, p. 255-262, 2007

MEETEI, A. R. et al. A novel ubiquitin ligase is deficient in Fanconi anemia. **Nature Genetics**, v. 35, n. 2, p. 165-170, 2003

_____. X-linked inheritance of Fanconi anemia complementation group B. **Nature Genetics**, v. 36, n. 11, p. 1219-1224, 2004

_____. A multiprotein nuclear complex connects Fanconi anemia and Bloom syndrome. **Mol. Cell. Biol.**, v. 23, n. 10, p. 3417-3426, 2003

MILLER, R. G.; MITCHELL, J. D.; MOORE, D. H. Riluzole for amyotrophic lateral sclerosis (ALS)/motor neuron disease (MND). **Cochrane Database of Systematic Reviews**, n. 3, 2012

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. et al. Familial amyotrophic lateral sclerosis is associated with a mutation in D-amino acid oxidase. **PNAS**, v. 107, n. 16, p. 7556-7561, 2010

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

MITNE-NETO, M. et al. Downregulation of VAPB expression in motor neurons derived from induced pluripotent stem cells of ALS8 patients. **Hum. Mol. Gen.**, v. 20, n. 18, p. 3642-3652, 2011

MODRICH, P. Mechanisms in eukaryotic mismatch repair. **J. Biol. Chem.**, v. 281, n. 41, p. 30305-30309, 2006

MOLLER, P.; LOFT, S. Oxidative Damage to DNA and Lipids as Biomarkers of Exposure to Air Pollution. **Environm. Health Persp.**, v. 118, n. 8, p. 1126-1136, 2010

MONOSTORI, P. et al. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples: an in-depth review. **J Chrom. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.**, v. 877, n. 28, p. 3331-46, 2009

MORGAN, B. et al. Multiple glutathione disulfide removal pathways mediate cytosolic redox homeostasis. **Nature Chem. Biol.**, v. 9, n. 2, p. 119-125, 2013

MORGAN, B.; SOBOTTA, M. C.; DICK, T. P. Measuring E-GSH and H₂O₂ with roGFP2-based redox probes. **Free Rad. Biol. Med.**, v. 51, n. 11, p. 1943-1951, 2011

MORIYA, M. et al. Mutagenic potency of exocyclic dna-adducts - marked differences between escherichia-coli and simian kidney-cells. **PNAS**, v. 91, n. 25, p. 11899-11903, 1994

MOSEDALE, G. et al. The vertebrate Hef ortholog is a component of the Fanconi anemia tumor-suppressor pathway. **Nature Struc. Mol. Biol.**, v. 12, n. 9, p. 763-771, 2005

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

MUYDERMAN, H. et al. The Human G93A-Superoxide Dismutase-1 Mutation, Mitochondrial Glutathione and Apoptotic Cell Death. **Neurochem. Res.**, v. 34, n. 10, p. 1847-1856, 2009

NABHAN, S. K. et al. Fertility recovery and pregnancy after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in Fanconi anemia patients. **Haematologica-the Hematology Journal**, v. 95, n. 10, p. 1783-1787, 2010

NAGAI, M. et al. Rats expressing human cytosolic copper-zinc superoxide dismutase transgenes with amyotrophic lateral sclerosis: Associated mutations develop motor neuron disease. **J. Neurosci.**, v. 21, n. 23, p. 9246-9254, 2001

NAIR, J. et al. High urinary excretion of lipid peroxidation-derived DNA damage in patients with cancer-prone liver diseases. **Mut. Res. -Fund. Mol. Mechan. Mut.**, v. 683, n. 1-2, p. 23-28, 2010

NAIR, U.; BARTSCH, H.; NAIR, J. Lipid peroxidation-induced DNA damage in cancer-prone inflammatory diseases: A review of published adduct types and levels in humans. **Free Rad. Biol. Med.**, v. 43, n. 8, p. 1109-1120, 2007.

NAKAO, S.; et al. Reversible bone marrow hypoplasia induced by alcohol. *Am J Hematol*, v. 307, p. 845-849, 1991.

NIKI, E. et al. Lipid peroxidation: Mechanisms, inhibition, and biological effects. **Biochem. Bioph. Res. Comm.**, v. 338, n. 1, p. 668-676, 2005

NISHIMURA, A. L. et al. A mutation in the vesicle-trafficking protein VAPB causes late-onset spinal muscular atrophy and amyotrophic lateral sclerosis. **Am. J. Hum. Gen.**, v. 75, n. 5, p. 822-831, 2004

NOHL, H. Generation of superoxide radicals as byproduct of cellular respiration. **Ann. Biol. Clin.**, v. 52, n. 3, p. 199-204, 1994.

