UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Toxicologia e Análises
Toxicológicas

Citotoxicidade do corante dinitrofenilazo CI DB291:
biotransformação, estresse oxidativo e alteração epigenética em
células HepG2

Tiago Franco de Oliveira

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:
Prof^ª. Dr^ª. Ana Paula de Melo Loureiro

São Paulo
2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Toxicologia e Análises
Toxicológicas

Citotoxicidade do corante dinitrofenilazo CI DB291:
biotransformação, estresse oxidativo e alteração epigenética em
células HepG2

Tiago Franco de Oliveira

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:
Prof^ª. Dr^ª. Ana Paula de Melo Loureiro

São Paulo
2012

Tiago Franco de Oliveira

Citotoxicidade do corante dinitrofenilazo CI DB291:
biotransformação, estresse oxidativo e alteração epigenética em
células HepG2

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Prof^a. Dr^a. Ana Paula de Melo Loureiro
orientador/presidente

Prof. Dr. Fábio Kummrow
1º. examinador

Prof^a. Dr^a. Miriam Galvonas Jasiulionis
2º. examinador

Prof. Dr. Fernando Salvador Moreno
3º. examinador

Prof^a. Dr^a. Ana Campa
4º. examinador

São Paulo, 24 de Agosto de 2012.

APOIO FINANCEIRO

CAPES – COORDENAÇÃO DE APERFEIÇOAMENTO DE PESSOAL DE NÍVEL SUPERIOR.

CNPq – CONSELHO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO.

FAPESP – FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO.

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA – UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

AGRADECIMENTOS

Inicialmente gostaria de dedicar meus mais sinceros agradecimentos a minha orientadora, a **Prof^a. Dr^a. Ana Paula de Melo Loureiro**, suas idéias e seu apoio foram fundamentais para a realização desta tese. Ana, sou eternamente grato por seus ensinamentos e orientação constante, pelas nossas discussões científicas, por muitas vezes estar na bancada comigo, por sanar minhas dúvidas e por estimular minha curiosidade me fazendo crescer em conhecimento. Obrigado, por fazer do aprendizado não um trabalho, mais um contentamento.

Sou particularmente grato a **Prof^a. Dr^a. Gisela de Aragão Umbuzeiro**, primeiramente, lhe agradeço por me apresentar ao programa de pós-graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas, sem sua intervenção provavelmente não teria executado esse trabalho. Obrigado pela colaboração, e por ter gentilmente fornecido o CI DB291, composto na qual esse trabalho se baseia.

Também gostaria de expressar meus agradecimentos ao **Prof. Dr. Paolo Di Mascio** e a **Prof^a. Dr^a. Marisa Helena Gennari de Medeiros**. Colaboradores ativos desse trabalho. Sem a ajuda de ambos, toda a parte experimental referente a espectrometria de massas seria inexecutável.

Agradeço a **Prof^a. Dr^a. Miriam Galvonas Jasiulionis** e aos membros do seu grupo de pesquisa, em especial a **Dr^a. Fernanda Molognoni** pela ajuda nos experimentos com a DNMT1 e por nossas conversas entusiasmadas, sobre os mecanismos do epigenéticos.

O Meu, eterno agradecimento para o meu pai e minha mãe, **Heitor Franco de Oliveira** (*in memoriam*) e **Mara Del Monde**, ao meu irmão **Mateus Franco de Oliveira**, obrigado pelo carinho, incentivo e apoio sempre incondicional. A minha irmã **Tais Franco de Oliveira Velhote** e ao meu cunhado **Carlos Eduardo Velhote**, simplesmente não tenho palavras para descrever a minha gratidão, vocês tem sido o meu porto-seguro, os mantenedores da minha paz de espírito, obrigado pelo apoio, força, incentivo, companheirismo.

Chega a hora mais complicada: agradecer aos amigos; os confidentes e companheiros dessa jornada acadêmica. Orgulho-me em dizer que tive o prazer de conhecer pessoas fantásticas, ao longo desses anos. Pessoas que foram capazes de despertar um laço de identificação tão forte que jamais poderá ser esquecido. Cada uma delas contribuiu, a sua maneira, para o realização dessa tese, bem como, para o meu desenvolvimento como pesquisador. Sou eternamente grato aos amigos, **Ana Lucia Shimada, André Nakasato, Andre Valle Bairros, Carolina Dizioli, Daniel Andregueti, Lara Lombardi, Rafael Menck e Rodrigo Dias**.

Aos companheiros do laboratório, **Ana Paula Gusman, Antônio Anax Falcão, Carla Baquedano, Diego Horita, Fabiana Almeida e Rafaela Moura**, sou grato por toda a amizade. Sou especialmente grato a minha amiga e parceira de bancada, **Amanda Lucila Medeiros da Silva**, iniciamos a pós-graduação juntos e ao longo dos anos compartilhamos alegrias e tristezas, sempre seguindo em frente. Obrigado pela ajuda nos primeiros passos do meu doutorado. Gostaria também de agradecer ao meu amigo **André Luiz Teroso Ribeiro**, pelas conversas e pelos momentos de descontração, mais também pelas discussões experimentais. Sinto-me particularmente orgulhoso pela sua iniciação no campo da química analítica .

Aos colegas de outros institutos, **Alliny Bastos, Angélica Sanchez, Camila Carrião, Fernanda Manso Prado, Florêncio Freitas, Izaura N. Toma, José Pedro Angeli, Osmar Gomes, Priscilla Derogis e Vanderson da Silva Bispo**, sou profundamente grato por tantas colaborações e pela forte amizade.

Aos colegas da Toxicologia e da Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Agradeço primeiro, aos alunos de uma geração anterior, **Cristina Bichels Hebeda, Danielle Maia, Fabiana Missau, Fabyana dos Anjos, Felipe Dörr, Stella de Bortoli, Tiago Peixe, Vanessa Gressler e Vania Rodriguez**, por tão bem me recepcionaram no meu ingresso na pós-graduação e pelos conselhos muitos valiosos. Aos mais novos, posso dizer que foi um prazer incomensurável conhecê-los, **Ana Carolina Durão, André Fukushima, Ariane Rivellis, Arícia Horácio, Bárbara Freitas, Bruna Rodrigues, Camila Araujo, Camila Lima, Carine Drewes, Cinthia Mantovani, Cyro Zacarias, Eric**

Barioni, Fabia Andrade, Filipe André, Franciele Knebel, Gabriela Müller, Graziela Bósio, Isabel Daufenback, Jose Santin, Joseane Sampaio, Juliana Miranda, Kaluce Almondes, Karen Belinati, Kátia Callou, Larissa Torres, Liliane Pires, Livia Dati, Livia Sanches, Lorena Pantaleão, Marcelo Filonzi, Mariah Ultramari, Marli Roehsig, Natália Figueiredo, Raphael Caio, , Renato Romano, Sarah Carobini, Saskia Seulin, Sayuri Udo, Simone Bolonheis, Simone Gomes, Thaísa Sandini e Wallace Moreira, foi um imensa satisfação trabalhar com pessoas tão distintas, uma verdadeira elite científica.

Aos Professores do departamento, **Dr^a. Ana Campa, Dr^a. Elizabeth de Souza Nascimento, Dr. Ernani Pinto Jr., Dr. Mauricio Yonamine, Dr^a. Regina Lúcia De Moraes Moreau, Dr^a. Sandra Helena Poliselli Farsky, Dr. Sandro Rogério de Almeida, Dr^a. Silvia Berlanga de Moraes Barros, Dr^a. Silvya Stuchi Maria-Engler e Dr^a. Tania Marcourakis** e aos funcionários **Ângelo, Beatriz, Dalva, Elaine, Jorge, Luzia, Nancy, Renata Albuquerque, Samanta e Sueli.**

A **TODOS** que de alguma forma ajudaram ou participaram no desenvolvimento deste trabalho, mesmo que seja dizendo um bom dia....
MUITO OBRIGADO !!!!

*“A mente que se abre a uma nova idéia
jamais voltará ao seu tamanho original”*

Albert Einstein

RESUMO

De OLIVEIRA, T. F. **Citotoxicidade do corante dinitrofenilazo CI DB291: biotransformação, estresse oxidativo e alteração epigenética em células HepG2**. 2012. Tese de Doutorado – Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2012.

O produto comercial CI Disperse Blue 291 (CI DB291) é amplamente utilizado pela indústria têxtil. Estudos mostram que corantes dinitrofenilazo são genotóxicos no ensaio de Ames/*Salmonella*, mas há poucos estudos sobre seus efeitos em células eucariontes. Este trabalho teve como objetivo investigar a genotoxicidade e citotoxicidade do corante DB291 em células humanas em cultura, bem como vias pelas quais o corante atua levando aos efeitos tóxicos. O corante comercial foi purificado por HPLC-DAD e utilizado para incubação com células HepG2 (5-100 μ M por 3-72 h). A citotoxicidade foi avaliada pelos ensaios de XTT, corante cristal violeta, lactato desidrogenase extracelular e consumo de glicose. A geração de ROS intracelular foi verificada pela emissão de fluorescência da 2',7'-diclorofluoresceína. Análises de ciclo celular, fragmentação do DNA, potencial de membrana mitocondrial (Ψ) e cálcio intracelular foram realizadas por citometria de fluxo. A produção de ATP foi mensurada por quimiluminescência. Níveis de 8-oxodG e 5-mdC foram avaliados por HPLC-ESI-MS/MS e HPLC-UV, respectivamente. A expressão da enzima DNMT1 foi avaliada por *western blot*. Um produto de biotransformação foi identificado e caracterizado estruturalmente por MS/MS e ^{1} H-RMN. A exposição ao corante DB291 diminuiu significativamente a sobrevivência das células em um modo tempo- e dose-dependente (IC_{50} = 74 μ M), com a concomitante formação de um produto de biotransformação reduzido. A morte celular ocorreu sem lise da membrana plasmática. Nas células expostas, foi observado aumento da atividade enzimática mitocondrial, acompanhado por um aumento da taxa de consumo de glicose. Índices elevados de ATP, Ψ e cálcio foram verificados após a incubação das células com concentrações crescentes do corante. Alterações mitocondriais e o processo de biotransformação impeliram a aumento na produção de ROS intracelular, 8-oxodG e fragmentação do DNA. O dano ao DNA induziu a parada no ciclo celular e super-expressão de DNMT1, seguido por hipometilação global do DNA no ciclo celular subsequente. Os resultados obtidos apontam pela primeira vez para a toxicidade do corante DB291 via biotransformação, com alterações mitocondriais e indução de estresse oxidativo.

Palavras-Chaves: DB291, dinitrofenilazo, estresse oxidativo, adutos de DNA, metilação global do DNA, mitocôndria.

ABSTRACT

De OLIVEIRA, T. F. **Cytotoxicity of the CI DB291 dinitrofenilazo dye: biotransformation, oxidative stress and epigenetic change in HepG2 cells.** 2012. Doctoral Thesis – Department of Clinical and Toxicological Analyses, Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, 2012.

The commercial CI Disperse Blue 291 (CI DB291) is widely used by textile industry. It is mutagenic in the Ames/*S. typhimurium* assay, but there are few studies showing its effects in eukaryotic cells. We evaluated here the toxicity of CI DB291 in the human HepG2 cell line. The commercial dye was purified by HPLC-DAD and used for incubation with HepG2 cells (5-100 μ M for 3-72 h). Cytotoxicity was assessed by the XTT, crystal violet dye, extracellular lactate dehydrogenase and glucose consumption assays. ROS formation was assessed by 2',7'-dichlorofluorescein fluorescence. Analyses of cell cycle, DNA fragmentation, mitochondrial membrane potential (Ψ) and intracellular calcium were analyzed by flow cytometry. ATP level was measured by chemiluminescence. Levels of 8-oxodG and 5-mdC were evaluated by HPLC-ESI-MS/MS and HPLC-UV, respectively. DNMT1 expression was assessed by *western blot*. A biotransformation product was identified and structurally characterized by MS/MS and ^{1} H-NMR. DB291 significantly decreased cell survival in a time- and dose-dependent manner (IC_{50} = 74 μ M), with concomitant formation of a reduced biotransformation product. Plasma membrane lysis did not occur. Increased mitochondrial enzymatic activity, accompanied by increase in glucose consumption rate, was observed in cells incubated with DB291. Elevated ATP, Ψ , and intracellular calcium was verified after cell incubation with increasing dye concentrations. Mitochondrial changes and the biotransformation process accounted for the observed raise in intracellular ROS, 8-oxodG, and DNA fragmentation. DNA damage induced cell cycle arrest and DNMT1 overexpression, followed by DNA hypomethylation in the subsequent cell cycle. Results point for the first time to toxicity of the dye through biotransformation, mitochondrial changes, and oxidative stress.

Keywords: DB291, dinitrophenylazo, oxidative stress, DNA adducts, DNA methylation, mitochondria.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ψ	Potencial de membrana mitocondrial
1,N⁶-ϵdA	1,N ⁶ -eteno-2'-desoxiadenosina
1,N²-ϵdG	1,N ² -eteno-2'-desoxiguanosina
5-metil-dC	5-metil-2'-desoxicitidina
8-oxodG	8-oxo-2'-desoxiguanosina
ACN	Acetonitrila
ALKP	Fosfatase alcalina
APAF-1	Fator de ativação de apoptose 1
BER	Reparo excisão de base
CD	Dicroísmo circular
CVD	Corante cristal violeta
dA	2'-desoxiadenosina
DB291	<i>CI Disperse Blue 291</i>
dC	2'-desoxicitidina
DCF	2',7'-diclorofluoresceína
DCFH	2',7'-diclorodihidrofluoresceína
DCFH-DA	2',7'-diacetato de diclorofluoresceína
DFOM	Desferroxamina
dG	2'-desoxiguanosina
DMEM	Meio Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNase 1	Desoxiribonuclease 1
DNMT	DNA metiltransferase
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ESI	Ionização por <i>eletrospray</i>
GOD	Glicose oxidase
HepG2	Células de carcinoma hepatocelular humano
HPLC	Cromatografia Líquida de alta eficiência
HPLC-DAD	Cromatografia Líquida de alta eficiência acoplada à um

	etector de arranjo de diodos
HPLC-ECD	Cromatografia Líquida de alta eficiência acoplada à um detector eletroquímico
HPLC-ESI-MS/MS	Cromatografia Líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massa com ionização por <i>electrospray</i> e análise de massa após fragmentação da molécula elecionada
IAP	Proteínas inibidoras de apoptose
JC-1	Iodeto de tetraclorotetraetilbenzimidazol carbocianina
LDH	Lactato desidrogenase
MetO	Metionina sulfóxido
MPT	Poros de transição mitocondrial
MRM	Monitoramento de reações múltiplas
MS	Espectrometria de massa
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADP	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NED	<i>N</i> -(1-naftil)-etilenodiamina
NER	Reparo por excisão de nucleotídeos
non-CIPBTA	PBTA não-clorados
PBS	Tampão salina fosfato
PBTA	2-fenilbenzotriazol
PDE 1	Fosfodiesterase 1
PI	Iodeto de propídio
POD	Peroxidase
RMN	Ressonância magnética nuclear
RNAse	Ribonuclease
SFB	Soro fetal bovino
SPE	Extração em fase sólida
TNF	Fator de necrose tumoral
XTT	2,3-bis[2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil]-2Htetrazólio-5-carboxanilida

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Estrutura química do corante azo 2-[(2-bromo-4,6-dinitrofenil)azo]-5-(dietilamino)-4-metoxiacetanilida (C.I. Disperse Blue 291). (Modificado de UMBUZEIRO et al., 2005b) e espectro de absorvância do corante obtido por HPLC-PDA..... 32
- Figura 2.** Via de formação dos PBTA não-clorados e PBTA a partir de corantes dinitrofenilazo (modificado de WATANABE et al., 2002; SHIOZAWA et al., 1998)..... 34
- Figura 3.** Vias de sinalização indutoras da apoptose (Modificado de HENGARTNER, 2000)..... 44
- Figura 4.** Iniciação da carcinogênese como resultado de um balanço entre detoxificação e ativação de xenobióticos. A apoptose impede que células com o material genético lesado fixe mutações na próxima geração celular (Modificado de BANOUB e LIMBACH, 2010)..... 46
- Figura 5.** 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina (8-oxodG), lesão gerada pelo ataque do radical $\cdot\text{OH}$ ou $^1\Delta\text{gO}_2$ à guanina; 1,N⁶-eteno-2'-desoxiadenosina (1,N⁶- ϵ dA) e 1,N²-eteno-2'-desoxiguanosina (1,N²- ϵ dG) oriundos de interações de produtos de lipoperoxidação com desoxinucleosídeos. 50
- Figura 6.** Metilação do DNA pela adição de um grupo metil (CH₃), através da enzima DNA metiltransferase (DNMT). 54
- Figura 7.** Válvula de comutação de fluxo empregada no Sistema Cromatográfico 8, descrita no item 3.17.4 de Materiais e Métodos. A. Válvula na Posição 0. B. Válvula na Posição 1. 92
- Figura 8.** Cromatogramas obtidos por HPLC-DAD (λ = 254 nm) de: A. Composto comercial CI Disperse Blue 291 e B. Corante dinitrofenilazo puro. Os espectros de absorvância de um constituinte da amostra comercial (a) e do corante dinitrofenilazo (b) são também apresentados..... 98
- Figura 9.** Cromatogramas obtidos por HPLC-DAD (λ = 200 – 800 nm) de: A. Composto comercial CI Disperse Blue 291 e B. Corante dinitrofenilazo puro. 99
- Figura 10.** A. Espectro de massas do corante 2-[(2-bromo-4,6-dinitrofenil)azo]-5-(dietilamino)-4-metoxiacetanilida. B. Estruturas sugeridas para os fragmentos observados. 100

Figura 11. Análise da citotoxicidade do composto comercial CI Disperse Blue 291 em células HepG2 utilizando o ensaio do corante cristal violeta (24 h). Valores expressos relativos ao controle (células HepG2 + DMSO). Dados correspondem à média $\pm$ desvio padrão de um experimento conduzido em quadruplicada, sendo que a leitura de absorbância de cada poço foi repetida três vezes. Asteriscos indicam que os valores são significativamente diferentes do controle, $**p < 0,01$ e $***p < 0,001$. IC₅₀ calculado foi 74 μ M..... 102

Figura 12. Análise da citotoxicidade do composto comercial CI Disperse Blue 291 em células HepG2 utilizando o ensaio do XTT (24 h). Valores expressos relativos ao controle (células HepG2 + DMSO). Dados correspondem à média $\pm$ desvio padrão de um experimento conduzido em quadruplicada, sendo que a leitura de absorbância de cada poço foi repetida três vezes. Asteriscos indicam que os valores são significativamente diferentes do controle, $*p < 0,05$ e $***p < 0,001$ 102

Figura 13. Análise da citotoxicidade do composto comercial CI Disperse Blue 291 em células HepG2 utilizando o ensaio de consumo de glicose (24 h). Dados correspondem à média $\pm$ desvio padrão de um experimento conduzido em quadruplicada, sendo que a leitura de absorbância de cada poço foi repetida três vezes. Asteriscos indicam que os valores são significativamente diferentes do controle, $***p < 0,001$ 103

Figura 14. Análise da citotoxicidade do composto comercial CI Disperse Blue 291 em células HepG2 utilizando o ensaio da lactato desidrogenase (24 h). Valores expressos relativos ao controle positivo (células HepG2 + Triton X–100). Dados correspondem à média $\pm$ desvio padrão de um experimento conduzido em quadruplicada..... 103

Figura 15. A. Estrutura química da hematoxilina. B. Estrutura química da hemateína..... 104

Figura 16. Espectro de absorbância da hematoxilina de Harris solubilizada em ácido acético 30%..... 105

Figura 17. Citotoxicidade do composto comercial CI Disperse Blue 291 e de seu corante dinitrofenilazo puro em células HepG2 no intervalo de 6 a 72 h de exposição. As células foram plaqueadas na densidade de 5×10^4 células/poço em placas de 96 poços 24 h antes do início do tratamento. O meio de cultura foi então substituído por um novo meio completo contendo 50 μ M do composto comercial CI Disperse Blue 291 ou seu corante dinitrofenilazo purificado, ambos dissolvidos em DMSO (concentração final de DMSO no meio de cultura: 0,5% v/v). As células controles foram incubadas com 0,5% de DMSO no meio de cultura completo. Meio de cultura contendo 1% de Triton X–100 foi utilizado como controle positivo. Foi utilizado o ensaio de marcação com hematoxilina de Harris para quantificação da sobrevivência celular. N = 5..... 106

Figura 18. Citotoxicidade do corante dinitrofenilazo puro em células HepG2 no intervalo de 6 a 72 h de exposição. As células foram plaqueadas na densidade de 5×10^4 células/poço em placas de 96 poços 24 h antes do início do tratamento. O meio de cultura foi então substituído por um novo meio completo contendo 50 μM do corante dinitrofenilazo purificado, dissolvido em DMSO (concentração final de DMSO no meio de cultura: 0,5% v/v). As células controles foram incubadas com 0,5% de DMSO no meio de cultura completo. Meio de cultura contendo 1% de Triton X- 100 foi utilizado como controle positivo. Foi utilizado o ensaio do XTT. N = 5, ***p< 0,001. 107

Figura 19. Alteração do potencial de membrana mitocondrial em células HepG2 incubadas por 12 e 24 h com diferentes concentrações do corante dinitrofenilazo purificado (5, 10, 50 e 100 μM). Dados correspondem à média $\pm$ desvio padrão de um experimento conduzido em quadruplicata (10.000 eventos analisados por amostra). Asteriscos indicam que os valores são significativamente diferentes do controle, *p< 0,05, **p< 0,01 e ***p< 0,001. FL1 ($\lambda_{\text{exc.}}$ = 488 nm; $\lambda_{\text{emi.}}$ = 525 nm), correspondente a mitocôndrias com baixo potencial de membrana que mantêm JC-1 na forma monomérica, de coloração verde. FL2 ($\lambda_{\text{exc.}}$ = 488 nm; $\lambda_{\text{emi.}}$ = 575 nm), correspondente a mitocôndrias ativas com alto potencial de membrana que formam agregados JC-1, de coloração vermelha..... 110

Figura 20. Alteração do potencial de membrana mitocondrial em células HepG2 incubadas por 24 h com diferentes concentrações do corante dinitrofenilazo purificado. A: Controle (0,5% DMSO); B-E: 5, 10, 50, 100 μM do corante. Dados foram obtidos por sistema de High-Content Imaging (Molecular Devices, USA) e correspondem a mitocôndrias ativas com alto potencial de membrana que formam agregados JC-1, de coloração vermelha, filtro Cy3 ($\lambda_{\text{exc.}}$ = 520/570 nm; $\lambda_{\text{emi.}}$ = 570/610 nm) 111

Figura 21. Alteração do potencial de membrana mitocondrial em células HepG2. A: Células do grupo controle; B: Células expostas a 100 μM do corante dinitrofenilazo purificado por 24 h. As imagens foram obtidas por sistema de High-Content Imaging (Molecular Devices, USA). Filtro FITC ($\lambda_{\text{exc.}}$ = 485 nm; $\lambda_{\text{emi.}}$ = 535 nm), correspondente a mitocôndrias com baixo potencial de membrana que mantêm JC-1 na forma monomérica, de coloração verde. Filtro Cy3 ($\lambda_{\text{exc.}}$ = 520/570 nm; $\lambda_{\text{emi.}}$ = 570/610 nm), correspondente a mitocôndrias ativas com alto potencial de membrana que formam agregados JC-1, de coloração vermelha..... 112

Figura 22. Níveis de ATP determinados por quimioluminescência (kit luciferina/luciferase) em células HepG2 expostas a diferentes concentrações do corante DB291 por 24 h, N = 5. Asteriscos indicam que os valores são significativamente diferentes do controle, ***p< 0,001. 115

Figura 23. Análise do Ca^{2+} intracelular, através da intensidade de fluorescência do composto Fluo-3 AM, por citometria de fluxo após tratamento de células HepG2 por 24 h com diferentes concentrações do corante dinitrofenilazo purificado (5, 10, 50 e 100 μM). Dados correspondem à média $\pm$ desvio padrão de um experimento conduzido em triplicata (10.000 eventos analisados por amostra). Asteriscos indicam que os valores são significativamente diferentes do controle, $**p < 0,01$ e $***p < 0,001$ 117

Figura 24. Histogramas da intensidade de fluorescência do composto Fluo-3 AM, marcador de cálcio intracelular, obtida por citometria de fluxo após tratamento de células HepG2 por 24 h com diferentes concentrações do corante dinitrofenilazo purificado (5, 10, 50 e 100 μM). As análises foram conduzidas pelo monitoramento da intensidade de fluorescência de 10.000 eventos por amostra, no canal FITC ($\lambda_{\text{exc.}} = 488 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{emi.}} = 525 \text{ nm}$). 118

Figura 25. Análise da intensidade de fluorescência do produto DCF (indicador geral de estresse oxidativo), após tratamento de células HepG2 com diferentes concentrações do corante dinitrofenilazo purificado (5, 10, 50 e 100 μM). Dados correspondem à média $\pm$ desvio padrão de um experimento conduzido em quintuplicata. Asteriscos indicam que os valores são significativamente diferentes do controle, $*p < 0,05$, $**p < 0,01$ $***p < 0,0001$ 121

Figura 26. Análise por microscopia de fluorescência de células HepG2 incubadas com a sonda fluorogênica DCFH ($\lambda_{\text{emi.}} = 530$ com $\lambda_{\text{exc.}} = 488 \text{ nm}$). A. Controle (DMSO 0,5%; v:v). B. 100 μM do corante dinitrofenilazo purificado. Período de exposição foi de 24 h. 122

Figura 27. Relação entre morte celular, aumento da atividade mitocondrial, aumento da produção de ATP e aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) em células expostas a diferentes concentrações do corante dinitrofenilazo purificado (5, 10, 50 e 100 μM), por um período de 24 h. Valores expressos relativos ao controle (células HepG2 + DMSO, 100%). 123

Figura 28. Histogramas da intensidade de fluorescência do iodeto de propídio (PI) ligado ao DNA obtidos por citometria de fluxo após incubação de células HepG2 por 24 h com diferentes concentrações do corante dinitrofenilazo purificado (5, 10, 50 e 100 μM). As análises foram conduzidas pelo monitoramento da intensidade de fluorescência de 10.000 eventos por amostra, no canal PerCP-Cy5-5 ($\lambda_{\text{exc.}} = 488 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{emi.}} = 695 \text{ nm}$). 126

Figura 29. Análise da fragmentação do DNA através da intensidade de fluorescência do iodeto de propídio (PI) ligado ao DNA. Os dados foram obtidos por citometria de fluxo após tratamento das células HepG2 por 24 h com diferentes concentrações do corante dinitrofenilazo purificado (5, 10, 50 e 100 μM). Dados correspondem à média $\pm$ desvio padrão de um experimento conduzido em quadruplicata (10.000 eventos analisados por amostra). Asteriscos indicam que os valores são significativamente diferentes do controle, $**p < 0,01$ 127

Figura 30. Histogramas da intensidade de fluorescência do complexo PI+DNA, após incubação de células HepG2 por 24 h com diferentes concentrações do corante dinitrofenilazo purificado (5, 10, 50 e 100 μ M), sendo A: G0/G1; B: S; C: G2/M. 129

Figura 31. Análise da distribuição das células nas fases do ciclo celular. Dados obtidos por citometria de fluxo após incubação de células HepG2 por 24 h com diferentes concentrações do corante dinitrofenilazo purificado (5, 10, 50 e 100 μ M). Dados correspondem à média $\pm$ desvio padrão de um experimento conduzido em quadruplicata (10.000 eventos analisados por amostra). Asteriscos indicam que os valores são significativamente diferentes do controle, * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ 130

Figura 32. Espectros de dicroísmo circular do DNA de células HepG2 expostas por 24 h ao corante dinitrofenilazo purificado (100 μ M, 0,25% DMSO, v:v) e do respectivo controle. 132

Figura 33. Cromatogramas e espectro de absorbância do padrão [$^{15}\text{N}_5$]-8-oxodG, obtidos por HPLC-DAD como descrito no item 3.17.1. A. Produtos da reação de [$^{15}\text{N}_5$]-dG com sulfato de cobre, ácido ascórbico e peróxido de hidrogênio. B. Padrão [$^{15}\text{N}_5$]-8-oxodG purificado. 135

Figura 34. Cromatogramas e espectro de absorbância do padrão [$^{15}\text{N}_5$]-1,N⁶- ϵ dA, obtidos por HPLC-DAD como descrito no item 3.17.2. A. Produtos da reação de [$^{15}\text{N}_5$]-dA com cloroacetaldeído. B. Padrão [$^{15}\text{N}_5$]-1,N⁶- ϵ dA purificado. 136

Figura 35. Cromatogramas e espectro de absorbância do padrão [$^{15}\text{N}_5$]-1,N²- ϵ dG, obtidos por HPLC-DAD como descrito no item 3.17.2. A. Produtos da reação de [$^{15}\text{N}_5$]-dG com cloroacetaldeído. B. Padrão [$^{15}\text{N}_5$]-1,N²- ϵ dG purificado. 137

Figura 36. Curva de calibração da lesão 8-oxodG, obtida por HPLC-ESI-MS/MS-MRM, como descrito em 3.17.4 de Materiais e Métodos 139

Figura 37. Curva de calibração da lesão 1,N⁶- ϵ dA, obtida por HPLC-ESI-MS/MS-MRM, como descrito em 3.17.4 de Materiais e Métodos. 140

Figura 38. Curva de calibração da lesão 1,N²- ϵ dG, obtida por HPLC-ESI-MS/MS-MRM, como descrito em 3.17.4 de Materiais e Métodos. 140

Figura 39. Níveis adicionados e quantificados das lesões 8-oxodG, 1,N⁶- ϵ dA e 1,N²- ϵ dG. Dados obtidos por HPLC-ESI-MS/MS-MRM, como descrito em 3.17.4 de Materiais e Métodos. 143

Figura 40. Cromatogramas mostrando a detecção de 8-oxodG em DNA de timo de bezerro (comercial). Dados obtidos por HPLC-ESI-MS/MS-MRM, como descrito em 3.17.4 de Materiais e Métodos. A. 50 μ g de DNA, nível basal de 8-oxodG. B. 50 μ g de DNA contaminado com 100 fmol de 8oxodG. 144

Figura 41. Cromatogramas mostrando a detecção de 1,N⁶- ϵ dA em DNA de timo de bezerro (comercial). Dados obtidos por HPLC-ESI-MS/MS-MRM, como descrito em 3.17.4 de Materiais e Métodos. A. 50 μ g de DNA, nível basal de 1,N⁶- ϵ dA. B. 50 μ g de DNA contaminado com 20 fmol de 1,N⁶- ϵ dA. 145

Figura 42. Cromatogramas mostrando a detecção de 1,N²- ϵ dG em DNA de timo de bezerro (comercial). Dados obtidos por HPLC-ESI-MS/MS-MRM, como descrito em 3.17.4 de Materiais e Métodos. A. 50 μ g de DNA, nível basal de 1,N²- ϵ dG. B. 50 μ g de DNA contaminado com 20 fmol de 1,N²- ϵ dG. 146

Figura 43. Níveis de 8-oxodG em DNA de células HepG2 expostas por 24 h a 50 ou 100 μ M do corante dinitrofenilazo purificado (0,25% DMSO, v:v) e 24 h após a troca do meio de cultura para remoção do corante. N=4. Asteriscos indicam que os valores são significativamente diferentes do controle, *p< 0,05. **p< 0,01. 149

Figura 44. Níveis de etenoaddutos em DNA de células HepG2 expostas por 24 h a 50 ou 100 μ M do corante dinitrofenilazo purificado (0,25% DMSO, v:v) e 24 h após a troca do meio de cultura para remoção do corante. N=4. 150

Figura 45. A. Espectro de massas obtido por dissociação induzida por colisão do íon [M + H]⁺ com m/z 242. Voltagem do cone= 25 V. Energia de colisão= 20 eV. B. Fragmentação da 5-metil-dC: m/z 242 [M+H]⁺ $\rightarrow$ m/z 126 [M - 2'-desoxirribose+H]⁺. 153

Figura 46. Cromatograma do padrão 5-metil-dC, obtido por HPLC-DAD (λ = 286 nm) como descrito no item 3.15.1 de Materiais e Métodos. 154

Figura 47. Cromatogramas de DNA de timo de bezerro (comercial) nos quais se observam os desoxinucleosídeos dC e 5-metil-dC. Dados obtidos por HPLC-DAD. A. Sistema cromatográfico eluído com um gradiente de água e CH₃OH, pH 7,0. B. Sistema cromatográfico eluído com um gradiente de ácido fórmico (0,1% em água) e CH₃OH, pH, 2,6. 155

Figura 48. Espectros de absorvância do padrão 5-metil-dC, obtidos por HPLC-DAD. A. Espectro com λ_{max} em 277 nm, pH 7,0. B. Espectro com λ_{max} em 286 nm, pH 2,6. 156

Figura 49. Curva de calibração da 5-metil-dC, obtida por HPLC-DAD (λ = 286 nm) como descrito em 3.15.3 de Materiais e Métodos. 157

Figura 50. Curva de calibração da dC, obtida por HPLC-DAD (λ = 260 nm) como descrito em 3.15.3 de Materiais e Métodos. 158

Figura 51 Níveis adicionados e quantificados de 5-metil-dC em DNA de timo de bezerro. Dados obtidos por HPLC-DAD, como descrito em 3.15.3 de Materiais e Métodos. 160

Figura 52. Cromatogramas mostrando a detecção de 5-metil-dC (2) e desoxinucleosídeos normais (dC,1; dA,3; dG,4; dT, 5) em DNA de timo de bezerro (comercial), contaminado com 0,05-0,20 nmol de 5-metil-dC. Dados obtidos por HPLC-DAD ($\lambda_{\text{max}} = 286 \text{ nm}$), como descrito em 3.15.4 de Materiais e Métodos. 160

Figura 53. Porcentagem de 5-metil-dC em DNA de células HepG2 expostas por 24 h a 50 ou 100 μM do corante dinitrofenilazo purificado (0,25% DMSO, v:v) e 24 e 48 h após a troca do meio de cultura para remoção do corante. Asteriscos indicam que os valores são significativamente diferentes do controle, * $p < 0,05$. ** $p < 0,01$ 162

Figura 54. Expressão da enzima DNMT1 em células HepG2 expostas por 24 h a 100 μM do corante dinitrofenilazo purificado (0,25% DMSO, v:v) e 24 após a troca do meio de cultura para remoção do corante. (N=3) Asteriscos indicam que os valores são significativamente diferentes do controle, * ** $p < 0,001$ . .. 163

Figura 55. Produto de biotransformação do corante DB291 no meio de cultura de células HepG2 em diferentes períodos de exposição. Dados obtidos por HPLC-DAD. A. Espectro de absorbância do DB291. B. Espectro de absorbância do produto de biotransformação. 167

Figura 56. Cromatogramas obtidos por HPLC-DAD ($\lambda = 450 \text{ nm}$) dos produtos de biotransformação do corante DB291 em células da linhagem HepG2. Três produtos principais (a, b e c) são formados. 1. Cromatograma obtido das células HepG2 incubadas com 100 μM do corante dinitrofenilazo. 2. Cromatograma obtido das células HepG2 controles. 168

Figura 57. A. Espectro de massas do produto de biotransformação do corante DB291. B. Espectro de massas obtido por dissociação induzida por colisão do íon $[M + H]^+$ com m/z 437. Voltagem do cone= 30 V. Energia de colisão= 20 eV. 170

Figura 58. Estruturas sugeridas para os fragmentos do espectro de massas obtido por dissociação induzida por colisão do íon $[M + H]^+$ com m/z 437. Voltagem do cone= 30 V. Energia de colisão= 20 eV. 171

Figura 59. Sugestão de uma via ainda incompleta para formação do produto de biotransformação a partir do corante. 171

Figura 60. Espectros de ^1H RMN do produto de biotransformação do corante DB291 obtidos com um equipamento de 300 MHz, em A. DMSO- d_6 e B. DMSO- d_6 + D_2O 172

Figura 61. Espectro de RMN de correlação bidimensional ^1H - ^1H (COSY) do produto de biotransformação, obtido em um equipamento de 300 MHz em DMSO- d_6 173

Figura 62. Vias conhecidas de redução de grupos nitro e azo (HALLIWELL e GUTERIDGE, 2007). 176

- Figura 63.** A. Cromatograma obtido por HPLC/ESI/MS da incubação controle (Tabela 6. Incubação 6). B. Cromatograma obtido por HPLC/ESI/MS da incubação completa (Tabela 6. Incubação 8). C. Espectro de massas do produto indicado. 177
- Figura 64.** A. Cromatograma obtido por HPLC/ESI/MS da incubação controle (Tabela 6. Incubação 6). B. Cromatograma obtido por HPLC/ESI/MS da incubação completa (Tabela 6. Incubação 8). C. Espectro de massas do produto indicado. 178
- Figura 65.** A. Cromatograma obtido por HPLC/ESI/MS da incubação controle (Tabela 6. Incubação 6). B. Cromatograma obtido por HPLC/ESI/MS da incubação completa (Tabela 6. Incubação 8). C. Espectro de massas do produto indicado. 179
- Figura 66.** Cromatograma obtido por HPLC/ESI/MS da incubação controle (Tabela 6. Incubação 6). B. Cromatograma obtido por HPLC/ESI/MS da incubação completa (Tabela 6. Incubação 8). C, D. Espectros de massas dos produtos indicados..... 180
- Figura 67.** Possíveis estruturas para os produtos detectados nas Figuras 63-66. É possível que algumas das estruturas contenham, na verdade, um anel envolvendo os 3 átomos de nitrogênio mais centrais circulados..... 181
- Figura 68.** Cromatograma obtido por HPLC-DAD ($\lambda = 250$ nm) dos produtos da reação de redução de CI Disperse Blue 291 com hidrossulfito de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$), como descrito no item 3.4 de Materiais e Métodos. Três produtos principais (P1, P2 e P3) são formados. 183
- Figura 69.** Espectros de massas e de absorbância dos produtos P1, P2 e P3 obtidos após a reação do composto comercial CI Disperse Blue 291 com hidrossulfito de sódio. 184
- Figura 70.** Espectros de massas obtidos por dissociação induzida por colisão dos íon $[\text{M} + \text{H}]^+$ do produtos P1 (m/z 465). Voltagem cone = 30 V. Energia de colisão = 30 eV. 185
- Figura 71.** Espectros de massas obtidos por dissociação induzida por colisão dos íon $[\text{M} + \text{H}]^+$ do produtos P2 (m/z 449). Voltagem cone = 30 V. Energia de colisão = 30 eV. 186
- Figura 72.** Espectros de massas obtidos por dissociação induzida por colisão dos íon $[\text{M} + \text{H}]^+$ do produtos P3 (m/z 465). O produto P3 apresenta os mesmos fragmentos do produto P1. Voltagem cone = 30 V. Energia de colisão = 30 eV. 187
- Figura 73.** Espectro de massas do produto P1 acetilado. Voltagem do cone = 55 V..... 187

Figura 74. Espectro de massas do produto P2 acetilado. Voltagem do cone = 55 V..... 188

Figura 75. Espectro de massas do produto P3 acetilado. Voltagem do cone = 55 V..... 188

Figura 76. A. Cromatograma obtido por HPLC/ESI/MS da incubação controle (Tabela 6. Incubação 1). B. Cromatograma obtido por HPLC/ESI/MS da incubação completa (Tabela 6. Incubação 3). C. Cromatograma obtido por HPLC/ESI/MS do produto P1..... 190

Figura 77. A. Espectro de massas do produto identificado na incubação enzimática completa (Tabela 6. Incubação 3). B. Espectro de massas obtido por dissociação induzida por colisão do íon m/z 465 identificado na incubação enzimática completa (Tabela 6. Incubação 3). C. Espectro de massas obtido por dissociação induzida por colisão do íon m/z 465 do produto P1..... 191

Figura 78. Eventos celulares envolvidos na citotoxicidade do corante DB291. (1) Redução enzimática do corante DB291; (2) Produção de espécies reativas pelo processo de redução enzimática; (3, 4 e 5) Ativação da cadeia de transporte de elétrons com aumento da síntese de ATP, aumento da concentração de Ca^{2+} intracelular, hiperpolarização mitocondrial, desencadeando em (6) estresse oxidativo, fragmentação do DNA, alterações do ciclo celular, alterações epigenéticas e (7) morte celular. 193

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Exatidão e coeficiente de variação do método de HPLC-ESI-MS/MS para a quantificação da lesão 8-oxodG, como descrito em 3.17.4 de Materiais e Métodos.	141
Tabela 2. Exatidão e coeficiente de variação do método de HPLC-ESI-MS/MS para a quantificação da lesão 1,N ⁶ -εdA, como descrito em 3.17.4 de Materiais e Métodos.	142
Tabela 3. Exatidão e coeficiente de variação do método de HPLC-ESI-MS/MS para a quantificação da lesão 1,N ² -εdG, como descrito em 3.17.4 de Materiais e Métodos.	142
Tabela 4. Exatidão e coeficientes de variação do método de HPLC-DAD para a quantificação de 5-metil-dC, como descrito em 3.15.4 de Materiais e Métodos.	159
Tabela 5. Robustez do método de HPLC-DAD para a quantificação 5-metil-dC, como descrito em 3.15.4 de Materiais e Métodos.	159
Tabela 6. Biotransformação do corante DB291 in vitro. Redução e acetilação conforme o descrito em 3.19 de Materiais e Métodos.	175
Tabela 7. Deslocamentos químicos no espectro de ¹ H RMN do produto P2 em DMSO-d ₆ ^{a, b}	189

SISTEMAS CROMATOGRÁFICOS

Sistema Cromatográfico 1. Coluna Luna C18 (2) 250 mm x 4,6 mm, ID, 5 μ m (Phenomenex, Torrance, CA) com uma pré-coluna C18 4,0 x 3,0 mm (Phenomenex, Torrance, CA) foi eluída com um gradiente de água e acetonitrila (0-60 min, 5-100% de acetonitrila), a 25 °C, com fluxo de 1 mL/min. O detector DAD foi fixado em 600 nm para a purificação do corante dinitrofenilazo, o pico com λ_{max} em 618 nm foi coletado e seco sob vácuo. A amostra sólida foi mantida a -20 °C e ressuspensa em DMSO para incubações com células da linhagem HepG2 e para experimentos in vitro.

Sistema Cromatográfico 2. Coluna Luna C18 (2) 250 mm x 4,6 mm, ID, 5 μ m (Phenomenex, Torrance, CA) com uma pré-coluna C18 4,0 x 3,0 mm (Phenomenex, Torrance, CA) foi eluída com um gradiente de água e acetonitrila (0-60 min, 5-100% de acetonitrila), a 25 °C, com fluxo de 1 mL/min. A absorbância foi monitorada no intervalo de 200 a 700 nm.

Sistema Cromatográfico 3. Coluna Luna C18 (2) (150 mm x 2 mm, ID, 3 μ m, Phenomenex, Torrance, CA) com uma pré-coluna C18 4,0 x 3,0 mm (Phenomenex, Torrance, CA) foi eluída com um gradiente de ácido fórmico (0,1% em água) e acetonitrila (de 0-60 min, 5-100% de acetonitrila), com fluxo de 0,120 mL/min, a 25 °C. A temperatura da fonte do espectrômetro de massas foi mantida em 100 °C e as taxas de vazão do gás (nitrogênio) de secagem e nebulização foram otimizadas para 350 e 10 L / h, respectivamente. Espectros de massas em MS₁ e espectros em MS₂ de fragmentos de íons selecionados foram adquiridos no intervalo de 100-800 m/z com diferentes voltagens de cone (15, 30 e 50 V).

Sistema Cromatográfico 4. Coluna Luna C18 (2) 250 mm x 4,6 mm, ID, 5 μ m, (Phenomenex, Torrance, CA) com uma pré-coluna C18 4,0 x 3,0 mm (Phenomenex, Torrance, CA) foi eluída com um gradiente de ácido fórmico (0,1% em água) e CH₃OH (0-25 min, 0-18% de CH₃OH; 25-27 min, 18-0% de CH₃OH; 27-37min, 0% de CH₃OH), com um fluxo de 1 mL/min, 30°C. O detector de DAD foi fixado em 260 nm para a quantificação da dC e 286 nm para a quantificação da 5-metil-dC. Curvas de calibração foram feitas no intervalo de 0,05-6 nmol para dC e de 0,005-0,4 nmol para 5-metil-dC.

Sistema Cromatográfico 5. Coluna Luna C18 (2) 250 mm x 4,6 mm, ID, 5 µm (Phenomenex, Torrance, CA) com uma pré-coluna C18 4,0 x 3,0 mm (Phenomenex, Torrance, CA), eluída com fase móvel constituída de 5% de acetonitrila em tampão fosfato (KH_2PO_4 – 25 mM), pH 5,5, em modo isocrático (tempo de corrida = 25 min), a 30 °C, com fluxo de 0,350 mL/min. O detector DAD foi fixado em 250 nm.

Sistema Cromatográfico 6. Coluna Luna C18 (2) 250 mm x 4,6 mm, ID, 5 µm (Phenomenex, Torrance, CA) com uma pré-coluna C18 4,0 x 3,0 mm (Phenomenex, Torrance, CA), eluída com fase móvel constituída de 5% de acetonitrila em água em modo isocrático (tempo de corrida = 25 min), a 30 °C, com fluxo de 0,350 mL/min. O detector DAD foi fixado em 250 nm.

Sistema Cromatográfico 7. Coluna Luna C18 (2) 250 mm x 4,6 mm, ID, 5 µm (Phenomenex, Torrance, CA) com uma pré-coluna C18 4,0 x 3,0 mm (Phenomenex, Torrance, CA) eluída com um gradiente de água e acetonitrila (0-30 min, 5-50% ACN; 30-31 min, 50-5% ACN e 31-40 min, 5% ACN), a 30 °C, com fluxo de 1,000 mL/min. O detector DAD foi fixado em 275 nm.

Sistema Cromatográfico 8. Válvula posição 0 (Figura 7. A.): Coluna Luna C18 (2) 50 mm x 4,6 mm, ID, 2.6 µm, (Phenomenex, Torrance, CA) com uma pré-coluna C18 4,0 x 3,0 mm (Phenomenex, Torrance, CA) eluída com um gradiente de ácido fórmico 0,1% em água (Solução A) e CH_3OH com 0,1% de ácido fórmico (Solução B), a um fluxo de 150 µL/min, 25 °C, nas seguintes condições: 0-25 min, 0-15% B; 25-26 min, 15-80% B; 26-31 min, 80% B; 31-33 min, 80-0% B; 33-53 min, 0% B. O sistema é integrado ao detector PDA (fixado em 260 nm) e posteriormente ao descarte (**Linha 1**). Concomitantemente uma coluna Luna C18 (2) 150 mm x 2,0 mm, ID, 3 µm, (Phenomenex, Torrance, CA) é eluída em modo isocrático por uma solução constituída por 15% de CH_3OH em água com 0,1% de ácido fórmico, a um fluxo de 150 µL/min, 25 °C. O sistema é integrado ao espectrômetro de massas API 4000 QTRAP (**Linha 2**). **Válvula posição 1 (Figura 7. B.):** Com a alteração do posicionamento da válvula, as duas linhas descritas acima passam a ser eluídas pelo gradiente da bomba binária e as duas colunas analíticas passam a integrar a mesma linha do sistema cromatográfico (**Linha 3**). As seguintes condições de posicionamento para a válvula de comutação de fluxo são empregadas: 0-3 min, posição 0; 3-6 min, posição 1; 6-13 min, posição 0; 13-33 min, posição 1; 33 -53 min, posição 0.

Sistema Cromatográfico 9. Coluna Luna C18 (2) 250 mm x 4,6 mm, ID, 5 μ m (Phenomenex, Torrance, CA) com uma pré-coluna C18 4,0 x 3,0 mm (Phenomenex, Torrance, CA) foi eluída com um gradiente de água e CH₃OH, a 30 °C, com fluxo de 1 mL/min, nas seguintes condições: 0-60 min, 5-100% de CH₃OH; 60-70 min, 100% de CH₃OH; 70-73 min, 100-5% de CH₃OH; 73-83 min 5% de CH₃OH. A absorbância foi monitorada no intervalo de 200 a 800 nm.

Sistema Cromatográfico 10. Coluna Luna C18 (2) (150 mm x 2 mm, ID, 3 μ m, Phenomenex, Torrance, CA) com uma pré-coluna C18 4,0 x 3,0 mm (Phenomenex, Torrance, CA) foi eluída com um gradiente de ácido fórmico (0,1% em água) e CH₃OH, com fluxo de 0,125 mL/min, a 35 °C, nas seguintes condições: 0-50 min, 5-100% de CH₃OH; 50-60 min, 100% de CH₃OH; 60-63 min, 100-5% de CH₃OH; 63-73 min 5% de CH₃OH. A temperatura da fonte do espectrômetro de massas foi mantida em 200 °C e as taxas de vazão do gás (nitrogênio) de secagem e nebulização foram otimizadas para 350 e 10 L / h, respectivamente. Espectros de massas em MS₁ e espectros em MS₂ de fragmentos de íons selecionados foram adquiridos no intervalo de 100-1000 m/z com diferentes voltagens de cone (15, 30 e 50 V).

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	iii
LISTA DE FIGURAS	v
LISTA DE TABELAS	xiv
SISTEMAS CROMATOGRÁFICOS	xv
1. INTRODUÇÃO	30
1.1 Azocorantes	31
1.2 Toxicidade de corantes da classe dinitrobromofenilazo	32
1.3 Apoptose	40
1.4 Adutos de DNA, mutação e câncer	45
1.5 Epigenética	52
2. OBJETIVO	58
3. MATERIAL E MÉTODOS	60
3.1 Reagentes	60
3.2 Equipamentos	61
3.2.1 Equipamentos básicos	61
3.2.2 Espectrofotômetros e luminômetro	62
3.2.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)	63
3.2.3.1 HPLC-DAD	63
3.2.3.2 HPLC-DAD-ECD	63
3.2.3.3 HPLC-DAD-FLUORESCÊNCIA	64
3.2.3.4 HPLC-DAD-ESI-MS/MS	64
3.2.4 Citometria de fluxo	65
3.2.5 Equipamentos de suporte	66
3.2.6 <i>High-Content Imaging</i>	66
3.3 Purificação do produto comercial DB291 por HPLC	66
3.4 Redução química do corante DB 291	67
3.5 Cultura de células da linhagem HepG2	68
3.6 Ensaios de Citotoxicidade	69
3.6.1 Ensaio do XTT	69
3.6.2 Ensaio do corante cristal violeta	70
3.6.3 Ensaio da enzima lactato desidrogenase	71
3.6.4 Avaliação do consumo de glicose	71

3.7 Citotoxicidade após diferentes períodos de incubação.....	72
3.8 Análise do potencial de membrana mitocondrial (Ψ)	74
3.9 Análise da concentração de cálcio intracelular	75
3.10 Análise dos níveis de adenosina trifosfato (ATP)	76
3.11 Verificação de estresse oxidativo.....	77
3.12 Análise de fragmentação do DNA e ciclo celular	78
3.13 Exposição das células ao corante dinitrofenilazo e extração do DNA ..	79
3.14 Dicroísmo circular do DNA de células expostas ao corante dinitrofenilazo	81
3.15 Determinação dos níveis de 5-metil-2'-desoxicitidina em DNA de células da linhagem HepG2	81
3.15.1 Solução padrão	81
3.15.2 Hidrólise enzimática do DNA.....	82
3.15.3 Sistema analítico	82
3.15.4 Validação do método	83
3.16 Análise dos níveis de DNMT1 em células expostas ao corante dinitrofenilazo	84
3.17 Quantificação simultânea de 8-oxodG, 1, N^6 - ϵ dA e 1, N^2 - ϵ dG em DNA por HPLC-ESI-MS/MS-MRM	85
3.17.1 Síntese do padrão [$^{15}\text{N}_5$]8-oxodG	85
3.17.2 Síntese e obtenção dos padrões de etenoadutos.....	87
3.17.3 Hidrólise enzimática e preparo das amostras de DNA	88
3.17.4 HPLC-DAD-ESI-MS/MS-MRM	89
3.18 Produtos de biotransformação	93
3.18.1 Purificação do principal produto de biotransformação presente no meio de cultura.....	93
3.18.2 Produtos de biotransformação presentes intracelularmente.....	95
3.19 Investigação da biotransformação do corante DB291 <i>in vitro</i> utilizando fração S9, nitrorredutase e acetiltransferase	95
3.20. Análise estatística	96
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	97
4.1 Análises cromatográficas e espectroscópicas do composto comercial CI Disperse Blue 291 e do corante dinitrofenilazo purificado	97
4.2 Citotoxicidade do composto comercial CI Disperse Blue 291 e do corante dinitrofenilazo purificado.....	101
4.3 Hiperpolarização mitocondrial e produção de ATP induzidas pelo corante dinitrofenilazo puro	108

4.4 Elevação do cálcio intracelular induzida pelo corante dinitrofenilazo puro	115
4.5 Estresse oxidativo, fragmentação do DNA e alterações do ciclo celular induzidos pelo corante DB291 puro	119
4.6 Espectro de dicroísmo circular do DNA de células HepG2 expostas ao corante dinitrofenilazo purificado.....	131
4.7 Análise de danos ao DNA devido ao estresse oxidativo.....	133
4.7.1 Validação do método para quantificação simultânea de 8-oxodG, 1, <i>N</i> ⁶ - ϵ dA e 1, <i>N</i> ² - ϵ dG em DNA por HPLC-ESI-MS/MS-MRM.....	133
4.7.2 <i>SPE online</i>	138
4.7.3 Linearidade.....	139
4.7.4 Limites de quantificação, exatidão e coeficientes de variação	141
4.7.5 Análise de lesões em DNA de células HepG2 expostas ao corante dinitrofenilazo puro	147
4.8 Análise de 5-metil-dC em amostras de DNA celular	151
4.8.1 Validação do método analítico para quantificação de 5-metil-dC	151
4.8.2 Linearidade.....	157
4.8.3 Limites de quantificação, exatidão e coeficientes de variação	158
4.8.4 Análise da metilação do DNA em células HepG2 expostas ao corante dinitrofenilazo puro	161
4.9 Biotransformação do corante DB291 em células HepG2	166
3.10 Biotransformação do corante DB291 <i>in vitro</i>	173
4.11 Redução química do corante DB291 para obtenção de padrões de fenilbenzotriazóis não clorados	182
5. CONCLUSÃO	192
6. REFERÊNCIAS	194
ANEXO	212
Ficha do Aluno	212
Curriculum Vitae.....	215

1. INTRODUÇÃO

Desde que o homem habita a face da Terra, várias de suas ações resultam em lançamentos de substâncias nos diversos compartimentos do meio ambiente. No início, o incremento dessas substâncias era ínfimo e não chegava a comprometer o ecossistema. Entretanto, com o crescimento da população, a industrialização, o desenvolvimento tecnológico e o uso de praguicidas e fertilizantes, a quantidade de substâncias liberadas tornou-se de tal vulto que atualmente existe a necessidade de medidas adequadas de controle, de modo a evitar situações que acabem por desequilibrar o ecossistema (OGA, 2003).

Sendo a água essencial à vida, sua poluição é um sério problema de saúde pública. A identificação de seus contaminantes é fundamental para determinar a contribuição do meio para o desenvolvimento de diversas doenças humanas (SHIOZAWA *et al.*, 1998). É também evidenciado que a poluição de efluentes aquáticos leva à formação de novas classes de compostos, durante os processos de tratamento de água, capazes de exercer ação deletéria na saúde e bem estar de indivíduos expostos cronicamente (MASUDA *et al.*, 2004). Sendo assim, estudos que visem identificar novos contaminantes aquáticos e avaliar sua toxicidade são necessários para que haja um eficiente gerenciamento do risco de desenvolvimento de doenças em populações expostas.

1.1 Azocorantes

Azocorantes constituem a classe mais importante de compostos orgânicos usados em processos de tingimento na indústria têxtil. Também são usados na indústria do papel, alimentícia, farmacêutica e de cosméticos (COLLIER, 1993; DILLON, 1994). São caracterizados por elevada resistência frente a processos aeróbios de biodegradação e, por consequência, persistência nos processos convencionais de tratamento de resíduos (SOUZA, 2006). A descoberta do primeiro azocorante foi feita por Martius em 1863 e, posteriormente, a reação de acoplamento de compostos diazônio foi descrita por Griess, em 1864 (GRIFFITHS, 1971).

Os azocorantes apresentam como constituinte principal de sua estrutura o grupo cromóforo azo ($-N=N-$) ligado a substituintes, em geral derivados de benzeno ou naftaleno, contendo grupos receptores e/ou doadores de elétrons (SNEHALATHA *et al.*, 2009). Transições $\pi \rightarrow \pi^*$ de elétrons do grupo azo na região UV-VIS, com altos coeficientes de extinção, estão envolvidas na intensa absorbância observada para esses compostos em comprimentos de onda longos. Grupos aromáticos em torno dessa ligação ajudam a estabilizar o grupo $N=N$, o que faz com que muitos compostos azo sejam coloridos, uma vez que sistemas conjugados frequentemente absorvem luz na região do visível (SNEHALATHA *et al.*, 2009). Diferentes substituintes nos anéis aromáticos proporcionam o surgimento de compostos com as mais amplas propriedades físico-químicas.

1.2 Toxicidade de corantes da classe dinitrobromofenilazo

O corante dinitrofenilazo 2-[(2-bromo-4,6-dinitrofenil)azo]-5-(dietilamino)-4-metoxiacetanilida (**Figura 1**) é o principal componente do produto comercial CI Disperse Blue 291 (número de registro CAS 56548-64-2), que é amplamente utilizado como corante disperso em processos de tingimento na indústria têxtil, juntamente com vários outros corantes dinitrofenilazo relacionados (WATANABE *et al.*, 2002; WATANABE *et al.*, 2006).

Figura 1. Estrutura química do corante azo 2-[(2-bromo-4,6-dinitrofenil)azo]-5-(dietilamino)-4-metoxiacetanilida (C.I. Disperse Blue 291). (Modificado de UMBUZEIRO *et al.*, 2005b) e espectro de absorvância do corante obtido por HPLC-PDA.

Compostos dessa classe são utilizados por indústrias têxteis no Brasil e alguns estudos mostram que efluentes que os contêm foram responsáveis pela atividade mutagênica no Ribeirão dos Cristais, o qual está localizado na região metropolitana de São Paulo e suas águas são utilizadas para abastecimento público (UMBUZEIRO, *et al.*, 2004; UMBUZEIRO *et al.*, 2005a; OLIVEIRA *et al.*, 2007). Tais corantes podem ser ainda convertidos a moléculas que foram detectadas em vários rios que passam por regiões de indústrias têxteis no Japão (WATANABE *et al.*, 2002; WATANABE *et al.*, 2006). Estudos realizados ao longo da última década demonstraram que essas moléculas podem ser formadas através da reação de corantes dinitrofenilazo com hidrossulfito de sódio (levando à redução de grupos nitro) e subsequente cloração com hipoclorito de sódio (NUKAYA *et al.*, 1997, 2001; OHE *et al.*, 2004; OGURI *et al.*, 1998; SHIOZAWA *et al.*, 1998, 2000; WATANABE *et al.*, 2001, 2002, 2006), dois processos que são comumente utilizados nas fábricas de tingimento e em estações de tratamento de efluentes de indústrias têxteis, respectivamente (SHIOZAWA *et al.*, 1998).

As moléculas que foram detectadas nos rios japoneses contêm o esqueleto 2-fenilbenzotriazol (PBTA) apresentado na **Figura 2**, podendo ser cloradas ou não. As moléculas cloradas foram denominadas compostos tipo PBTA e as não cloradas receberam a denominação de PBTA não-clorados (MORIWAKI *et al.*, 2004; WATANABE *et al.*, 2006). A via de síntese dos PBTA não-clorados e compostos tipo PBTA a partir de corantes dinitrofenil azo está esquematizada na **Figura 2**. Foi verificado que sete compostos tipo PBTA (PBTA-1, PBTA-2, PBTA-3, PBTA-4, PBTA-6, PBTA-7, PBTA-8) e cinco

correspondentes congêneres de PBTA não-clorados (*non*-CIPBTA-1, *non*-CIPBTA-2, *non*-CIPBTA-3, *non*-CIPBTA-4, *non*-CIPBTA-7) são importantes mutágenos obtidos a partir da extração/concentração seletiva com *blue rayon* em corpos d'água de rios japoneses localizados à jusante de indústrias têxteis ou de estações de tratamento de água de esgoto doméstico e de efluentes de indústrias têxteis (WATANABE *et al.*, 2006; MATSUOKA *et al.*, 2001).

Figura 2. Via de formação dos PBTA não-clorados e PBTA a partir de corantes dinetrofenilazo (modificado de WATANABE *et al.*, 2002; SHIOZAWA *et al.*, 1998).

PBTA	R ₁ R ₂	Nome Químico
1	R ₁ : C ₂ H ₄ OCH ₃ R ₂ : C ₂ H ₄ OCH ₃	2-[2-(acetilamino)-4-[bis(2-metoxietil)amino]-5-metoxifenil]-5-amino-7-bromo-4-cloro-2H-benzotriazol
2	R ₁ : C ₂ H ₄ CN R ₂ : C ₂ H ₅	2-[2-(acetilamino)-4-[N-(2-cianoetil)etilamino]-5-metoxifenil]-5-amino-7-bromo-4-cloro-2H-benzotriazol
3	R ₁ : C ₂ H ₄ OH R ₂ : H	2-[2-(acetilamino)-4-[(2-hidroxietil)-amino]-5-metoxifenil]-5-amino-7-bromo-4-cloro-2H-benzotriazol
4	R ₁ : H R ₂ : H	2-[2-(acetilamino)-4-amino-5-metoxifenil]-5-amino-7-bromo-4-cloro-2H-benzotriazol
5	R ₁ : C ₂ H ₄ OCOCH ₃ R ₂ : C ₂ H ₄ OCOCH ₃	2-[2-(acetilamino)-4-[bis(2-acetoxietil)amino]-5-metoxifenil]-6-amino-4-bromo-2H-benzotriazol
6	R ₁ : C ₂ H ₄ OH R ₂ : C ₂ H ₄ OH	2-[2-(acetilamino)-4-[bis(2-hidroxietil)amino]-5-metoxifenil]-5-amino-7-bromo-4-cloro-2H-benzotriazol
7	R ₁ : C ₂ H ₅ R ₂ : C ₂ H ₅	2-[2-(acetil-amino)-4-(dietilamino)-5-metoxifenil]-5-amino-7-bromo-4-cloro-2H-benzotriazol
8	R ₁ : CH ₂ CH=CH ₂ R ₂ : CH ₂ CH=CH ₂	2-[2-(acetilamino)-4-(dialilamino)-5-metoxifenil]-5-amino-7-bromo-4-cloro-2H-benzotriazol

Figura 2. (Continuação) Via de formação dos PBTA não-clorados e PBTA a partir de corantes dinitrofenilazo.

Non-CIPBTA-7 e PBTA-7 são, respectivamente, os derivados gerados a partir da redução e subsequente cloração do corante dinitrofenilazo presente no composto comercial CI Disperse Blue 291 (WATANABE *et al.*, 2002). *Non*-CIPBTA-7, juntamente com os *non*-CIPBTA-2, -3 e -4 foram identificados como principais constituintes mutagênicos em amostras com elevada mutagenicidade de concentrados de água oriundos do rio Ho no Japão (WATANABE *et al.*, 2006).

Compostos tipo PBTA, incluindo PBTA-7, foram também identificados como importantes mutágenos em concentrados de vários outros rios no Japão (NUKAYA *et al.*, 1997, 2001; OHE *et al.*, 2004; OGURI *et al.*, 1998; SHIOZAWA *et al.*, 1998, 2000; WATANABE *et al.*, 2001, 2002). Ao comparar a mutagenicidade de *non*-CIPBTA-7 e PBTA-7 nas linhagens TA98, TA100, YG1024, e YG1029 de *S. typhimurium*, na presença de fração S9, foi verificada alta atividade mutagênica na linhagem YG1024 (linhagem derivada de TA98, com alta capacidade de síntese da enzima O-acetiltransferase, utilizada como detector de mutações do tipo alteração do quadro de leitura), indicando a produção predominante de alterações do quadro de leitura e a necessidade de ativação metabólica por acetiltransferase para a manifestação da mutagenicidade. Além disso, PBTA-7 foi aproximadamente 8 vezes mais mutagênico que *non*-CIPBTA-7 (WATANABE *et al.*, 2002; WATANABE *et al.*, 2006). Esse comportamento quanto à mutagenicidade foi também verificado para outros compostos tipo PBTA e *non*-CIPBTA (OGURI *et al.*, 1998; NUKAYA *et al.*, 2001; WATANABE *et al.*, 2006). Foi também demonstrado que *N*-acetiltransferases (NAT1, NAT2) e citocromo P4501A1 humanos expressos em

linhagens de *S. typhimurium* ativaram PBTA-4, -6, -7, e -8 para metabólitos genotóxicos (ODA *et al.*, 2008).

A mutagenicidade do produto comercial CI Disperse Blue 291 foi avaliada em um estudo utilizando diferentes protocolos do ensaio *S. typhimurium* (UMBUZEIRO *et al.*, 2005). Dentre as várias linhagens testadas, a maior potência foi obtida na presença da fração S9 para YG1041, uma linhagem com alta capacidade de síntese de nitrorredutase e O-acetiltransferase, atividades enzimáticas importantes para a ativação do corante para compostos mutagênicos (UMBUZEIRO *et al.*, 2005). Embora os dados revelem que esses compostos são genotóxicos no teste de Ames/*Salmonella*, existem poucos estudos mostrando os efeitos dos corantes dinitrofenilazo e seus derivados non-CIPBTA e PBTA em células eucariontes (MATSUOKA *et al.*, 2000; MATSUOKA *et al.*, 2001; MASUDA *et al.*, 2004; TSUBOY *et al.*, 2007).

PBTA-2, na ausência de S9, foi caracterizado como um composto capaz de induzir poliploidia em duas linhagens celulares de hamster chinês, CHL e V79-MZ, utilizando o teste do micronúcleo *in vitro*. A menor dose eficaz de PBTA-2 em células CHL foi 25 µg/mL, enquanto que em células V79-MZ foi 0,78 µg/mL. PBTA-1 (6,25 µg/mL) induziu aneuploidia nas células V79-MZ, também na ausência de fração S9. Non-CIPBTA-1 e -2, na ausência de S9, foram citotóxicos em ambas linhagens celulares na concentração de 25 µg/mL, com pequena indução de micronúcleos no intervalo de concentrações testadas (6,25–200 µg/mL). O corante dinitrofenilazo-1 (precursor dos compostos non-CIPBTA-1 e PBTA-1) induziu a formação de micronúcleos em células CHL (100 µg/mL) e mitose com endorreduplicação em células V79-MZ (50 µg/mL)

apenas na presença de fração S9. O corante dinitrofenilazo-2 (precursor dos compostos *non*-CIPBTA-2 e PBTA-2) induziu a formação de micronúcleos e poli-núcleos nas células CHL nas concentrações de 3,125-12,5 µg/mL, sem a necessidade de S9. Células V79-MZ mitóticas com núcleos densamente contraídos foram observadas nas concentrações de 50-100 µg/mL, na presença de S9 (MATSUOKA *et al.*, 2000; MATSUOKA *et al.*, 2001).

Outro estudo realizado por Masuda e colaboradores demonstrou, através de ensaio cometa e teste de micronúcleo (*in vivo*), genotoxicidade induzida por PBTA-6 em peixes-dourados (*Carassius aurantus*). O teste de micronúcleo foi realizado em células branquiais e eritrócitos periféricos de peixes-dourados e mostrou aumento na incidência de micronúcleos em células branquiais a partir de 48 h até 96 h após injeção intraperitoneal de PBTA-6 (50 mg/Kg), diminuindo a incidência de micronúcleos após 144 h da injeção. PBTA-6 induziu formação de micronúcleos de forma dose-dependente (1–100 mg/Kg), tendo significativo aumento após injeção das doses de 50 mg/Kg e 100 mg/Kg. Por outro lado, não foram observados aumentos significativos de micronúcleos em eritrócitos periféricos. Houve indução de fragmentação do DNA, avaliada pelo ensaio cometa, em eritrócitos periféricos de peixes-dourados 6 h após a injeção intraperitoneal de PBTA-6 (50 mg/Kg) (MASUDA *et al.*, 2004).

Efeitos citotóxicos e genotóxicos do corante comercial CI Disperse Blue 291 foram avaliados em células HepG2, linhagem obtida de carcinoma hepatocelular humano. O composto comercial foi testado no intervalo de concentração de 200-1.000 µg/mL por um período de 24 h. Os parâmetros avaliados foram indução de micronúcleos, fragmentação do DNA verificada

através do ensaio cometa e os índices de apoptose/necrose (TSUBOY *et al.*, 2007). Aumentos no comprimento da cauda do cometa e na frequência de micronúcleos foram detectados para concentrações do corante DB291 iguais ou superiores a 400 µg/mL. A concentração de 1.000 µg/mL não induziu mais que 20% de morte celular, com predomínio da via apoptótica (TSUBOY *et al.*, 2007).

Uma vez caracterizado na literatura que diversos representantes dessa classe de corantes e seus produtos de redução e subsequente cloração são mutagênicos no ensaio de Ames/*Salmonella* e levam a alterações cromossômicas e fragmentação do DNA em estudos com células eucariontes *in vitro* e em um estudo *in vivo* realizado em peixes-dourados, faz-se necessário compreender os mecanismos pelos quais tais efeitos são desencadeados.

Neste trabalho investigou-se a citotoxicidade, genotoxicidade e efeitos epigenéticos do corante DB291 em células HepG2. Com o intuito de avaliar alterações celulares precoces, o corante foi testado em concentrações de 2,5-50 µg/mL (5-100 µM), pelo menos 20 vezes menores que as concentrações utilizadas por Tsuboy e colaboradores (2007) para a observação de efeitos genotóxicos. Os resultados mostram que o corante dinitrofenilazo altera funções celulares, principalmente as mitocondriais, em concentrações muito mais baixas que as testadas anteriormente para indução de micronúcleos e fragmentação do DNA na mesma linhagem celular. Tais alterações levam à morte das células, mas também favorecem a ocorrência de eventos genotóxicos e epigenéticos que podem alterar a taxa de proliferação celular.

Os resultados gerados apontam para parâmetros mais sensíveis para a análise da toxicidade desses compostos e podem ainda ser úteis para o desenvolvimento de ensaios *in vitro* para monitoramento da toxicidade de água utilizada para consumo e para o monitoramento de alterações celulares em populações expostas.

1.3 Apoptose

O termo apoptose foi utilizado pela primeira vez em 1972 por Kerr, Wyllie, e Currie para descrever uma forma morfológicamente distinta de morte celular. No entanto, muitos componentes desse conceito foram descritos anos antes por outros autores (KERR *et al.*, 1972; PAWELETZ, 2001; KERR, 2002). A apoptose é reconhecida e aceita como um modo distinto e importante de morte celular “programada”, que envolve a eliminação de células geneticamente determinadas. No entanto, é importante lembrar que outras formas de morte celular têm sido descritas, e que outras ainda podem ser descobertas (FORMIGLI *et al.*, 2000; SPERANDIO *et al.*, 2000; DEBNATH *et al.*, 2005; ELMORE, 2007).

O processo de apoptose ocorre normalmente durante o desenvolvimento e envelhecimento celular, como um mecanismo homeostático para a manutenção de populações celulares em todos os tecidos de um organismo (ELMORE, 2007). Além disso, a apoptose também pode atuar como um mecanismo de defesa, evitando a propagação de danos desencadeados por processos patológicos ou ainda agentes nocivos (NORBURY e HICKSON, 2001).

Morfologicamente a apoptose apresenta características marcantes. Inicialmente ocorre uma retração celular, que promove a perda de aderência com a matriz extracelular e com células adjacentes, desencadeando assim uma série de eventos como o encolhimento celular, a condensação das organelas citoplasmáticas e do núcleo. O resultado da condensação da cromatina é denominado picnose, a característica mais acentuada de todo o processo apoptótico. Após esse estágio, a membrana celular forma prolongamentos e o núcleo se desintegra em fragmentos envoltos pela membrana nuclear. Os prolongamentos da membrana celular aumentam em número e tamanho, e acabam se rompendo originando porções celulares contendo citoplasma e organelas com ou sem fragmentos nucleares, denominadas corpos apoptóticos. Estas estruturas são subsequentemente fagocitadas por macrófagos, células parenquimatosas, ou células neoplásicas e degradadas dentro de fagolisossomas. Não existe nenhuma reação inflamatória associada com o processo de apoptose, nem com a remoção de células apoptóticas. Isso ocorre por três motivos: (1), as células apoptóticas não liberam seus constituintes celulares no tecido intersticial circundante; (2) são rapidamente fagocitadas por células adjacentes, prevenindo assim a necrose; (3) células com corpos apoptóticos não produzem citocinas inflamatórias (SAVILL e FADOK, 2000;. KUROSAKA *et al*, 2003; ELMORE, 2007).

São reportados vários estímulos e condições, tanto fisiológicos como patológicos, que podem desencadear a apoptose, tais como: agentes quimioterápicos, radiação ionizante, toxicantes, danos ao DNA, ligação de moléculas a receptores de membrana, baixas concentrações de fatores de crescimento, hipóxia, aumento dos níveis de cálcio, níveis aumentados de

espécies reativas de oxigênio (ROS) e de nitrogênio (RNS), entre outros (HENGARTNER, 2000; POPOV *et al*, 2002; BRÜNE *et al*, 2003; MATTSON e CHAN 2003; ELMORE, 2007). Os mecanismos bioquímicos para a ativação das vias de apoptose são complexos e sofisticados, e envolvem uma cascata de eventos moleculares que são necessariamente dependentes de energia (ELMORE, 2007; RASOLA e BERNARDI, 2011; WANG *et al*, 2012; DER-FER *et al*, 2012). São reportadas duas rotas principais capazes de desencadear a ativação: a via extrínseca (receptores de morte celular) e a via intrínseca (mitocondrial). No entanto, existem evidências de que as duas vias estão ligadas e que as moléculas em um mecanismo podem influenciar o outro (IGNEY e KRAMMER, 2002; BRENNER e MAK, 2009).

A via de sinalização extrínseca é desencadeada por interações transmembrana específicas, ou seja, é estimulada através da ligação de fatores extracelulares aos receptores de membrana da superfamília dos receptores do fator de necrose tumoral (TNF) (LOCKSLEY *et al.*, 2001). Os membros da família dos receptores de TNF possuem um domínio extracelular rico em cisteína e uma porção citoplasmática com cerca de 80 aminoácidos chamados "domínio de morte" (ASHKENAZI e DIXIT, 1998), que desempenham um papel fundamental na transmissão do sinal de morte da superfície da célula para as vias de sinalização intracelular. Quando os receptores de morte celular reconhecem um ligante específico, os seus domínios de morte interagem com proteínas citoplasmáticas adaptadoras, conhecidas como FADD, resultando em complexos que ativam de modo auto-catalítico a caspase-8 (KISCHKEL *et al.*, 1995) que, por sua vez, irá ativar a caspase-3, executando a apoptose (DANIEL *et al.*, 2001).

A via de sinalização intrínseca também pode ser ativada por receptores de morte (BRENNER e MAK, 2009), entretanto é majoritariamente desencadeada por um conjunto de estímulos, tanto de origem intracelular como extracelular, que produzem sinais transduzidos no citosol e que convergem principalmente para a mitocôndria (HENGARTNER, 2000; MAYER E OBERBAUER, 2003; BRENNER e MAK, 2009). Ao atingirem a mitocôndria, esses estímulos promovem uma alteração na membrana interna da mitocôndria, levando a uma permeabilidade de poros de transição mitocondrial (MPT), a um colapso do potencial da membrana mitocondrial (Ψ) e à liberação de dois grupos de proteínas pró-apoptóticas do espaço intermembranas para o citoplasma (SAELENS *et al.*, 2004).

O primeiro grupo é constituído pelo citocromo c e por proteínas ativadoras de caspase-9 e inibidoras de IAP (proteínas inibidoras de apoptose), são elas: Smac/DIABLO e protease serina HtrA2/Omin (VAN LOO *et al.*, 2002; SCHIMMER, 2004). Uma vez no citosol, o citocromo c forma um complexo com a APAF-1 (Fator de ativação de apoptose 1) e com a caspase-9, denominado apoptossomo, que promove a clivagem da pró-caspase-9, liberando a caspase-9 ativa (HILL *et al.*, 2004; GRIVICICH *et al.*, 2007; ELMORE, 2007), que por sua vez ativa a caspase-3 e inicia o processo apoptótico. O segundo grupo ou AIF (fator indutor de apoptose), é liberado pelas mitocôndrias somente quando a viabilidade celular já está comprometida e migra para o núcleo, promovendo a fragmentação do DNA (fragmentos de ~50-300 kb) e condensação da cromatina (GRIVICICH *et al.*, 2007; ELMORE, 2007). As vias de sinalização das rotas apoptóticas estão esquematizadas na **Figura 3**.