OAKLEY, A. Glutathione transferases: a structural perspective. **Drug Metabolism. Reviews**, v. 43, n. 2, p. 138-151, 2011

OBTULOWICZ, T. et al. Aberrant repair of etheno-DNA adducts in leukocytes and colon tissue of colon cancer patients. **Free Rad. Biol. Med.**, v. 49, n. 6, p. 1064-1071, 2010

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

ORLACCHIO, A. et al. SPATACSIN mutations cause autosomal recessive juvenile amyotrophic lateral sclerosis. **Brain**, v. 133, p. 591-598, 2010

OSTERGAARD, H.; TACHIBANA, C.; WINTHER, J. R. Monitoring disulfide bond formation in the eukaryotic cytosol. **J. Cell Biol.**, v. 166, n. 3, p. 337-345, 2004

PACE, P. et al. FANCE: the link between Fanconi anaemia complex assembly and activity. **Embo J.**, v. 21, n. 13, p. 3414-3423, 2002

_____. Ku70 Corrupts DNA Repair in the Absence of the Fanconi Anemia Pathway. **Science**, v. 329, n. 5988, p. 219-223, 2010

PALEJWALA, V. A. et al. Quantitative multiplex sequence-analysis of mutational hot-spots - frequency and specificity of mutations induced by a site-specific ethenocytosine in m13 viral-DNA. **Biochemistry**, v. 32, n. 15, p. 4105-4111, 1993

PANDYA, G. A.; MORIYA, M. 1,N-6-ethenodeoxyadenosine, a DNA adduct highly mutagenic in mammalian cells. **Biochemistry**, v. 35, n. 35, p. 11487-11492, 1996

PARAKH, S. et al. Redox Regulation in Amyotrophic Lateral Sclerosis. **Oxid. Med. Cel. Long.**, v. 2013, p. 12, 2013

PARKINSON, N. et al. ALS phenotypes with mutations in CHMP2B (charged multivesicular body protein 2B). **Neurology**, v. 67, n. 6, p. 1074-1077, 2006

PEDERSEN, W. A. et al. Protein modification by the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal in the spinal cords of amyotrophic lateral sclerosis patients. **Ann. Neurol.**, v. 44, n. 5, p. 819-24, 1998

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

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

PERLUIGI, M. et al. Proteomic analysis of 4-hydroxy-2-nonenal-modified proteins in G93A-SOD1 transgenic mice--a model of familial amyotrophic lateral sclerosis. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 38, n. 7, p. 960-8, 2005

POLI, G. et al. 4-hydroxynonenal: A membrane lipid oxidation product of medicinal interest. **Med. Res. Reviews**, v. 28, n. 4, p. 569-631, 2008

POOT, M. et al. Influence Of Cumene Hydroperoxide And 4-Hydroxynonenal On The Glutathione Metabolism During Invitro Aging Of Human-Skin Fibroblasts. **Eur. J. Biochem.**, v. 162, n. 2, p. 287-291, 1987

PORTER, N. A. Chemistry of lipid-peroxidation. **Meth. Enzymol.**, v. 105, p. 273-282, 1984

PORTER, N. A.; CALDWELL, S. E.; MILLS, K. A. Mechanisms of free-radical oxidation of unsaturated lipids. **Lipids**, v. 30, n. 4, p. 277-290, 1995

PRUTHI, S. et al. Evaluation of serum estrogen-DNA adducts as potential biomarkers for breast cancer risk. **J. Steroid Biochem. Mol. Biol.**, v. 132, n. 1-2, p. 73-79, 2012.

PU, X.; KAMENDULIS, L. M.; KLAUNIG, J. E. Acrylonitrile-induced oxidative stress and oxidative DNA damage in male Sprague-Dawley rats. **Toxicol. Sci.**, v. 111, n. 1, p. 64-71, 2009

PULS, I. et al. Mutant dynactin in motor neuron disease. **Nature Genetics**, v. 33, n. 4, p. 455-456, 2003

QUADROS, A. A. J. História da Esclerose Lateral Amiotrófica no Brasil. **Revista Neurociências**, v. 14, n. 2 (Supl - versão eletrônica), p. 14-23, 2006

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

RAESCHLE, M. et al. Mechanism of replication-coupled DNA interstrand crosslink repair. **Cell**, v. 134, n. 6, p. 969-980, 2008

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

RAY, P. D.; HUANG, B.-W.; TSUJI, Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. **Cellular Sign.**, v. 24, n. 5, p. 981-990, 2012

REAUME, A. G. et al. Motor neurons in Cu/Zn superoxide dismutase-deficient mice develop normally but exhibit enhanced cell death after axonal injury. **Nature Genetics**, v. 13, n. 1, p. 43-47, 1996

RENTON, A. E. et al. A Hexanucleotide Repeat Expansion in C9ORF72 Is the Cause of Chromosome 9p21-Linked ALS-FTD. **Neuron**, v. 72, n. 2, p. 257-268, 2011

RHEE, S. G. et al. Peroxiredoxin Functions as a Peroxidase and a Regulator and Sensor of Local Peroxides. **J. Biol. Chem.**, v. 287, n. 7, p. 4403-4410, 2012

RIGGINS, J. N. et al. Kinetic and thermodynamic analysis of the hydrolytic ring-opening of the malondialdehyde-deoxyguanosine adduct, 3-(2'-deoxy-beta-D-erythro-pentofuranosyl)pyrimido 1,2-alpha purin-10(3H)-one. **JACS**, v. 126, n. 26, p. 8237-8243, 2004

RIPPS, M. E. et al. Transgenic Mice Expressing An Altered Murine Superoxide-Dismutase Gene Provide An Animal-Model Of Amyotrophic-Lateral-Sclerosis. **PNAS**, v. 92, n. 3, p. 689-693, 1995