Figura 3. Vias de sinalização indutoras da apoptose (Modificado de HENGARTNER, 2000).

Além da liberação de moléculas pela mitocôndria, as alterações no $\Delta\Psi_m$ e no MPT causam perda da homeostasia celular, interrompendo a síntese de ATP e aumentando a produção de ROS e RNS (GRIVICICH *et al.*, 2007; RASOLA e BERNARDI, 2011; WANG *et al.*, 2012). O aumento do nível dessas espécies reativas pode favorecer a oxidação de lipídios, proteínas e ácidos nucleicos, contribuindo para a formação de tumores e o desenvolvimento da carcinogênese.

1.4 Adutos de DNA, mutação e câncer

Por definição, carcinogênese corresponde ao processo de conversão de uma célula normal em uma célula maligna (HALLIWELL e GUTERIDGE, 2007). O desenvolvimento do câncer ocorre em várias etapas e a exposição a xenobióticos pode ter um papel chave para a formação do tumor. Três grandes etapas estão envolvidas no desenvolvimento do câncer: iniciação, promoção e progressão (BALMAIN e HARRIS, 2000; LOUREIRO *et al.*, 2002). É aceito que o desenvolvimento de um processo neoplásico pode ser iniciado pela interação de agentes carcinogênicos com o DNA. Este dano ao DNA leva a mutações e altera a expressão de alguns genes-chaves, como por exemplo genes que regulam a diferenciação e o crescimento celular. Após a alteração inicial, surgem novas populações celulares e estas podem representar a evolução de células normais para células pré-neoplásicas, pré-malignas e malignas (LOUREIRO *et al.*, 2002).

Em geral, os agentes iniciadores são substâncias de caráter eletrofílico ou são metabolizados para as mesmas durante o seu processo de detoxificação. Tais substâncias são atraídas por moléculas com alta densidade eletrônica, nucleofílicas, como é o caso dos constituintes do DNA (bases nitrogenadas e cadeia açúcar-fosfato), às quais acabam se ligando covalentemente e levando à formação de adutos. É evidente, considerando-se a estrutura e a função do DNA, que modificações em determinadas posições das bases, especialmente nas que estão relacionadas com a formação de pontes de hidrogênio, podem perturbar a homeostasia do código genético afetando assim o bom funcionamento da célula. Dessa maneira, a menos que reparados, os adutos

de DNA podem iniciar eventos como morte celular, mutação ou câncer (**Figura 4**) (FARMER *et al.*, 2004; SEDGWICK *et al.*, 2007). Os efeitos dos adutos de DNA, bem como as técnicas analíticas empregadas para a sua detecção ainda são temas de muitos estudos. A elucidação das estruturas químicas e quantificação dos níveis dos vários adutos formados apresentam importância fundamental para a compreensão dos mecanismos de carcinogênese.

Figura 4. Iniciação da carcinogênese como resultado de um balanço entre detoxificação e ativação de xenobióticos. A apoptose impede que células com o material genético lesado fixe mutações na próxima geração celular (Modificado de BANOUB e LIMBACH, 2010).

Além de apresentar uma incidência aumentada após a exposição direta a xenobióticos, o dano ao DNA também é associado a processos como

depurinação, desaminação e principalmente oxidação (LOUREIRO *et al.*, 2002; MEDEIROS, 2009; CADET *et al.*, 2010, 2011).

O dano nas bases do DNA gerado oxidativamente não é resultante de um agente químico específico que apresenta capacidade de modificar o DNA, mas é o resultado da interação do DNA com ROS e RNS (MANGAL *et al.*, 2009; BANOUB e LIMBACH, 2010; CADET *et al.*, 2010, 2011; ANDREOLI *et al.*, 2011).

A origem de ROS pode ser muito diversificada em um organismo, entretanto, as espécies reativas produzidas são sempre as mesmas, bem como as modificações geradas em macro moléculas. ROS é um termo coletivo utilizado para classificar compostos químicos resultantes da ativação ou redução do oxigênio molecular, são eles: radicais de oxigênio [superóxido ($O_2^{\cdot-}$), hidroxila ($\cdot OH$), peroxil (RO_2) e alcoxil (RO)] e espécies não radicalares que atuam como agentes de oxidação, ou ainda, que podem ser convertidos facilmente para radicais, como ácido hipocloroso ($HOCl$), ozônio (O_3), peroxinitrito ($ONOO^-$), oxigênio singlete ($^1\Delta gO_2$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (HALLIWELL e GUTERIDGE, 2007). As interações de espécies reativas com as bases do DNA são amplamente investigadas. Sabe-se que as lesões induzidas por elas incluem quebras, formação de sítios abásicos, dano na cadeia açúcar-fosfato e modificações nas bases purínicas e pirimidínicas (LOUREIRO *et al.*, 2002; HALLIWELL e GUTERIDGE, 2007). São reportadas na literatura aproximadamente 40 modificações de DNA e RNA, oriundas da interação das bases com espécies reativas (CADET *et al.*, 2010, 2011).

O produto de oxidação do DNA mais extensivamente estudado é a 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina (8-oxodG), lesão gerada pela oxidação

monoeletrônica e pelo ataque do radical $\cdot\text{OH}$ ou do $^1\Delta\text{gO}_2$ à guanina (CADET *et al.*, 2008) (**Figura 5**). Suas propriedades biológicas foram intensamente investigadas nos últimos 30 anos, tendo sido verificado que é uma lesão mutagênica em bactérias e células de mamíferos, favorecendo transversões $\text{G} \rightarrow \text{T}$ ou bloqueando o processo de transcrição. Além disso, seu significado biológico ainda é evidenciado pela existência de mecanismos de reparo específicos, que são capazes de reconhecer e remover esta lesão do DNA (LUNEC *et al.*, 2002; HAGHDOOST *et al.*, 2005).

Inúmeros estudos correlacionam um aumento no nível de 8-oxodG com a ocorrência de dano gerado oxidativamente em múltiplos compartimentos do organismo (RAVANAT *et al.*, 2002; WUA *et al.*, 2004; HAGHDOOST *et al.*, 2005; COOKE *et al.*, 2008; CADET *et al.*, 2008; MANGAL *et al.*, 2009; CADET *et al.*, 2010, 2011; ANDREOLI *et al.*, 2011; BROHEM *et al.*, 2012). Não obstante, altos níveis de 8-oxodG também são correlacionados com tabagismo e doenças, como o diabetes e a artrite reumatóide (HAJIZADEH, *et al.*, 2003; SIMONE *et al.*, 2008; ROSSNER *et al.*, 2009; BROEDBAEK *et al.*, 2011)

Devido a sua elevada incidência no DNA genômico, a 8-oxodG assume um papel fundamental nos estudos de caracterização de dano ao DNA. Entretanto, a correta quantificação dos níveis de 8-oxodG se mostra um constante desafio analítico, uma vez que os níveis basais detectados variam de acordo com o método utilizado (HPLC-ECD, GS-MS, LC-MS ou ^{32}P -*postlabeling*) e também entre os laboratórios (LOUREIRO *et al.*, 2002; RAVANAT *et al.*, 2002). A magnitude dos níveis basais detectados em DNA de células humanas normais é de 5-50 lesões a cada 10^7 desoxiguanosina não modificada (RAVANAT *et al.*, 2002; KNERR *et al.*, 2006; HANZALOVA *et al.*, 2010). Infelizmente, é

extremamente fácil induzir a formação artefactual de 8-oxodG no DNA celular durante as etapas de extração e hidrólise (RAVANAT *et al.*, 2002; ESCODD, 2002; GEDIK *et al.*, 2004; MANGAL *et al.*, 2009). A comparação de diferentes protocolos de extração leva a conclusão de que a oxidação artefactual do DNA pode ser minimizada se o núcleo for isolado após a lise da célula ou ainda se agentes antioxidantes ou quelantes de ferro, como a desferroxamina, forem adicionados às soluções de extração.

Observando esses fatos, fica claro que a quantificação de um único aduto como índice de todo o dano gerado oxidativamente ao DNA, pode resultar em um dado não confiável. Felizmente, adutos de DNA exocíclicos estão emergindo como potenciais ferramentas para o estudo de doenças relacionadas ao estresse oxidativo e para a determinação da etiologia da carcinogênese (MEDEIROS, 2009).

Adutos de DNA exocíclicos surgem a partir da reação de DNA com produtos da peroxidação lipídica, tais como malonaldeído, 4-hidroxi-2(*E*)-nonenal, 4-oxo-2(*E*)-nonenal, 2,4-decadienal, acroleína e crotonaldeído (NAIR *et al.*, 2007; MEDEIROS, 2009; GARCIA *et al.*, 2010). A adição direta de aldeídos α,β -insaturados ao DNA acaba gerando adutos com um anel de seis membros resultante da ligação de três átomos de carbono às bases (propano). Alternativamente, aldeídos α,β -insaturados podem ser também oxidados por ROS para epóxidos reativos que se ligam, por sua vez, ao DNA gerando adutos com um anel de cinco membros resultante da ligação de dois átomos de carbono às bases (eteno), conforme é ilustrado na **Figura 5** (NAIR *et al.*, 2007; GARCIA *et al.*, 2010). Estudos demonstraram que estas lesões são altamente

mutagênicas e que podem conduzir à carcinogênese mediada pelo processo de peroxidação lipídica (ZHANG *et al.*, 2009; GARCIA *et al.*, 2010).

Figura 5. 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina (8-oxodG), lesão gerada pelo ataque do radical $\cdot\text{OH}$ ou $^1\Delta\text{gO}_2$ à guanina; 1,N⁶-eteno-2'-desoxiadenosina (1,N⁶-EdA) e 1,N²-eteno-2'-desoxiguanosina (1,N²-EdG) oriundos de interações de produtos de lipoperoxidação com desoxinucleosídeos.

Os etenoadutos já encontrados em amostras de DNA humano são: 1, N^6 -eteno-2'-desoxiadenosina (1, N^6 - ϵ dA), 3, N^4 -eteno-2'-desoxicitidina (3, N^4 - ϵ dC), 1, N^2 -eteno-2'-desoxiguanosina (1, N^2 - ϵ dG) e N^2 ,3-eteno-2'-desoxiguanosina (N^2 ,3- ϵ dG) (NAIR *et al.*, 2007; MEDEIROS, 2009). Quantidades elevadas de 1, N^6 - ϵ dA e 3, N^4 - ϵ dC foram relatadas em situações clínicas associadas a processos como infecção crônica e inflamação (NAIR *et al.*, 2007).

A importância biológica dos etenoadutos foi estabelecida quando se constatou que essas lesões são induzidas em DNA mediante a exposição a conhecidos carcinógenos, entre eles o cloreto de vinila e o uretano, após a sua metabolização para intermediários oxiranos (FERNANDO *et al.*, 1996; BARBIN *et al.*, 2000; LOUREIRO *et al.*, 2002; NAIR *et al.*, 2007; GARCIA *et al.*, 2010). A mutagenicidade dessas lesões foi muito bem caracterizada em estudos com *Escherichia coli* e em linhagens de células humanas, sendo observadas: transições C $\rightarrow$ T e transversões A $\rightarrow$ T, A $\rightarrow$ C, C $\rightarrow$ A e G $\rightarrow$ T. (LANGOUET *et al.*, 1998; AKASAKA *et al.*, 1999; LOUREIRO *et al.*, 2002; ZHANG *et al.*, 2009). A magnitude dos níveis basais de etenoadutos detectados em DNA de células humanas normais é de ~ 20 lesões a cada 10^9 bases não modificadas, sendo observada uma boa correlação entre os dados das diferentes metodologias empregadas para a quantificação (GUICHARD *et al.*, 1996; LEVINE *et al.*, 2000; DOERGE *et al.*, 2000; ROBERTS *et al.*, 2001; NAIR *et al.*, 2007; GARCIA *et al.*, 2010).

Todos os estudos, acima reportados, nos levam a acreditar que a correta quantificação de lesões ao DNA se faz necessária para a elucidação dos mecanismos envolvidos em processos citotóxicos e genotóxicos, desencadeados pela exposição aos mais diferentes tipos de xenobióticos.

1.5 Epigenética

Além da indução de lesões em DNA, substâncias podem levar a alterações epigenéticas que podem contribuir para o desenvolvimento de patologias. Padrões de metilação do DNA são alterados em tecidos de câncer e após a exposição a agentes genotóxicos, podendo propagar-se em novas gerações celulares (YAUK *et al.*, 2008).

A epigenética compreende alterações de caráter hereditário que estão envolvidas no processo de regulação da expressão gênica, mas que atuam sem alterar a codificação dos nucleotídeos do DNA (BIRD, 2007). A maioria dessas alterações hereditárias é estabelecida durante a diferenciação celular e mantida de forma estável ao longo de vários ciclos no processo de divisão. Tal característica permite que as células apresentem identidades e funcionalidades distintas, preservando toda a informação genética, colaborando para a adaptação genômica ao ambiente e contribuindo para o fenótipo (BIRD, 2007; CUOZZO *et al.*, 2007; REIK, 2007; GEHRING *et al.*, 2009).

Os mecanismos epigenéticos de regulação são essenciais para o desenvolvimento e manutenção de uma resposta celular frente a um estímulo endógeno ou exógeno (LAMBERT e HERCEG, 2007; SHARMA *et al.*, 2010). No entanto, a exposição prolongada a um conjunto de agentes químicos, físicos ou biológicos, bem como fatores relacionados ao estilo de vida, podem induzir mudanças epigenéticas que conduzem o organismo a um processo neoplásico.

Os principais mecanismos epigenéticos presentes em células normais são: metilação da citosina no DNA, modificações pós-traducionais de histonas, bem

como o posicionamento dos nucleossomos ao longo do DNA, e RNAs não-codificadores, incluindo microRNAs (miRNAs). São correlacionados a esses mecanismos a regulação da estrutura da cromatina, inativação do cromossomo X, silenciamento de elementos repetitivos do genoma, *imprinting* gênico, diferenciação celular auxiliando na formação de tecidos durante o período embrionário, compartimentalização do genoma em regiões ativas e condensadas, inativação de oncogenes e repressão da expressão de genes supressores de tumor (BIRD, 2007; CUOZZO *et al.*, 2007; REIK, 2007; YAUK *et al.*, 2008; GEHRING *et al.*, 2009; RODRIGUEZ, 2010). Todo o conjunto de mecanismos mantenedor dessa maquinaria genética e da homeostase hereditária é definido como epigenética.

A marca epigenética atualmente melhor caracterizada é a metilação do DNA, que quando associada a modificações nas histonas e outras proteínas, desempenha papel regulatório na manutenção da estrutura da cromatina. O mecanismo de metilação do DNA consiste na adição de um grupo metil (CH_3), através de enzimas DNA metiltransferases (DNMTs), à posição C-5 da citosina, originando a 5-metil-2'-desoxicitidina (5-metil-dC). Para que ocorra essa adição, é necessário que haja um doador de CH_3 . O cofator S-adenosilmetionina (SAM) desempenha esse papel (ROBERTSON e WOLFFE, 2000; BENDER, 2004; MAGANÃ *et al.*, 2007). De 2 a 5% do total de citosinas do DNA humano estão na forma metilada, sendo portanto o quinto desoxinucleosídeo mais abundante no DNA. As estruturas das moléculas envolvidas no processo estão apresentadas na **Figura 6**.

Figura 6. Metilação do DNA pela adição de um grupo metil (CH_3), através da enzima DNA metiltransferase (DNMT).

O padrão de 5-metil-dC no DNA é precisamente preservado por herança mitótica pela ação de DNMTs. Três membros cataliticamente ativos dessa família de enzimas são encontrados em células de mamíferos (DNMT1, DNMT3a, DNMT3b). DNMT1 é a mais abundante em células diferenciadas e possui afinidade pelo DNA hemi-metilado, metilando sítios hemi-metilados após a replicação do DNA. A metilação em tecidos somáticos de mamíferos ocorre em citosinas que precedem uma guanina (dinucleotídeos CpG) e sua distribuição no genoma não é randômica. Grande parte de 5-metil-dC está localizada em transposons, que representam mais de 40% do genoma humano e são um desafio para a função e estabilidade do genoma. A intensa metilação e silenciamento de vários tipos de transposons em diversos tipos celulares

pode significar um mecanismo de defesa das células contra parasitas invasores. A estimativa é de que aproximadamente 70% dos dinucleotídeos CpG no DNA estejam metilados, sendo que CpGs não metilados são encontrados primariamente em “ilhas CpG”. Tais ilhas são regiões do DNA com mais de 500 pb com altas densidades relativas de dinucleotídeos CpG. Grande parte das regiões promotoras de genes humanos contêm ilhas CpG desmetiladas, sendo que fatores de transcrição específicos e modificações em histonas determinam a atividade ou inatividade transcripcional desses genes. Ilhas CpG normalmente metiladas são encontradas nas regiões promotoras de genes imprinted, genes do cromossomo X inativo no sexo feminino, e genes tecido-específicos (WANG *et al.*, 2004; SHARMA *et al.*, 2010; BRENET *et al.*, 2011; DAHL *et al.*, 2011). Em geral, metilação densa de região promotora é associada a silenciamento gênico e a distribuição de 5-metil-dC no genoma define regiões com atividades transcripcionais variáveis. Alterações nos padrões de metilação do DNA estão presentes em doenças autoimunes, condições neurológicas e psiquiátricas, e câncer. Células tumorais apresentam caracteristicamente uma perda da metilação global do DNA (hipometilação), acompanhada por hipermetilações focais, o que pode levar a instabilidade genômica (hipometilação) e silenciamento transcripcional de genes supressores de tumor (hipermetilação de regiões promotoras). Trabalhos recentes, no entanto, têm apontado que grande parte das variações da metilação do DNA ocorrem em regiões com menor densidade de dinucleotídeos CpG localizadas próximo às ilhas CpG (menos que 2 kpb de distância), sendo denominadas “praias de ilhas CpG”. O grau de metilação dessas regiões é relacionado à atividade transcripcional de genes e ao uso de

sítios iniciais alternativos para a transcrição (IRIZARRY *et al.*, 2009; DOI *et al.*, 2009; DAHL *et al.*, 2011).

O desenvolvimento de métodos para a identificação e quantificação da metilação do DNA é importante para a compreensão de mecanismos moleculares envolvidos no processo de carcinogênese, para a verificação de efeitos de xenobióticos e para o monitoramento terapêutico.

Como o interesse neste campo é crescente, são descritos atualmente diversos métodos para análise da metilação do DNA (XIONG *et al.*, 1997; EADS *et al.*, 2000; EHRLICH *et al.*, 2003; WIDSCHWENDTER *et al.*, 2004). Dentre estes estão técnicas cromatográficas para a separação dos diferentes nucleosídeos obtidos após hidrólise enzimática. Os procedimentos cromatográficos descritos envolvem o uso de sistemas de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detecção por UV (MAGANÃ *et al.*, 2007; SANDHU *et al.*, 2009; ARMSTRONG *et al.*, 2010; YANG *et al.*, 2011) ou acoplada a um espectrômetro de massas (HU *et al.*, 2010; NOHARA *et al.*, 2010; WROBEL *et al.*, 2010; ZHANG *et al.*, 2011). Alguns estudos foram conduzidos com intuito realizar a detecção dos nucleosídeos por cromatografia gasosa (CG) acoplada à espectrometria de massas (ROSSELLA *et al.*, 2009), mas a aplicação é limitada devido à necessidade de conversão das bases do DNA em derivados voláteis.

Nos sistemas analíticos que utilizam cromatografia líquida é reportado o uso de uma variedade de gradientes de eluição, fases móveis (solventes e tampões variados) e fases estacionárias, contudo o objetivo principal se mantém: realizar a quantificação de 5-metil-dC e dC. Para tanto deve ser assegurada uma separação eficiente desses dois analitos em relação aos outros

nucleosídeos. Foi desenvolvido e validado durante este trabalho um método analítico (utilizando cromatografia líquida com detecção por UV), para quantificar os níveis de 5-metil-dC em amostras contendo baixas concentrações de DNA.

2. OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi desvendar mecanismos pelos quais o corante 2-[(2-bromo-4,6-dinitrofenil)azo]-5-(dietilamino)-4-metoxiacetanilida, principal constituinte do composto comercial CI Disperse Blue 291 (DB291), induz citotoxicidade e genotoxicidade em células humanas (linhagem HepG2) *in vitro*.

Para isso, o plano abaixo foi desenvolvido:

1. Análise da citotoxicidade utilizando como parâmetros a atividade da cadeia respiratória mitocondrial (ensaio do XTT), morte/proliferação celular (corantes cristal violeta ou hematoxilina de Harris), integridade da membrana plasmática (ensaio da lactato desidrogenase) e atividade metabólica (consumo de glicose);
2. Análise do potencial de membrana mitocondrial, cálcio intracelular e mensuração dos níveis de ATP;
3. Análise da geração intracelular de espécies reativas de oxigênio;
4. Análise de danos gerados oxidativamente, utilizando como parâmetros as lesões 8-oxo-2'-desoxiguanosina, 1, N^2 -eteno-2'-desoxiguanosina e 1, N^6 -eteno-2'-desoxiadenosina, em DNA. Validação de método de HPLC-ESI-MS/MS para quantificação dessas lesões;
5. Análise da metilação global do DNA. Validação de método de HPLC-DAD para quantificação de 5-metil-dC;
6. Análise da fragmentação do DNA e do ciclo celular;

7. Análise da biotransformação do corante em células HepG2.
Caracterização espectroscópica dos produtos principais;
8. Incubação do corante com fração S9, nitrorredutase e acetiltransferase *in vitro* para verificar se os mesmos produtos observados em células HepG2 seriam formados;
9. Redução química do corante DB291 para obtenção de uma mistura de produtos reduzidos contendo fenilbenzotriazóis não clorados;
10. Incubação do corante com nitrorredutase *in vitro* para verificar se fenilbenzotriazóis não clorados podem ser formados por redução enzimática do corante DB291

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Reagentes

Todas as substâncias empregadas neste trabalho são do mais alto grau de pureza disponível comercialmente. O produto comercial CI Disperse Blue 291 foi gentilmente fornecido pela Prof^a. Dr^a. Gisela de Aragão Umbuzeiro (Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, Brasil). Etanol, metanol, acetonitrila e isopropanol, todos grau de pureza HPLC, foram obtidos da empresa Carlo Erba Reagentes (Milão, Itália). Os *kits* para os ensaios do 2,3-bis[2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil]-2H-tetrazólio-5-carboxanilida (XTT), do corante cristal violeta (CVD), da lactato desidrogenase (LDH) e da taxa de consumo de glicose (GLU) foram adquiridos da empresa Xenometrix (Allschwil, Suíça). Carbonato de sódio, hidrossulfito de sódio, fosfato de potássio, ácido acético, hematoxilina para a solução de Harris foram comprados da empresa Merck (Darmstadt, Alemanha). Os *kits* para a extração de DNA (Gentra Puregene® Kit) foram fornecidos pela empresa QIAGEN Sciences (Mayland, EUA). O meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), soro fetal bovino (SFB) e solução de tripsina/EDTA foram fornecidos pela empresa Vitrocell (Campinas, Brasil). Todos os outros reagentes utilizados são provenientes da empresa Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, EUA). A água utilizada nos experimentos e sistemas analíticos foi deionizada em um sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, EUA).

3.2 Equipamentos

3.2.1 Equipamentos básicos

No decorrer deste trabalho foram utilizados os seguintes equipamentos para a realização dos procedimentos experimentais: Microcentrifuga (modelo Mikro 120, marca Hettich, Alemanha), centrifuga (modelo 5702R, marca Eppendorf, Alemanha), centrífuga (modelo 5810R, marca Eppendorf, Alemanha), balança semi-analítica (modelo FA210N, marca Bioprecisa, Japão), balança analítica (modelo AT261-DeltaRange, marca Mettler Toledo, EUA), incubadora com controle de temperatura e agitação (modelo Vortemp56, marca Labnet, EUA), agitador de tubos (modelo AP56, marca Phoenix, Brasil), agitador magnético (modelo 78HW-1, marca Biomixer, Brasil), potenciômetro digital (modelo PHS-3B, marca PHTEK, Brasil), banho maria (modelo 245, marca Cientec, Brasil), estufa de CO₂ (modelo 3110, marca Thermo Electron, EUA), fluxo laminar vertical (modelo PCR-2, Pachane, Brasil), fluxo laminar vertical (modelo PA400, Pachane, Brasil), microscópio binocular comum (modelo *BPW-431967*, marcaXS-2100, China), microscópio binocular invertido (modelo CTR 4000, marca Leica, Alemanha), microscópio binocular com fluorescência (modelo Axioplan2, marca Zeiss, Alemanha) e autoclave (modelo 415, marca Fanem, Brasil). As liofilizações descritas foram realizadas em um sistema equipado com uma bomba a vácuo de alta performance (modelo VLP120, marca Savant, EUA), um micromódulo para secagem a baixas temperaturas (modelo E-C, Savant, EUA) e um concentrador (modelo 5301, Eppendorf, Alemanha).

3.2.2 Espectrofotômetros e luminômetro

Os espectros de absorbância foram adquiridos utilizando-se um espectrofotômetro Libra S12 proveniente da empresa Biochrom (Cambridge, Reino Unido). Os dados foram processados utilizando o *software* BioDC 2.0. As leituras de absorbância em UV/VIS de placas para cultura de células de 96 poços foram conduzidas no equipamento Power Wave X340 e os dados analisados no *software* KC4 3.0 da empresa Bio-Tek Instruments (Winooski, USA), disponibilizado pela Prof^a. Dr^a. Tania Marcourakis (Faculdade de Ciências Farmacêuticas, FCF-USP, São Paulo, Brasil). As leituras de fluorescência das placas para cultura de células de 96 poços foram realizadas em um leitor de ELISA, modelo Synergy HT Bio-Tek Instruments (Winooski, USA), disponibilizado pela Prof^a. Dr^a. Silvy Stuchi Maria-Engler (Faculdade de Ciências Farmacêuticas, FCF-USP, São Paulo, Brasil). A análise dos dados foi conduzida no *software* Gen.5. As leituras de luminescência foram realizadas em um luminômetro, modelo LB96V, EG&G Berthold MicroLumat Plus (Bad Wildbad, Alemanha), disponibilizado pela Prof^a. Dr^a. Ana Campa (Faculdade de Ciências Farmacêuticas, FCF-USP, São Paulo, Brasil), a análise dos dados foi conduzida no *software* WinGlow.

3.2.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

3.2.3.1 HPLC-DAD

As análises e purificações realizadas com UV/VIS foram conduzidas em um equipamento da Shimadzu Corporation (Kyoto, Japão) equipado com duas bombas LC-20AT, um detector de arranjo de fotodiodos PDA-20AV, um auto injetor (Proeminence SIL– 20AC) e um forno para colunas (CTO-10AS/VP) controlado por um módulo de comunicação CBM-20A. Os dados foram processados pelo *software* LC-Solution 1.21. (Shimadzu, Japão). Os sistemas com as condições cromatográficas são descritos no decorrer da metodologia específica.

3.2.3.2. HPLC-DAD-ECD

Utilizou-se um sistema de HPLC-DAD-ECD, constituído por um equipamento da Shimadzu (Kyoto, Japão) equipado com duas bombas LC-20AT, um detector de arranjo de fotodiodos PDA-20AV, um auto-injetor (Proeminence SIL-20AC), um detector eletroquímico (Coulochem III, ESA, Chemsford, EUA), com uma cela analítica 5011A (ESA, Chemsford, EUA) e um forno para colunas (CTO-10AS/VP) controlados por um módulo de comunicação CBM-20A e pelo *software* LC-Solution 1.21 (Shimadzu, Japão). Os sistemas com as condições de eluição e os potenciais utilizados são descritos no decorrer do texto.

3.2.3.3 HPLC-DAD-FLUORESCÊNCIA

Utilizou-se um sistema de HPLC, disponibilizado pela Prof^a. Dr^a. Marisa Helena Gennari de Medeiros (Instituto de Química, IQ-USP, São Paulo, Brasil), constituído por um equipamento da Shimadzu (Kyoto, Japão) equipado com duas bombas LC-10AT, um detector de arranjo de fotodiodos SPD-20A, um detector de fluorescência RF-10AXL, um auto-injetor SIL-10AF, controlados por um módulo comunicação SCL-10A e pelo *software* Class-VP (Shimadzu, Japão).

3.2.3.4 HPLC-DAD-ESI-MS/MS

As análises por ESI-MS/MS foram feitas utilizando-se dois espectrômetros de massas, ambos disponibilizados pelo Prof. Dr. Paolo Di Mascio (Instituto de Química, IQ-USP, São Paulo, Brasil). Em todas as análises realizadas foi utilizada ionização por *electrospray* em modo positivo. A otimização do sistema e as condições de eluição empregadas são descritas no decorrer do texto. Os instrumentos estão descritos abaixo:

ESI-MS/MS 1. Sistema de HPLC constituído por um equipamento da Shimadzu (Kyoto, Japão) equipado de um injetor automático (SIL-10AD/VP), um injetor Rheodyne (Cotati, CA), uma válvula automática de comutação de fluxo (FCV-12AH), duas bombas (Class LC 10AD) e um detector de absorvância SPD-10AV/VP, controlados por um módulo de comunicação (SCL-

10A/VP-CBM 10A) e pelo *software* Class-VP (Shimadzu, Japão), acoplado a um espectrômetro de massas Quattro II da empresa Micromass (Manchester, Reino Unido). Os dados foram processados utilizando-se o *software* MassLynx 3.2 (Micromass, Reino Unido).

ESI-MS/MS 2. O sistema analítico é constituído por HPLC Agilent série 1200 (Wilmington, EUA) equipado com uma bomba binária (Agilent 1200 G1312B), uma bomba isocrática (Agilent 1200 G1310A), um forno para coluna (Agilent 1200 G1316B), um detector de absorbância de arranjo de diodos (Agilent 1200 DAD G1315C) e um injetor automático (G1367C Agilent 1200). O sistema de HPLC é integrado a um espectrômetro de massas Linear Quadrupole Ion Trap modelo 4000 QTRAP da empresa Applied Biosystems/MDS Sciex Instruments (Foster City, EUA). Os dados foram processados utilizando o *software* Analyst 1.4 (*Applied Biosystems, EUA*).

3.2.4 Citometria de fluxo

O sistema analítico utilizado é constituído por um equipamento de FACs CANTO II (BD, Biosciences, EUA) disponibilizado pelo Prof. Dr. Sandro Rogério de Almeida (Faculdade de Ciências Farmacêuticas, FCF-USP, São Paulo, Brasil). Para a análise dos dados foi utilizado o *software* BD FACs DIVA (BD, Biosciences, EUA). Todos os fluorocromos utilizados são provenientes da empresa Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, EUA).

3.2.5 Equipamentos de suporte

Junto à Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo - IQ/USP foram obtidos espectros de dicroísmo circular (CD) em um espectropolarímetro J-720 (Jasco, Reino Unido).

Espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) foram obtidos no equipamento DPX300 (Bruker Avance, Alemanha) disponível no Departamento de Farmácia da FCF-USP.

3.2.6 *High-Content Imaging*

Um equipamento *ImageX press Micro® Widefield High Content Screening System*, foi gentilmente disponibilizado pela empresa Molecular Devices (Sunnyvale, USA). As imagens foram processados utilizando o software *MetaXpress®* (Sunnyvale, USA).

3.3 Purificação do produto comercial DB291 por HPLC

Alíquotas de uma solução aquosa do produto comercial CI Disperse Blue 291 (5 mg/mL) foram injetadas no sistema de HPLC-DAD (descrito no item **3.2.3.1** de Materiais e Métodos). A seguinte condição cromatográfica foi utilizada:

Sistema Cromatográfico 1. Coluna Luna C18 (2) 250 mm x 4,6 mm, ID, 5 μ m (Phenomenex, Torrance, CA) com uma pré-coluna C18 4,0 x 3,0 mm (Phenomenex, Torrance, CA) foi eluída com um gradiente de água e acetonitrila (0-60 min, 5-100% de acetonitrila), a 25 °C, com fluxo de 1 mL/min. O detector DAD foi fixado em 600 nm para a purificação do corante dinitrofenilazo, o pico com λ_{max} em 618 nm foi coletado e seco sob vácuo. A amostra sólida foi mantida a -20 °C e ressuspensa em DMSO para incubações com células da linhagem HepG2 e para experimentos *in vitro*.

3.4 Redução química do corante DB 291

A uma amostra de corante previamente purificado por HPLC (5 mg) foram adicionados 0,018 g de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ e 200 μ L de solução saturada de Na_2CO_3 . As amostras foram incubadas a 37 °C sob agitação por 16 h. Obteve-se uma solução amarelada com um precipitado branco que foi solubilizada com água e filtrada através de filtros de 0,2 μ m para obtenção de soluções límpidas. Alíquotas das soluções obtidas na reação de redução foram injetadas no sistema de HPLC-DAD (descrito no item 3.2.3.1 de Materiais e Métodos) e posteriormente no sistema **ESI-MS/MS 1** (descrito no item 3.2.3.4 de Materiais e Métodos). As condições cromatográficas são respectivamente descritas abaixo.

Sistema Cromatográfico 2. Coluna Luna C18 (2) 250 mm x 4,6 mm, ID, 5 μ m (Phenomenex, Torrance, CA) com uma pré-coluna C18 4,0 x 3,0 mm

(Phenomenex, Torrance, CA) foi eluída com um gradiente de água e acetonitrila (0-60 min, 5-100% de acetonitrila), a 25 °C, com fluxo de 1 mL/min. A absorbância foi monitorada no intervalo de 200 a 700 nm.

Sistema Cromatográfico 3. Coluna Luna C18 (2) (150 mm x 2 mm, ID, 3 µm, Phenomenex, Torrance, CA) com uma pré-coluna C18 4,0 x 3,0 mm (Phenomenex, Torrance, CA) foi eluída com um gradiente de ácido fórmico (0,1% em água) e acetonitrila (de 0-60 min, 5-100% de acetonitrila), com fluxo de 0,120 mL/min, a 25 °C. A temperatura da fonte do espectrômetro de massas foi mantida em 100 °C e as taxas de vazão do gás (nitrogênio) de secagem e nebulização foram otimizadas para 350 e 10 L / h, respectivamente. Espectros de massas em MS₁ e espectros em MS₂ de fragmentos de íons selecionados foram adquiridos no intervalo de 100-800 *m/z* com diferentes voltagens de cone (15, 30 e 50 V).

3.5 Cultura de células da linhagem HepG2

A linhagem HepG2, células de carcinoma hepatocelular humano, foi gentilmente fornecida pela Prof^a. Dr^a. Mari Cleide Sogayar (Instituto de Química, IQ-USP, São Paulo, Brasil). A cultura foi mantida em meio DMEM suplementado com 15% SFB, 10 U/mL de penicilina, 0,1 mg/mL de sulfato de estreptomicina e 1,2 mg/mL de bicarbonato de sódio. Foi utilizado filtro com membrana de 0,22 µm (TPP, Suíça) para esterilização do meio de cultura. As células foram incubadas a 37°C, em atmosfera contendo 5% de CO₂.

3.6 Ensaios de Citotoxicidade

Para obter dados sobre a citotoxicidade do composto comercial CI Disperse Blue 291, foram analisadas a atividade da cadeia respiratória mitocondrial (ensaio do XTT), a sobrevivência celular (utilizando corante cristal violeta), a integridade da membrana plasmática (ensaio da enzima lactato desidrogenase) e a atividade metabólica (consumo de glicose) utilizando os *kits* de citotoxicidade da empresa Xenometrix. Todos os ensaios foram realizados com células da linhagem HepG2 plaqueadas na densidade de 5×10^4 células por poço (200 μ L) em placas de cultura de 96 poços, 24 h antes do início do tratamento. Após o período de adesão celular, o meio de cultura foi substituído por um novo contendo 5, 10, 50 ou 100 μ M do corante dissolvido em dimetilsulfóxido (a concentração final de DMSO no meio de cultura foi de 0,5%, v/v). Incubações controle foram feitas com 0,5% de DMSO no meio de cultura completo. A exposição celular ocorreu por 24 h e após esse período os ensaios de citotoxicidade foram realizados de acordo com as instruções do fabricante (Xenometrix).

3.6.1 Ensaio do XTT

Após o término do período de exposição, o meio de cultura foi removido, as células foram cuidadosamente lavadas com solução salina fosfato tamponada (PBS) pH 7,0 e um novo meio de cultura com 5% de SFB (200 μ L/poço) foi adicionado à placa. Uma solução pré-formulada de 50 μ L do reagente XTT (reagente XTT : tampão = 100:1) foi então adicionada a cada

poço e a placa de cultura foi incubada por 1 h a 37 °C, 5% de CO₂. Os valores da absorbância (OD = OD_{450nm}-OD_{690nm}) foram aferidos fazendo a leitura no comprimento de onda de 450 nm, com a leitura de referência no comprimento de onda de 690 nm. Os resultados foram expressos em porcentagem relativa ao grupo controle.

3.6.2 Ensaio do corante cristal violeta

Como as células mortas não aderem às placas de cultura, é possível avaliar a sobrevivência celular através da coloração das células aderidas com o corante cristal violeta. Após o término do período de exposição, o meio de cultura foi removido e as células foram cuidadosamente lavadas com solução de lavagem pré-formulada, por duas vezes. A solução de lavagem foi removida dos poços e 100 µL de uma solução pré-formulada do corante cristal violeta foram então adicionados a cada poço. A placa foi incubada por dez minutos à temperatura ambiente. Após o término da incubação o corante cristal violeta foi cuidadosamente aspirado e cada poço foi lavado 4 vezes com 200 µL de água deionizada. O corante cristal violeta foi dissolvido pela adição de 100 µL/poço de uma solução pré-formulada de solubilização. Os valores de absorbância (OD = OD_{540nm}-OD_{690nm}) foram aferidos fazendo a leitura teste no comprimento de onda de 540 nm e a leitura de referência no comprimento de onda de 690 nm. Os resultados foram expressos em porcentagem relativa ao grupo controle.