ROBERTS, B. R. et al. Structural characterization of zinc-deficient human superoxide dismutase and implications for ALS. **J. Mol. Biol.**, v. 373, n. 4, p. 877-890, 2007

ROSEN, D. R. et al. Mutations In Cu/Zn Superoxide-Dismutase Gene Are Associated With Familial Amyotrophic-Lateral-Sclerosis. **Nature**, v. 362, n. 6415, p. 59-62, 1993

ROSENBERG, P. S.; ALTER, B. P.; EBELL, W. Cancer risks in Fanconi anemia: findings from the German Fanconi Anemia Registry. **Haematologica-the Hematology Journal**, v. 93, n. 4, p. 511-517, 2008

ROSENBERG, P. S.; GREENE, M. H.; ALTER, B. P. Cancer incidence in persons with Fanconi anemia. **Blood**, v. 101, n. 3, p. 822-826, 2003

ROSS, W. C. J. Biological Action Of X-Rays, Nitrogen Mustards, Diepoxides And Peroxides. **Nature**, v. 165, n. 4203, p. 808-809, 1950

SAGRIPANTI, J. L.; GOERING, P. L.; LAMANNA, A. Interaction Of Copper With Dna And Antagonism By Other Metals. **Toxicol. Appl. Pharm.**, v. 110, n. 3, p. 477-485, 1991

SALADI, R. N.; PERSAUD, A. N. The causes of skin cancer: A comprehensive review. **Drugs of Today**, v. 41, n. 1, p. 37-53, 2005

SAMPEY, B. P. et al. Immunohistochemical characterization of hepatic malondialdehyde and 4-hydroxynonenal modified proteins during early stages of ethanol-induced liver injury. **Alcoholism-Clin. Exp. Res.**, v. 27, n. 6, p. 1015-1022, 2003

SANCHEZ-GOMEZ, F. J. et al. S-glutathionylation: relevance in diabetes and potential role as a biomarker. **Biol. Chem.**, v. 394, n. 10, p. 1263-1280, 2013

SARAN, M.; MICHEL, C.; BORS, W. Reaction Of No With O-2- Implications For The Action Of Endothelium-Derived Relaxing Factor (Edrf). **Free Rad. Res. Comm.**, v. 10, n. 4-5, p. 221-226, 1990

SCHAUENSTEIN, E.; DORNER, F.; SONNENBICHLER, J. Linkage of 4-hydroxy-2,3-enals to protein SH groups. **Zeitschrift Fur Naturforschung Part B-Chemie Biochemie Biophysik Biologie Und Verwandten Gebiete**, v. B 23, n. 3, p. 316-&, 1968

SCHAUR, R. J. Basic aspects of the biochemical reactivity of 4-hydroxynonenal. **Mol. Aspec. Med.**, v. 24, n. 4-5, p. 149-159, 2003

SCHNEIDER, C. et al. Two distinct pathways of formation of 4-hydroxynonenal - Mechanisms of nonenzymatic transformation of the 9-and 13-hydroperoxides of linoleic acid to 4-hydroxyalkenals. **J. Biol. Chem.**, v. 276, n. 24, p. 20831-20838, 2001

SENER, G. et al. Ginkgo biloba extract protects against mercury(II)-induced oxidative tissue damage in rats. **Food Chem. Toxicol.**, v. 45, n. 4, p. 543-50, 2007

SEO, J.-S. et al. SK-PC-B70M alleviates neurologic symptoms in G93A-SOD1 amyotrophic lateral sclerosis mice. **Brain Res.**, v. 1368, n. 0, p. 299-307, 2011.

SHAW, I. C. et al. Studies on cellular free radical protection mechanisms in the anterior horn from patients with amyotrophic lateral sclerosis. **Neurodegeneration**, v. 4, n. 4, p. 391-6, 1995

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

SHIBATA, N. et al. Accumulation of protein-bound 4-hydroxy-2-hexenal in spinal cords from patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. **Brain Res.**, v. 1019, n. 1-2, p. 170-7, 2004

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

SHIGECHI, T. et al. ATR-ATRIP Kinase Complex Triggers Activation of the Fanconi Anemia DNA Repair Pathway. **Cancer Res.**, v. 72, n. 5, p. 1149-1156, 2012

SHIMAMURA, A.; ALTER, B. P. Pathophysiology and management of inherited bone marrow failure syndromes. **Blood Reviews**, v. 24, n. 3, p. 101-122, 2010

SICILIANO, G. et al. Antioxidant capacity and protein oxidation in cerebrospinal fluid of amyotrophic lateral sclerosis. **J. Neurol.**, v. 254, n. 5, p. 575-80, 2007

SIGOLO, C. A.; DI MASCIO, P.; MEDEIROS, M. H. Covalent modification of cytochrome c exposed to trans,trans-2,4-decadienal. **Chem. Res. Toxicol.**, v. 20, n. 8, p. 1099-110, 2007

SILVERSTAIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRIL, T. C. Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos. In: (Ed.). 5ª. Rio de Janeiro, RJ: Ed Guanabara Koogan S.A., 1994. p.180.

SIMPSON, E. P. et al. Increased lipid peroxidation in sera of ALS patients: a potential biomarker of disease burden. **Neurology**, v. 62, n. 10, p. 1758-65, May 25 2004.