3.6.3 Ensaio da enzima lactato desidrogenase

A liberação de lactato desidrogenase (LDH) para o meio de cultura foi avaliada como marcador de dano à membrana plasmática. LDH usa NADH para reduzir piruvato a lactato. O ensaio mede o consumo de NADH no meio de cultura pelo decaimento da absorbância em 340 nm. Após o período de exposição, 20 µL do meio de cultura foram coletados e transferidos para uma nova placa de 96 poços para a realização do ensaio. Uma solução contendo NADH e piruvato (5:1, 240 µL) foi então adicionada à nova placa, iniciando a reação. Imediatamente os valores de absorbância foram aferidos em modo cinético, fazendo leituras em 340 nm a cada 20 segundos pelo período de 25 min, a 37 °C. Os resultados são expressos como porcentagem da taxa máxima de consumo de NADH (NADH/min), obtida por lise das células com 1% de Triton X-100.

3.6.4 Avaliação do consumo de glicose

O ensaio foi realizado para avaliar alterações no estado metabólico das células. O procedimento utiliza as atividades acopladas de glicose oxidase (GOD) e peroxidase (POD), como abaixo:

A medida de absorvância do corante oxidado é feita no meio de cultura a 540 nm. Ao final do período de exposição, uma alíquota de 10 µL do meio de cultura de cada poço foi coletada e transferida para novos poços em placa de 96 poços. Para a realização do ensaio, após a transferência foram adicionados 190 µL de água deionizada a cada novo poço para obter uma solução diluída (1:20) e otimizar o ensaio de acordo com as recomendações do fabricante. Uma alíquota de 50 µL de cada solução diluída foi então transferida para novos poços em uma terceira placa de 96 poços. Uma solução (100 µL) contendo GOD, POD e o corante reduzido foi adicionada a cada poço e a placa foi incubada por 30 min a 37 °C e 5% de CO₂. A reação foi interrompida pela adição de 100 µL/poço de uma solução de HCl 37%. A placa foi suavemente homogeneizada e os valores da absorvância foram aferidos a 540 nm. A taxa de consumo de glicose foi calculada subtraindo-se os valores médios de absorvância dos sobrenadantes das incubações contendo células dos valores médios de absorvância de incubações sem células (branco).

3.7 Citotoxicidade após diferentes períodos de incubação

Células da linhagem HepG2 foram plaqueadas na densidade de 5×10^4 células por poço (200 µL) em placas de cultura de 96 poços, 24 h antes do início do tratamento. O meio de cultura foi então substituído por um novo meio completo contendo 50 µM do composto comercial CI Disperse Blue 291 ou seu corante dinitrofenilazo purificado, ambos dissolvidos em DMSO (concentração final de DMSO no meio de cultura foi de 0,5%, v/v). Incubações controle foram

feitas com 0,5% de DMSO no meio de cultura completo. Para o controle positivo foram realizadas incubações com solução 1% de Triton X-100. As células foram expostas pelo período de 6 a 72 h.

Coloração com hematoxilina de Harris – Após diferentes períodos de exposição, o meio de cultura foi removido de cada poço e a camada celular foi cuidadosamente lavada, por duas vezes, com solução salina fosfato tamponada (PBS) pH 7,0. A solução de PBS foi removida dos poços e metanol (100 µL) foi adicionado como agente fixador a cada poço e aspirado após 20 segundos de contato. As células foram coradas com 50 µL/poço da solução de hematoxilina de Harris (1,5 mM), por 10 min a 37 °C, sob agitação (150 rpm). Após o término da incubação, a solução de hematoxilina foi cuidadosamente aspirada e cada poço foi lavado 4 vezes com 200 µL de PBS. As células foram lisadas pela adição de 200 µL/poço de uma solução de ácido acético 30%. Os valores de absorbância ($OD = OD_{494nm} - OD_{690nm}$) foram aferidos fazendo a leitura teste no comprimento de onda de 494 nm e a leitura de referência no comprimento de onda de 690 nm. Os resultados foram normalizados em relação às células controle.

Ensaio do XTT – Após diferentes períodos de exposição, o ensaio do XTT foi realizado de acordo com o procedimento descrito acima.

3.8 Análise do potencial de membrana mitocondrial (Ψ)

Para a determinação do Ψ , células da linhagem HepG2 foram plaqueadas com meio DMEM suplementado com 15% SFB, em placas de 24 poços na densidade de 5×10^5 células por poço (1000 μ L). Após 24 h o meio de cultura foi substituído por um novo contendo 5, 10, 50 ou 100 μ M do corante dinitrofenilazo purificado, dissolvido em DMSO (0,5%, v/v). Incubações controles foram feitas com 0,5% de DMSO (controle veículo) e com 200 μ M de valinomicina (desacoplador mitocondrial). Ao término de 12 e 24 h de exposição, o meio de cultura foi removido da placa e as células foram lavadas duas vezes com PBS. Foram adicionados a cada poço 200 μ L de uma solução contendo o fluorocromo lipofílico catiônico iodeto de tetraclorotetraetilbenzimidazol carbocianina (JC-1, 5 μ g/mL). A incubação se deu a 37 °C por 20 min. Após esse período, as células foram lavadas com PBS e tripsinizadas (100 μ L/poço). Após 1 min de contato, a tripsina foi removida e foram adicionados 300 μ L de PBS. As células foram homogeneizadas e transferidas para tubos de citometria. Foram avaliadas duas intensidades de fluorescência por citometria de fluxo:

FL1 ($\lambda_{\text{exc.}} = 488 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{emi.}} = 525 \text{ nm}$), correspondente a mitocôndrias com baixo potencial de membrana que mantêm JC-1 na forma monomérica, de coloração verde.

FL2 ($\lambda_{\text{exc.}} = 488 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{emi.}} = 575 \text{ nm}$), correspondente a mitocôndrias ativas com alto potencial de membrana que formam agregados JC-1, de coloração vermelha.

Dez mil eventos por amostra foram monitorados. A razão FL2/FL1 foi calculada e refletiu o Ψ .

3.9 Análise da concentração de cálcio intracelular

Para a determinação dos níveis de cálcio intracelular, células da linhagem HepG2 foram plaqueadas com meio DMEM suplementado com 15% SFB, em placas de 24 poços na densidade de 5×10^5 células por poço (1000 μ L). Após o período de adesão (24 h) o meio de cultura foi substituído por um novo contendo 5, 10, 50 ou 100 μ M do corante dinitrofenilazo purificado dissolvido em DMSO (0,5%, v/v). Ao término de 24 h de exposição o meio de cultura foi removido da placa, as células foram lavadas duas vezes com PBS e tripsinizadas (100 μ L/poço). Após 1 minuto de contato, a tripsina foi removida e foram adicionados 1000 μ L do meio de cultura DMEM livre de fenol vermelho suplementado com 15% SBF contendo 4 μ M do fluorocromo fluo-3am. As células ressuspensas foram transferidas para tubos de citometria de fluxo e incubadas a 37 °C, por 30 min, no escuro. As análises foram conduzidas pelo monitoramento da intensidade de fluorescência de 10.000 eventos por amostra, no canal *FITC* ($\lambda_{exc.} = 488$ nm; $\lambda_{emi.} = 525$ nm).

3.10 Análise dos níveis de adenosina trifosfato (ATP)

Foram plaqueadas células da linhagem HepG2 (5×10^5 células por poço) em placas de 24 poços. Após o período de adesão celular (24 h) o meio de cultura (DMEM, 15% SBF) foi substituído por um novo contendo 5, 10, 50 ou 100 μM do corante dinitrofenilazo purificado, dissolvido em DMSO (0,5%, v/v). Incubações controles foram feitas com 0,5% de DMSO (controle veiculo). Ao término de 24 h de exposição o meio de cultura foi removido da placa, as células foram lavadas duas vezes com PBS, tripsinizadas (100 μL /poço) e ressuspensas em 1000 μL de meio de cultura (DMEM, 15% SBF). Foi realizada uma contagem das células viáveis com azul de *Trypan* e 8×10^4 células em 50 μL foram transferidas para novas placas de 96 poços (em duplicata), contendo 100 μL da solução pré-formulada *Somatic Cell ATP Releasing Solution* (*ATP bioluminescent somatic cell assay kit*, Sigma-Aldrich Co, USA) e 50 μL de H_2O ou 50 μL do padrão interno contendo 200 pmol de ATP. Após uma suave homogeneização, 100 μL desta solução foram transferidos para uma nova placa de 96 poços contendo 100 μL de uma solução pré-formulada de luciferase (*ATP bioluminescent somatic cell assay kit*, Sigma-Aldrich Co, USA). A placa foi imediatamente transferida ao luminômetro e a quimioluminescência foi monitorada por 10 min. A quantidade de ATP em cada amostra foi calculada pela seguinte equação:

$$ATP_{(A)} = \frac{ATP_{(IS)} \times L_{(A)}}{L_{(A+IS)} - L_{(A)}}$$

Sendo $ATP_{(A)}$ a quantidade de ATP por amostra (em mol); $ATP_{(IS)}$ o valor do padrão interno (em mol); $L_{(A)}$ a luz emitida pela amostra; $L_{(A+IS)}$ a luz emitida pela amostra mais o padrão interno.

3.11 Verificação de estresse oxidativo

Sondas fluorogênicas fornecem uma maneira conveniente e sensível para detectar oxidantes intracelulares. A verificação de estresse oxidativo induzido pelo corante foi monitorada quantitativamente por análise de fluorescência do produto 2',7'-diclorofluoresceína (DCF) resultante da oxidação de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (DCFH) intracelularmente. As células foram incubadas com 2',7'-diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA), o qual se acumula no citosol e é desacetilado por esterases para 2',7'-diclorodihidrofluoresceína o qual pode ser, então, oxidado por radicais livres gerados intracelularmente, como $RO_2^{\bullet}$, $RO^{\bullet}$, $NO_2^{\bullet}$, $CO_3^{\bullet-}$ e $HO^{\bullet}$. Células HepG2 foram plaqueadas em uma densidade de 5×10^4 células / poço em placas de cultura de 96 poços por 24 h. O meio de cultura foi substituído por um novo contendo $10 \mu M$ de DCFH-DA, as células foram incubadas por 60 min a $37^{\circ} C$ (no escuro). Após o período de incubação, o meio foi removido e as células

foram lavadas com PBS para remover o DCFH-DA extracelular. As células foram por fim incubadas com o meio de cultura DMEM livre de fenol vermelho por períodos de 30 min, 3 e 24 h, contendo 5, 10, 50 ou 100 μM do corante dinitrofenilazo purificado dissolvido em DMSO (0,5%, v/v).

Peróxido de hidrogênio (2,5 μM) foi utilizado como controle positivo. A intensidade de emissão de fluorescência foi mensurada a $\lambda_{\text{emi.}} = 530 \text{ nm}$ com $\lambda_{\text{exc.}} = 488 \text{ nm}$, no leitor de ELISA (3.2.2 de Materiais e Métodos).

3.12 Análise de fragmentação do DNA e ciclo celular

Para a análise concomitante de fragmentação do DNA e ciclo celular, células da linhagem HepG2 foram plaqueadas com meio DMEM suplementado com 15% SFB, em placas de 24 poços na densidade de 5×10^5 células por poço (1000 μL). Após o período de adesão celular (24 h) o meio de cultura foi substituído por um novo contendo 5, 10, 50 ou 100 μM do corante dinitrofenilazo purificado, dissolvido em DMSO (0,5%, v/v). Incubações controles foram feitas com 0,5% de DMSO (controle veiculo) e 10% DMSO (controle positivo). Ao término de 24 h de exposição, o meio de cultura foi removido da placa e descartado, as células foram lavadas duas vezes com PBS e tripsinizadas (100 μL /poço). Após 1 minuto de contato, a tripsina foi removida e foram adicionados 1000 μL de meio de cultura DMEM livre de fenol vermelho suplementado com 15% SFB. As células foram homogeneizadas, transferidas para tubos de citometria e centrifugadas a $500 \times g$ por 10 min a 4°C . O sobrenadante foi desprezado e foram adicionados a cada tubo 50 μL de uma solução contendo a enzima RNase A (15 mg/mL) e 150 μL do tampão

hipotônico fluorescente (PBS, 2% SFB, 0,05 % Triton– X100, 0,1% de citrato de sódio, 25 µg/mL de iodeto de propídio). As amostras foram incubadas por 30 min à temperatura ambiente e as análises foram realizadas por citometria de fluxo. Foi avaliada a intensidade de fluorescência do iodeto de propídio ligado ao DNA de 10.000 eventos por amostra, monitorados no canal PerCP-Cy 5.5 ($\lambda_{exc.} = 488 \text{ nm}$; $\lambda_{emi.} = 695 \text{ nm}$).

3.13 Exposição das células ao corante dinitrofenilazo e extração do DNA

As células da linhagem HepG2 foram repicadas para crescimento em placas de 14,6 cm de diâmetro, TPP (Suíça). Após atingirem a confluência ($\sim 1 \times 10^7$ células), foram incubadas com o corante dinitrofenilazo purificado nas concentrações de 50 e 100 µM, dissolvido em DMSO (0,25%, v/v). Incubações controle foram feitas com 0,25% de DMSO no meio de cultura completo, a exposição celular ocorreu por 24 h.

Concomitantemente foram conduzidos experimentos com o intuito de avaliar a recuperação celular após a exposição ao xenobiótico. Para tanto, placas expostas por 24 h a ambas concentrações do corante dinitrofenilazo purificado tiveram o meio de cultura substituído por um novo meio contendo 15% de SFB após o período de exposição. As células foram então incubadas por 24 e 48 h antes da extração do DNA.

O DNA das células da linhagem HepG2 foi extraído seguindo o protocolo do *kit* de extração de DNA Gentra Puregene® (QIAGEN Sciences, USA). Após os períodos de exposição, o meio de cultura foi substituído por um novo (10 mL

por placa) desprovido de SFB (para minimizar a contaminação proteica no processo de extração), as células foram suavemente homogeneizadas e centrifugadas a 400 x g por 5 min, 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspense em 3 mL da solução de lise celular (*Cell Lysis Solution*, Gentra Puregene® Kit), sendo a solução vigorosamente agitada por 20 segundos. Foram adicionados 30 µL de uma solução contendo a enzima RNase A na concentração de 15 mg/mL e as amostras foram incubadas por 1 h a 37 °C. Após a incubação foi adicionado 1 mL da solução de precipitação proteica (*Protein Precipitation*, Gentra Puregene® Kit) e novamente as amostras foram submetidas a uma vigorosa agitação por 20 segundos e posterior centrifugação a 2000 x g por 10 min, 4 °C. Após a centrifugação coletou-se o sobrenadante e aos tubos foram adicionados 5 mL de isopropanol gelado. Após leve agitação, para precipitação do DNA, as soluções foram centrifugadas a 2000 x g por 3 min, 4 °C, e o isopropanol foi descartado. O DNA foi lavado com 3 mL de etanol (70% em água), centrifugado a 2000 x g por 3 min, 4 °C, seco e ressuspense em 200 µL de solução de desferroxamina (0,1 mM).

A solução de desferroxamina contendo o DNA extraído foi mantida a 4°C por 24 h para a solubilização do mesmo. Após esse período sua concentração foi determinada pela intensidade de absorbância em $\lambda = 260$ nm, utilizando-se um espectrofotômetro Libra S12. A pureza das amostras de DNA foi avaliada pela razão das intensidades de absorbância em λ 260/280 nm, e por fim o DNA extraído foi estocado a -20 °C.

3.14 Dicroísmo circular do DNA de células expostas ao corante dinitrofenilazo

O espectro de dicroísmo circular do DNA genômico de células expostas ao corante dinitrofenilazo foi obtido através de análise em um espectropolarímetro J-720 (JASCO, Reino Unido), na Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo – IQ/USP. A análise foi conduzida ressuspensando 25 µg do DNA extraído, não hidrolisado, em tampão HEPES 0,01 M, pH 7,4. O monitoramento foi realizado no intervalo de 200 a 350 nm, com caminho óptico de 1 mm.

3.15 Determinação dos níveis de 5-metil-2'-desoxicitidina em DNA de células da linhagem HepG2

3.15.1 Solução padrão

O padrão de 5-metil-2'-desoxicitidina (5-metil-dC) foi obtido por purificação a partir de DNA de timo de bezerro (Sigma) hidrolizado enzimaticamente, utilizando-se um sistema de HPLC. Sua identidade foi confirmada pelas seguintes características espectroscópicas: espectro de absorvância em H₂O : CH₃OH (6:1, v/v), λ_{max} 277 nm; espectro de absorvância em ácido fórmico 0.1% : CH₃OH (19:1, v/v), λ_{max} 286 nm; ESI-MS (modo positivo): m/z 242 [M + H]⁺, m/z 126 [M- 2'-desoxirribose + H]⁺.

As concentrações das soluções de 5-metil-dC e dC foram calculadas através da determinação da absorbância em água, utilizando-se os respectivos coeficientes de extinção molar (ϵ): 5-metil-dC, $\epsilon = 8500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ em $\lambda = 277 \text{ nm}$; dC, $\epsilon = 9000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ em $\lambda = 271 \text{ nm}$.

3.15.2 Hidrólise enzimática do DNA

Para a reação de hidrólise enzimática, alíquotas contendo 10 μg de DNA em desferroxamina (0,1 mM) foram adicionadas a 1 μL de tampão Tris-HCl/MgCl₂ 200 mM (pH 7,4) e 1,2 unidade de DNase 1. As amostras foram incubadas a 37 °C por 1 h. Após a incubação foram adicionados 0,0005 unidade de fosfodiesterase 1 (PDE1) e 1,2 unidade de fosfatase alcalina. As amostras foram novamente incubadas a 37 °C por 1 h com agitação de 1000 rpm. Ao término da segunda hora o volume final da incubação (20 μL) foi centrifugado por 10 min a 9.300 x g e o sobrenadante foi coletado. Alíquotas de 10 μL (5 μg de DNA) foram analisadas em um sistema de HPLC-DAD.

3.15.3 Sistema analítico

As alíquotas de DNA foram injetadas no sistema analítico de HPLC-DAD descrito no item **3.2.3.1** de Materiais e Métodos. A seguinte condição cromatográfica foi utilizada para as análises:

Sistema Cromatográfico 4. Coluna Luna C18 (2) 250 mm x 4,6 mm, ID, 5 µm, (Phenomenex, Torrance, CA) com uma pré-coluna C18 4,0 x 3,0 mm (Phenomenex, Torrance, CA) foi eluída com um gradiente de ácido fórmico (0,1% em água) e CH₃OH (0-25 min, 0-18% de CH₃OH; 25-27 min, 18-0% de CH₃OH; 27-37min, 0% de CH₃OH), com um fluxo de 1 mL/min, 30°C. O detector de DAD foi fixado em 260 nm para a quantificação da dC e 286 nm para a quantificação da 5-metil-dC. Curvas de calibração foram feitas no intervalo de 0,05-6 nmol para dC e de 0,005-0,4 nmol para 5-metil-dC. A porcentagem da metilação global do DNA foi calculada usando a seguinte equação:

$$5\text{-metil-dC}_{(\%) } = \frac{5\text{-metil-dC}_{(\text{nmol})} \times 100}{5\text{-metil-dC}_{(\text{nmol})} + \text{dC}_{(\text{nmol})}}$$

3.15.4 Validação do método

Para validação do método, quantidades conhecidas do padrão purificado 5-metil-dC (50, 100 e 200 pmol no volume de injeção) foram adicionadas a 10 µg de DNA de timo de bezerro (Sigma). O DNA foi hidrolisado enzimaticamente e analisado por HPLC-DAD como descrito acima. Para o cálculo de exatidão e coeficiente de variação, as amostras foram processadas em quadruplicata. Subsequentemente, o coeficiente de variação foi calculado para amostras de DNA processadas em 3 dias distintos (N = 10). A linearidade foi verificada através das curvas de calibração obtidas com os padrões puros

dissolvidos em água. O limite de quantificação foi estabelecido pela injeção de quantidades decrescentes do padrão 5-metil-dC até obtenção da razão sinal/ruído (S/N) igual a 5.

3.16 Análise dos níveis de DNMT1 em células expostas ao corante dinitrofenilazo

As células da linhagem HepG2 foram repicadas para crescimento em placas de 14,6 cm de diâmetro, TPP (Suíça). Após atingirem a confluência ($\sim 1 \times 10^7$ células), foram incubadas com o corante dinitrofenilazo purificado na concentração de 100 μ M, dissolvido em DMSO (0,25%, v/v). Incubações controles foram feitas com 0,25% de DMSO no meio de cultura completo. A exposição celular ocorreu por 24 h. Ao término desse período, o meio de cultura foi removido e descartado, as células foram coletadas e lavadas com PBS. O procedimento foi realizado conforme descrito por MOLOGNONI, *et al.*, 2011. Após a retirada do PBS, as células foram ressuspensas em tampão contendo 10 mM de Tris (pH 7,4), 10 mM de NaCl, 3 mM de $MgCl_2$, 0,1 mM de EDTA, 0,5% de NP40 e inibidores de protease e fosfatase e incubadas no gelo durante 5 min. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 3000 rpm por 5 minutos a 4 °C e os sobrenadantes, compostos pelos extratos citoplasmáticos, foram removidos e armazenados a -70 °C. O *pellet* foi lavado com tampão contendo 10 mM de Tris (pH 7,4), 10 mM de NaCl, 3 mM de $MgCl_2$, 0,1 mM de EDTA e inibidores de protease e fosfatase. Após as lavagens, os núcleos foram lisados em tampão contendo 400 mM de NaCl, 7,5 mM de $MgCl_2$, 0,2 mM de

EDTA, 1 mM de DTT e inibidores de protease e fosfatase e as amostras incubadas a 4 °C com agitação por 15 minutos. Após esse período de incubação, as amostras foram centrifugadas a 13.000 rpm por 5 minutos a 4 °C e os sobrenadantes correspondendo aos extratos nucleares foram coletados e armazenados a -70 °C. Os lisados protéicos foram separados por eletroforese em gel SDS-PAGE e transferidos para membrana de PVDF ou nitrocelulose. Após serem bloqueadas em molico 5% em TBS-T, as membranas foram incubadas com os anticorpos primários durante aproximadamente 16 horas sob agitação a 4 °C. Os anticorpos primários usados e suas respectivas diluições foram anti-dnmt1 (1:1000, Imgenex), e anti-PCNA (1:1500, Cell Signaling). A detecção foi feita através de quimioluminescência utilizando o kit *Super Signal West Pico* (Pearce). Essa técnica foi realizada na Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP, com a colaboração do grupo de pesquisa da Prof^a. Dr^a. Miriam Galvonas Jasiulionis.

3.17 Quantificação simultânea de 8-oxodG, 1,N⁶-εdA e 1,N²-εdG em DNA por HPLC-ESI-MS/MS-MRM

3.17.1 Síntese do padrão [¹⁵N₅]8-oxodG

Alíquotas de [¹⁵N₅]2'-desoxiguanosina (200 µg) foram solubilizadas em água deionizada (400 µL). Foram adicionados a cada incubação 5 µL de uma solução contendo sulfato de cobre 0,2 M, 50 µL de uma solução de ácido ascórbico 2 M e 50 µL de peróxido de hidrogênio (30%, v:v). As alíquotas foram

submetidas a uma vigorosa agitação por 60 segundos e incubadas à temperatura de -4 °C por 15 min. Em seguida o produto da reação de oxidação foi purificado por HPLC-DAD utilizando o equipamento descrito no item **3.2.3.1** de Materiais e Métodos. A condição cromatográfica é descrita abaixo (**Sistema Cromatográfico 5**). O produto correspondente à [¹⁵N₅]8-oxodG, com λ_{max} em 294 nm foi coletado, liofilizado e ressuspenso em água. Alíquotas dessa nova solução foram injetadas novamente no sistema HPLC-DAD, sendo utilizado o **Sistema Cromatográfico 6** para a remoção do sal da amostra.

O pico com espectro de absorvância correspondente à [¹⁵N₅]8-oxodG foi coletado, seco e ressuspenso em 200 µL de água. A concentração foi determinada pela intensidade de absorvância em 294 nm ($\epsilon_{294 \text{ nm}} = 9700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). A identidade e a pureza isotópica foram confirmadas no sistema analítico **ESI-MS/MS 1**, descrito em **3.2.3.4** de Materiais e Métodos, utilizando o **Sistema Cromatográfico 3**.

Sistema Cromatográfico 5. Coluna Luna C18 (2) 250 mm x 4,6 mm, ID, 5 µm (Phenomenex, Torrance, CA) com uma pré-coluna C18 4,0 x 3,0 mm (Phenomenex, Torrance, CA), eluída com fase móvel constituída de 5% de acetonitrila em tampão fosfato (KH₂PO₄ – 25 mM), pH 5,5, em modo isocrático (tempo de corrida = 25 min), a 30 °C, com fluxo de 0,350 mL/min. O detector DAD foi fixado em 250 nm.

Sistema Cromatográfico 6. Coluna Luna C18 (2) 250 mm x 4,6 mm, ID, 5 µm (Phenomenex, Torrance, CA) com uma pré-coluna C18 4,0 x 3,0 mm (Phenomenex, Torrance, CA), eluída com fase móvel constituída de 5% de

acetonitrila em água em modo isocrático (tempo de corrida = 25 min), a 30 °C, com fluxo de 0,350 mL/min. O detector DAD foi fixado em 250 nm.

3.17.2 Síntese e obtenção dos padrões de etenoadutos

1,*N*⁶-eteno-2'-desoxiadenosina (1,*N*⁶-εdA) está disponível comercialmente e foi adquirido da empresa Sigma–Aldrich Co. (St. Louis, MO). Alíquotas de soluções de dG (3 mg), [¹⁵N₅]-dG (3 mg) e [¹⁵N₅]-dA (3 mg) foram solubilizadas separadamente em 750 µL de tampão fosfato de potássio (KH₂PO₄ 0,1 M, pH 6,0). Foram adicionados a cada incubação 15 µL de cloroacetaldeído (CAA, 2,0 M) e as soluções foram incubadas a 37 °C por 18 h. Os produtos das reações dos desoxinucleosídeos com o CAA foram purificados por HPLC-DAD, descrito no item **3.2.3.1** de Materiais e Métodos, utilizando o **Sistema Cromatográfico 7**.

Os produtos [¹⁵N₅]-1,*N*⁶-εdA (espectro de absorbância com λ_{max} . em 275 nm), 1,*N*²-εdG e [¹⁵N₅]-1,*N*²-εdG (espectro de absorbância com λ_{max} . em 284 nm) foram coletados, secos e solubilizados em água. A *identidade e a pureza isotópica* desses adutos foram confirmadas no sistema analítico **ESI-MS/MS 1**, descrito em **3.2.3.4** de Materiais e Métodos, utilizando o **Sistema Cromatográfico 3**. As concentrações de 1,*N*⁶-εdA e [¹⁵N₅]-1,*N*⁶-εdA foram determinadas pela intensidade de absorbância em 275 nm ($\epsilon_{275 \text{ nm}} = 10300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, pH 7,0). As concentrações de 1,*N*²-εdG e [¹⁵N₅]-1,*N*²-εdG foram determinadas pela intensidade de absorbância em 285 nm ($\epsilon_{285 \text{ nm}} = 16785 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, pH 7,0).

Sistema Cromatográfico 7. Coluna Luna C18 (2) 250 mm x 4,6 mm, ID, 5 μ m (Phenomenex, Torrance, CA) com uma pré-coluna C18 4,0 x 3,0 mm (Phenomenex, Torrance, CA) eluída com um gradiente de água e acetonitrila (0-30 min, 5-50% ACN; 30-31 min, 50-5% ACN e 31-40 min, 5% ACN), a 30 °C, com fluxo de 1,000 mL/min. O detector DAD foi fixado em 275 nm.

3.17.3 Hidrólise enzimática e preparo das amostras de DNA

Para a reação de hidrólise enzimática foram adicionados 3,75 μ L de tampão Tris-HCl/MgCl₂ 200 mM (pH 7,4), 6,5 unidades de DNase 1, 2000 fmol de [¹⁵N₅]-8-oxodGuo, 400 fmol de [¹⁵N₅]-1,N⁶- ϵ dA e 400 fmol de [¹⁵N₅]-1,N²- ϵ dG a alíquotas contendo 160 μ g de DNA em solução de desferroxamina 0,1 mM. As amostras foram incubadas a 37 °C por 1 h. Após a incubação foram adicionados 0,005 unidade de fosfodiesterase 1 (PDE1) e 6,5 unidades de fosfatase alcalina. A amostra foi novamente incubada a 37 °C por 1 h sob agitação de 1000 rpm. Ao término da segunda hora, o volume final da incubação (100 μ L) foi centrifugado por 10 min a 9300 x g e uma alíquota de 10 μ L do sobrenadante foi coletada para injeção de 6 μ L no sistema HPLC-DAD (**Sistema Cromatográfico 4**) utilizado para quantificação de 5-Metil-dC e dos desoxinucleosídeos normais (dC, dG e dA). Do volume restante da incubação (90 μ L), 50 μ L foram injetados no sistema **ESI-MS/MS 2** descrito em **3.2.3.4** de Materiais e Métodos, utilizando o **Sistema Cromatográfico 8**.

3.17.4 HPLC-DAD-ESI-MS/MS-MRM

O sistema analítico empregado para a quantificação das lesões no DNA das células da linhagem HepG2 está descrito no item **3.2.3.4** de Materiais e Métodos (**ESI-MS/MS 2**).

O sistema de HPLC é integrado a um espectrômetro de massas Linear Quadrupole Ion Trap modelo 4000 QTRAP (Applied Biosystems/MDS Sciex Instruments, Foster City). As análises por ESI-MS foram realizadas em modo positivo, utilizando-se os seguintes parâmetros otimizados: gás de nebulização, 20 psi; gás na fonte de íons, 50 psi; gás de dissociação induzida por colisão, LOW; temperatura da fonte do ESI, 550 °C; potencial de dissociação, 46 V; potencial de entrada, 10 V; energia de colisão, 17 eV, potencial de saída da célula, 52 V; e tensão do spray de íons, 5500 V. Foi utilizado o modo de monitoramento de reação múltipla (MRM) para detecção e quantificação de 8-oxodG, 1,N⁶-εdA e 1,N²-εdG, sendo utilizadas as seguintes fragmentações: m/z 284 $[M+H]^+ \rightarrow m/z$ 168 $[M-2'-desoxirribose+H]^+$ e m/z 289 $[M+H]^+ \rightarrow m/z$ 173 $[M-2'-desoxirribose+H]^+$ para a detecção de 8-oxodG e respectivo padrão interno [¹⁵N₅]-8-oxodG, m/z 276 $[M+H]^+ \rightarrow m/z$ 160 $[M-2'-desoxirribose+H]^+$ e m/z 281 $[M+H]^+ \rightarrow m/z$ 165 $[M-2'-desoxirribose+H]^+$ para a detecção de 1,N⁶-εdA e respectivo padrão interno [¹⁵N₅]-1,N⁶-εdA, m/z 292 $[M+H]^+ \rightarrow m/z$ 176 $[M-2'-desoxirribose+H]^+$ e m/z 297 $[M+H]^+ \rightarrow m/z$ 181 $[M-2'-desoxirribose+H]^+$ para a detecção de 1,N²-εdG e respectivo padrão interno [¹⁵N₅]-1,N²-εdG. As razões entre as áreas (aduto/padrão interno) foram utilizadas para quantificação. Curvas de calibração foram injetadas no intervalo de 50 a 2000

fmol de 8-oxodG (1000 fmol de [$^{15}\text{N}_5$]-8-oxodG), 0,5 a 100 fmol de 1, N^6 - ϵ dA e de 1, N^2 - ϵ dG (200 fmol de [$^{15}\text{N}_5$]-1, N^6 - ϵ dA e de [$^{15}\text{N}_5$]-1, N^2 - ϵ dG). Os dados foram processados utilizando-se o *software* Analyst 1.4 (*Applied Biosystems, USA*). Foi utilizado um sistema de SPE *online* com o **Sistema Cromatográfico 8**, descrito abaixo:

Sistema Cromatográfico 8. Válvula posição 0 (Figura 7. A.): Coluna Luna C18 (2) 50 mm x 4,6 mm, ID, 2.6 μm , (Phenomenex, Torrance, CA) com uma pré-coluna C18 4,0 x 3,0 mm (Phenomenex, Torrance, CA) eluída com um gradiente de ácido fórmico 0,1% em água (Solução A) e CH_3OH com 0,1% de ácido fórmico (Solução B), a um fluxo de 150 $\mu\text{L}/\text{min}$, 25 $^\circ\text{C}$, nas seguintes condições: 0-25 min, 0-15% B; 25-26 min, 15-80% B; 26-31 min, 80% B; 31-33 min, 80-0% B; 33-53 min, 0% B. O sistema é integrado ao detector PDA (fixado em 260 nm) e posteriormente ao descarte (**Linha 1**). Concomitantemente uma coluna Luna C18 (2) 150 mm x 2,0 mm, ID, 3 μm , (Phenomenex, Torrance, CA) é eluída em modo isocrático por uma solução constituída por 15% de CH_3OH em água com 0,1% de ácido fórmico, a um fluxo de 150 $\mu\text{L}/\text{min}$, 25 $^\circ\text{C}$. O sistema é integrado ao espectrômetro de massas API 4000 QTRAP (**Linha 2**). **Válvula posição 1 (Figura 7. B.):** Com a alteração do posicionamento da válvula, as duas linhas descritas acima passam a ser eluídas pelo gradiente da bomba binária e as duas colunas analíticas passam a integrar a mesma linha do sistema cromatográfico (**Linha 3**). As seguintes condições de posicionamento para a válvula de comutação de fluxo são empregadas: 0-3 min, posição 0; 3-6 min, posição 1; 6-13 min, posição 0; 13-33 min, posição 1; 33 -53 min, posição 0.

3.17.5 Validação do método

Para validação do método, quantidades conhecidas dos padrões 8-oxodG (50, 100 e 200 fmol no volume de injeção), 1, N^6 - ϵ dA (10, 20 e 40 fmol no volume de injeção) e 1, N^2 - ϵ dG (10, 20 e 40 fmol no volume de injeção) foram adicionadas a 100 μ g de DNA de timo de bezerro (Sigma). Os padrões internos foram também adicionados como descrito acima. O DNA foi hidrolisado enzimaticamente e analisado por HPLC-DAD-ESI-MS/MS. Para o cálculo de exatidão e coeficiente de variação, as amostras foram processadas em triplicata em dois dias distintos. A linearidade foi verificada através das curvas de calibração obtidas com os padrões puros dissolvidos em água. Os limites de quantificação foram estabelecidos pela injeção de quantidades decrescentes dos padrões até obtenção da razão sinal/ruído (S/N) igual a 5.

A.

B.

Figura 7. Válvula de comutação de fluxo empregada no **Sistema Cromatográfico 8**, descrita no item 3.17.4 de Materiais e Métodos. **A.** Válvula na Posição 0. **B.** Válvula na Posição 1.

3.18 Produtos de biotransformação

As células da linhagem HepG2 foram repicadas para crescimento em placas de 14,6 cm de diâmetro, TPP (Suíça). Após atingirem a confluência, foram incubadas por 24 h com o corante dinitrofenilazo purificado (100 μ M), dissolvido em DMSO (0,25%, v/v). Incubações controles foram feitas com 0,25% de DMSO no meio de cultura completo.

Alíquotas do meio de cultura foram coletadas com 0, 12 e 24 h de exposição e injetadas no sistema de HPLC-DAD (descrito em **3.2.3.1** de Materiais e Métodos), utilizando o **Sistema Cromatográfico 9**, para verificação da presença de produtos de biotransformação do corante.

Sistema Cromatográfico 9. Coluna Luna C18 (2) 250 mm x 4,6 mm, ID, 5 μ m (Phenomenex, Torrance, CA) com uma pré-coluna C18 4,0 x 3,0 mm (Phenomenex, Torrance, CA) foi eluída com um gradiente de água e CH₃OH, a 30 °C, com fluxo de 1 mL/min, nas seguintes condições: 0-60 min, 5-100% de CH₃OH; 60-70 min, 100% de CH₃OH; 70-73 min, 100-5% de CH₃OH; 73-83 min 5% de CH₃OH. A absorbância foi monitorada no intervalo de 200 a 800 nm.

3.18.1 Purificação do principal produto de biotransformação presente no meio de cultura

O meio de cultura das células expostas ao corante dinitrofenilazo como descrito acima foi coletado e eluído através de cartuchos de extração em fase sólida (SPE) C₁₈ (500 mg / 6 mL, Applied Separations, Allentown, PA).

Alíquotas de 1 mL do meio de cultura foram aplicadas aos cartuchos de SPE já condicionados. Os cartuchos foram lavados sequencialmente com 5 mL de H₂O e 5 mL de metanol. As frações de lavagem com metanol foram coletadas, secas sob vácuo e dissolvidas em água deionizada.

A purificação do produto de biotransformação foi realizada através de múltiplas injeções de alíquotas das amostras provenientes da SPE no sistema de HPLC-DAD (**3.2.3.1** de Materiais e Métodos), utilizando o **Sistema Cromatográfico 9**. O produto com λ_{max} em 473 nm foi coletado e seco sob vácuo. Uma fração do produto de biotransformação foi ressuspensa em água deionizada e injetada no sistema de **ESI-MS/MS 1**, (**3.2.3.4** de Materiais e Métodos), utilizando o **Sistema Cromatográfico 10**. O restante do produto purificado foi ressuspenso em DMSO-*d*₆ para a obtenção de espectro de ressonância magnética nuclear (¹H RMN).

Sistema Cromatográfico 10. Coluna Luna C18 (2) (150 mm x 2 mm, ID, 3 µm, Phenomenex, Torrance, CA) com uma pré-coluna C18 4,0 x 3,0 mm (Phenomenex, Torrance, CA) foi eluída com um gradiente de ácido fórmico (0,1% em água) e CH₃OH, com fluxo de 0,125 mL/min, a 35 °C, nas seguintes condições: 0-50 min, 5-100% de CH₃OH; 50-60 min, 100% de CH₃OH; 60-63 min, 100-5% de CH₃OH; 63-73 min 5% de CH₃OH. A temperatura da fonte do espectrômetro de massas foi mantida em 200 °C e as taxas de vazão do gás (nitrogênio) de secagem e nebulização foram otimizadas para 350 e 10 L / h, respectivamente. Espectros de massas em MS₁ e espectros em MS₂ de fragmentos de íons selecionados foram adquiridos no intervalo de 100-1000 *m/z* com diferentes voltagens de cone (15, 30 e 50 V).