SINGER, B.; HANG, B. Mammalian enzymatic repair of etheno and para-benzoquinone exocyclic adducts derived from the carcinogens vinyl chloride and benzene. In: SINGER, B. e BARTSCH, H. (Ed.). **Exocyclic DNA Adducts in Mutagenesis and Carcinogenesis**, 1999. p.233-247. (Iarc Scientific Publications). ISBN 0300-5038 92-832-2150-8.

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. J. et al. Reexamination of the mechanism of hydroxyl radical adducts formed from the reaction between familial amyotrophic lateral sclerosis-associated Cu,Zn superoxide dismutase mutants and H₂O₂. **PNAS**, v. 95, n. 12, p. 6675-6680, 1998

SIU, G. M.; DRAPER, H. H. Metabolism of malonaldehyde in vivo and in vitro. **Lipids**, v. 17, n. 5, p. 349-355, 1982

SMOGORZEWSKA, A. et al. A Genetic Screen Identifies FAN1, a Fanconi Anemia-Associated Nuclease Necessary for DNA Interstrand Crosslink Repair. **Mol. Cell**, v. 39, n. 1, p. 36-47, Jul 9 2010.

_____. Identification of the FANCI protein, a monoubiquitinated FANCD2 paralog required for DNA repair. **Cell**, v. 129, n. 2, p. 289-301, 2007

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

SREEDHARAN, J. et al. TDP-43 mutations in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. **Science**, v. 319, n. 5870, p. 1668-1672, 2008

STEIN, S. et al. Genotoxicity of acetaldehyde- and crotonaldehyde-induced 1,N-2-propanodeoxyguanosine DNA adducts in human cells. **Mut. Res. – Gen. Toxicol. Environm. Mut.**, v. 608, n. 1, p. 1-7, 2006

STEVENS, J. F.; MAIER, C. S. Acrolein: Sources, metabolism, and biomolecular interactions relevant to human health and disease. **Mol. Nut. Food Res.**, v. 52, n. 1, p. 7-25, 2008

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

STONE, M. P. et al. Interstrand DNA cross-links induced by alpha,beta-unsaturated aldehydes derived from lipid peroxidation and environmental sources. **Acc. Chem. Res.**, v. 41, n. 7, p. 793-804, 2008

STRATHDEE, C. A. et al. Cloning of cdnas for fanconis anemia by functional complementation. **Nature**, v. 356, n. 6372, p. 763-767, 1992

STURTZ, L. A. et al. A fraction of yeast Cu,Zn-superoxide dismutase and its metallochaperone, CCS, localize to the intermembrane space of mitochondria - A physiological role for SOD1 in guarding against mitochondrial oxidative damage. **J. Biol. Chem.**, v. 276, n. 41, p. 38084-38089, 2001

SULTANA, R.; PERLUIGI, M.; BUTTERFIELD, D. A. Lipid peroxidation triggers neurodegeneration: A redox proteomics view into the Alzheimer disease brain. **Free Rad. Biol. Med.**, v. 62, p. 157-169, 2013

SVENDSEN, J. M. et al. Mammalian BTBD12/SLX4 Assembles A Holliday Junction Resolvase and Is Required for DNA Repair. **Cell**, v. 138, n. 1, p. 63-77, 2009

TAHARA, E. B.; NAVARETE, F. D. T.; KOWALTOWSKI, A. J. Tissue-, substrate-, and site-specific characteristics of mitochondrial reactive oxygen species generation. **Free Rad. Biol. Med.**, v. 46, n. 9, p. 1283-1297, 2009

TAINER, J. A. et al. Determination and analysis of the 2 A-structure of copper, zinc superoxide dismutase. **J. Mol. Biol.**, v. 160, n. 2, p. 181-217, 1982

TANIGUCHI, T.; D'ANDREA, A. D. Molecular pathogenesis of Fanconi anemia: recent progress. **Blood**, v. 107, n. 11, p. 4223-4233, 2006

TARTARI, S. et al. Adaptation to G93Asuperoxide dismutase 1 in a motor neuron cell line model of amyotrophic lateral sclerosis. **Febs J.**, v. 276, n. 10, p. 2861-2874, 2009

TICOZZI, N. et al. Mutational Analysis Reveals the FUS Homolog TAF15 as a Candidate Gene for Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis. **Am. J. Med. Gen. Part B-Neuropsych. Gen.**, v. 156B, n. 3, p. 285-290, 2011

TIELEMAN, D. P.; BERENDSEN, H. J. C. A molecular dynamics study of the pores formed by Escherichia coli OmpF porin in a fully hydrated palmitoylcholine bilayer. **Biophysical J.**, v. 74, n. 6, p. 2786-2801, 1998

TOKLU, H. Z. et al. The protective effect of alpha lipoic acid against traumatic brain injury in rats. **Free Radic. Res.**, v. 43, n. 7, p. 658-67, 2009

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

TOMKINS, J. et al. Novel insertion in the KSP region of the neurofilament heavy gene in amyotrophic lateral sclerosis (ALS). **Neuroreport**, v. 9, n. 17, p. 3967-3970, 1998

TU, P. H. et al. Transgenic mice carrying a human mutant superoxide dismutase transgene develop neuronal cytoskeletal pathology resembling human amyotrophic lateral sclerosis lesions. **PNAS**, v. 93, n. 7, p. 3155-3160, 1996

VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 39, n. 1, p. 44-84, 2007

VAN DER GRAAFF, M. M. et al. Upper motor neuron and extra-motor neuron involvement in amyotrophic lateral sclerosis: a clinical and brain imaging review. **Neuromuscul. Disord.**, v. 19, n. 1, p. 53-8, 2009

VAN DER LELIJ, P. et al. Diagnostic overlap between fanconi anemia and the cohesinopathies: Roberts syndrome and Warsaw breakage syndrome. **Anemia**, v. 2010, 2010

VANCE, C. et al. Mutations in FUS, an RNA Processing Protein, Cause Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis Type 6. **Science**, v. 323, n. 5918, p. 1208-1211, 2009

VARGA, V. et al. Glutathione is an endogenous ligand of rat brain N-methyl-D-aspartate (NMDA) and 2-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate (AMPA) receptors. **Neurochem. Res.**, v. 22, n. 9, p. 1165-71, 1997

VAZ, F. et al. Mutation of the RAD51C gene in a Fanconi anemia-like disorder. **Nature Genetics**, v. 42, n. 5, p. 406-U63, 2010

VILA, A. et al. Identification of Protein Targets of 4-Hydroxynonenal Using Click Chemistry for ex Vivo Biotinylation of Azido and Alkynyl Derivatives. **Chem. Res. Toxicol.**, v. 21, n. 2, p. 432-44, 2008

VOLKEL, W. et al. Glutathione conjugates of 4-hydroxy-2(E)-nonenal as biomarkers of hepatic oxidative stress-induced lipid peroxidation in rats. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 38, n. 11, p. 1526-36, 2005

_____. Increased brain levels of 4-hydroxy-2-nonenal glutathione conjugates in severe Alzheimer's disease. **Neurochem. Int.**, v. 48, n. 8, p. 679-686, 2006

VOULGARIDOU, G.-P. et al. DNA damage induced by endogenous aldehydes: Current state of knowledge. **Mut. Res. – Fund. Mol. Mechan. Mut.**, v. 711, n. 1-2, p. 13-27, 2011

WAKITA, C. et al. A method for detection of 4-hydroxy-2-nonenal adducts in proteins. **Free Rad. Biol. Med.**, v. 51, n. 1, p. 1-4, 2011

WANG, H.-T. et al. Mutagenicity and Sequence Specificity of Acrolein-DNA Adducts. **Chem. Res. Toxicol.**, v. 22, n. 3, p. 511-517, 2009

WANG, J. et al. Copper-binding-site-null SOD1 causes ALS in transgenic mice: aggregates of non-native SOD1 delineate a common feature. **Hum. Mol. Gen.**, v. 12, n. 21, p. 2753-2764, 2003

WANG, L. et al. Wild-type SOD1 overexpression accelerates disease onset of a G85R SOD1 mouse. **Hum. Mol. Gen.**, v. 18, n. 9, p. 1642-1651, 2009

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

WARD, E. M. et al. Research Recommendations for Selected IARC-Classified Agents. **Environm. Health Perspec.**, v. 118, n. 10, p. 1355-1362, 2010

WENK, M. R. The emerging field of lipidomics. **Nat. Rev. Drug Discov.**, v. 4, n. 7, p. 594-610, 2005

WILLIAMS, S. A. et al. Functional and physical interaction between the mismatch repair and FA-BRCA pathways. **Hum. Mol. Gen.**, v. 20, n. 22, p. 4395-4410, 2011

WINCZURA, A.; ZDZALIK, D.; TUDEK, B. Damage of DNA and proteins by major lipid peroxidation products in genome stability. **Free Rad. Res.**, v. 46, n. 4, p. 442-459, 2012

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

WINTHER, J. R.; JAKOB, U. REDOX CONTROL: A black hole for oxidized glutathione. **Nature Chem. Biol.**, v. 9, n. 2, p. 69-70, 2013

WONG, P. C. et al. An adverse property of a familial als-linked sod1 mutation causes motor-neuron disease characterized by vacuolar degeneration of mitochondria. **Neuron**, v. 14, n. 6, p. 1105-1116, 1995

WOOSLEY, R. L. One Hundred Years of Drug Regulation: Where Do We Go from Here? **Annual Review of Pharm. Toxicol.**, Vol 53, 2013, v. 53, p. 255-273, 2013

WU, A. S. et al. Iron porphyrin treatment extends survival in a transgenic animal model of amyotrophic lateral sclerosis. **J Neurochem**, v. 85, n. 1, p. 142-50, 2003

XIA, B. et al. Fanconi anemia is associated with a defect in the BRCA2 partner PALB2. **Nature Genetics**, v. 39, n. 2, p. 159-161, 2007

_____. Control of BRCA2 cellular and clinical functions by a nuclear partner, PALB2. **Molecular Cell**, v. 22, n. 6, p. 719-729, 2006

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

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

ZHANG, H. et al. Bicarbonate-dependent peroxidase activity of human Cu, Zn-superoxide dismutase induces covalent aggregation of protein - Intermediacy of tryptophan-derived oxidation products. **J. Biol. Chem.**, v. 278, n. 26, p. 24078-24089, 2003

ZHANG, H.; FORMAN, H. J. Glutathione synthesis and its role in redox signaling. **Semin. Cell Develop. Biol.**, v. 23, n. 7, p. 722-728, 2012

ZHU, P.; JIAN, W.; BLAIR, I. A. A 4-oxo-2(E)-nonenal-derived glutathione adduct from 15-lipoxygenase-1-mediated oxidation of cytosolic and esterified arachidonic acid. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 47, n. 7, p. 953-61, 2009

ZHU, Y.; CARVEY, P. M.; LING, Z. Age-related changes in glutathione and glutathione-related enzymes in rat brain. **Brain Res.**, v. 1090, n. 1, p. 35-44, 2006

ZINMAN, L.; CUDKOWICZ, M. Emerging targets and treatments in amyotrophic lateral sclerosis. **Lancet Neurology**, v. 10, n. 5, p. 481-490, 2011

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^{CRSA}”, 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^{CRSA}”, 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

ANEXO III – Parecer da Comissão de Ética em Pesquisas com Seres Humanos – ICB / USP.**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (11) 3091.7733 telefax : (55) (11) 3091-7438
e-mail: cep@icb.usp.br

São Paulo, 25 de maio de 2009.

PARECER 891/CEP

Prezada Senhora,

Atendendo sua solicitação, a *Comissão de Ética em Pesquisas com Seres Humanos do ICB*, em sua 95ª reunião realizada em 22.05.09, analisou o projeto de sua responsabilidade intitulado: "*Estudo de biomarcadores de estresse redox em urina e sangue humano*".

Informo a V.Sa. que, após análise e discussão, o referido projeto foi **aprovado por esta Comissão.**

Lembramos que cabe ao pesquisador elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais ou final), de acordo com a resolução 196/06 do Conselho Nacional da Saúde, item IX.2 letra c.

O primeiro relatório deverá ser encaminhado à Secretaria deste CEP em **22 de maio de 2010.**

Atenciosamente,

Prof. Dr. PAOLO M.A ZANOTTO
Vice-Coordenador da Comissão de Ética em
Pesquisas com Seres Humanos - ICB/USP

Ilma Sra.
PROFA. DRA. MARISA HELENA GENNARI DE MEDEIROS
Departamento de Bioquímica
Instituto de Química -USP

ANEXO IV – Parecer de aprovação do relatório Parcial pela Comissão de Ética em Pesquisas com Seres Humanos – ICB / USP.



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone: (55) (011) 38130900 - telefax: (55) (011) 3818-7438
e-mail: icbcedir@icb.usp.br

Decl. CEPESH, 006/2011

DECLARAÇÃO

Declaro que o relatório Parcial apresentado pela pesquisadora **Marisa Helena Gennari de Medeiros**, referente ao projeto intitulado: "*Estudo de biomarcadores de estresse redox em urina e sangue humano*" foi analisado e considerado satisfatório por esta Comissão, conforme prevê a resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde.

São Paulo, 18 de janeiro de 2011.

Prof. Dr. PAOLO M.A. ZANOTTO
Coordenador da Comissão de Ética em
Pesquisas com Seres Humanos - ICB /USP

APÊNDICE

APÊNDICE A – Tabela de avaliação dos ratos SOD1^{G93A}

Data: ___/___/___

Número do Animal	Marcação (caixa)	Peso (gramas)	Tempo Suspensão (seg)	Levanta da caixa	Plano Inclinado		Endireitamento em 30 seg	Arrastando parte do corpo	cauda arrastando	Torção do corpo	Extensão membros torácicos	
					Inclinação (graus)	Tempo (seg)					Direito	Esquerdo
			1 2 3 4 5 >5	S N		1 2 3 4 5 >5	S 1L N	S N	S N	0 S E	0 1 2	0 1 2
			1 2 3 4 5 >5	S N		1 2 3 4 5 >5	S 1L N	S N	S N	0 S E	0 1 2	0 1 2

Movimento do membro												Observações
Pélvicos						Torácicos						
Quadril		Joelho		Tornozelo		Ombro		Cotovelo		Punho		
Direito	Esquerdo	Direito	Esquerdo	Direito	Esquerdo	Direito	Esquerdo	Direito	Esquerdo	Direito	Esquerdo	
0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	
0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	

<i>Campo</i>	<i>Código</i>	<i>Valor</i>
Levanta na caixa	S	Sim
Arrastando parte do corpo	N	Não
Endireitamento em 30 seg.	S	Sim, de ambos os lados
	1L	Sim, mas apenas por um dos lados
	N	Não, por nenhum dos lados
Torção do corpo	0	Nulo
Movimento do membro	S	Suave
	E	Extenso
Extensão dos membros torácicos	0	Sem reflexo
	1	Sem resistência a pressão lateral
	2	Com resistência a pressão lateral

APÊNDICE B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Universidade de São Paulo

Instituto de Química

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**I – DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU LEGAL RESPONSÁVEL**

1. Nome do doador:
 Documento de identidade Nº:.....Sexo: () M () F
 Data de nascimento:/...../.....
 Endereço:..... Nº:..... Apto:.....
 Bairro:..... Cidade:.....
 CEP:..... Telefone:.....