3.18.2 Produtos de biotransformação presentes intracelularmente

Após a coleta do meio de cultura, conforme o descrito em **3.17** de Materiais e Métodos, as células expostas ao corante foram lavadas 2 vezes com PBS, removidas das placas de cultura com o auxílio de um *cell scraper* e homogeneizadas em 5 mL de água deionizada. Com o intuito de romper a membrana plasmática, as células foram diretamente submersas em nitrogênio líquido por 10 min e armazenadas a 4 °C por 24 h. Após esse período a solução foi vigorosamente agitada por 5 min e centrifugada a 9300 x *g* por 10 min. Alíquotas do sobrenadante foram injetadas no sistema de HPLC-DAD (**3.2.3.1** de Materiais e Métodos), utilizando o **Sistema Cromatográfico 9** e concomitantemente no sistema **ESI-MS/MS 1**, (**3.2.3.4** de Materiais e Métodos), utilizando o **Sistema Cromatográfico 10**.

3.19 Investigação da biotransformação do corante DB291 *in vitro* utilizando fração S9, nitrorredutase e acetiltransferase

DB 291 (5 µL de uma solução 10 mM em DMSO) foi incubado com 25 µL de fração S9, 10 µL de NADPH (estoque = 250 mM), 10 µL da enzima nitrorredutase (estoque = 0,8 mM), 20 µL de NADH (estoque = 1 mM), 20 µL da enzima arilamina acetiltransferase de fígado de pombo (estoque = 0,3 mM), 20 µL de acetil CoA (estoque = 2 mM) e 20 µL de DTT (estoque = 1 µM) em tampão fosfato de sódio (25 mM, pH 7) (volume final 500 µL) por 4 h a 37 °C, sob agitação.

Incubações contendo apenas um dos sistemas enzimáticos e controles sem DB291, sem cofatores ou sem enzimas foram paralelamente realizadas.

3.20. Análise estatística

Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão. Para testar a significância das diferenças entre os grupos foi utilizada análise de variância simples (One way ANOVA), através do *software* de análise estatística *GraphPrism*. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análises cromatográficas e espectroscópicas do composto comercial CI Disperse Blue 291 e do corante dinitrofenilazo purificado

Os cromatogramas obtidos por HPLC-DAD do composto comercial CI Disperse Blue 291 estão apresentados nas **Figuras 8 A. e 9 A.** É possível observar a presença de diferentes constituintes na composição do produto comercial. Dessa forma, houve a necessidade de purificação do corante 2-[(2-bromo-4,6-dinitrofenil)azo]-5-(dietilamino)-4-metoxiacetanilida (pico b) para melhor avaliação da toxicidade dessa molécula. A purificação foi realizada como descrito no item **3.3** e os cromatogramas obtidos do corante dinitrofenilazo puro estão apresentados nas **Figuras 8 B. e 9 B.**

O espectro de massas (ESI/MS) do corante purificado está apresentado na **Figura 10 A.**, sendo possível observar os íons $[M+H]^+$ com m/z 509/511 e os fragmentos com m/z 493/495 e m/z 480/482, indicando a presença de ^{79}Br e ^{81}Br . As estruturas sugeridas para os fragmentos obtidos estão apresentadas na **Figura 10 B.**

Figura 8. Cromatogramas obtidos por HPLC-DAD ($\lambda = 254 \text{ nm}$) de: **A.** Composto comercial CI Disperse Blue 291 e **B.** Corante dinitrofenilazo puro. Os espectros de absorvância de um constituinte da amostra comercial (**a**) e do corante dinitrofenilazo (**b**) são também apresentados.

Figura 9. Cromatogramas obtidos por HPLC-DAD ($\lambda = 200 - 800$ nm) de: **A.** Composto comercial CI Disperse Blue 291 e **B.** Corante dinitrofenilazo puro.

Figura 10. A. Espectro de massas do corante 2-[(2-bromo-4,6-dinitrofenil)azo]-5-(dietilamino)-4-metoxiacetanilida. **B.** Estruturas sugeridas para os fragmentos observados.

4.2 Citotoxicidade do composto comercial CI Disperse Blue 291 e do corante dinitrofenilazo purificado

Através do ensaio do corante cristal violeta verificou-se que o composto comercial CI Disperse Blue 291 induziu morte celular de forma dose-dependente no intervalo de concentrações testado (5-100 μM) pelo período de 24 h (**Figura 11**). A concentração que levou à morte de 50% das células (IC_{50}) foi calculada em 74 μM (37 $\mu\text{g/mL}$). O ensaio do XTT, entretanto, revelou a indução de geração do formazan solúvel (coloração laranja) quando as células foram incubadas com 10 ou 50 μM de CI Disperse Blue 291 por 24 h (**Figura 12**). Tal efeito não foi acompanhado pelo aumento do número de células (**Figura 11**), podendo ser devido a um aumento da atividade de enzimas mitocondriais favorecendo a redução do sal tetrazólio para formazan. A maior concentração testada de CI Disperse Blue (100 μM) inibiu a conversão do sal terazólio em formazan, mostrando claramente um efeito citotóxico. O ensaio foi repetido duas vezes para confirmação dos resultados. Concomitantemente, células incubadas com 50 μM de CI Disperse Blue 291 por 24 h apresentaram um aumento da taxa de consumo de glicose (**Figura 13**), confirmando a hipótese de aumento da atividade metabólica celular nas incubações com o corante comercial. Adicionalmente, verificamos através do ensaio da lactato desidrogenase que a morte celular não ocorreu com lise da membrana plasmática nas concentrações testadas (**Figura 14**), indicando que a via de morte celular não é necrose.

Figura 11. Análise da citotoxicidade do composto comercial CI Disperse Blue 291 em células HepG2 utilizando o ensaio do corante cristal violeta (24 h). Valores expressos relativos ao controle (células HepG2 + DMSO). Dados correspondem à média $\pm$ desvio padrão de um experimento conduzido em quadruplicada, sendo que a leitura de absorbância de cada poço foi repetida três vezes. Asteriscos indicam que os valores são significativamente diferentes do controle, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. IC₅₀ calculado foi 74 µM.

Figura 12. Análise da citotoxicidade do composto comercial CI Disperse Blue 291 em células HepG2 utilizando o ensaio do XTT (24 h). Valores expressos relativos ao controle (células HepG2 + DMSO). Dados correspondem à média $\pm$ desvio padrão de um experimento conduzido em quadruplicada, sendo que a leitura de absorbância de cada poço foi repetida três vezes. Asteriscos indicam que os valores são significativamente diferentes do controle, * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$.

Figura 13. Análise da citotoxicidade do composto comercial CI Disperse Blue 291 em células HepG2 utilizando o ensaio de consumo de glicose (24 h). Dados correspondem à média $\pm$ desvio padrão de um experimento conduzido em quadruplicada, sendo que a leitura de absorbância de cada poço foi repetida três vezes. Asteriscos indicam que os valores são significativamente diferentes do controle, *** $p < 0,001$.

Figura 14. Análise da citotoxicidade do composto comercial CI Disperse Blue 291 em células HepG2 utilizando o ensaio da lactato desidrogenase (24 h). Valores expressos relativos ao controle positivo (células HepG2 + Triton X-100). Dados correspondem à média $\pm$ desvio padrão de um experimento conduzido em quadruplicada.

Foi avaliado, subsequentemente, o efeito citotóxico do composto comercial CI Disperse Blue 291 e do corante dinitrofenilazo puro por períodos prolongados de incubação utilizando o ensaio de marcação com hematoxilina de Harris e o ensaio do XTT, como descrito no item **3.7** de Materiais e Métodos.

A hematoxilina (**Figura 15 A.**) é utilizada em histologia para colorir os componentes ácidos dos tecidos, aos quais dá uma coloração violeta. Colore intensamente os núcleos das células, dado que estes contêm ácidos nucleicos. Antes de ser utilizada como corante nuclear, a hematoxilina precisa ser oxidada para hemateína (**Figura 15 B.**) e combinada com um íon metálico (mordente). A maioria dos mordentes bem sucedidos são sais de alumínio ou ferro.

Figura 15. **A.** Estrutura química da hematoxilina. **B.** Estrutura química da hemateína

Utilizando o mesmo princípio do ensaio com o corante cristal violeta, as células coradas com solução de hematoxilina de Harris (1,5 mM) foram lisadas pela adição de ácido acético 30%, havendo a solubilização do corante. O comprimento de onda utilizado para a quantificação do corante foi determinado

a partir do espectro de absorbância do corante solubilizado em ácido acético 30% (**Figura 16**).

Figura 16. Espectro de absorbância da hematoxilina de Harris solubilizada em ácido acético 30%.

Como apresentado na **Figura 17**, tanto o composto comercial CI Disperse Blue 291 (50 μ M) quanto seu corante dinitrofenilazo puro (50 μ M) induziram a mesma porcentagem de morte celular em diferentes períodos no intervalo de 6 a 72 h de exposição. Tal observação nos permite concluir que o corante dinitrofenilazo é o principal constituinte do composto comercial CI Disperse Blue 291 a induzir os efeitos citotóxicos nas células HepG2. Adicionalmente, além de dose-dependente (**Figura 11**, IC₅₀ 74 μ M), os efeitos citotóxicos são tempo-dependentes (**Figura 17**).

A **Figura 18** mostra que o efeito observado anteriormente (**Figura 12**) no ensaio do XTT foi também evidenciado para o corante dinitrofenilazo puro (50

μM) após 6, 12 e 24 h de exposição. Novamente, o corante dinitrofenilazo pode ter um efeito indutor da atividade redutase mitocondrial, o qual é tempo dependente.

Figura 17. Citotoxicidade do composto comercial CI Disperse Blue 291 e de seu corante dinitrofenilazo puro em células HepG2 no intervalo de 6 a 72 h de exposição. As células foram plaqueadas na densidade de 5×10^4 células/poço em placas de 96 poços 24 h antes do início do tratamento. O meio de cultura foi então substituído por um novo meio completo contendo 50 μM do composto comercial CI Disperse Blue 291 ou seu corante dinitrofenilazo purificado, ambos dissolvidos em DMSO (concentração final de DMSO no meio de cultura: 0,5% v/v). As células controles foram incubadas com 0,5% de DMSO no meio de cultura completo. Meio de cultura contendo 1% de Triton X-100 foi utilizado como controle positivo. Foi utilizado o ensaio de marcação com hematoxilina de Harris para quantificação da sobrevivência celular. N = 5.

Figura 18. Citotoxicidade do corante dinitrofenilazo puro em células HepG2 no intervalo de 6 a 72 h de exposição. As células foram plaqueadas na densidade de 5×10^4 células/poço em placas de 96 poços 24 h antes do início do tratamento. O meio de cultura foi então substituído por um novo meio completo contendo 50 µM do corante dinitrofenilazo purificado, dissolvido em DMSO (concentração final de DMSO no meio de cultura: 0,5% v/v). As células controles foram incubadas com 0,5% de DMSO no meio de cultura completo. Meio de cultura contendo 1% de Triton X-100 foi utilizado como controle positivo. Foi utilizado o ensaio do XTT. N = 5, *** $p < 0,001$.

Os estudos de citotoxicidade aqui apresentados foram feitos com o corante na faixa de 5-100 µM, tendo sido possível a observação de efeitos sobre as células. Em um estudo anterior realizado por Tsuboy e colaboradores, o corante DB291 foi incubado com células HepG2 na faixa de concentração de 400-2.000 µM. Foram feitas análises de micronúcleo, cometa, apoptose e necrose, sendo que aumento da fragmentação do DNA no ensaio cometa e indução de micronúcleos foram observados a partir da concentração de 400 µM. Aumento dos índices de apoptose e necrose foram observados a partir

da menor concentração testada (400 μM), mas sem haver grande indução de morte celular mesmo na concentração de 2.000 μM (viabilidade celular maior que 80%) (TSUBOY *et al.*, 2007). Os dados aqui apresentados mostram que em concentrações inferiores às testadas anteriormente, o corante DB291 exerce efeitos sobre as mitocôndrias, o que pode explicar a apoptose observada por Tsuboy e colaboradores nas concentrações mais altas. Diante das observações acima, novos experimentos foram conduzidos para elucidar o mecanismo de ação do corante.

4.3 Hiperpolarização mitocondrial e produção de ATP induzidas pelo corante dinitrofenilazo puro

Considerando os efeitos observados no ensaio do XTT (**Figuras 12 e 18**), avaliou-se o potencial de membrana mitocondrial (ψ) em células HepG2 incubadas por 12 e 24 h com 5-100 μM do corante purificado (**Figura 19**).

O potencial de membrana mitocondrial é mantido pela respiração celular. É um reflexo do bombeamento de íons H^+ através da membrana interna da mitocôndria durante o processo de transporte de elétrons e fosforilação oxidativa, sendo a força motriz para produção de ATP e crítico para a manutenção das funções celulares (OROPESA *et al.*, 2011).

Um aumento da respiração mitocondrial nas células HepG2 incubadas com o corante DB291 puro era esperado em virtude da observação de aumento da atividade desidrogenase da cadeia respiratória (ensaio do XTT), o

que poderia resultar em aumento da produção de ATP e hiperpolarização mitocondrial (NAGY *et al.*, 2007).

De fato, como apresentado na **Figura 19**, houve aumento do $\Delta\Psi_m$ nas células expostas por 12 e 24 h a 50 e 100 μM do corante puro. Para a determinação do $\Delta\Psi_m$ foi utilizado o fluorocromo lipofílico catiônico iodeto de tetraclorotetraetilbenzimidazol carbocianina (JC-1) como descrito no item 3.8 de Materiais e Métodos. Esse fluorocromo tem sido amplamente utilizado para triagem de compostos que provocam alterações do potencial de membrana mitocondrial (FACOMPRÉ *et al.*, 2000; WAGNER *et al.*, 2008; RANA *et al.*, 2010). Nas **Figuras 20** e **21** são apresentadas imagens obtidas por sistema de *High-Content Imaging* (Molecular Devices, USA) de células HepG2 incubadas com JC-1 e expostas por 24 h ao corante dinitrofenilazo purificado. Na **Figura 20** é exibida a formação dose-dependente de agregados vermelhos, que representam mitocôndrias com alto potencial de membrana (Filtro Cy3, $\lambda_{\text{exc.}} = 520/570 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{emi.}} = 570/610 \text{ nm}$). A **Figura 21** mostra células HepG2 expostas a 100 μM do corante dinitrofenilazo purificado e seu respectivo controle, são observados a forma monomérica e agregados de JC-1 (Filtro FITC, $\lambda_{\text{exc.}} = 485 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{emi.}} = 535 \text{ nm}$; Filtro Cy3, $\lambda_{\text{exc.}} = 520/570 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{emi.}} = 570/610 \text{ nm}$).

Figura 19. Alteração do potencial de membrana mitocondrial em células HepG2 incubadas por 12 e 24 h com diferentes concentrações do corante dinitrofenilazo purificado (5, 10, 50 e 100 µM). Dados correspondem à média $\pm$ desvio padrão de um experimento conduzido em quadruplicata (10.000 eventos analisados por amostra). Asteriscos indicam que os valores são significativamente diferentes do controle, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. FL1 ($\lambda_{exc.} = 488$ nm; $\lambda_{emi.} = 525$ nm), correspondente a mitocôndrias com baixo potencial de membrana que mantêm JC-1 na forma monomérica, de coloração verde. FL2 ($\lambda_{exc.} = 488$ nm; $\lambda_{emi.} = 575$ nm), correspondente a mitocôndrias ativas com alto potencial de membrana que formam agregados JC-1, de coloração vermelha.

Figura 20. Alteração do potencial de membrana mitocondrial em células HepG2 incubadas por 24 h com diferentes concentrações do corante dinitrofenilazo purificado. **A:** Controle (0,5% DMSO); **B-E:** 5, 10, 50, 100 μM do corante. Dados foram obtidos por sistema de *High-Content Imaging* (Molecular Devices, USA) e correspondem a mitocôndrias ativas com alto potencial de membrana que formam agregados JC-1, de coloração vermelha, filtro Cy3 ($\lambda_{\text{exc.}}$ = 520/570 nm; $\lambda_{\text{emi.}}$ = 570/610 nm)

Figura 21. Alteração do potencial de membrana mitocondrial em células HepG2. **A:** Células do grupo controle; **B:** Células expostas a 100 μM do corante dinitrofenilazo purificado por 24 h. As imagens foram obtidas por sistema de *High-Content Imaging* (Molecular Devices, USA). Filtro FITC ($\lambda_{\text{exc.}}$ = 485 nm; $\lambda_{\text{emi.}}$ = 535 nm), correspondente a mitocôndrias com baixo potencial de membrana que mantêm JC-1 na forma monomérica, de coloração verde. Filtro Cy3 ($\lambda_{\text{exc.}}$ = 520/570 nm; $\lambda_{\text{emi.}}$ = 570/610 nm), correspondente a mitocôndrias ativas com alto potencial de membrana que formam agregados JC-1, de coloração vermelha.

A hiperpolarização mitocondrial e altos níveis de ATP parecem ser eventos importantes para a organização da rede de microtúbulos apoptótica e sua manutenção durante a apoptose. Quando ocorre a despolarização mitocondrial e os níveis de ATP caem, a rede de microtúbulos é desorganizada, havendo aumento da permeabilidade da membrana plasmática. Esse aumento de permeabilidade pode ser avaliado pela liberação de lactato desidrogenase para o meio de cultura e pelo aumento dos níveis de cálcio intracelular. Uma intensa despolarização mitocondrial leva a célula à necrose secundária, apesar de serem mantidas algumas das características típicas de células apoptóticas, como núcleo fragmentado e ativação residual de caspases. Alterações do $\Delta\Psi_m$ podem, dessa forma, refletir o estado bioenergético de células apoptóticas (OROPESA *et al.*, 2011). Durante a apoptose, uma hiperpolarização mitocondrial inicial tem sido descrita. Em seguida, a despolarização mitocondrial é relacionada à abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial e consequente liberação de proteínas pró-apoptóticas para o citoplasma, desencadeando a ativação de caspases e morte celular (OROPESA *et al.*, 2011). Tanto hiperpolarização como despolarização mitocondrial estão envolvidas no desenvolvimento de doenças importantes, incluindo uma variedade de desordens neurológicas e cardíacas (LYON *et al.*, 2010).

Uma vez que o ensaio da lactato desidrogenase não revelou liberação dessa enzima para o meio de cultura (**Figura 14**) e o corante induziu morte celular nas concentrações de 50 e 100 μM após 24 h (**Figura 11**), os dados de alteração do Ψ sugerem que a maioria das células em processo de morte estejam na fase de execução da apoptose, com a rede de microtúbulos

apoptótica organizada, durante o período inicial de 24 h de exposição. Apesar de no período inicial de 12 h de exposição a 50 μ M do corante DB291 puro não ser observada morte significativa das células (**Figura 17**), o Ψ encontra-se elevado em relação ao controle (**Figura 19**), assim como a atividade desidrogenase da cadeia respiratória (**Figura 18**). Uma possível sequência de eventos induzida pelo corante DB291 em células HepG2 seria a ativação da cadeia de transporte de elétrons com aumento da síntese de ATP e hiperpolarização mitocondrial, levando à morte das células por apoptose.

Dando continuidade às observações de aumento do potencial de membrana mitocondrial nas células incubadas com o corante DB291, foram avaliados os níveis de ATP. Níveis de ATP elevados durante a apoptose têm sido descritos por diferentes pesquisadores (ATLANTE *et al.*, 2005; ZAMARAEVA *et al.*, 2005; OROPESA *et al.*, 2011). É sugerido que a hiperpolarização mitocondrial seja consequência de níveis intracelulares altos de ATP. O complexo FoF1-ATPase utiliza o gradiente eletroquímico através da membrana interna da mitocôndria para converter ADP a ATP durante a fosforilação oxidativa. Entretanto, quando a razão ATP/ADP se torna alta na matriz mitocondrial, o complexo FoF1-ATPase atua de forma reversa, consumindo ATP e bombeando íons H^+ da matriz para o espaço intermembranas, o que leva à hiperpolarização (OROPESA *et al.*, 2011). Dessa forma, para adequada caracterização do processo apoptótico foram determinados os níveis de ATP nas células expostas ao corante DB291. Na **Figura 22** são apresentados os níveis de ATP nas células expostas às diferentes concentrações do corante, sendo evidenciado aumento em relação ao controle nas incubações com 5 a 100 μ M do corante.

Figura 22. Níveis de ATP determinados por quimioluminescência (*kit* luciferina/luciferase) em células HepG2 expostas a diferentes concentrações do corante DB291 por 24 h, N = 5. Asteriscos indicam que os valores são significativamente diferentes do controle, *** $p < 0,001$.

4.4 Elevação do cálcio intracelular induzida pelo corante dinitrofenilazo puro

Durante a apoptose, e principalmente com a queda do Ψ , ocorre liberação de Ca^{2+} da matriz mitocondrial e influxo de Ca^{2+} a partir do meio, o que leva a aumento do Ca^{2+} intracelular (OROPESA *et al.*, 2011). O íon Ca^{2+} é considerado um importante mediador envolvido nos mais distintos processos biológicos (secreção, motilidade, metabolismo e divisão celular). Apresenta a função de mensageiro intracelular e interfere nos processos de transcrição de genes e apoptose (ALMEIDA, 1997).

Níveis elevados de Ca^{2+} intracelular têm importante papel na morte celular induzida por diferentes agentes, incluindo oxidantes. É sugerido que o aumento do Ca^{2+} intracelular leve a estresse oxidativo, dano mitocondrial, ativação de enzimas dependentes de cálcio (dentre elas NO sintase neuronal, endotelial, mitocondrial) e indução de morte celular (FROSALI *et al.*, 2009). Dado esse papel importante da homeostase de Ca^{2+} , foram verificados os níveis de Ca^{2+} intracelular nas células incubadas com o corante DB291 puro.

A determinação do Ca^{2+} intracelular foi feita através da marcação com o fluoróforo Fluo-3 AM, conforme descrito no item **3.9** de Materiais e Métodos. O Fluo-3 AM é uma substância hidrofóbica, permeável somente em células vivas, comumente utilizado como marcador de cálcio intracelular (PEREIRA *et al.*, 2010; CALDERÓN-SÁNCHEZ *et al.*, 2011; KAWANAI *et al.*, 2011). Uma vez dentro da célula, os grupos lipofílicos do Fluo 3-AM, que estão bloqueados, são clivados por esterases resultando em um corante fluorescente de carga negativa, o Fluo-3. Na presença de cálcio a fluorescência do Fluo-3 é ampliada ($\lambda_{\text{exc.}} = 488 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{emi.}} = 525 \text{ nm}$), fornecendo um indicador ideal para a mensuração dos níveis de cálcio intracelular.

Nas **Figuras 23 e 24** são apresentados os resultados obtidos por citometria de fluxo das células da linhagem HepG2 incubadas por 24 h com o corante dinitrofenilazo purificado. Foi observado que a intensidade de fluorescência aumentou de modo dose-dependente na faixa de concentração testada (5 -100 μM) caracterizando um aumento na concentração de Ca^{2+} no interior celular.

Figura 23. Análise do Ca^{2+} intracelular, através da intensidade de fluorescência do composto Fluo-3 AM, por citometria de fluxo após tratamento de células HepG2 por 24 h com diferentes concentrações do corante dinitrofenilazo purificado (5, 10, 50 e 100µM). Dados correspondem à média $\pm$ desvio padrão de um experimento conduzido em triplicata (10.000 eventos analisados por amostra). Asteriscos indicam que os valores são significativamente diferentes do controle, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

Figura 24. Histogramas da intensidade de fluorescência do composto Fluo-3 AM, marcador de cálcio intracelular, obtida por citometria de fluxo após tratamento de células HepG2 por 24 h com diferentes concentrações do corante dinitrofenilazo purificado (5, 10, 50 e 100µM). As análises foram conduzidas pelo monitoramento da intensidade de fluorescência de 10.000 eventos por amostra, no canal *FITC* ($\lambda_{exc.} = 488 \text{ nm}$; $\lambda_{emi.} = 525 \text{ nm}$).

As mitocôndrias estão envolvidas na homeostase de Ca^{2+} . Há evidências de que o acúmulo de Ca^{2+} em mitocôndrias em episódios de sobrecarga celular de Ca^{2+} inicia uma cascata de eventos que culminam em morte celular (DUCHEN, 2000; BERNARDI E RASOLA, 2007). É conhecido que a captura de Ca^{2+} pelas mitocôndrias estimula desidrogenases da matriz acopladas ao ciclo do ácido tricarboxílico. Essa atividade fornece substratos para a respiração mitocondrial, que pode promover um aumento do $\Delta\Psi_m$ (ROBB-GASPERS *et al.*, 1998; FROSALI *et al.*, 2009). Dessa forma, o aumento observado da concentração de Ca^{2+} intracelular nas incubações com o corante DB291 puro pode levar à captura de Ca^{2+} pelas mitocôndrias, estímulo da respiração, síntese de ATP e, conseqüentemente, hiperpolarização mitocondrial. Tais eventos constituem alterações precoces associadas à morte celular induzida pelo corante DB291 nas concentrações testadas.

4.5 Estresse oxidativo, fragmentação do DNA e alterações do ciclo celular induzidos pelo corante DB291 puro

Considerando que (i) alterações da função mitocondrial levam geralmente ao aumento da geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e que (ii) a membrana mitocondrial hiperpolarizada pode aumentar o vazamento de elétrons da cadeia respiratória, levando a passos de redução monoeletrônica do oxigênio molecular, avaliou-se a geração intracelular de ROS e o dano oxidativo induzido pelo corante DB291 puro.

O estresse oxidativo é definido como uma condição biológica em que ocorre desequilíbrio entre a produção de ROS e a sua detoxificação, através de sistemas biológicos que as removam. Perturbações neste equilíbrio redox podem provocar danos a todos os componentes celulares, incluindo biomoléculas como DNA, lipídios e proteínas. Esses danos, se não reparados, acabam comprometendo o funcionamento da célula, promovendo injúria e morte (apoptose ou necrose).

A verificação de estresse oxidativo induzido pelo corante foi monitorada quantitativamente por análise de fluorescência do produto 2',7'-diclorofluoresceína (DCF) resultante da oxidação de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (DCFH) intracelularmente. As células foram incubadas com 2',7'-diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA), o qual se acumula no citosol e é desacetilado por esterases para 2',7'-diclorodihidrofluoresceína o qual pode ser, então, oxidado por radicais livres gerados intracelularmente, como $RO_2^{\cdot}$, $RO^{\cdot}$, $NO_2^{\cdot}$, $CO_3^{\cdot-}$ e $HO^{\cdot}$. As células da linhagem HepG2 foram expostas por 30 min, 3 h e 24 h a concentrações crescentes do corante dinitrofenilazo purificado, conforme descrito no item **3.11** de Materiais e Métodos. Os resultados obtidos, referentes a fluorescência do produto DCF gerado nos tratamentos com o corante dinitrofenilazo, estão apresentados na **Figura 25**.

Figura 25. Análise da intensidade de fluorescência do produto DCF (indicador geral de estresse oxidativo), após tratamento de células HepG2 com diferentes concentrações do corante dinitrofenilazo purificado (5, 10, 50 e 100 µM). Dados correspondem à média $\pm$ desvio padrão de um experimento conduzido em quintuplicata. Asteriscos indicam que os valores são significativamente diferentes do controle, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ *** $p < 0,0001$.

Com 30 min de exposição não foi observada diferença entre os grupos tratados com o corante dinitrofenilazo e o grupo controle. Após 3 h de exposição, a maior concentração testada (100 µM) mostrou-se estatisticamente diferente do grupo controle ($p < 0,05$). A intensidade de DCF gerada aumenta significativamente em todas as concentrações testadas (5, 10, 50 e 100 µM), após 24 h de exposição, caracterizando um efeito dose-dependente. Tal observação mostra que a geração intracelular de ROS é um evento inicial na citotoxicidade induzida pelo corante DB291 puro. A **Figura 26** apresenta imagens de microscopia de fluorescência das células HepG2 tratadas por 24 h com 100 µM do corante dinitrofenilazo purificado e seu respectivo controle

(DMSO 0,5%, v:v), marcadas com a sonda fluorogênica *DCFH*. As imagens foram obtidas com $\lambda_{\text{emi.}} = 530$ nm e $\lambda_{\text{exc.}} = 488$ nm. É possível observar um nítido aumento de intensidade de fluorescência intracelular no grupo tratado em relação ao controle, indicando o aumento da formação de ROS.

Figura 26. Análise por microscopia de fluorescência de células HepG2 incubadas com a sonda fluorogênica *DCFH* ($\lambda_{\text{emi.}} = 530$ nm e $\lambda_{\text{exc.}} = 488$ nm). A. Controle (DMSO 0,5%; v:v). B. 100 μM do corante dinitrofenilazo purificado. Período de exposição foi de 24 h.

Analisando os dados obtidos nos ensaios do XTT, ψ , ATP e Ca^{2+} , que apontam alterações no metabolismo mitocondrial após a exposição ao corante dinitrofenilazo, podemos relacionar a indução da formação de ROS com o processo de respiração celular exacerbado, devido a mitocôndrias mais ativas e hiperpolarizadas. A **Figura 27** ilustra a relação entre morte celular, aumento da atividade mitocondrial, aumento dos níveis de ATP e aumento da produção de ROS em células expostas a diferentes concentrações do corante dinitrofenilazo purificado (5, 10, 50 e 100 μM), pelo período de 24 h.

Figura 27. Relação entre morte celular, aumento da atividade mitocondrial, aumento da produção de ATP e aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) em células expostas a diferentes concentrações do corante dinitrofenilazo purificado (5, 10, 50 e 100 μM), por um período de 24 h. Valores expressos relativos ao controle (células HepG2 + DMSO, 100%).

Um possível efeito da geração intracelular de ROS é a indução de fragmentação do DNA, um evento importante que, além de levar as células à morte, pode levar a mutações e aberrações cromossômicas. Avaliou-se, portanto, a integridade do DNA das células expostas ao corante DB291 através da marcação fluorescente com iodeto de propídio (PI). O PI se liga ao DNA de modo não específico, intercalando-se com os desoxinucleosídeos na estequiometria de uma molécula de PI para cada 4-5 pares de bases. Quando o PI se liga aos ácidos nucleicos, sua fluorescência aumenta aproximadamente 25 vezes, com $\lambda_{exc.}$ máximo deslocado ~40 nm para o vermelho e λ_{emi} deslocado ~15 nm para o azul. Devido ao seu alto peso molecular, o PI não atravessa a membrana plasmática. Portanto, foi utilizada nos experimentos a solução hipotônica à base de triton e citrato de sódio, que permeabiliza a membrana plasmática garantindo a entrada do corante na célula. O PI também é passível de conjugação com o RNA, tal característica pode acarretar em um déficit de especificidade, interferindo no processo de análise. Portanto, foi necessário realizar um tratamento das células com a enzima ribonuclease A antes da realização das leituras por citometria de fluxo (SUZUKI *et al.*, 1997; FACOMPRÉ *et al.*, 2000; IACOMINO *et al.*, 2006). As células da linhagem HepG2 foram expostas por 24 h a concentrações crescentes do corante dinitrofenilazo purificado, como descrito no item **3.12** de Materiais e Métodos e a mensuração da intensidade de fluorescência ($\lambda_{exc.} = 488$ nm; $\lambda_{emi.} = 695$ nm) foi realizada por citometria de fluxo.

A **Figura 28** mostra os histogramas representativos da fluorescência do PI ligado ao DNA. Os resultados obtidos das incubações de células HepG2 com o corante dinitrofenilazo purificado são ilustrados na **Figura 29**. Foi

observado um aumento de fragmentação do DNA na concentração de 100 μ M em relação ao nível basal do controle, embora seja um aumento pequeno.

Os dados anteriores sugerem que a maioria das células em processo de morte estejam numa fase inicial de apoptose. Dessa forma, não seria esperada intensa fragmentação do DNA, a qual ocorre tardiamente no processo apoptótico (ORRENIUS, 2004; KASS, 2006; WLODKOWIC *et al.*, 2011). Pode-se dizer que as células incubadas com o corante *dinitrofenilazo* purificado ainda não atingiram um estágio apoptótico avançado, quando seria possível observar uma fragmentação acentuada do DNA. A fragmentação observada na maior concentração pode ser relacionada à maior geração de ROS induzida pelo corante DB291.

Figura 28. Histogramas da intensidade de fluorescência do iodeto de propídio (PI) ligado ao DNA obtidos por citometria de fluxo após incubação de células HepG2 por 24 h com diferentes concentrações do corante dinitrofenilazo purificado (5, 10, 50 e 100 μ M). As análises foram conduzidas pelo monitoramento da intensidade de fluorescência de 10.000 eventos por amostra, no canal *PerCP-Cy5-5* ($\lambda_{exc.}$ = 488 nm; $\lambda_{emi.}$ = 695 nm).

Figura 29. Análise da fragmentação do DNA através da intensidade de fluorescência do iodeto de propídio (PI) ligado ao DNA. Os dados foram obtidos por citometria de fluxo após tratamento das células HepG2 por 24 h com diferentes concentrações do corante dinitrofenilazo purificado (5, 10, 50 e 100 µM). Dados correspondem à média $\pm$ desvio padrão de um experimento conduzido em quadruplicata (10.000 eventos analisados por amostra). Asteriscos indicam que os valores são significativamente diferentes do controle, ** $p < 0,01$.

Concomitantemente, foi observada parada do ciclo celular em G0/G1 quando as células foram incubadas com 10 e 50 µM do corante puro, enquanto 100 µM do corante puro levou à parada na fase G2/M (**Figuras 30 e 31**). A parada em G2/M pode ser resultado do acúmulo de danos celulares, uma vez que coincide com a pronunciada hiperpolarização mitocondrial (**Figura 19**), aumento na produção de ATP (**Figura 22**), elevação do Ca^{2+} intracelular (**Figura 23**), indução da geração intracelular de ROS (**Figura 25**) e aumento da fragmentação do DNA (**Figura 29**). Foi observado também que nas concentrações de 50 e 100 µM do corante puro houve uma diminuição das

células em fase S, que corresponde ao período de síntese do DNA. Parada na replicação do DNA pode ser associada à ocorrência de lesões em DNA.

Estudos cinéticos do ciclo celular demonstraram que o bloqueio da progressão do ciclo na fase G2/M é um requisito para a deflagração da apoptose (LIU *et al.*, 2005). Considerando que a homeostase mitocondrial desempenha um papel importante nessa regulação, podemos dizer que os efeitos do corante DB291 sobre as mitocôndrias estão relacionados com a parada no ciclo celular, conforme o observado por outros autores em diferentes tipos de linhagens celulares (LI *et al.*, 1999; FACOMPRÉ *et al.*, 2000; LIU *et al.*, 2005).

Figura 30. Histogramas da intensidade de fluorescência do complexo PI+DNA, após incubação de células HepG2 por 24 h com diferentes concentrações do corante dinitrofenilazo purificado (5, 10, 50 e 100 μM), sendo A: G0/G1; B: S; C: G2/M.

Figura 31. Análise da distribuição das células nas fases do ciclo celular. Dados obtidos por citometria de fluxo após incubação de células HepG2 por 24 h com diferentes concentrações do corante dinitrofenilazo purificado (5, 10, 50 e 100 μ M). Dados correspondem à média $\pm$ desvio padrão de um experimento conduzido em quadruplicata (10.000 eventos analisados por amostra). Asteriscos indicam que os valores são significativamente diferentes do controle, * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$.

4.6 Espectro de dicroísmo circular do DNA de células HepG2 expostas ao corante dinitrofenilazo purificado

Dicroísmo circular é a medida espectroscópica da absorbância diferencial entre duas rotações (horário/anti-horário) de luz circularmente polarizada por uma molécula assimétrica. É rotineiramente utilizada para a caracterização estrutural de moléculas. De modo geral, xenobióticos podem interagir com o DNA de forma covalente ou não covalente, se intercalando entre as bases e consequentemente alterando o espectro de absorbância.

O espectro de dicroísmo circular do DNA genômico de células expostas ao corante dinitrofenilazo (100 μ M), como descrito em **3.14** de Materiais e Métodos, foi obtido através de análise em um espectropolarímetro (Central Analítica – IQ/USP). A **Figura 32** apresenta os espectros de dicroísmo circular obtidos. No intervalo de 216 a 237 nm o grupo tratado apresentou um deslocamento quando comparado com o grupo controle. A alteração observada pode ser um reflexo da interação de moléculas do corante ou de seus produtos de biotransformação com o DNA. Entretanto, em análises do DNA hidrolisado enzimaticamente por HPLC-DAD-Fluorescência ou HPLC-DAD-ESI-MS não foi possível detectar a formação de adutos dos desoxirribonucleosídeos com o corante DB291.

Figura 32. Espectros de dicroísmo circular do DNA de células HepG2 expostas por 24 h ao corante dinitrofenilazo purificado (100 μ M, 0,25% DMSO, v:v) e do respectivo controle.

4.7 Análise de danos ao DNA devido ao estresse oxidativo

O aumento da produção endógena de ROS pode levar ao aumento de dano gerado oxidativamente ao DNA, lipídios e proteínas, desencadeando uma maior propensão ao surgimento de mutações. O desenvolvimento de métodos analíticos suficientemente sensíveis para a quantificação de lesões em DNA é de grande importância para a avaliação de risco de desenvolvimento de doenças relacionadas à exposição a substâncias que podem danificar o DNA.

Para avaliar o dano oxidativo induzido pelo corante DB291 puro em células HepG2, foram quantificadas as lesões 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina (8-oxodG), 1, N^2 -eteno-2'-desoxiguanosina (1, N^2 - ϵ dG) e 1, N^6 -eteno-2'-deoxiadenosina (1, N^6 - ϵ dA) no DNA das células por HPLC-ESI-MS/MS. A completa validação do método utilizado é descrita abaixo.

4.7.1 Validação do método para quantificação simultânea de 8-oxodG, 1, N^6 - ϵ dA e 1, N^2 - ϵ dG em DNA por HPLC-ESI-MS/MS-MRM

Para a validação do método, os padrões 8-oxodG e 1, N^6 - ϵ dA foram obtidos comercialmente, o padrão 1, N^2 - ϵ dG é proveniente de um estoque disponível no laboratório, sintetizado e purificado anteriormente pela Prof^a. Dr^a. Ana Paula de Melo Loureiro (Faculdade de Ciências Farmacêuticas, FCF-USP, São Paulo, Brasil), os padrões [$^{15}\text{N}_5$]-8-oxodG e [$^{15}\text{N}_5$]-1, N^6 - ϵ dA foram sintetizados e purificados, e o padrão [$^{15}\text{N}_5$]-1, N^2 - ϵ dG foi gentilmente doado pela Prof^a. Dr^a. Marisa Helena Gennari de Medeiros (Instituto de Química, IQ-

USP, São Paulo, Brasil). O uso de padrões isotópicos é requisito para uma quantificação precisa das lesões, compensando as perdas dos analitos durante a preparação da amostra e os efeitos da matriz.

Para obtenção do padrão [$^{15}\text{N}_5$]8-oxodG foram realizadas reações de oxidação de uma solução de [$^{15}\text{N}_5$]-dG com sulfato de cobre, ácido ascórbico e peróxido de hidrogênio, como descrito no item **3.17.1** de Materiais e Métodos. O pico com λ_{max} em 294 nm foi coletado e purificado, a concentração foi determinada pela absorbância em 294 nm ($\epsilon_{294\text{nm}} = 9700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). No final do processo foi obtida uma solução de padrão [$^{15}\text{N}_5$]-8-oxodG (500 μL) com concentração de 36,1 pmol/ μL . Para síntese do padrão [$^{15}\text{N}_5$]-1, N^6 - ϵ dA foram realizadas incubações de [$^{15}\text{N}_5$]-dA com cloroacetaldeído, como descrito no item **3.17.2** de Materiais e Métodos. O pico com λ_{max} em 275 nm foi coletado e purificado, a concentração foi determinada pela absorbância em 260 nm ($\epsilon_{260\text{nm}} = 10300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) e foi obtida uma solução de padrão [$^{15}\text{N}_5$]-1, N^6 - ϵ dA (200 μL) com concentração de 3,2 nmol/ μL . A identidade e a pureza isotópica dos padrões foram confirmadas por análises de HPLC-ESI-MS/MS-MRM. Nas **Figuras 33, 34 e 35** são apresentados os cromatogramas nos quais se observam as purezas dos padrões sintetizados.

Figura 33. Cromatogramas e espectro de absorvância do padrão $[^{15}\text{N}_5]$ -8-oxodG, obtidos por HPLC-DAD como descrito no item 3.17.1. **A.** Produtos da reação de $[^{15}\text{N}_5]$ -dG com sulfato de cobre, ácido ascórbico e peróxido de hidrogênio. **B.** Padrão $[^{15}\text{N}_5]$ -8-oxodG purificado.

Figura 34. Cromatogramas e espectro de absorvância do padrão $[^{15}\text{N}_5]\text{1},N^6\text{-}\epsilon\text{dA}$, obtidos por HPLC-DAD como descrito no item 3.17.2. **A.** Produtos da reação de $[^{15}\text{N}_5]\text{-dA}$ com cloroacetaldeído. **B.** Padrão $[^{15}\text{N}_5]\text{-1},N^6\text{-}\epsilon\text{dA}$ purificado.

Figura 35. Cromatogramas e espectro de absorvância do padrão $[^{15}\text{N}_5]1, N^2\text{-}\epsilon\text{dG}$, obtidos por HPLC-DAD como descrito no item 3.17.2. **A.** Produtos da reação de $[^{15}\text{N}_5]\text{dG}$ com cloroacetaldeído. **B.** Padrão $[^{15}\text{N}_5]1, N^2\text{-}\epsilon\text{dG}$ purificado.

4.7.2 SPE online

Considerando a sensibilidade dos métodos analíticos e sabendo-se que os níveis basais dos etenoadutos em amostras de DNA estão na ordem de 5-200 lesões para cada 10^8 dos respectivos desoxinucleosídeos, decidiu-se utilizar 80 μg de DNA para a realização das análises das lesões. Entretanto, a dimensão da coluna analítica utilizada não permitia a injeção dessa quantidade de DNA no sistema cromatográfico, uma vez que injeções com mais de 40 μg de DNA acabavam por saturar a coluna, ocasionando coeluição e consequentemente perda de sensibilidade. Uma alternativa seria a realização de extração em fase sólida para pré-purificação dos adutos das amostras de DNA, eliminando interferências dos desoxinucleosídeos normais no método cromatográfico. Uma desvantagem dessa pré-purificação é a impossibilidade de quantificar a 8-oxodG nas amostras que passam por SPE, uma vez que essa lesão é eluída dos cartuchos juntamente com os desoxinucleosídeos normais na condição utilizada. Para evitar a perda da 8-oxodG e realizar a detecção simultânea dos etenoadutos, foi utilizado um sistema de SPE *online* (**Figura 7**) como descrito no item 3.17.4 de Materiais e Métodos. Nesse sistema a separação cromatográfica é realizada em uma primeira coluna (50 mm x 4,6 mm ID, 2.6 μm) de menor tamanho que possibilita a injeção de até 100 μg de DNA. Uma válvula de comutação de fluxo é integrada a essa coluna e atua direcionando para o descarte ou para uma segunda coluna (150 mm x 2,0 mm ID, 3,0 μm) as frações cromatográficas desejadas. A segunda coluna está conectada ao espectrômetro de massas. Esse sistema permite que grandes quantidades de DNA sejam injetadas no sistema, garantindo a sensibilidade e a resolução analítica.

4.7.3 Linearidade

As curvas de calibração foram lineares nas faixas de concentração estudadas para as lesões analisadas: 8-oxodG (50 a 2000 fmol), 1, N^6 - ϵ dA (0,5 a 100 fmol) e 1, N^2 - ϵ dG (1 a 100 fmol).

As curvas de calibração, as equações de regressão linear e os coeficientes de determinação (R^2) são apresentados nas **Figuras 36, 37 e 38**, sendo que **Y** representa a área relativa (relação entre a área do pico correspondente à lesão e a área do padrão interno isotópico) e **X** corresponde à quantidade da lesão (fmol).

Figura 36. Curva de calibração da lesão 8-oxodG, obtida por HPLC-ESI-MS/MS-MRM, como descrito em 3.17.4 de Materiais e Métodos

Figura 37. Curva de calibração da lesão $1,N^6\text{-}\epsilon\text{dA}$, obtida por HPLC-ESI-MS/MS-MRM, como descrito em 3.17.4 de Materiais e Métodos.

Figura 38. Curva de calibração da lesão $1,N^2\text{-}\epsilon\text{dG}$, obtida por HPLC-ESI-MS/MS-MRM, como descrito em 3.17.4 de Materiais e Métodos.

4.7.4 Limites de quantificação, exatidão e coeficientes de variação

Os dados de validação do método utilizando o **Sistema Cromatográfico 8** de HPLC-ESI-MS/MS-MRM com SPE *online* estão descritos nas **Tabelas 1, 2 e 3**. Foram utilizados 50 µg de DNA de timo de bezerro, obtido comercialmente, contaminado com quantidades conhecidas dos adutos no volume de injeção: 8-oxodG (50, 100 e 200 fmol), 1,*N*⁶-εdA e 1,*N*²-εdG (10, 20 e 40 fmol), como descrito no item **3.17.5** de Materiais e Métodos.

O método mostrou-se preciso e exato, com excelente concordância entre os níveis adicionados e os quantificados para os três analitos. Os gráficos estão apresentados na **Figura 39**: 8-oxodG (R^2 : 0,9998), 1,*N*⁶-εdA (R^2 : 0,9957), 1,*N*²-εdG (R^2 : 0,9981), com uma média de coeficiente de variação de 5,61%. Os limites de quantificação para os padrões injetados na coluna foram: 8-oxodG, 10 fmol; 1,*N*²-εdG, 1 fmol; 1,*N*⁶-εdA, 0,1 fmol. Nas **Figuras 40, 41 e 42** são apresentados os cromatogramas obtidos por HPLC-ESI-MS/MS-MRM do DNA de timo de bezerro contaminado com as quantidades indicadas dos padrões e hidrolisado enzimaticamente.

Tabela 1. Exatidão e coeficiente de variação do método de HPLC-ESI-MS/MS para a quantificação da lesão 8-oxodG, como descrito em **3.17.4** de Materiais e Métodos.

Validação do método para quantificação de 8-oxodG (50 µg DNA; N=3)					
8-oxodG basal (fmol/média±DP)	Adição de 8-oxodG (fmol)	8-oxodG detectado (fmol/média±DP)	Média (-)Basal (fmol 8-oxodG)	Exatidão (%)	C.V. (%)
913,60 ± 35,70	0	913,60 ± 94,88	0	---	10,38
898,43 ± 13,16	50	948,29 ± 29,78	49,86	99,70	3,14
892,99 ± 06,73	100	993,60 ± 22,59	100,61	100,60	2,27
941,15 ± 84,10	200	1108,9 ± 16,05	195,69	97,80	1,30

Tabela 2. Exatidão e coeficiente de variação do método de HPLC-ESI-MS/MS para a quantificação da lesão 1,*N*⁶-εdA, como descrito em 3.17.4 de Materiais e Métodos.

Validação do método para quantificação de 1, <i>N</i> ⁶ -εdA (50 µg DNA; N=3)					
1, <i>N</i> ⁶ -εdA basal (fmol/média±DP)	Adição de 1, <i>N</i> ⁶ -εdA (fmol)	1, <i>N</i> ⁶ -εdA detectado (fmol/média±DP)	Média (-)Basal (fmol 1, <i>N</i> ⁶ -εdA)	Exatidão (%)	C.V. (%)
2,21 ± 0,105	0	2,21 ± 0,222	0	---	10,08
2,17 ± 0,027	10	13,35 ± 0,557	10,18	101,80	4,51
2,16 ± 0,026	20	24,02 ± 0,547	21,85	109,26	2,28
2,41 ± 0,218	40	41,42 ± 0,491	39,02	97,54	1,18

Tabela 3. Exatidão e coeficiente de variação do método de HPLC-ESI-MS/MS para a quantificação da lesão 1,*N*²-εdG, como descrito em 3.17.4 de Materiais e Métodos.

Validação do método para quantificação de 1, <i>N</i> ² -εdG (50 µg DNA; N=3)					
1, <i>N</i> ² -εdG basal (fmol/média±DP)	Adição de 1, <i>N</i> ² -εdG (fmol)	1, <i>N</i> ² -εdG detectado (fmol/média±DP)	Média (-)Basal (fmol 1, <i>N</i> ² -εdG)	Exatidão (%)	C.V. (%)
1,14 ± 0,053	0	1,14 ± 0,127	0	---	11,22
1,12 ± 0,017	10	10,84 ± 0,191	9,72	97,17	1,76
1,11 ± 0,011	20	22,43 ± 2,101	21,31	106,56	9,36
1,12 ± 0,017	40	46,44 ± 4,499	45,32	113,30	9,98

Figura 39. Níveis adicionados e quantificados das lesões 8-oxodG, 1,N⁶-εdA e 1,N²-εdG. Dados obtidos por HPLC-ESI-MS/MS-MRM, como descrito em 3.17.4 de Materiais e Métodos.

Figura 40. Cromatogramas mostrando a detecção de 8-oxodG em DNA de timo de bezerro (comercial). Dados obtidos por HPLC-ESI-MS/MS-MRM, como descrito em 3.17.4 de *Materiais e Métodos*. **A.** 50 μ g de DNA, nível basal de 8-oxodG. **B.** 50 μ g de DNA contaminado com 100 fmol de 8oxodG.

$1,N^6\text{-}\epsilon\text{dA}$

Figura 41. Cromatogramas mostrando a detecção de $1,N^6\text{-}\epsilon\text{dA}$ em DNA de timo de bezerro (comercial). Dados obtidos por HPLC-ESI-MS/MS-MRM, como descrito em 3.17.4 de Materiais e Métodos. **A.** 50 μg de DNA, nível basal de $1,N^6\text{-}\epsilon\text{dA}$. **B.** 50 μg de DNA contaminado com 20 fmol de $1,N^6\text{-}\epsilon\text{dA}$.

$1,N^2\text{-}\epsilon\text{dG}$

Figura 42. Cromatogramas mostrando a detecção de $1,N^2\text{-}\epsilon\text{dG}$ em DNA de timo de bezerro (comercial). Dados obtidos por HPLC-ESI-MS/MS-MRM, como descrito em **3.17.4** de *Materiais e Métodos*. **A.** 50 μg de DNA, nível basal de $1,N^2\text{-}\epsilon\text{dG}$. **B.** 50 μg de DNA contaminado com 20 fmol de $1,N^2\text{-}\epsilon\text{dG}$.

4.7.5 Análise de lesões em DNA de células HepG2 expostas ao corante dinitrofenilazo puro

O produto de oxidação do DNA mais extensivamente estudado é a 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina (8-oxodG), lesão gerada pela oxidação monoelétrica da guanina e pelo ataque do radical hidroxila ($\cdot\text{OH}$) ou oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) à guanina no DNA (CADET *et al.*, 2008). Essa lesão apresenta grande importância biológica, uma vez que pode causar emparelhamento errôneo, gerando uma transversão G→T ou bloqueando o processo de transcrição do DNA. Transversões G→T são encontradas em genes supressores de tumor e proto-oncogenes mutados (LOUREIRO *et al.*, 2002). A lesão 8-oxodG tem sido largamente utilizada como marcador de estresse oxidativo em estudos epidemiológicos e mecanísticos (BIANCHINI *et al.*, 2001; CADET *et al.*, 2008) e esforços têm sido feitos nos últimos anos para minimizar sua formação artefactual durante o preparo do DNA para análise (RAVANAT *et al.*, 2002; ESCODD, 2002; GEDIK *et al.*, 2004; MANGAL *et al.*, 2009).

O método que utilizamos para quantificação de 8-oxodG em DNA levou em consideração as precauções recomendadas para minimizar erros. Desferroxamina (0,1 mM) foi adicionada às soluções de extração e hidrólise do DNA, os passos de manipulação do DNA foram reduzidos e as amostras foram mantidas em gelo nos períodos entre as incubações. Tais precauções permitiram a obtenção de baixos níveis basais de 8-oxodG em DNA de células HepG2 controles ($3,80 \pm 0,58$ 8-oxodG/ 10^6 dG), os quais estão de acordo com a literatura atual (KNERR *et al.*, 2006; HANZALOVA *et al.*, 2010).

A partir dos dados obtidos nos ensaios de citotoxicidade, selecionaram-se as concentrações de 50 e 100 μM do corante dinitrofenilazo purificado (0,25% DMSO, v:v), sendo um ponto abaixo e outro acima do IC_{50} (74 μM), para incubações com células HepG2. O experimento foi realizado como descrito no item **3.13** de Materiais e Métodos. A exposição celular ocorreu por 24 h e, em seguida, o meio de cultura foi trocado, ficando as células mais 24 h na ausência do corante para avaliação da recuperação celular. Na **Figura 43** são apresentados os níveis de 8-oxodG no DNA celular. Foi possível observar um nítido aumento da formação dessa lesão nas células expostas à maior concentração testada do corante dinitrofenilazo (100 μM), em ambos os períodos: exposição e recuperação. Entretanto, no período de recuperação foi possível observar uma queda do nível de 8-oxodG em comparação ao período de exposição. A queda observada pode ser devida ao restabelecimento do ciclo celular com a remoção do corante, havendo diluição das lesões; ao reparo do DNA; ou à morte das células contendo as lesões. No entanto, o nível de 8-oxodGuo ainda encontra-se aumentado no DNA da nova geração celular (**Figura 43**).

Outras lesões de DNA que podem fornecer informações sobre a ocorrência de estresse oxidativo são os etenoadutos 1, N^2 - ϵ dG e 1, N^6 - ϵ dA formados a partir da reação de epóxidos de aldeídos α,β -insaturados com as bases guanina e adenina no DNA. Uma importante fonte desses aldeídos é o processo de peroxidação lipídica, que pode ser iniciado e propagado sob condições de estresse oxidativo (PANG *et al.*, 2007; MEDEIROS, 2009). A determinação simultânea de diferentes lesões de DNA na mesma amostra fornece mais dados sobre o mecanismo subjacente de toxicidade.

Na **Figura 44** são apresentados os níveis obtidos dos etenoadutos no DNA das células, não tendo sido possível observar a indução de dano em relação ao controle. Uma vez que a peroxidação lipídica leva à desorganização da membrana plasmática, acarretando perda de suas funções, a não observação de indução de formação de etenoadutos pelo corante DB291 está de acordo com a não observação de liberação de lactato desidrogenase para o meio de cultura das células (**Figura 14**). O estresse oxidativo desencadeado pelo corante DB291 não foi suficiente para levar à peroxidação lipídica capaz de acarretar a reação de aldeídos com o DNA.

Figura 43. Níveis de 8-oxodG em DNA de células HepG2 expostas por 24 h a 50 ou 100 µM do corante dinitrofenilazo purificado (0,25% DMSO, v:v) e 24 h após a troca do meio de cultura para remoção do corante. N=4. Asteriscos indicam que os valores são significativamente diferentes do controle, * $p < 0,05$. ** $p < 0,01$.

Figura 44. Níveis de etenoadutos em DNA de células HepG2 expostas por 24 h a 50 ou 100 μM do corante dinitrofenilazo purificado (0,25% DMSO, v:v) e 24 h após a troca do meio de cultura para remoção do corante. N=4.

4.8 Análise de 5-metil-dC em amostras de DNA celular

O padrão de metilação do DNA é considerado uma modificação epigenética estável do genoma, sendo herdado pelas gerações celulares subsequentes. No entanto, é cada vez mais evidente que o processo de metilação/demetilação do DNA é dinâmico, podendo ser modulado por diversos fatores (NIEHRS, 2009). Recentemente tem sido verificado o envolvimento dos mecanismos de reparo do DNA por excisão de bases (BER) e excisão de nucleotídeos (NER) no processo de desmetilação do DNA (GEHRING *et al.*, 2009; NEIHR, 2009; WANG *et al.*, 2012; HU *et al.*, 2012), o que sugere a existência de uma correlação entre níveis de lesões em DNA e a perda de 5-metil-dC do genoma (HU *et al.*, 2012).

Uma vez tendo sido verificada a indução de lesões no DNA das células expostas ao corante DB291, decidiu-se avaliar se essas células teriam alteração do nível global de metilação do DNA. Para isso, utilizou-se um método de HPLC-DAD para quantificação de 5-metil-dC. A completa validação do método analítico utilizado está descrita abaixo.

4.8.1 Validação do método analítico para quantificação de 5-metil-dC

Com o intuito de verificarmos se o corante DB291 poderia induzir alterações epigenéticas em células HepG2, foi realizada a validação de um método de HPLC-DAD para quantificação de 5-metil-dC em DNA. Para isso, o padrão 5-metil-dC foi obtido por purificação a partir de DNA de timo de bezerro hidrolisado enzimaticamente, como descrito no item **3.15.1** de Materiais e

Métodos. O pico com λ_{max} em 286 nm foi purificado e a concentração foi determinada pela absorbância em 277 nm ($\epsilon_{277 \text{ nm}} = 8500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Uma solução de padrão (2 mL) com concentração de 290 pmol/ μL foi obtida. A identidade do padrão foi confirmada por análises de HPLC-ESI-MS/MS. A **Figura 45 A** ilustra o espectro de massas obtido por dissociação induzida por colisão do íon $[\text{M} + \text{H}]^+$ com m/z 242. O pico com m/z 126 corresponde à perda de 116 Da (2'-desoxirribose) (**Figura 45 B**). Na **Figura 46** é apresentado o cromatograma no qual se observa a pureza do padrão 5-metil-dC. Em um experimento prévio, a separação cromatográfica por HPLC-DAD foi conduzida com um gradiente de água e CH_3OH , pH 7,0. Nesse sistema ocorre coeluição dos picos correspondentes a 5-metil-dC (λ_{max} 277 nm) e um subproduto da hidrólise enzimática do DNA (λ_{max} 254 nm), inviabilizando a análise. Para solucionar esse problema, foi utilizado o **Sistema Cromatográfico 4** descrito no item **3.15.3** de Materiais e Métodos, no qual a coluna foi eluída com um gradiente de ácido fórmico (0,1% em água) e CH_3OH , pH 2,6, sendo possível visualizar uma clara separação entre a 5-metil-dC (λ_{max} 286 nm) e os outros desoxinucleosídeos. Os cromatogramas que ilustram os dois sistemas cromatográficos testados são apresentados na **Figura 47**. Os espectros de absorbância do padrão 5-metil-dC nos pHs testados são apresentados na **Figura 48**.

Figura 45. A. Espectro de massas obtido por dissociação induzida por colisão do íon $[M + H]^+$ com m/z 242. Voltagem do cone= 25 V. Energia de colisão= 20 eV. **B.** Fragmentação da 5-metil-dC: m/z 242 $[M+H]^+ \rightarrow m/z$ 126 $[M - 2'$ -desoxirribose $+H]^+$.

Figura 46. Cromatograma do padrão 5-metil-dC, obtido por HPLC-DAD ($\lambda = 286\text{ nm}$) como descrito no item **3.15.1** de Materiais e Métodos.

Figura 47. Cromatogramas de DNA de timo de bezerro (comercial) nos quais se observam os desoxinucleosídeos dC e 5-metil-dC. Dados obtidos por HPLC-DAD. **A.** Sistema cromatográfico eluído com um um gradiente de água e CH_3OH , pH 7,0. **B.** Sistema cromatográfico eluído com um gradiente de ácido fórmico (0,1% em água) e CH_3OH , pH, 2,6.

5-metil-dC

Figura 48. Espectros de absorvância do padrão 5-metil-dC, obtidos por HPLC-DAD. **A.** Espectro com λ_{max} em 277 nm, pH 7,0. **B.** Espectro com λ_{max} em 286 nm, pH 2,6.

4.8.2 Linearidade

As curvas de calibração foram lineares nas faixas de concentração estudadas: 5-metil-dC (0,005 a 0,4 nmol) e dC (0,05 a 6 nmol).

As curvas de calibração, as equações de regressão linear e os coeficientes de determinação (R^2) são apresentados nas **Figuras 49** e **50**, sendo que **Y** representa a área do pico e **X** corresponde à quantidade do analito (nmol).

Figura 49. Curva de calibração da 5-metil-dC, obtida por HPLC-DAD ($\lambda = 286$ nm) como descrito em **3.15.3** de Materiais e Métodos.

Figura 50. Curva de calibração da dC, obtida por HPLC-DAD ($\lambda = 260$ nm) como descrito em **3.15.3** de *Materiais e Métodos*.

4.8.3 Limites de quantificação, exatidão e coeficientes de variação

Os dados de validação do método utilizando o **Sistema Cromatográfico 4** por HPLC-DAD estão descritos nas **Tabelas 4 e 5**. Foram utilizados 5 μg de DNA de timo de bezerro, obtido comercialmente, contaminado com quantidades conhecidas do padrão 5-metil-dC no volume de injeção (50, 100 e 200 pmol), como descrito no item **3.15.4** de *Materiais e Métodos*.

O método mostrou-se preciso e exato, com uma excelente concordância entre os valores adicionados e os valores quantificados ($R^2 = 0,9998$). O gráfico é ilustrado na **Figura 51**, os cromatogramas obtidos por HPLC-DAD do DNA (5 μg , N=4) de timo de bezerro contaminado com as quantidades indicadas dos padrões são ilustrados na **Figura 52**. Foi verificado um coeficiente de variação médio de 3%. Para avaliar a robustez do método, DNA de timo de bezerro

(5 µg, N=10) hidrolisado enzimaticamente foi injetado no sistema analítico em 3 dias distintos. Os dados referentes às precisões intra e interensaio, definidas pelos coeficientes de variação, são apresentados na **Tabela 5**. O limite de quantificação (S/N=5) verificado para a 5-metil-dC foi de 1 pmol.

Tabela 4. Exatidão e coeficientes de variação do método de HPLC-DAD para a quantificação de 5-metil-dC, como descrito em 3.15.4 de Materiais e Métodos.

Validação do método para quantificação de 5-metil-dC (5 µg DNA; N=4)					
5-metil-dC basal (nmol/média±DP)	Adição de 5-metil-dC (nmol)	5-metil-dC detectado (nmol/média±DP)	Média (-)Basal (nmol 5-metil-dC)	Exatidão (%)	C.V. (%)
0,2200 ± 0,007	0	0,2195 ± 0,006	0	---	3,16
0,1986 ± 0,005	0,050	0,2488 ± 0,006	0,0502	100,40	2,72
0,2137 ± 0,007	0,100	0,3189 ± 0,010	0,1052	105,20	3,43
0,2080 ± 0,002	0,200	0,4178 ± 0,004	0,2098	104,90	1,07

Tabela 5. Robustez do método de HPLC-DAD para a quantificação 5-metil-dC, como descrito em 3.15.4 de Materiais e Métodos.

Validação do método para quantificação de 5-metil-dC (5 µg DNA; N=10)						
DNA	5-MetildC			dC		
	Área Média ± DP	nmol	C.V. (%)	Área Média ± DP	nmol	C.V. (%)
Dia 01	121443 ± 4134	0,2325	3,40	1013210 ± 38486	2,38	3,79
Dia 02	125569 ± 918	0,2404	0,78	1039419 ± 13737	2,44	1,32
Dia 03	126599 ± 2314	0,2424	1,82	1045142 ± 21001	2,46	2,00
Interensaio	124537 ± 3667	0,2385	2,80	1032591 ± 29241	2,43	2,83

Figura 51 Níveis adicionados e quantificados de 5-metil-dC em DNA de timo de bezerro. Dados obtidos por HPLC-DAD, como descrito em 3.15.3 de Materiais e Métodos.

Figura 52. Cromatogramas mostrando a detecção de 5-metil-dC (2) e desoxinucleosídeos normais (dC,1; dA,3; dG,4; dT, 5) em DNA de timo de bezerro (comercial), contaminado com 0,05-0,20 nmol de 5-metil-dC. Dados obtidos por HPLC-DAD ($\lambda_{\text{max}} = 286 \text{ nm}$), como descrito em 3.15.4 de Materiais e Métodos.

4.8.4 Análise da metilação do DNA em células HepG2 expostas ao corante dinitrofenilazo puro

Avaliou-se a metilação global do DNA das células incubadas por 24 horas com 50 ou 100 μM do corante dinitrofenilazo purificado (0,25% DMSO, v:v). Concomitantemente os níveis de 5-metil-dC também foram analisados durante os intervalos de recuperação celular, 24 ou 48 horas, após a troca do meio de cultura. Os experimentos foram realizados conforme o descrito no item **3.15** de Materiais e Métodos. Os dados obtidos são apresentados na **Figura 53**.

Observa-se que durante o período de exposição, ambas as concentrações testadas não alteraram o padrão de metilação das células expostas, em comparação ao grupo controle. Entretanto, no período de recuperação, a concentração de 100 μM do corante induziu uma hipometilação do DNA em ambos os intervalos testados (24 e 48 h). Com base nessas observações foram selecionadas amostras de DNA de células incubadas com 100 μM do corante dinitrofenilazo purificado (24 h; exposição/recuperação), para a mensuração da expressão da enzima DNMT1. O experimento foi realizado conforme o descrito no item **3.16** de Materiais e Métodos.

Como apresentado na **Figura 54**, foi observado que o tratamento com 100 μM do corante dinitrofenilazo purificado induziu um nítido aumento da expressão da enzima DNMT1, em relação ao grupo controle, nas células HepG2 expostas por 24 h. No período subsequente, após a troca do meio de cultura e consequente recuperação, foi observada uma normalização da expressão enzimática nas células, em relação ao respectivo controle.

Figura 53. Porcentagem de 5-metil-dC em DNA de células HepG2 expostas por 24 h a 50 ou 100 µM do corante dinitrofenilazo purificado (0,25% DMSO, v:v) e 24 e 48 h após a troca do meio de cultura para remoção do corante. Asteriscos indicam que os valores são significativamente diferentes do controle, * $p < 0,05$. ** $p < 0,01$.

Figura 54. Expressão da enzima DNMT1 em células HepG2 expostas por 24 h a 100 μM do corante dinitrofenilazo purificado (0,25% DMSO, v:v) e 24 após a troca do meio de cultura para remoção do corante. (N=3) Asteriscos indicam que os valores são significativamente diferentes do controle, * ** $p < 0,001$.

Estudos reportados na literatura mostram que a metionina, precursora da SAM e portanto molécula chave no processo de metilação enzimática do DNA, pode ser facilmente oxidada por ROS, formando metionina sulfóxido (MetO) (STADTMAN *et al.*, 2005; HU *et al.*, 2012). MetO pode, por sua vez, reagir com radicais hidroxila e gerar radicais metila que acabam levando à

metilação não enzimática de outras bases do DNA, gerando lesões como O^6 -metil-2'-desoxiguanosina, N^7 -metil-2'-desoxiguanosina e N^3 -metil-2'-desoxiadenosina (STADTMAN *et al.*, 2005; KAWAI *et al.*, 2010; HU *et al.*, 2012). Dessa forma, é provável que a exposição das células HepG2 ao corante DB291 leve ao aumento dos níveis dessas lesões no DNA, além do aumento verificado dos níveis de 8-oxodGuo. O aumento da taxa de lesões levará a maior ativação da maquinaria de reparo do DNA, cujas proteínas dependem da re-estruturação da cromatina para uma forma aberta a fim de melhor acessar os danos. Proteínas de reparo do DNA poderiam então recrutar proteínas remodeladoras da cromatina, enzimas modificadoras de histonas e DNMTs para sítios de lesões de modo a parar a transcrição e evitar erros de leitura da fita danificada (MOLOGNONI *et al.*, 2011). De fato, foi reportado que o reparo de quebras do DNA pode causar o recrutamento da maquinaria epigenética, incluindo DNMTs (O'HAGAN *et al.*, 2008). Tal recrutamento para sítios de lesões no DNA pode explicar o aumento da expressão da enzima DNMT1 observado nas células expostas ao corante DB291 por 24 h.

Aumento da expressão de DNMT1 foi observado durante a gênese do melanoma em um modelo de transformação de melanócito de camundongo envolvendo a geração de ROS. Concomitantemente ao aumento da expressão de DNMT1 foi observada hipometilação global do DNA das linhagens de melanoma obtidas (MOLOGNONI *et al.*, 2011). Os autores sugerem que o recrutamento da maquinaria epigenética para sítios de lesões no DNA pode resultar em um perfil epigenético e de expressão gênica alterados com o passar do tempo, levando ao fenótipo maligno (MOLOGNONI *et al.*, 2011). Perfil semelhante de aumento da expressão de DNMT1 e subsequente

hipometilação do DNA foi observado nas células HepG2 expostas ao corante DB291. Tal observação juntamente com os dados de 8-oxodGuo sugerem que o processo de reparo de lesões no DNA esteja envolvido na desmetilação observada.

4.9 Biotransformação do corante DB291 em células HepG2

Uma vez que os efeitos desencadeados pelo corante DB291 em células HepG2 mostraram-se tempo dependentes, resolveu-se verificar a formação de produtos de sua biotransformação nas células. Assim, o meio de cultura das células expostas ao corante *dinitrofenilazo*, como descrito em **3.18** de Materiais e Métodos, foi coletado e as amostras foram processadas como descrito no item **3.18.1** de Materiais e Métodos. Os cromatogramas da fração metanólica obtidos após a etapa de pré-purificação por extração em fase sólida (C₁₈) estão apresentados na **Figura 55**.

Injetando-se alíquotas do meio de cultura de diferentes períodos de incubação (0, 12 e 24 h) foi possível observar a formação de produtos que não estavam presentes nas incubações controles.

O espectro de absorbância do produto majoritário formado na incubação de células HepG2 com 100 µM do corante dinitrofenilazo está apresentado na **Figura 55 b**, possuindo λ_{max} em 473 nm. A perda de absorbância em 618 nm (λ_{max} do corante dinitrofenilazo, **Figura 55 a**) é um indicativo de que o corante dinitrofenilazo sofreu redução de alguma ligação. Esta é a primeira vez que produtos resultantes da biotransformação de um corante da classe dinitrofenilazo são detectados.

Figura 55. Produto de biotransformação do corante DB291 no meio de cultura de células HepG2 em diferentes períodos de exposição. Dados obtidos por HPLC-DAD. **A.** Espectro de absorvância do DB291. **B.** Espectro de absorvância do produto de biotransformação.

Foram analisados concomitantemente os produtos presentes no interior das células. Para tanto, células expostas ao corante dinitrofenilazo (100 μ M) foram processadas como descrito em **3.18.2** de Materiais e Métodos. As células foram lisadas após 24 h de exposição e alíquotas do sobrenadante do homogenato celular foram injetadas no sistema de HPLC-DAD. A **Figura 56** ilustra o cromatograma dos produtos encontrados. É observado que três produtos principais são formados. O produto “c” apresenta o mesmo espectro de absorvância do metabólito do corante encontrado no meio de cultura.

Figura 56. Cromatogramas obtidos por HPLC-DAD ($\lambda = 450 \text{ nm}$) dos produtos de biotransformação do corante DB291 em células da linhagem HepG2. Três produtos principais (a, b e c) são formados. **1.** Cromatograma obtido das células HepG2 incubadas com 100 μ M do corante dinitrofenilazo. **2.** Cromatograma obtido das células HepG2 controles.

O produto com λ_{max} em 473 nm foi coletado, seco sob vácuo e concentrado para a realização de análises espectroscópicas. O espectro de massas (ESI/MS) do principal produto de biotransformação do corante em

células HepG2 (**Figura 57 A**) apresenta os íons $[M + H]^+$ com m/z 435 e 437, o que indica que durante o processo de biotransformação não houve a perda do bromo da molécula. A indução de fragmentação do íon com m/z 437 gerou os fragmentos apresentados na **Figura 57 B**. As estruturas sugeridas para os fragmentos estão representadas na **Figura 58**. Os íons detectados correspondem à massa molecular do corante sem os dois grupos nitro e com um grupo OH, como apresentado na **Figura 59**. Tal estrutura foi deduzida a partir da análise dos espectros de ^1H RMN apresentados na **Figura 60**. Na **Figura 61** é apresentado o espectro de RMN de correlação bidimensional ^1H - ^1H (COSY) do produto de biotransformação. A estrutura apresentada na **Figura 59** poderia surgir a partir de um intermediário envolvendo a ligação de um dos grupos nitro à ligação azo, com subsequente rearranjo e estabilização da molécula na forma apresentada.

Figura 57. A. Espectro de massas do produto de biotransformação do corante DB291. **B.** Espectro de massas obtido por dissociação induzida por colisão do íon $[M + H]^+$ com m/z 437. Voltagem do cone= 30 V. Energia de colisão= 20 eV.

Figura 58. Estruturas sugeridas para os fragmentos do espectro de massas obtido por dissociação induzida por colisão do íon $[M + H]^+$ com m/z 437. Voltagem do cone= 30 V. Energia de colisão= 20 eV.

Figura 59. Sugestão de uma via ainda incompleta para formação do produto de biotransformação a partir do corante.

Figura 60. Espectros de ^1H RMN do produto de biotransformação do corante DB291 obtidos com um equipamento de 300 mHz, em **A.** DMSO- d_6 e **B.** DMSO- d_6 + D $_2$ O.

Figura 61. Espectro de RMN de correlação bidimensional ^1H - ^1H (COSY) do produto de biotransformação, obtido em um equipamento de 300 MHz em $\text{DMSO}-d_6$.

3.10 Biotransformação do corante DB291 *in vitro*

Uma alíquota do corante dissolvido em DMSO foi incubada com as enzimas nitrorredutase e arilamina acetiltransferase em tampão fosfato de sódio (25 mM, pH 7), na presença dos respectivos cofatores enzimáticos, NADH e acetil-CoA. As incubações foram feitas a 37 °C, sob agitação, por 4 h

ou por 24 h. Paralelamente, foram realizadas incubações controles com o corante, com enzimas sem cofatores e cofatores sem enzimas. Também foram realizados experimentos utilizando a fração microssomal S9 de fígado de rato, objetivando a catálise da formação de metabólitos do corante DB291. As incubações realizadas estão descritas na **Tabela 6**.

Essas incubações *in vitro* foram realizadas com o intuito de melhor compreender o processo de biotransformação do corante DB291. Inicialmente, buscamos nas incubações o principal produto de biotransformação descrito acima, encontrado nas células HepG2. Como esse produto não foi detectado nas incubações *in vitro*, procuramos por outros produtos que pudessem fazer parte da mesma via de biotransformação do corante. Como apresentado na **Figura 62**, vias conhecidas de redução de grupos nitro e azo levam à formação de diversos intermediários radicalares e não radicalares. No processo de biotransformação pode haver também a geração de ROS a partir da redução de O₂ pelos radicais intermediários. Nas **Figuras 63, 64, 65 e 66** são apresentados os cromatogramas e espectros de massas de alguns produtos de biotransformação resultantes da redução dos grupos nitro e azo do corante original. As possíveis estruturas dos produtos encontrados estão apresentadas na **Figura 67**.

Tabela 6. Biotransformação do corante DB291 *in vitro*. Redução e acetilação conforme o descrito em 3.19 de Materiais e Métodos.

REDUÇÃO E ACETILAÇÃO ENZIMÁTICA DO CORANTE DB291	
INCUBAÇÕES	CONSTITUINTES
1 Corante + Tampão + Enzimas, sem cofatores	DB291 + Tampão NaH_2PO_4 + Nitrorredutase + Acetiltransferase
2 Corante + Tampão + Cofatores, sem enzimas	DB291 + Tampão NaH_2PO_4 + NADH + Acetil-CoA
3 Corante + Tampão + Enzimas, com cofatores	DB291 + Tampão NaH_2PO_4 + Nitrorredutase + Acetiltransferase + NADH + Acetil-CoA
4 Tampão + Enzimas, com cofatores	Tampão NaH_2PO_4 + Nitrorredutase + Acetiltransferase
5 Tampão + Cofatores, sem enzimas	Tampão NaH_2PO_4 + NADH + Acetil-CoA
6 Corante + S9 + Tampão + Enzimas, sem cofatores	DB291 + S9 + Tampão NaH_2PO_4 + Nitrorredutase + Acetiltransferase
7 Corante + S9 + Tampão + Cofatores, sem enzimas	DB291 + S9 + Tampão NaH_2PO_4 + NADPH+ NADH + Acetil-CoA
8 Corante + S9 + Tampão + Enzimas, com cofatores	DB291 + S9 + Tampão NaH_2PO_4 + Nitrorredutase + Acetiltransferase + NADPH+ NADH + Acetil-CoA

Figura 62. Vias conhecidas de redução de grupos nitro e azo (HALLIWELL e GUTERIDGE, 2007).

Redução Enzimática

Figura 63. A. Cromatograma obtido por HPLC/ESI/MS da incubação controle (**Tabela 6.** Incubação 6). B. Cromatograma obtido por HPLC/ESI/MS da incubação completa (**Tabela 6.** Incubação 8). C. Espectro de massas do produto indicado.

Redução Enzimática

Figura 64. **A.** Cromatograma obtido por HPLC/ESI/MS da incubação controle (**Tabela 6.** Incubação 6). **B.** Cromatograma obtido por HPLC/ESI/MS da incubação completa (**Tabela 6.** Incubação 8). **C.** Espectro de massas do produto indicado.