Histórico

Peso:_____ Altura:_____

Atividade física:

- Repouso
- Muito leve
- Leve
- Moderada
- Intensa

Frequência da atividade física:

- 1 vez por semana
- 3 vezes por semana
- diariamente
- outras (quantas)

História médica:

- Enfermidade renal
- Enfermidade cardiovascular
- Enfermidade hepática
- Problemas intestinais
- Diabetes
- Nenhum
- Outro(s) qual(is)

Tomou algum medicamento nos últimos 2 dias? Quais

Consome suplementos alimentares, vitaminas etc.? Quais?

Fuma? Se sim quantos cigarros por dia.

Consome bebidas alcoólicas? Qual a frequência semanal

II – DADOS SOBRE A PESQUISA

1. Título do projeto de pesquisa: Estudo de biomarcadores de estresse redox em urina e sangue humano
2. Pesquisador: Profa. Dra. Marisa Helena Gennari de Medeiros
Cargo/Função: Professora Titular
Departamento de Bioquímica
Instituto de Química
Universidade de São Paulo
3. AVALIAÇÃO DE RISCO DA PESQUISA:
Risco Mínimo () Risco Médio () Risco Baixo () Risco Maior ()

A probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo é praticamente nula. Eventualmente pode ser que após a coleta de sangue, o indivíduo possa apresentar algum tipo de hematoma na região da coleta.

III – REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA, CONSIGNANDO:

1. A pesquisa da qual você participará tem a finalidade de estudar biomarcadores de estresse redox.
2. Como se trata de um projeto de pesquisa, não haverá benefícios imediatos para os envolvidos na pesquisa.
3. Serão coletados aproximadamente 20 mL de sangue, e para tal serão utilizados materiais descartáveis e esterilizados.
4. O indivíduo não precisará estar em jejum no momento da coleta.
5. O procedimento da coleta é de aproximadamente 05 minutos.
6. Este procedimento já foi comprovado e não acarretará ao indivíduo nenhum agravo imediato ou tardio.
7. No caso dos estudos com sangue humano, será coletado 20 mL de sangue, por profissional habilitado, em sala com assepsia adequada, será utilizado álcool 70% para higienização do local da punção. Todo o material utilizado será estéril e descartável. Não há risco de contrair doenças.
8. No caso dos estudos com urina, os participantes doarão uma amostra de urina que será coletada pelo próprio doador em frasco doado pelo laboratório responsável pela pesquisa.

IV – ESCLARECIMENTO DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA

1. O material de cada indivíduo será coletado uma única vez. Todas as informações sobre os procedimentos e benefícios relacionados à pesquisa serão fornecidas antes da coleta.
2. Sua participação neste estudo será sigilosa e, portanto, seu nome não será utilizado em nenhuma etapa desta pesquisa.
3. Este estudo não envolve nenhum dano à saúde dos indivíduos participantes.
4. O sangue e urina coletados serão utilizados somente para a obtenção de biomarcadores de sangue e urina, conforme descrito no projeto.
5. Não há despesa pessoal para o indivíduo participante do estudo. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação
6. Após receber todas as informações relativas ao projeto, você poderá optar por não participar do estudo.

V – CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Acredito ter sido suficientemente esclarecido e informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo acima. Ficaram claros para mim quais são os propósitos, os procedimentos a serem realizados e as garantias de ser confidencial. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar meu consentimento por escrito antes da coleta, sem penalidades, prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste serviço.

Por fim, declaro que entendi todos os pontos do presente termo.

São Paulo, ____ de _____ de _____.

Assinatura do Doador

Pesquisadora responsável: Profa. Dra. Marisa H. G. Medeiros
Instituto de Química
Universidade de São Paulo
Av. Professor Lineu Prestes, 748
Telefone: (011) 3091-2153

SÚMULA CURRICULAR

1. Dados Pessoais

Florêncio Porto Freitas

Imperatriz – MA, 12 de dezembro de 1980

2. EDUCAÇÃO

Escola Rui Barbosa, Imperatriz – MA, 1998.

Universidade Federal de Sergipe, São Cristovão – SE, 2008.

Farmácia

3. OCUPAÇÃO

Analista Laboratório, Instituto de Ensino e Pesquisa – Hospital Sírio Libanês.

Bolsista de Doutorado Direto, FAPESP, 2008 - 2013

4.PUBLICAÇÕES

4.1. Artigos completos publicados em periódicos

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. 26, p. 1602-1604, 2013.

Derogis, Priscilla B. M. C. ; Freitas, Florêncio P. ; Marques, Anna S. F. ; Cunha, Daniela ; Appolinário, Patricia P. ; De Paula, Fernando ; Lourenço, Tiago C. ; Murgu, Michael ; Di Mascio, Paolo ; Medeiros, Marisa H. G. ; Miyamoto, Sayuri . The Development of a Specific and Sensitive LC-MS-Based Method for the Detection and Quantification of Hydroperoxy- and Hydroxydocosahexaenoic Acids as a Tool for Lipidomic Analysis. *Plos One* , v. 8, p. e77561, 2013.