Redução Enzimática

Figura 65. **A.** Cromatograma obtido por HPLC/ESI/MS da incubação controle (**Tabela 6.** Incubação 6). **B.** Cromatograma obtido por HPLC/ESI/MS da incubação completa (**Tabela 6.** Incubação 8). **C.** Espectro de massas do produto indicado.

Redução Enzimática

Figura 66. Cromatograma obtido por HPLC/ESI/MS da incubação controle (Tabela 6. Incubação 6). **B.** Cromatograma obtido por HPLC/ESI/MS da incubação completa (Tabela 6. Incubação 8). **C, D.** Espectros de massas dos produtos indicados.

Figura 67. Possíveis estruturas para os produtos detectados nas Figuras 63-66. É possível que algumas das estruturas contenham, na verdade, um anel envolvendo os 3 átomos de nitrogênio mais centrais circutados.

4.11 Redução química do corante DB291 para obtenção de padrões de fenilbenzotriazóis não clorados

O cromatograma obtido por HPLC-DAD dos produtos formados após reação de redução do corante com hidrossulfito de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$), como descrito nos item 3.4 de Materiais e Métodos, está apresentado na **Figura 68**.

É observado na **Figura 68** que três produtos principais são formados na reação de CI Disperse Blue 291 com hidrossulfito de sódio. Seus espectros de absorvância estão apresentados na **Figura 69** e se assemelham aos espectros de non-CIPBTA sintetizados anteriormente por Watanabe e colaboradores (WATANABE *et al.*, 2006). O espectro de massas (ESI/MS) do produto P2 (**Figura 69**) apresenta picos com m/z 447 e 449 em razão aproximada 1:1 (indicando a presença de ^{79}Br e ^{81}Br , respectivamente), os quais correspondem aos íons $[\text{M} + \text{H}]^+$ do produto non-CIPBTA-7 sintetizado anteriormente (WATANABE *et al.*, 2002). A fragmentação do íon com m/z 449 gerou os fragmentos apresentados na **Figura 71**. Anteriormente no laboratório o produto P2 foi purificado através do **Sistema Cromatográfico 1** utilizando um HPLC-DAD e seu espectro de ^1H RMN (**Tabela 7**) se assemelhou ao obtido previamente para o produto non-CIPBTA-7 (WATANABE *et al.*, 2002; CARMAZEM, 2007). Como picos com m/z 527 e 529 foram observados no espectro de massas do produto P2 (voltagem do cone: 30 V), anteriormente em nosso grupo foi feita a acetilação do produto P2 com anidrido acético em piridina e observada a supressão da adição de 80 Da ao íon molecular esperado (**Figura 74**) (CARMAZEM, 2007). Também observamos a adição de

80 Da ao íon esperado no espectro de massas do produto P1, mas não do produto P3 (**Figura 69**). Novamente, o produto P1 acetilado apresentou o íon esperado sem a adição de 80 Da (**Figura 73**). A fragmentação do íon com m/z 465 (produtos P1 e P3) gerou os fragmentos apresentados nas **Figuras 70 e 72**. Tais análises espectroscópicas nos mostram que pelo menos três produtos com a porção fenilbenzotriazol podem ser formados na redução de CI Disperse Blue 291 com hidrossulfito de sódio.

Figura 68. Cromatograma obtido por HPLC-DAD ($\lambda = 250$ nm) dos produtos da reação de redução de CI Disperse Blue 291 com hidrossulfito de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$), como descrito no item 3.4 de Materiais e Métodos. Três produtos principais (P1, P2 e P3) são formados.

Figura 69. Espectros de massas e de absorvância dos produtos P1, P2 e P3 obtidos após a reação do composto comercial CI Disperse Blue 291 com hidrossulfito de sódio.

Figura 70. Espectros de massas obtidos por dissociação induzida por colisão dos íon $[M + H]^+$ do produtos P1 (m/z 465). Voltagem cone = 30 V. Energia de colisão = 30 eV.

Figura 71. Espectros de massas obtidos por dissociação induzida por colisão dos íon $[M + H]^+$ do produtos P2 (m/z 449). Voltagem cone = 30 V. Energia de colisão = 30 eV.

Figura 72. Espectros de massas obtidos por dissociação induzida por colisão dos íon $[M + H]^+$ do produtos P3 (m/z 465). O produto P3 apresenta os mesmos fragmentos do produto P1. Voltagem cone = 30 V. Energia de colisão = 30 eV.

Figura 73. Espectro de massas do produto P1 acetilado. Voltagem do cone = 55 V.

Figura 74. Espectro de massas do produto P2 acetilado. Voltagem do cone = 55 V.

Figura 75. Espectro de massas do produto P3 acetilado. Voltagem do cone = 55 V.

Tabela 7. Deslocamentos químicos no espectro de ^1H RMN do produto P2 em $\text{DMSO}-d_6^{a, b}$

δ (ppm)	Tipo	
1.05	T	6H (2 x CH_3), $J = 6.9$ Hz
1.99	s	3H (COCH_3)
3.22	q	4H (2 x CH_2), $J = 6.9$ Hz
3.86	s	3H (OCH_3)
8.47	s (largo)	2H (NH_2)
7.37	s	1H (ArH)
7.41	s	1H (ArH)
7.46	s	1H (ArH)
7.61	s	1H (ArH)
9.94	S (largo)	1H (CONH)

^a m, multipeto; t, tripleto; d, dubleto; s, singleto

^b espectro adquirido em um espectrômetro de RMN DPX 300

Os produtos P1, P2 e P3 puros foram utilizados como padrões para investigação de suas formações nas incubações *in vitro* do corante DB291 com os diferentes sistemas enzimáticos apresentados na **Tabela 6**. Foi encontrado um produto que eluiu cromatograficamente no mesmo tempo do produto P1 (**Figura 76**) e que possui os espectros de massas apresentados na **Figura 77 A e B**. O produto apareceu tanto na incubação de 4 h como na de 24 h. Apesar de apresentar a mesma massa molecular e os mesmos fragmentos do produto P1 (**Figura 77 B, C**), observa-se nos espectros de massas diferença de intensidade entre os íons dos fragmentos obtidos para os dois produtos, indicando serem isômeros com diferença na ligação de algum substituinte. Entretanto, por estarem presentes os mesmos fragmentos principais, acredita-se que a molécula resultante da transformação enzimática do corante contenha a estrutura básica de fenilbenzotriazol do produto P1. A possibilidade de formação enzimática de um fenilbenzotriazol a partir de um corante dinitrofenilazo nunca foi mencionada na literatura. Tal via de redução enzimática pode contribuir para a ocorrência de mutações relacionadas à exposição ao corante, uma vez que essas moléculas são muito mais

mutagênicas no teste de Ames (WATANABE *et al.*, 2002, 2006, MATSUOKA *et al.*, 2001, ODA *et al.*, 2008).

Redução Enzimática: Formação de *non*-CIPBTAs

Figura 76. **A.** Cromatograma obtido por HPLC/ESI/MS da incubação controle (**Tabela 6.** Incubação 1). **B.** Cromatograma obtido por HPLC/ESI/MS da incubação completa (**Tabela 6.** Incubação 3). **C.** Cromatograma obtido por HPLC/ESI/MS do produto P1.

Figura 77. A. Espectro de massas do produto identificado na incubação enzimática completa (**Tabela 6.** Incubação 3). **B.** Espectro de massas obtido por dissociação induzida por colisão do íon m/z 465 identificado na incubação enzimática completa (**Tabela 6.** Incubação 3). **C.** Espectro de massas obtido por dissociação induzida por colisão do íon m/z 465 do produto P1.

5. CONCLUSÃO

Com os dados obtidos neste trabalho, podemos concluir que:

1. O corante DB291 é citotóxico para células HepG2 em concentrações (5-100 μM) abaixo das reportadas na literatura (400-2.000 μM). A citotoxicidade é tempo e dose dependente.
2. A citotoxicidade do DB291 envolve seu processo de biotransformação e alterações mitocondriais.
3. Um produto principal de biotransformação intracelular é formado após a incubação de células HepG2 com o corante DB291, de modo tempo-dependente.
4. Fenilbenzotriazóis não clorados e uma série de intermediários são formados após incubação do corante DB291 com fração S9, nitrorredutase e acetiltransferase *in vitro*.
5. Uma possível sequência de eventos resultante da exposição de células HepG2 ao corante DB291 seria sua biotransformação para moléculas reativas levando ao aumento da concentração de Ca^{2+} intracelular, à ativação da cadeia de transporte de elétrons com aumento da síntese de ATP, hiperpolarização mitocondrial e subsequente geração intracelular de ROS. Algumas consequências observadas foram fragmentação do DNA, dano oxidativo, alterações do ciclo celular e alterações epigenéticas. Em decorrência de tais alterações as células podem morrer (provavelmente por apoptose nas concentrações testadas) ou ter a sua taxa de proliferação alterada, o que pode contribuir para o desenvolvimento de doenças, como o câncer.

Os eventos intracelulares desencadeados pelo corante DB291 estão ilustrados na **Figura 78**.

Figura 78. Eventos celulares envolvidos na citotoxicidade do corante DB291. (1) Redução enzimática do corante DB291; (2) Produção de espécies reativas pelo processo de redução enzimática; (3, 4 e 5) Ativação da cadeia de transporte de elétrons com aumento da síntese de ATP, aumento da concentração de Ca^{2+} intracelular, hiperpolarização mitocondrial, desencadeando em (6) estresse oxidativo, fragmentação do DNA, alterações do ciclo celular, alterações epigenéticas e (7) morte celular.

6. REFERÊNCIAS

AGUIAR, A. L. C.; SCHÖNBERGER, H. **Revista Têxtil**, São Paulo: Silva Haydu e Cia Ltda, (3), p.100-114, 1995.

AKASAKA, S.; GUENGERICH, F. P. Mutagenicity of site-specifically located 1,N2-ethenoguanine in Chinese hamster ovary cell chromosomal DNA. **Chemical Research in Toxicology**. v. 12, p. 501-507, 1999.

AKUDUGU J.; GÄDE G.; BÖHM L. Cytotoxicity of azadirachtin A in human glioblastoma cell lines. **Life Sciences**. v. 68, p. 1153-1160, 2001.

ALCANTARA, M. R. e DALTIN, D. A química do processamento têxtil. **Química Nova**. v. 19, p. 320-330, 1996.

ALMEIDA, M. A. **Dano em DNA mitocondrial em condição de estresse oxidativo**. Dissertação de Mestrado. Escola Paulista de Medicina. Universidade Federal de São Paulo, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. São Paulo, 1997.

ANDREOLI, R.; MUTTI, A.; GOLDONI, M.; MANINI, P.; APOSTOLI, P.; DE PALMA, G. Reference ranges of urinary biomarkers of oxidized guanine in (2'-deoxy)ribonucleotides and nucleic acids. **Free Radical Biology & Medicine**. v. 50, p. 254-261, 2011.

ARMSTRONG, K. M.; BERMINGHAM, E. N.; BASSETT, S. A.; TRELOAR, B. P.; ROY, N. C.; BARNETT, M. P. Global DNA methylation measurement by HPLC using low amounts of DNA. **Biotechnology Journal**. v. 6, p. 113-117, 2010.

ASHKENAZI, A.; DIXIT, V. M. Death receptors: signaling and modulation. **Science**. v. 281, p. 1305-1308, 1998.

ATLANTE, A.; GIANNATTASIO, S.; BOBBA, A.; GAGLIARDI, S.; PETRAGALLO, V.; CALISSANO, P.; MARRA, E.; PASSARELLA, S. An increase in the ATP levels occurs in cerebellar granule cells en route to apoptosis in which ATP derives from both oxidative phosphorylation and anaerobic glycolysis. **BBA – Bioenergetics**. v. 1708, p. 50-62, 2005.

BALMAIN, A.; HARRIS, C.C. Carcinogenesis in mouse and human cells: parallels and paradoxes. **Carcinogenesis**. v. 3, p. 371-377, 2000.

BANOUB, J. H.; LIMBACH, P. A. **Mass spectrometry of nucleosides and nucleic acids**. Boca Raton: Taylor & Francis Group, 1^o ED ,2010.

BARBIN A. Etheno-adduct-forming chemicals: from mutagenicity testing to tumor mutation spectra. **Mutation Research**. v. 462, p. 55-69, 2000.

BARROWS, L. R.; MAGEE, P. N. Nonenzymatic methylation of DNA by S-adenosylmethionine in vitro. **Carcinogenesis**. v. 3, p. 349-341, 1982.

BENDER, J. DNA methylation and epigenetics. **Annual Review of Plant Biology**. v. 55, p. 41-68, 2004.

BERNARDI, P.; RASOLA, A. The mitochondrial permeability transition pore and its involvement in cell death and in disease pathogenesis. **Apoptosis**. v. 12, p. 815-833, 2007.

BERSON, A.; CAZANAVE, S.; DESCATOIRE, V.; TINEL, M.; GRODET, A.; WOLF, C.; FELDMANN, G.; PESSAYRE, D. The anti-inflammatory drug, nimesulide(4-nitro-2-phenoxy methane-sulfoanilide), uncouples mitochondria and induces mitochondrial permeability transition in human hepatoma cells: protection by albumin. **Journal of Pharmacology And Experimental Therapeutics**. v. 318, p. 444-454, 2006

BIANCHINI, F.; JAECKEL, A.; VINEIS, P.; MARTINEZ-GARCÍA, C.; ELMSTAHL, S.; VAN KAPPEL, A. L.; BOEING, H.; OHSHIMA, H.; RIBOLI, E.; KAKS, R. Inverse correlation between alcohol consumption and lymphocyte levels of 8-hydroxydeoxyguanosine in humans. **Carcinogenesis**. v. 22, p. 885-890, 2001.

BIRD, A. Perceptions of epigenetics. **Nature**. v. 447, p. 396-398, 2007.

BONASIO, R.; TU, S.; REINBERG, D. Molecular signals of epigenetic states. **Science**. v. 330, p. 612-616, 2010.

BRENET, F.; MOH, M.; FUNK, P.; FEIERSTEIN, E.; VIALE, A. J.; SOCCI, N. D.; SCANDURA, J. M. DNA methylation of the first exon is tightly linked to transcriptional silencing. **PLOS One**. v. 6, e14524, 2011.

BRENNER. D.; MAK, T. W. Mitochondrial cell death effectors. **Current Opinion in Cell Biology**. v.6, p. 1871-877, 2009.

BROEDBAEK, K.; WEIMANN, A.; STOVGAARD, E. S.; POULSEN, H. E. Urinary 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine as a biomarker in type 2 diabetes. **Free Radical Biology & Medicine**. v.51, p. 1473-1479, 2011.

BROHEM, C. A.; MASSARO, R. R.; TIAGO, M.; MARINHO, C. E.; JASIULIONIS, M. G.; DE ALMEIDA, R. L.; RIVELLI, D. P.; ALBUQUERQUE, R. C.; DE OLIVEIRA, T. F.; LOUREIRO, A. P. M.; OKADA, S.; SOENGAS, M. S.; DE MORAES BARROS, S. B.; MARIA-ENGLER, S. S. Proteasome inhibition and ROS generation by 4-nerolidylcatechol induces melanoma cell death. **Pigment Cell & Melanoma Research**. v. 25, p. 354-369, 2012.

BROMBERG, A.; BERSUDSKY, Y.; LEVINE, J.; AGAM, G. Global leukocyte DNA methylation is not altered in euthymic bipolar patients. **Journal of Affective Disorders**. v. 118, p. 234-239, 2009.

BROYDE, S.; GRAD, R.; SHAPIRO, R.; HINGERTY, B. E. A molecular mechanics and dynamics study of the minor adduct between DNA and the carcinogen 2-(Acetylamino)fluorene (dG-N-2-AAF). **Chemical Research in Toxicology**. v. 10, p. 1123-1132, 1997.

BRÜNE, B. Nitric oxide: NO apoptosis or turning it ON? **Cell Death & Differentiation**. v. 10, p. 864-869, 2003.

CADET, J.; DOUKI, T.; RAVANAT, J. L. Measurement of oxidatively generated base damage in cellular DNA. **Mutation Research**. v. 711, p. 3-12, 2011.

CADET, J.; DOUKI, T.; RAVANAT, J. L. Oxidatively generated base damage to cellular DNA. **Free Radical Biology & Medicine**. v. 49, p. 9-21, 2010.

CADET, J.; DOUKI, T.; RAVANAT, J. L. Oxidatively generated damage to the guanine moiety of DNA: mechanistic aspects and formation in cells. **Accounts of Chemical Research**. v. 41, p. 1075-1083, 2008.

CALDERÓN-SÁNCHEZ, E. M.; RUIZ-HURTADO, G.; SMANI, T.; DELGADO, C.; BENITAH, J. P.; GÓMEZ, A. M.; ORDÓÑEZ, A. Cardioprotective action of urocortin in postconditioning involves recovery of intracellular calcium handling. **Cell Calcium**. v. 50, p. 84-90, 2011.

CARMAZEN, P. C. V. **Investigação de lesões em DNA induzidas por produtos de redução do corante C. I. Disperse Blue 291**. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF). Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Programa de Pós-Graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas. São Paulo, 2007.

CLARKE, E. A.; STEINLE, D. Organic dyes and pigments, **O. Hutzinger (Ed.) in Handbook of Environmental chemistry**, Berlin. v. 3 A, 1995.

COLLIER, S. W.; STORM, J. E.; BRONAUGH, R. L. Reduction of azo dyes during in vitro percutaneous absorption. **Toxicology and Applied Pharmacology**. v. 118, p. 73-79, 1993

COOKE, M. S.; OLINSKI, R.; LOFT, S.; EUROPEAN STANDARDS COMMITTEE ON URINARY (DNA) LESION ANALYSIS. Measurement and meaning of oxidatively modified DNA lesions in urine. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**. v. 17, p. 3-14, 2008.

CUOZZO, C.; PORCELLINI, A.; ANGRISANO, T.; MORANO, A.; LEE, B.; DIPARDO, A.; MESSINA, S.; IULIANO, R.; FUSCO, A.; SANTILLO, M. R.; MULLER, M.T., CHIARIOTTI, L., GOTTESMAN, M.E., AVVEDIMENTO, E.V. DNA damage, homology-directed repair, and DNA methylation. **PLOS Genetics**. v. 3, p. 1144-1162, 2007.

DAHL, C.; GRØNBÆK, K.; GULDBERG, P. Advances in DNA methylation: 5-hydroxymethylcytosine revisited. **Clinica Chimica Acta**. v. 412, p. 381-386, 2011.

DANIEL, P. T.; WIEDER, T.; STURM, I.; SCHULZE-OSTHOFF, K. The kiss of death: promises and failures of death receptors and ligands in cancer therapy. **Leukemia**. v. 15, p. 1022-1032, 2001.

DEBNATH, J.; BAEHRECKE, E. H.; KROEMER, G. Does autophagy contribute to cell death? **Autophagy**. v. 1, p. 66-75, 2005.

DILLON, D.; COMBES, R.; ZEIGER, E. Activation by caecal reduction of the azo dye D&C Red No. 9 to a bacterial mutagen. **Mutagenesis**. v.9 , p. 295-299, 1994.

DOERGE, D. R.; CHURCHWELL, M. I.; FANG, J. L.; BELAND, F. A. Quantification of etheno-DNA adducts using liquid chromatography, on-line sample processing, and electrospray tandem mass spectrometry. **Chemical Research in Toxicology**. v. 13, p. 1259-1264, 2000.

DOI, A.; PARK, I. H.; WEN, B.; MURAKAMI, P.; ARYEE, M. J.; IRIZARRY, R.; HERB, B.; LADD-ACOSTA, C.; RHO, J.; LOEWER, S.; MILLER, J.; SCHLAEGER, T.; DALEY, G. Q.; FEINBERG, A. P. Differential methylation of tissue- and cancer-specific CpG island shores distinguishes human induced pluripotent stem cells, embryonic stem cells and fibroblasts. **Nature Genetics**. v. 41, p. 1350-1353, 2009.

DUCHEN, M. R. Mitochondria and calcium: from cell signalling to cell death. **The Journal of Physiology**. v. 529, p. 57-68, 2000.

EADS, C. A.; DANENBERG, K. D.; KAWAKAMI, K.; SALTZ, L. B.; BLAKE, C.; SHIBATA, D.; DANENBERG, P. V.; LAIRD, P. W. MethyLight: a high-throughput assay to measure DNA methylation. **Nucleic Acids Research**. v. 15, p. 28-32, 2000.

EHRlich, M.; HOPKINS, N. E.; JIANG, G.; DOME, J. S.; YU, M. C.; WOODS, C. B.; TOMLINSON, G. E.; CHINTAGUMPALA, M.; CHAMPAGNE, M.; DILLER, L.; PARHAM, D. M.; SAWYER, J. Satellite DNA hypomethylation in karyotyped Wilms tumors. **Cancer Genetics and Cytogenetics**. v. 141, p. 97-105, 2003.

ELMORE, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicologic Pathology**. v. 35, p. 495-516, 2007.

ESCODD (European Standards Committee on Oxidative DNA Damage). Comparative analysis of baseline 8-oxo-7,8-dihydroguanine in mammalian cell DNA, by different methods in different laboratories: an approach to consensus. **Carcinogenesis**. v. 23, p. 1129-1133, 2002.

FARMER, F. B. DNA and protein adducts as markers of genotoxicity. **Toxicology Letters**. v. 149, p. 3-9, 2004.

FERNANDO, R. C.; NAIR, J.; BARBIN, A.; MILLER, J. A.; BARTSCH, H. Detection of 1,N6-ethenodeoxyadenosine and 3,N4-ethenodeoxycytidine by immunoaffinity/³²P-postlabelling in liver and lung DNA of mice treated with ethyl carbamate (urethane) or its metabolites. **Carcinogenesis**. v. 17, p. 1711-1718, 1996.

FORMIGLI, L.; PAPUCCI, L.; TANI, A.; SCHIAVONE, N.; TEMPESTINI, A.; ORLANDINI, G. E.; CAPACCIOLI, S.; ORLANDINI, S. Z. Aponecrosis: morphological and biochemical exploration of a syncretic process of cell death sharing apoptosis and necrosis. **Journal of Cellular Physiology**. v. 182, p. 41-49, 2000.

FOUSE, S. D.; NAGARAJAN, R. P.; COSTELLO, J. F. Genome-scale DNA methylation analysis. **Epigenomics**. v. 2, p. 105-117, 2010.

FROSALI, S.; LEONINI, A.; ETTORRE, A.; DI MAIO, G.; NUTI, S.; TAVARINI, S.; DI SIMPLICIO, P.; DI STEFANO, A. Role of intracellular calcium and S-glutathionylation in cell death induced by a mixture of isothiazolinones in HL60 cells. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1793, p. 752-83, 2009.

GARCIA, C. C.; FREITAS, F. P.; DI MASCIO, P.; MEDEIROS, M. H. 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.

GARDINER, K. D.; BORNE, B. J. Textile waste waters, treatment and environmental effects. **Journal of the Society of Dyers and Colourists**. v. 98, p. 339-348, 1978.

GEDIK, C. M.; COLLINS, A.; ESCODD (European Standards Committee on Oxidative DNA Damage). Establishing the background level of base oxidation in human lymphocyte DNA: results of an interlaboratory validation study. **The FASEB Journal**. v. 19, p. 82-84, 2004.

GEHRING, M.; REIK, W.; HENIKOFF, S. DNA demethylation by DNA repair. **Trends in Genetics**. v. 25, p. 82-99, 2009.

GRIFFITHS J. Photochemistry of azobenzene and its derivatives. **Chemical Society Reviews**. v. 1, p. 481-493, 1972.

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; BRONDANI, A. R. Morte celular por apoptose. **Revista Brasileira de Cancerologia**. v. 53, p. 335-343, 2007.

GUICHARD, Y.; EL GHISSASSI, F.; NAIR, J.; BARTSCH, H.; BARBIN, A. Formation and accumulation of DNA ethenobases in adult Sprague-Dawley rats exposed to vinyl chloride. **Carcinogenesis**. v. 17, p. 1553-1559, 1996.

HAGHDOOST, S.; CZENE, S.; NÄSLUND, I.; SKOG, S.; HARMS-RINGDAHL, M. Extracellular 8-oxo-dG as a sensitive parameter for oxidative stress in vivo and in vitro. **Free Radicals Research**. v. 39, p. 153-162, 2005

HAJIZADEH, S.; DEGROOT, J.; TEKOPPELE, J. M.; TARKOWSKI, A.; COLLINS, L. V. Extracellular mitochondrial DNA and oxidatively damaged DNA in synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. **Arthritis Research & Therapy**. v. 5, p. 234-240, 2003.

HALLIWELL B.; GUTERIDGE J.M.C., **Free Radicals in Biology and Medicine**. Oxford: Biosciences. 4° ED, 2007)

HANZALOVA, K.; ROSSNER, P. JR.; SRAM, R. J. Oxidative damage induced by carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons and organic extracts from urban air particulate matter. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**. v. 698, p. 114-121, 2010.

HENGARTNER, M. O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**. v. 407, p. 770-776, 2000.

HERCEG, Z.; PALIWAL, A. Epigenetic mechanisms in hepatocellular carcinoma: how environmental factors influence the epigenome. **Mutation Research**. v. 727, p. 55-61, 2011.

HERMIDA, S. A. S.; POSSARI, E. P. M. , SOUZA, D. B.; CAMPOS, I. P. A.; GOMES, O. F.; DI MASCIO, P; MEDEIROS, M. H. G.; LOUREIRO, A.P.M. 2'-deoxyguanosine, 2'-deoxycytidine, and 2'-deoxyadenosine adducts resulting from the reaction of tetrahydrofuran with DNA Bases. **Chemical Research in Toxicology**. v. 19, p. 927-936, 2006.

HILL, M. M., ADRAIN, C.; DURIEZ, P. J.; CREAGH, E. M.; MARTIN, S. J. Analysis of the composition, assembly kinetics and activity of native Apaf-1 apoptosomes. **The EMBO Journal**. v. 23, p. 2134-2145, 2004.

HU, C. W.; LIU, H. H.; LI, Y. J.; CHAO, M. R. Direct analysis of 5-methylcytosine and 5-methyl-2'-deoxycytidine in human urine by isotope dilution LC-MS/MS: correlations with N-methylated purines and oxidized DNA lesions. **Chemical Research in Toxicology**. v. 25, p. 462-470, 2012.

HU, J.; ZHANG, W.; MA, H.; CAI, Y.; SHENG, G.; FU, J. Simultaneous determination of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine and 5-methyl-2'-deoxycytidine in DNA sample by high performance liquid chromatography/positive electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**. v. 878, p. 2765-2769, 2010.

IACOMINO, G.; MEDICI, M. C.; NAPOLI, D.; RUSSO G. L. Effects of histone deacetylase inhibitors on p53/Cdc20 expression in HT29 cell line. **Journal of Cellular Biochemistry**. v. 99, p. 1122-1131, 2006.

IGNEY, F. H.; KRAMMER, P. H. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. **Nature Reviews Cancer**. v. 2, p. 277-288, 2002.

IRIZARRY, R. A.; LADD-ACOSTA, C.; WEN, B.; WU, Z.; MONTANO, C.; ONYANGO, P.; CUI, H.; GABO, K.; RONGIONE, M.; WEBSTER, M.; JI, H.; POTASH, J. B.; SABUNCİYAN, S.; FEINBERG, A. P. The human colon cancer methylome shows similar hypo- and hypermethylation at conserved tissue-specific CpG island shores. **Nature Genetics**. v. 41, p. 178-186, 2009.

KASAI, H.; KAWAI, K. DNA methylation at the C-5 position of cytosine by methyl radicals: A possible role for epigenetic change during carcinogenesis by environmental agents. **Chemical Research in Toxicology**. v. 22, p. 984-989, 2009.

KASHANIAN, S.; KHODAEI, M. M.; ROSHANFEKR, H.; SHAHABADI, N.; REZVANI, A.; MANSOURI, G. DNA binding, DNA cleavage, and cytotoxicity studies of two new copper (II) complexes. **DNA and Cell Biology**. v. 30, p. 287-296, 2011.

KAWAI, K.; LI, Y. S.; SONG, M. F.; KASAI, H. DNA methylation by dimethyl sulfoxide and methionine sulfoxide triggered by hydroxyl radical and implications for epigenetic modifications. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. v. 20, p. 260-265, 2010.

KAWANAI, T.; FUJINAGA, M.; KOIZUMI, K.; KUROTANI, I.; HASHIMOTO, E.; SATOH, M.; IMAI, S.; MIYOSHI, N.; OYAMA, Y. Some characteristics of membrane Cd(2+) transport in rat thymocytes: an analysis using Fluo-3. **Biometals**. v. 1, p. 1-12, 2011.

KERR, J. F. History of the events leading to the formulation of the apoptosis concept. **Toxicology**. v. 181-182, p. 471-474, 1972.

KERR, J. F.; WYLLIE, A. H.; CURRIE, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **British Journal of Cancer**. v. 26, p. 239-257, 1972.

KISCHKEL, F. C.; HELLBARDT, S.; BEHRMANN, I.; GERMER, M.; PAWLITA, M.; KRAMMER, P. H.; PETER, M. E. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)- associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. **The EMBO Journal**. v. 14, p. 5579-5588, 1995.

KNERR, S.; SCHAEFER, J.; BOTH, S.; MALLY, A.; DEKANT, W.; SCHRENK, D. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin induced cytochrome P450s alter the formation of reactive oxygen species in liver cells. **Molecular Nutrition & Food Research**. v. 50, p. 378-384, 2006.

KUROSAKA, K.; TAKAHASHI, M.; WATANABE, N.; KOBAYASHI, Y. Silent cleanup of very early apoptotic cells by macrophages. **The Journal of Immunology**. v. 171, p. 4672-4679, 2003.

KUSANRAN, W. R.; WAKABAYASHI, K.; OGURI, A.; TEPSUWAN, A.; NAGAO, M.; SUGIMURA, T. Mutagenicities of Bangkok and Tokyo river waters. **Mutation Research**. v. 325, p. 99-104, 1994.

LAMBERT, M. P.; HERCEG, Z. Epigenetics and cancer, 2nd IARC meeting, Lyon, France, 6 and 7 December 2007. **Molecular Oncology**. v. 2; p. 33-40, 2007.

LANGOUËT, S.; MICAN, A. N.; MÜLLER, M.; FINK, S. P.; MARNETT, L.J.; MUHLE, S. A.; GUENGERICH, F. P. Misincorporation of nucleotides opposite five-membered exocyclic ring guanine derivatives by escherichia coli polymerases in vitro and in vivo: 1,N2-ethenoguanine, 5,6,7,9-tetrahydro-9-oxoimidazo[1, 2-a]purine, and 5,6,7,9-tetrahydro-7-hydroxy-9-oxoimidazo[1, 2-a]purine. **Biochemistry**. v. 37, p. 5184-5163, 1998.

LEVINE, R.L.; YANG, I.Y.; HOSSAIN, M.; PANDYA, G. A.; GROLLMAN, A. P.; MORIYA, M. Mutagenesis induced by a single 1,N6-ethenodeoxyadenosine adduct in human cells. **Cancer Research**. v. 60, p. 4098-4104, 2000.

LIMA, R. O. A.; BAZ, A. P.; SALVADORI, D. M. F.; RECH, C. M.; OLIVEIRA, D. P.; UMBUZEIRO, G. A. Mutagenic and carcinogenic potential of a textile azo dye processing plant effluent that impacts a drinking water source. **Mutation Research**. v. 626, p. 53-60, 2007.

LOCKSLEY, R. M.; KILLEEN, N.; LENARDO, M. J. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. **Cell**. v. 104, p. 487-501, 2001.

LOUREIRO, A. P. M.; DI MASCIO, P.; MEDEIROS, M. H. G. Formação de adutos exocíclicos com bases de DNA: implicações em mutagênese e carcinogênese. **Química Nova**. v. 25, p. 777-793, 2002.

LUNEC, J.; HOLLOWAY, K. A.; COOKE, M. S.; FAUX, S.; GRIFFITHS, H. R.; EVANS, M. D. Urinary 8-oxo-2'-deoxyguanosine: Redox regulation of DNA repair in vivo? **Free Radical Biology & Medicine**. v. 33, p. 875-885, 2002.

LYON, A. R.; JOUDREY, P. J.; JIN, D.; NASS, R. D.; AON, M. A.; O'ROURKE, B.; AKAR, F. G. Optical imaging of mitochondrial function uncovers actively propagating waves of mitochondrial membrane potential collapse across intact heart. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**. v. 49, p. 565-575, 2010.

MAGAÑA, A. A.; WROBEL, K.; CAUDILLO, Y. A.; ZAINA, S.; LUND, G.; WROBEL, K. High-performance liquid chromatography determination of 5-methyl-2'-deoxycytidine, 2'-deoxycytidine, and other deoxynucleosides and nucleosides in DNA digests. **Analytical Biochemistry**. v. 374, p. 378-385, 2007.

MANGAL, D.; VUDATHALA, D.; PARK, J. H.; LEE, S. H.; PENNING, T. M.; BLAIR, I.A. Analysis of 7,8-dihydro-8-oxo-2'-deoxyguanosine in cellular DNA during oxidative stress. **Chemical Research in Toxicology**. v. 22, p. 788-797, 2009.

MASUDA, S.; DEGUCHI, Y.; MASUDA, Y.; WATANABE, T.; NUKAYA, H.; TERAOKA, Y.; TAKAMURA, T.; WAKABAYASHI, K.; KINAE, N. Genotoxicity of 2-[2-(acetylamino)-4-[bis(2-hydroxyethyl)amino]-5-methoxyphenyl]-5-amino-7-bromo-4-chloro-2H-benzotriazole (PBTA-6) and 4-amino-3,3-dichloro-5,4-dinitro-biphenyl (ADDB) in goldfish (*Carassius auratus*) using the micronucleus test and the comet assay. **Mutation Research**. v. 560, p. 33-40, 2004.

MATSUOKA, A.; SAKAMOTO, H.; TADOKORO, S.; TADA, A.; TERAOKA, Y.; NUKAYA, H.; WAKABAYASHI, K. The 2-phenylbenzotriazole-type water pollutant PBTA-2 has cytochalasin B-mimetic activity. **Mutation Research**. v. 464, p. 161-167, 2000.

MATSUOKA, A.; TADA, A.; TERAOKA, Y.; NUKAYA, H.; ONFELT, A.; WAKABAYASHI, K. Chromosomal effects of newly identified water pollutants PBTA-1 and PBTA-2 and their possible mother compounds (AZO DYES) and intermediates (*non*-CIPBTAs) in two Chinese hamster cell lines. **Mutation Research**. v. 493, p. 75-85, 2001.

MATTSON, M. P.; CHAN, S. L. Calcium orchestrates apoptosis. **Nature Cell Biology**. v. 12, p. 1051-1061, 2003.

MAYER, B.; OBERBAUER, R. Mitochondrial regulation of apoptosis. **News In Physiological Sciences**. v. 18, p. 89-94, 2003.

MEDEIROS, M. H. Exocyclic DNA adducts as biomarkers of lipid oxidation and predictors of disease. Challenges in developing sensitive and specific methods for clinical studies. **Chemical Research in Toxicology**. v. 22, p. 419-425, 2009.

MOLOGNONI, F.; CRUZ, A. T.; MELISO, F. M.; MORAIS, A. S.; SOUZA, C.F.; XANDER, P.; BISCHOF, J. M.; COSTA, F. F.; SOARES, M. B.; LIANG, G.; JONES, P. A.; JASIULIONIS, M. G. Epigenetic reprogramming as a key contributor to melanocyte malignant transformation. **Epigenetics**. v. 6, p. 450-464, 2011.

MORIWAKI, H.; HARINO, H.; HASHIMOTO, H.; ARAKAWA, R.; OHE, T.; YOSHIKURA, T. Determination of aromatic amine mutagens, PBTA-1 and PBTA-2, in river water by solid-phase extraction followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**. v. 995, p. 239-243, 2003.

MORIWAKI, H.; HARINO, H.; YOSHIKURA, T.; OHE, T.; NUKAYA, H.; TERAOKA, Y.; SAWANISHI, H.; WAKABAYASHI, K.; MIYAKODA, H.; ALARY J. F. Simultaneous determination of 2-phenylbenzotriazole-type mutagens, PBTA-1 through -8, in river water by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Environmental Monitoring**. v. 6, p. 897-902, 2004.

NAGY, G.; KONCZ, A.; TELARICO, T.; FERNANDEZ, D.; ERSEK, B.; BUZÁS, E.; PERL, A. Central role of nitric oxide in the pathogenesis of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. **Arthritis Research & Therapy**. v. 42, p. 1625-1631, 2007.

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 Radical Biology & Medicine**. v. 43, p. 1109-1120, 2007.

NIEHRS, C. Active DNA demethylation and DNA repair. **Differentiation**. v. 707, p. 1-11, 2009.

NOHARA, K.; BABA, T.; MURAI, H.; KOBAYASHI, Y.; SUZUKI, T.; TATEISHI, Y.; MATSUMOTO, M.; NISHIMURA, N.; SANO, T. Global DNA methylation in the mouse liver is affected by methyl deficiency and arsenic in a sex-dependent manner. **Archives of Toxicology**. v. 85, p. 653-661, 2010.

NORBURY, C. J.; HICKSON, I. D. Cellular responses to DNA damage. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**. v. 41, p. 367-401, 2001.

NUKAYA, H.; YAMASHITA, J.; TSUJI, K.; TERAOKA, Y.; OHE, T.; SAWANISHI, H.; KATSUHARA, T.; KIYOKAWA, K.; TEZUKA, M.; OGURI, A.; SUGIMURA, T.; WAKABAYASHI, K. Isolation and Chemical-Structural Determination of a novel aromatic amine mutagen in water from the Nishitakase River in Kyoto. **Chemical Research in Toxicology**. v. 10, p. 1061-1066, 1997.

NUKAYA, H.; SHIOZAWA, T.; TADA, A.; TERAOKA, Y.; OHE, T.; WATANABE, T.; ASANOMA, M.; SAWANISHI, H.; KATSUBARA, T.; SUGIMURA, T.; WAKABAYASHI, K. Identification of 2-[2-(acetylamino)-4-amino-5-methoxyphenyl]-5-amino-7-bromo-4-chloro-2H-benzotriazole (PBTA-4) as a potent mutagen in river water in Kyoto and Aichi prefectures, Japan. **Mutation Research**. v. 492, p. 73-80, 2001.

ODA, Y.; WATANABE, T.; TERAOKA, Y.; NUKAYA, H.; WAKABAYASHI, K. Genotoxic activation of 2-phenylbenzotriazole-type compounds by human cytochrome P4501A1 and N-acetyltransferase expressed in *Salmonella typhimurium* strains. **Mutation Research**. v. 657, p. 52-57, 2008.