Santos, João L.A. ; Bispo, Vanderson S. ; C. Filho, Adriano B. ; Pinto, Isabella F.D. ; Dantas, Lucas S. ; Vasconcelos, Daiane F. ; Abreu, Fabíula F. ; Melo, Danilo A. ; Matos, Isaac A. ; Freitas, Florêncio P. ; Gomes, Osmar F. ; Medeiros,

Marisa H.G. ; Matos, Humberto R. . Evaluation of Chemical Constituents and Antioxidant Activity of Coconut Water (*Cocos nucifera* L.) and Caffeic Acid in Cell Culture. *Anais da Academia Brasileira de Ciências (Impresso)* , v. 85, p. 1235-1246, 2013.

Angeli, José Pedro F. ; Garcia, Camila Carrião M. ; Sena, Fernanda ; Freitas, Florêncio P. ; Miyamoto, Sayuri ; Medeiros, Marisa Helena G. ; Di Mascio, Paolo . Lipid hydroperoxide-induced and hemoglobin-enhanced oxidative damage to colon cancer cells. *Free Radical Biology & Medicine* , v. 51, p. 503-515, 2011.

Garcia, Camila Carrião M. ; Angeli, José Pedro F. ; Freitas, Florêncio P. ; Gomes, Osmar F. ; de Oliveira, Tiago F. ; Loureiro, Ana Paula M. ; Di Mascio, Paolo ; Medeiros, Marisa H. G. [13C2]- Acetaldehyde Promotes Unequivocal Formation of 1,N2-Propano-2'-deoxyguanosine in Human Cells. *Journal of the American Chemical Society* , v. 133, p. 9140-9143, 2011.

Garcia, Camila C. M. ; Freitas, Florêncio. P. ; Di Mascio, Paolo ; Medeiros, Marisa H. G. . Ultrasensitive Simultaneous Quantification of 1,N2-Etheno-2'-deoxyguanosine and 1,N2-Propano-2'-deoxyguanosine in DNA by an Online Liquid Chromatography-Electrospray Tandem Mass Spectrometry Assay. *Chemical Research in Toxicology* , v. 23, p. 1245-1255, 2010.

4.1. Resumos publicados em anais de congressos

Freitas, F.P., Garcia, C. C. M.; Di Mascio, P. Medeiros, M. H. G.;. In: 16th biennial meeting for the Society for Free Radical Research International (SFRRI)", 6 a 9 de setembro de 2013, Londres, Inglaterra. Disponível em: Free Radical Biology and Medicine, V 53 (1), pág. S175, setembro de 2012.

Freitas,F.P. ; Garcia, Camila Carrião M. ; Gomes, O. F. ; Miyamoto, Sayuri ; Di Mascio, Paolo ; Medeiros, Marisa H. G. . DNA Adducts in the Brain of a Rat Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. In: VII Meeting of the SFRBM South American Group, 2011, São Pedro - SP. Program Book, 2011. p. 154.

Garcia, Camila C. M. ; Freitas,F.P. ; BATISTA, G. L. ; Sanchez, A. B. ; Angeli, José Pedro F. ; Gomes, Osmar F. ; GUTZ, I. G. R. ; Di Mascio, Paolo ; Medeiros, Marisa H. G. . Low Doses of Inhaled Acetaldehyde Promote Lipid Peroxidation and DNA Damage in Rats. In: VII Meeting of the SFRBM South American Group, 2011, São Pedro - SP. Program Book, 2011. p. 126.

Freitas,F.P. ; Garcia, Camila C. M. ; Gomes, O. F. ; MIYAMOTO, S. ; Di Mascio, Paolo ; Medeiros, Marisa H. G. . Analysis of Lipid Peroxidation-Derived Aldehydes in a Rat Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. In: XXXIX Reunião Anual da sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBq, 2010, Foz do Iguaçu - PR. Livro de Resumo, 2010.

Freitas,F.P. ; Garcia, Camila C. M. ; Gomes, O. F. ; MIYAMOTO, S. ; Di Mascio, Paolo ; Medeiros, Marisa H. G. . Quantification of aldehydes in tissues from transgenic rats SOD G93A ALS models. In: VI Meeting of SFRBM South American Group, 2009, Santiago. Congress Book, 2009. p. 119.

Freitas,F.P. ; Garcia, Camila C. M. ; MIYAMOTO, S. ; Di Mascio, Paolo ; Medeiros, Marisa H. G. . Development of an On-Line Liquid Chromatography-Electrospray Tandem Mass Spectrometry Assay to Quantitatively Determine Aldehydes Derived from Lipid Peroxidation in ALS Animal Models. In: XXXVIII Annual Meeting of The Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq), 2009, Aguas de Lindóia - SP. Livro de Resumo, 2009.

Freitas,F.P. ; Garcia, Camila C. M. ; MIYAMOTO, S. ; Di Mascio, Paolo ; Medeiros, Marisa H. G. . Development of an On-Line Liquid Chromatography-Electrospray Tandem Mass Spectrometry Assay to Quantitatively Determine Aldehydes Derived from Lipid Peroxidation in ALS Animal Models. In: XXXVIII Annual Meeting of The Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq), 2009, Aguas de Lindóia - SP. Livro de Resumo, 2009.

4. PRÊMIOS

Travel Award pelo resumo “DNA adducts in the brain of a rat model of Amyotrophic Lateral Sclerosis” apresentado durante o “VII Meeting of the SFRBM-South American group”, 13 a 21 de Agosto de 2011. São Pedro, São Paulo, Brasil.