OGA, S. **Fundamentos de Toxicologia**. 2ª. ed. Ed. Atheneu, São Paulo-SP, p.101-123, 2003.

OGURI, A.; SHIOZAWA, T.; TERAOKA, Y.; NUKAYA, H.; YAMASHITA, J.; OHE, T.; SAWANISHI, H.; KATSUHARA, T.; SUGIMURA, T.; WAKABAYASHI, K. Identification of a 2-phenylbenzotriazole (PBTA)-type mutagen, PBTA-2, in water from the Nishitakase River in Kyoto. **Chemical Research in Toxicology**. v. 11, p. 1195-1200, 1998.

O'HAGAN, H.M.; MOHAMMAD, H.P.; BAYLIN, S.B. Double strand breaks can initiate gene silencing and SIRT1-dependent onset of DNA methylation in an exogenous promoter CpG island. **PLOS Genetics**. v. 4, e1000155, 2008.

OHE, T.; WATANABE, T.; WAKABAYASHI, K. Mutagens in surface waters: a Review. **Mutation Research**. v. 567, p. 109-149, 2004.

OLIVEIRA, D. P.; CARNEIRO, P. A.; RECH, C. M.; ZANONI, M. V.; CLAXTON, L. D. Mutagenic compounds generated from the chlorination of disperse azo-dyes and their presence in drinking water. **Environmental Science & Technology**. v. 40, p. 6682-6689, 2006.

OLIVEIRA, D. P.; CARNEIRO, P. A.; SAKAGAMI, M. K.; ZANONI, M. V. B.; UMBUZEIRO, G. A. Chemical characterization of a dye processing plant effluent Identification of the mutagenic components. **Mutation Research**. v. 626, p. 135-142, 2007.

OROPESA, M.; DE-LA-MATA, M.; MARAVER, J. G.; CORDERO, M. D.; COTÁN, D.; RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ, A.; DOMÍNGUEZ-MOÑINO, I.; DE MIGUEL, M.; NAVAS, P.; SÁNCHEZ-ALCÁZAR, J.A. Apoptotic microtubule network organization and maintenance depend on high cellular ATP levels and energized mitochondria. **Apoptosis**. v. 16, p. 404-424, 2011.

ORRENIUS, S. Mitochondrial regulation of apoptotic cell death. **Toxicology Letters**. v. 149, p. 19-23, 2004.

PANG, B.; ZHOU, X.; YU, H.; DONG, M.; TAGHIZADEH, K.; WISHNOK, J. S.; TANNENBAUM, S. R.; DEDON, P. C. Lipid peroxidation dominates the chemistry of DNA adduct formation in a mouse model of inflammation. **Carcinogenesis**. v. 28, p. 1807-1813, 2007.

PAWELETZ, N. Walther Flemming: pioneer of mitosis research. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**. v.2, p. 72-75, 2001.

PEREIRA, A. C.; OLIVON, V. C.; DE OLIVEIRA, A. M. Impaired calcium influx despite hyper-reactivity in contralateral carotid following balloon injury: eNOS involvement. **European Journal of Pharmacology**. v. 642, p 121-127, 2010.

POPOV, S. G.; VILLASMIL, R.; BERNARDI, J.; GRENE, E.; CARDWELL, J.; WU, A.; ALIBEK, D.; BAILEY, C.; ALIBEK, K. Lethal toxin of *Bacillus anthracis* causes apoptosis of macrophages. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v.293, p. 349-355, 2002.

PORTER, J. J.; SNIDER, E. H. Thirty Day Biodegradability of textile chemicals and dyes. **Journal of the Water Pollution Control Federation**. v. 46, p. 427-236, 1974.

RASOLA, A.; BERNARDI, P. Mitochondrial permeability transition in Ca^{2+} -dependent apoptosis and necrosis. **Cell Calcium**. v. 50, p. 222-233, 2011.

RAVANAT, J. L.; DOUKI, T.; DUEZ, P.; GREMAUD, E.; HERBERT, K.; HOFER, T.; LASSERRE, L.; SAINT-PIERRE, C.; FAVIER, A.; CADET, J. 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, p. 1911-1918, 2002.

REIK, W. Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development. **Nature**. v. 447, p. 425-437, 2007.

ROBB-GASPERS, L. D.; BURNETT, P.; RUTTER, G. A.; DENTON, R. M.; RIZZUTO, R.; THOMAS, A. P. Integrating cytosolic calcium signals into mitochondrial metabolic responses. **The EMBO Journal**. v. 17, p. 4987-5000, 1998.

ROBERTS, D. W.; CHURCHWELL, M. I.; BELAND, F. A.; FANG, J. L.; DOERGE, D. R. Quantitative analysis of etheno-2'-deoxycytidine DNA adducts using on-line immunoaffinity chromatography coupled with LC/ES-MS/MS detection. **Analytical Chemistry**. v. 73, p. 303-309, 2001.

ROBERTSON, K. D., WOLFFE, A. P. DNA methylation in health and disease. **Nature Reviews**. v. 1, p. 11-19, 2000.

RODRIGUEZ, M. M. T. Methylation and expression of genes in thyroid differentiated cancer. **Revista Cubana de Endocrinología**. v. 21, p. 340-350, 2010.

ROSSELLA, F.; POLLEDRI, E.; BOLLATI, V.; BACCARELLI, A.; FUSTINONI, S. Development and validation of a gas chromatography/mass spectrometry method for the assessment of genomic DNA methylation. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**. v. 22, p. 2667-2646, 2009.

ROSSNER, P.; MILCOVA, A.; LIBALOVA, H.; NOVAKOVA, Z.; TOPINKA, J.; BALASCAK, I.; SRAM, R. J. Biomarkers of exposure to tobacco smoke and environmental pollutants in mothers and their transplacental transfer to the foetus. Part II. Oxidative damage. **Mutation Research**. v. 669, p. 20-26, 2009.

SAELEN, X.; FESTJENS, N.; VANDE WALLE, L.; VAN GURP, M.; VAN LOO, G.; VANDENABEELE, P. Toxic proteins released from mitochondria in cell death. **Oncogene**. v.23, p. 2861-2874, 2004.

SAKHI, A. K.; RUSSNES, K. M.; SMELAND, S.; BLOMHOFF, R.; GUNDERSEN T. E. Simultaneous quantification of reduced and oxidized glutathione in plasma using a two-dimensional chromatographic system with parallel porous graphitized carbon columns coupled with fluorescence and coulometric electrochemical detection. **Journal of Chromatography A**. v. 1104, p. 179-189, 2006.

SANDHU, J.; KAUR, B.; ARMSTRONG, C.; TALBOT, C. J.; STEWARD, W. P.; FARMER, P. B.; SINGH, R. Determination of 5-methyl-2'-deoxycytidine in genomic DNA using high performance liquid chromatography-ultraviolet detection. **Journal of Chromatography B**. v. 877, p. 1957-1961, 2009.

SAVILL, J.; FADOK, V. Toxic proteins Corpse clearance defines the meaning of cell death. **Nature**. v.407, p. 784-788, 2000.

SCHIMMER, A. D. Inhibitor of apoptosis proteins: translating basic knowledge into clinical practice. **Cancer Research**. v.64, p. 7183-7190, 2004.

SEDGWICK, B.; BATES, P. A.; PAIK, J.; JACOBS, S. C.; LINDAHL, T. Repair of alkylated DNA: recent advances. **DNA Repair**. v. 6, p. 429-442, 2007.

SHARMA, S.; KELLY, T. K.; JONES, P. A. Epigenetics in cancer. **Carcinogenesis**. v. 31, p. 27-36, 2010.

SHIOZAWA, T.; MURAOKA, K.; NUKAYA, H.; OHE, T.; SAWANISHI, H.; OGURI, A.; WAKABAYASHI, K.; SUGIMURA, T.; TERAOKA, Y. Chemical synthesis of a novel aromatic amine mutagen isolated from water of the Nishitakase River in Kyoto and a possible route of its formation. **Chemical Research in Toxicology**. v. 11, p. 375-380, 1998.

SHIOZAWA, T.; TADA, A.; NUKAYA, H.; WATANABE, T.; TAKAHASHI, Y.; ASANOMA, M.; OHE, T.; SAWANISHI, H.; KATSUHARA, T.; SUGIMURA, T.; WAKABAYASHI, K.; TERAOKA, Y. Isolation and identification of a new 2-phenylbenzotriazole-type mutagen (PBTA-3) in the Nikko River in Aichi, Japan. **Chemical Research in Toxicology**. v. 13, p. 535-540, 2000.

SIMONE, S.; GORIN, Y.; VELAGAPUDI, C.; ABOUD, H. E.; HABIB, S. L. Mechanism of oxidative DNA damage in diabetes: tuberin inactivation and downregulation of DNA repair enzyme 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine-DNA glycosylase. **Diabetes**. v. 57, p. 2626-2636, 2008.

SNEHALATHA, M.; RAVIKUMAR, C.; HUBERT J. I.; SEKAR, N.; JAYAKUMAR, V. S. Spectroscopic analysis and DFT calculations of a food additive carmoisine. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**. v. 72, p. 654-662, 2009.

SOUZA, C. L.; PERALTA-ZAMORA, P. Reductive degradation of azo-dyes by metallic iron. **Engenharia Sanitária e Ambiental**. v. 11, p. 16-20, 2006.

SPERANDIO, S.; DE BELLE, I.; BREDESEN, D. E. An alternative, *non*-apoptotic form of programmed cell death. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 97, p. 14376-14381, 2000.

STADTMAN, E. R.; VAN REMMEN, H.; RICHARDSON, A.; WEHR, N. B.; LEVINE, R. L. Methionine oxidation and aging. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1703, p. 135-140, 2005.

SUEN, D. F.; NORRIS, K. L.; YOULE, R. J. Mitochondrial dynamics and apoptosis. **Genes & Development**. v. 22, p. 1577-1590, 2012.

SUZUKI, T.; FUJIKURA, K.; HIGASHIYAMA, T.; TAKATA, K. DNA staining for fluorescence and laser confocal microscopy. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**. v. 45, p. 49-53, 1997.

TSUBOY, M. S.; ANGELI, J. P. F.; MANTOVANI, M. S.; KNASMÜLLER, S.; UMBUZEIRO, G. A.; RIBEIRO L. R. Genotoxic, mutagenic and cytotoxic effects of the commercial dye CI Disperse Blue 291 in the human hepatic cell line HepG2. **Toxicology in Vitro**. v. 21, p. 1650-1655, 2007.

UMBUZEIRO, G. A.; FREEMAN, H. S.; WARREN, S. H.; OLIVEIRA, D. P.; TERAQ, Y.; WATANABE, T.; CLAXTON, L. D. The contribution of azo dyes to the mutagenic activity of the Cristais River. **Chemosphere**. v. 60, p. 55-64, 2005a.

UMBUZEIRO, G. A.; FREEMAN, H.; WARREN, S. H.; KUMMROW, F.; CLAXTON, L. D. Mutagenicity evaluation of the commercial product CI Disperse Blue 291 using different protocols of the Salmonella assay. **Food and Chemical Toxicology**. v. 43, p. 49-56, 2005b.

UMBUZEIRO, G. A.; ROUBICEK, D. A.; RECH, C. M.; SATO, M. I. Z.; CLAXTON, L. D. Investigating the sources of the mutagenic activity found in a river using the Salmonella assay and different water extraction procedures. **Chemosphere**. v. 54, p. 1589-1597, 2004.

UMBUZEIRO, G. A.; ROUBICEK, D. A.; SANCHEZ, P. S.; SATO, M. I. Z. The Salmonella mutagenicity assay in a surface water quality monitoring program based on a 20-year survey. **Mutation Research**. v. 491, p. 119-126, 2001.

UMBUZEIRO, G. A.; WRREN, S. H.; CLAXTON, L. D. The mutation spectra of chlorinated drinking water samples using the base-specific TA7000 strains of Salmonella in the micro-suspension assay. **Mutation Research**. v. 609, p. 26-33, 2006.

URDINGUIO, R. G.; SANCHEZ-MUT, J. V.; ESTELLER, M. Epigenetic mechanisms in neurological diseases: genes, syndromes, and therapies. **Lancet Neurology**. v. 8, p. 1056-1072, 2009.

VAN LOO, G.; SAELENS, X.; VAN GURP, M.; MACFARLANE, M.; MARTIN, S. J.; VANDENABEELE, P. The role of mitochondrial factors in apoptosis: a Russian roulette with more than one bullet. **Cell Death & Differentiation**. v. 9, p. 1031-1042, 2002.

VERDINE, G. L.; BRUNER. S. D. How do DNA repair proteins locate damaged bases in the genome?. **Chemistry & Biology**. v. 4, p. 329-334, 1997.

WANG, T. C.; SONG, Y. S.; WANG, H.; ZHANG, J.; YU, S. F.; GU, Y. E.; CHEN, T.; WANG, Y.; SHEN, H. Q.; JIA, G. Oxidative DNA damage and global DNA hypomethylation are related to folate deficiency in chromate manufacturing workers. **Journal of Hazardous Materials**. v. 213-214, p. 440-444, 2012.

WANG, X. The expanding role of mitochondria in apoptosis. **Genes & Development**. v. 15, p. 2922-2933, 2012.

WANG, Y.; LEUNG, F. C. C. An evaluation of new criteria for CpG islands in the human genome as gene markers. **Bioinformatics**. v. 20, p. 1170-1170, 2004.

WATANABE, H. K.; HASHIMOTO, Y.; ABE, I.; SATO, H. Carcinogenicities of 3-methoxy-4-aminoazobenzene, N-hydroxy-3-methoxy-4-aminoazobenzene and related azo dyes in the mouse. **Japanese Journal of Cancer Research**. v. 73, p. 136-140, 1982.

WATANABE, T.; NUKAYA, H.; TERAOKA, Y.; TAKAHASHI, Y.; TADA, A.; TAKAMURA, T.; SAWANISHI, H.; OHE, T.; HIRAYAMA, T.; SUGIMURA, T.; WAKABAYASHI, K. Synthesis of 2-phenylbenzotriazole-type mutagens, PBTA-5 and PBTA-6, and their detection in river water from Japan. **Mutation Research**. v. 498, p. 107-115, 2001.

WATANABE, T.; OHBA, H.; ASANOMA, M.; HASEI, T.; TAKAMURA, T.; TERAOKA, Y.; SHIOZAWA, T.; HIRAYAMA, T.; WAKABAYASHI, K.; NUKAYA, H. Isolation and identification of *non*-chlorinated phenylbenzotriazole (*non*-CIPBTA)-type mutagens in the Ho River in Shizuoka Prefecture, Japan. **Mutation Research**. v. 609, p. 137-145, 2006.

WATANABE, T.; SHIOZAWA, T.; TAKAHASHI, Y.; TAKAHASHI, T.; TERAOKA, Y.; NUKAYA, H.; TAKAMURA, T.; SAWANISHI, H.; OHE, T.; HIRAYAMA, T.; WAKABAYASHI, K. Mutagenicity of two 2-phenylbenzotriazole derivatives, 2-[2-(acetylamino)-4-(diethylamino)-5-methoxyphenyl]-5-amino-7-bromo-4-chloro-2H-benzotriazole and 2-[2-(acetylamino)-4-(diallylamino)-5-methoxyphenyl]-5-amino-7-bromo-4-chloro-2H-benzotriazole and their detection in river water in Japan. **Mutagenesis**. v. 17, p. 293-299, 2002.

WIDSCHWENDTER, M.; JIANG, G.; WOODS, C.; MÜLLER, H. M.; FIEGL, H.; GOEBEL, G.; MARTH, C.; MÜLLER-HOLZNER, E.; ZEIMET, A. G.; LAIRD, P. W.; EHRLICH, M. DNA hypomethylation and ovarian cancer biology. **Cancer research**. v. 64, p. 4472-4480, 2004.

WROBEL, K.; LANDERO FIGUEROA, J. A.; ZAINA, S.; LUND, G.; Phosphorus and osmium as elemental tags for the determination of global DNA methylation a novel application of high performance liquid chromatography inductively coupled plasma mass spectrometry in epigenetic studies. **Journal of Chromatography B**. v. 878, p. 609-614, 2010.

WU, L. L.; CHIOU, C. C.; CHANG, P. Y.; WU, J. T. Urinary 8-OHdG: a marker of oxidative stress to DNA and a risk factor for cancer, atherosclerosis and diabetics. **Clinica Chimica Acta**. v. 339, p. 1-9, 2004.

XIONG, Z.; LAIRD, P. W. COBRA: a sensitive and quantitative DNA methylation assay. **Nucleic Acids Research**. v. 25, p. 2532-2534, 1997.

YANG, I.; FORTIN, M. C.; RICHARDSON, J. R.; BUCKLEY, B. Fused-core silica column ultra-performance liquid chromatography-ion trap tandem mass spectrometry for determination of global DNA methylation status. **Analytical Biochemistry**. v. 409, p. 138-143, 2011.

YAUK, C.; POLYZOS, A.; ROWAN-CARROLL, A.; SOMERS, C. M.; GODSCHALK, R. W.; VAN SCHOOTEN, F. J.; BERNDT, M. L.; POGRIBNY, I. P.; KOTURBASH, I.; WILLIAMS, A.; DOUGLAS, G. R.; KOVALCHUK, O. Germ-line mutations, DNA damage, and global hypermethylation in mice exposed to particulate air pollution in an urban/industrial location. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 105, p. 605-610, 2008.

ZAMARAEVA, M. V.; SABIROV, R. Z.; MAENO, E.; ANDO-AKATSUKA, Y.; BESSONOVA, S. V.; OKADA, Y. Cells die with increased cytosolic ATP during apoptosis: a bioluminescence study with intracellular luciferase. **Cell Death Differ**. v. 12, p. 1390-1397, 2005.

ZHANG, H.; BECKMAN, J. W.; GUENGERICH, F. P. Frameshift deletion by *Sulfolobus solfataricus* P2 DNA polymerase Dpo4 T239W is selective for purines and involves normal conformational change followed by slow phosphodiester bond formation. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 284, p. 35144-35153, 2009.

ZHANG, J. J.; ZHANG, L.; ZHOU, K.; YE, X.; LIU, C.; ZHANG, L.; KANG, J.; CAI, C. Analysis of global DNA methylation by hydrophilic interaction ultra high-pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Analytical Biochemistry**. v. 413, p. 164-170, 2011.

ZUH, J. K. Active DNA demethylation mediated by DNA glycosylases. **Annual Review of Genetic**. v. 43, p. 143-166, 2009.

ANEXO I

Ficha do Aluno

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

FICHA DO ALUNO

9141 - 6067701/2 - Tiago Franco de Oliveira

Email: tito@usp.br
Data de Nascimento: 14/06/1985
Cédula de Identidade: RG - 43.742.759-6 - SP
Local de Nascimento: Estado de São Paulo
Nacionalidade: Brasileira
Graduação: Bacharel em Biomedicina - Faculdades Integradas Einstein de Limeira - Associação Limeirense de Educação e Cultura - São Paulo - Brasil - 2007

Curso: Doutorado Direto
Programa: Toxicologia e Análises Toxicológicas
Data de Matrícula: 12/02/2008
Início da Contagem de Prazo: 12/02/2008
Data Limite: 11/06/2012
Orientador: Prof(a). Dr(a). Ana Paula de Melo Loureiro - 12/02/2008 até o presente. E.Mail: apmlou@usp.br
Proficiência em Línguas: Inglês, Aprovado em 21/10/2010
Prorrogação: 120 dias
 Período de 12/02/2012 a 11/06/2012
Data de Aprovação no Exame de Qualificação: Aprovado em 02/08/2011
Data do Depósito do Trabalho:
Título do Trabalho:
Data Máxima para Aprovação da Banca:
Data de Aprovação da Banca:
Data Máxima para Defesa:
Data da Defesa:
Resultado da Defesa:
Histórico de Ocorrências: Ingressou no Doutorado Direto em 12/02/2008
 Prorrogação em 11/01/2012
 Matrícula de Acompanhamento em 27/02/2012

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 27/02/2012

Impresso em: 03/06/12 19:44:45

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

FICHA DO ALUNO

9141 - 6067701/2 - Tiago Franco de Oliveira

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
QBQ5741-4/2	Resposta Molecular de Organismos Aquáticos Expostos a Poluentes Ambientais. Regulação e Expressão de Proteínas, Danos Celulares e Biomarcadores (Instituto de Química - Universidade de São Paulo)	11/03/2008	13/05/2008	120	8	100	A	N	Concluída
FBC5747-1/4	Toxicologia Forense	15/04/2008	19/05/2008	75	5	90	B	N	Concluída
HSA5740-3/3	Higiene e Toxicologia Ocupacional (Faculdade de Saúde Pública - Universidade de São Paulo)	03/06/2008	15/07/2008	60	4	100	A	N	Concluída
FBC5802-1/4	Seminários Gerais em Toxicologia I	11/08/2008	24/11/2008	30	2	100	A	N	Concluída
EDM5791-5/1	Metodologia do Ensino Superior (Faculdade de Educação - Universidade de São Paulo)	13/08/2008	04/11/2008	120	8	100	A	N	Concluída
FBC5795-7/2	Radicais Livres em Bioquímica Clínica	04/11/2008	08/12/2008	75	0	0	-	N	Matrícula cancelada
FBC5752-1/3	Danos em Biomoléculas e o seu Papel no Monitoramento da Exposição a Agentes Tóxicos	02/06/2009	06/07/2009	45	0	0	-	N	Turma cancelada
Atividade do Programa	Participou da Etapa de Estágio Supervisionado em Docência do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino junto à Disciplina FBC-0520 Análises Toxicológicas, ministrada aos alunos de graduação do curso de Farmácia-Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (1)	01/07/2009	30/11/2009	-	3	0	-	-	-
FBC5752-2/1	Danos em Biomoléculas e o seu Papel no Monitoramento da Exposição a Agentes Tóxicos	21/08/2009	24/09/2009	45	3	100	A	N	Concluída
6045842-1/1	Escola de Altos Estudos em Toxicologia (Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo)	30/11/2009	13/12/2009	60	4	100	A	N	Concluída
FBC5784-2/4	Tópicos Avançados em Toxicologia II	17/08/2010	14/12/2010	30	2	75	A	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito de tese	
Disciplinas:	25	25	39
Atividades Programadas:			
Seminários:			
Estágios:			
Total:	25	25	39

Créditos Atribuídos à Tese: 167

Observações:

1) Créditos atribuídos de acordo com o disposto na Portaria GR-3588 e GR-4391 - PAE, de 31.08.09 e aprovados pela Comissão de Pós-Graduação, em Sessão de 30/04/2010.

Conceito a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.
Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 27/02/2012

Impresso em: 03/06/12 19:44:45

ANEXO II
Curriculum Vitae

TIAGO FRANCO DE OLIVEIRA

tito@usp.br

Address: Av. Prof. Lineu Prestes, N° 580, 13B, Butantã,
São Paulo, 05508-900, SP – Brazil

PERSONAL INFORMATION:

Name used in Bibliographic Citations: OLIVEIRA, T. F.; De OLIVEIRA, T.F.;
de Oliveira, Tiago Franco

Date of Birth: 06/14/1985 – Limeira, São Paulo – Brazil

EDUCATION:

2008– PhD in Toxicology and Toxicological Analyses, Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo – USP, Brazil. **Title of project:** Cytotoxicity of the CI DB291 dinitrofenilazo dye: biotransformation, oxidative stress and epigenetic change in HepG2 cells. **Advisor:** Dr. Ana Paula De Melo Loureiro. **Keywords:** Carcinogenesis, mutagenesis, DNA adducts, DNA methylation, DB 291, Nitro-Azo Dyes, non CIPBTA and mass spectrometry. **Scholarship from:** Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

2003 – 2006, Bachelor's in Biomedical Sciences, Faculty of Biomedical Sciences, FIEL, Brazil. **Title:** Effects of ethanol in rat's molars microhardness and morphology during pregnancy. **Advisor:** Dr. Marcelo Fabiano Gomes Boriollo. **Keywords:** Microhardness, morphology and scanning electron microscopy

COMPLEMENTARY EDUCATION:

2011, Short-Term Course: “The Interpretation of Mass Spectra: EI-MS and ESI-MS/MS”; Brazilian Society of Mass Spectrometry - BrMASS, Campinas, Brazil.

2011, Short-Term Course: “Epigenetics”; Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo – USP, Brazil.

2011, Short-Term Course: “Quality assurance, method validation, calculation of uncertainty”, Brazilian Society of Toxicology – SBTOx, São Paulo, Brazil.

2011, Short-Term Course: “Getting a manuscript accepted and published more quickly: what can the author do to help?”; Brazilian Society of Toxicology – SBTOx, São Paulo, Brazil.

2010, Short-Term Course: “Applications of flow cytometry in experimental models”; Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo – USP, Brazil.

2009, Short-Term Course: “School of advanced studies in toxicology”; Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo – USP, Brazil.

2008, Short-Term Course: “Genotoxicity evaluation”; Brazilian Society of Environmental Mutagenesis, Carcinogenesis and Teratogenesis – SBMCTA, Ribeirão Preto, Brazil.

2007, Short-Term Course: “Salmonella / microsome assay applications”, Faculty of Biomedicine, FIEL, Brazil.

2006, Continuing Education: “Electrophoresis in haemoglobinopathies diagnosis”, Faculty of Biomedicine, FIEL, Brazil.

2004, Continuing Education: “Mutation and Cancer”, Faculty of Biomedical Sciences, FIEL, Brazil.

2004, Continuing Education: “Colpocytology”, Faculty of Biomedical Sciences, FIEL, Brazil.

LANGUAGES:

English: *Understanding:* Fluent, *Speaking:* Fluent, *Writing:* Fluent, *Reading:* Fluent

Portuguese: *Understanding:* Fluent, *Speaking:* Fluent, *Writing:* Fluent, *Reading:* Fluent

Español: *Understanding:* Fluent, *Speaking:* Basic, *Writing:* Basic, *Reading:* Fluent

Italian: *Understanding:* Fluent, *Speaking:* Basic, *Writing:* Basic, *Reading:* Basic

AWARDS:

2011, Best Abstract Prize, "CYTOTOXIC AND GENOTOXIC EFFECTS OF PURIFIED CI DB291 DINITROPHENYLHAZO: INDUCTION OF OXIDATIVE DAMAGE, DNA FRAGMENTATION AND CELL CYCLE ARREST", XVII Brazilian Congress of Toxicology, Ribeirão Preto, Brazil, 2011; Journal of Toxicology and Environmental Health and Taylor & Francis Group.

2011- Best Abstract Prize, "OXIDATIVE DAMAGE AND EPIGENETIC CHANGES IN INDIVIDUALS EXPOSED TO SUGAR-CANE BURNING ", XVII Brazilian Congress of Toxicology, Ribeirão Preto, Brazil, 2011; Journal of Toxicology and Environmental Health and Taylor & Francis Group.

2011- Best oral presentation; Area: Experimental Toxicology, XVII Brazilian Congress of Toxicology, Brazilian Society of Toxicology – SBTOX.

2011- Honorable Mention: "Evaluation of lipid peroxidation in the gingival sulcular fluid: Use of high-performance liquid chromatography", 28th SBPqO Annual Meeting; Brazilian Society for Dental Research – SBPqO.

2009- Best scientific Abstract presented as a poster, "TOXICITY OF THE CONTENTS OF LIGHT STICKS: FORMATION OF DNA ADDUCTS AND OXIDATIVE DAMAGE IN HEPG2 CELLS", XVI Brazilian Congress of Toxicology, Belo Horizonte, Brazil, 2009; Brazilian Society of Toxicology – SBTOX.

2009, Best oral presentation Annual Symposium of Pharmaceutical Science Research, Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo – USP, Brazil.

ARTICLES PUBLISHED IN SCIENTIFIC JOURNALS:

2012, BROHEM, C.A.; MASSARO R.R.; TIAGO M.; MARINHO, C.E.; ALMEIDA, R.L.; RIVELLI, D.P.; ALBUQUERQUE, R.C.; OLIVEIRA, T.F.; LOUREIRO, A.P.M.; OKADA, S.; SOENGAS, M.; MORAES-BARROS, S.B. & MARIA-ENGLER S.S. **4-nerolidylcatechol induces apoptosis via ROS and Noxa in melanoma cell lines.** *Pigment Cell & Melanoma Research*.

2012, BASTOS, A.B.; LOUREIRO, A.P.M; OLIVEIRA, T.F.; CORBI, S.C.T.; CAMINAGA, R.M.S.; ORRICO, S.R. **Quantitation of malonaldehyde in gingival crevicular fluid by a high-performance liquid-chromatography-based method.** *Analytical Biochemistry (Print)*. v.423, p. 141 – 146.

2011, Garcia, Camila Carrião Machado, Angeli, José Pedro F., Freitas, Florêncio Porto, Gomes, Osmar Francisco, de Oliveira, Tiago Franco, Loureiro, Ana Paula Melo, Di Mascio, Paolo, Medeiros, Marisa Helena Gennari de. **[13C2]-Acetaldehyde promotes unequivocal formation of 1,N²-propano-2'-deoxyguanosine in human cells.** *Journal of the American Chemical Society*, p.110523140305011 – 9143.

2011, Ribeiro, André Luiz Teroso, Shimada, Ana Lúcia Borges, Hebeda, Cristina Bichels, Oliveira, Tiago Franco de, Loureiro, Ana Paula de Melo, Filho, Walter dos Reis Pereira, Santos, Alcinéa Meigikos dos Anjos, Tavares de Lima, Wothan, Farsky, Sandra Helena Poliselli. **In vivo hydroquinone exposure alters circulating neutrophil activities and impairs LPS-induced lung inflammation.** *Toxicology (Amsterdam)*. v.288, p.1 - 7.

2007, Bianchi, Fabio José, Oliveira, Tiago Franco de, Saito, Cristiane Borges Pereira, Peres, Regina Célia Rocha, Line, Sérgio Roberto Peres, **Association between polymorphism in the promoter region (G/C-915) of PAX9 gene and third molar agenesis.** *Journal of Applied Oral Science*, v.15, p.382 - 386.

LATEST ABSTRACTS PUBLISHED IN SCIENTIFIC MEETINGS:

2011, DE OLIVEIRA, TIAGO FRANCO, LOUREIRO, A.P.M. **CYTOTOXIC AND GENOTOXIC EFFECTS OF THE PURIFIED CI DB291 DINITROPHENYLAZO DYE IN HEPG2 CELLS** In: 47th Congress of European Societies of Toxicology, Paris, France. *Toxicology Letters*.

2011, FARSKY, SANDRA HELENA POLISELLI, RIBEIRO, ANDRÉ LUIZ TEROSO, SHIMADA, ANA LÚCIA BORGES, HEBEDA, CRISTINA BICHELS, DE OLIVEIRA, T.F., LOUREIRO, A. P. M., FILHO, WALTER DOS REIS PEREIRA, SANTOS, ALCINÉA MEIGIKOS DOS ANJOS, TAVARES DE LIMA, WOTHAN IN VIVO HYDROQUINONE EXPOSURE ALTERS CIRCULATING NEUTROPHILS ACTIVITIES AND IMPAIRS LPS-INDUCED LUNG INFLAMMATION In: 10th World Congress on Inflammation, 2011, Paris, France. *Inflammation Research*.

2011, DE OLIVEIRA, TIAGO FRANCO, LOUREIRO, A.P.M. MASS SPECTROMETRY AS A TOOL TO DETECT FOOTPRINTS OF GENOMIC CHANGES In: IV Congress of the Brazilian Society of Mass Spectrometry, Campinas, Brazil. *BrMass Review*.

2011 BAQUEDANO, C., De OLIVEIRA, T.F., LOUREIRO, A. P. M. MECHANISMS OF TOXICITY TETRAHYDROFURAN: GENOTOXIC AND EPIGENETIC EFFECTS In: IV Congress of the Brazilian Society of Mass Spectrometry, Campinas, Brazil. *BrMass Review*.

2011 OLIVEIRA, A. A. F.; OLIVEIRA, T. F.; LEMOS, M.; SALDIVA, P. H. N.; LOUREIRO, A. P.M. GENOTOXIC AND EPIGENETIC CHANGES IN MICE EXPOSED TO AIR POLLUTANTS OF SÃO PAULO, BRAZIL In: IV Congress of the Brazilian Society of Mass Spectrometry, Campinas, Brazil. *BrMass Review*.

2011, DE OLIVEIRA, TIAGO FRANCO, LOUREIRO, A.P.M. CYTOTOXIC AND GENOTOXIC EFFECTS OF PURIFIED CI DB291 DINITROPHENYLAZO: INDUCTION OF OXIDATIVE DAMAGE, DNA FRAGMENTATION AND CELL CYCLE ARREST In: XVII Brazilian Congress of Toxicology, Ribeirão Preto, Brazil. *Brazilian Journal of Toxicology*.

2011, GUSMAN, A. P. P., SANTOS, F.A, De OLIVEIRA, T.F., RODRIGUES, C.D., DURÃO, A.C.S., TORRES, L.H.L., MARCOURAKIS, T., LOUREIRO, A. P. M., SANTOS, U.P. DANO OXIDATIVO E ALTERAÇÕES EPIGENÉTICAS EM INDIVÍDUOS EXPOSTOS A PRODUTOS DA QUEIMA DA CANA-DE-AÇÚCAR In: XVII Brazilian Congress of Toxicology, Ribeirão Preto, Brazil. *Brazilian Journal of Toxicology*.

2011, RIBEIRO, ANDRÉ LUIZ TEROSO, SHIMADA, ANA LÚCIA BORGES, HEBEDA, CRISTINA BICHELS, DE OLIVEIRA, TIAGO FRANCO, LOUREIRO, ANA PAULA DE MELO, FILHO, WALTER DOS REIS PEREIRA, SANTOS, ALCINÉA MEIGIKOS DOS ANJOS, TAVARES DE LIMA, WOTHAN, FARSKY, SANDRA HELENA POLISELLI *In vivo* HYDROQUINONE EXPOSURE ALTERS CIRCULATING NEUTROPHIL ACTIVITIES AND IMPAIRS LPS-INDUCED LUNG INFLAMMATION In XVII Brazilian Congress of Toxicology, Ribeirão Preto, Brazil. *Brazilian Journal of Toxicology*.

2011, BAQUEDANO, C., De OLIVEIRA, T.F., PEDROSA, M.S., HERMIDA, S.A.S., LOUREIRO, A. P. M. MECANISMOS DE TOXICIDADE DO TETRAIDROFURANO: EFEITOS GENOTÓXICOS E EPIGENÉTICOS In: XVII Brazilian Congress of Toxicology, Ribeirão Preto, Brazil. *Brazilian Journal of Toxicology*.

2011, De OLIVEIRA, TIAGO FRANCO, LOUREIRO, A.P.M. FOOTPRINTS OF GENOMIC CHANGES: DNA ADDUCTS & DNA METHYLATION In: XVI Technology and Pharmaceutical Science Week - SFCT, São Paulo, Brazil. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*.

2011, GUSMAN, A. P. P., SANTOS, F.A, De OLIVEIRA, T.F., RODRIGUES, C.D., DURÃO, A.C.S., TORRES, L.H.L., MARCOURAKIS, T., LOUREIRO, A. P. M., SANTOS, U.P. OXIDATIVE DAMAGE AND EPIGENETIC CHANGES IN INDIVIDUALS EXPOSED TO SUGAR-CANE BURNING In: XVI Technology and Pharmaceutical Science Week - SFCT, São Paulo, Brazil. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*.

2011, BAQUEDANO, C., De OLIVEIRA, T.F., PEDROSA, M.S., HERMIDA, S.A.S., LOUREIRO, A. P. M. MECHANISMS OF TOXICITY TETRAHYDROFURAN: GENOTOXIC AND EPIGENETIC EFFECTS In: XVI Technology and Pharmaceutical Science Week - SFCT, São Paulo, Brazil. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*.

2011, CHIACCHIA, B. ; BOSIO, B. C. ; De OLIVEIRA, T.F. ; LOUREIRO, A. P. M. ; MOREAU, R.L.M. VALIDATION OF HPLC-DAD METHOD FOR THE QUANTIFICATION OF MALONDIALDEHYDE: APPLICATION TO THE RAT LIVER AND KIDNEY SAMPLES In: XVI Technology and Pharmaceutical Science Week - SFCT, São Paulo, Brazil. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*.

2011, FIORI, L.C., BASTOS, A.S., LOUREIRO, A. P. M., De OLIVEIRA, T.F., CORBI, S.C.T., GIOVANI, B.P., SCAREL-CAMINAGA, R.M., ORRICO, S.R.P. EVALUATION OF FLUID LIPID PEROXIDATION IN THE SULCULAR GINGIVA. EMPLOYMENT OF HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY In: 28th SBPqO Annual Meeting; Brazilian Society for Dental Research – SBPqO, Águas de Lindóia, Brazil. *Brazilian Oral Research*.

2010, de OLIVEIRA, TIAGO FRANCO, DE MELO LOUREIRO, ANA PAULA. DNA DAMAGE AND CYTOTOXIC EFFECTS OF THE CI DB291PURIFIED DINITROPHENYLazo DYE IN HEPG2 CELLS In: 17th Annual Meeting of the Society-for-Free-Radical-Biology-Medicine /15th Biennial Meeting of the Society-for-Free-Radical-Research-International, Orlando, USA. *Free Radical Biology and Medicine*.

2010, OLIVEIRA, T. F., SILVA, A.L.M., LOUREIRO, A. P. M. CYTOTOXIC EFFECTS OF THE DB291 PURIFIED DINITROPHENYLazo DYE IN HEPG2 CELLS In: XV Technology and Pharmaceutical Science Week - SFCT, São Paulo, Brazil. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*.

2010, SILVA, A.L.M., BAGATTINI, R., OLIVEIRA, T. F., CAMPOS, I. P. A., BECHARA, E. J. H., LOUREIRO, A. P. M. REACTIVITY WITH BIOMOLECULES AND CELLULAR TOXICITY OF “LIGHT STICK” SOLUTIONS In: XV Technology and Pharmaceutical Science Week - SFCT, São Paulo, Brazil. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*.

2010, SILVA, A.L.M., BAGATTINI, R., OLIVEIRA, T. F., CAMPOS, I. P. A., BECHARA, E. J. H., LOUREIRO, A. P. M. TOXICITY OF “LIGHT STICK” SOLUTIONS: DNA ADDUCT FORMATION AND CELL OXIDATIVE DAMAGE In: XVI Congresso Paulista de Farmacêuticos, São Paulo. *Revista do Congresso Paulista de Farmacêuticos*.

2009, OLIVEIRA, T. F., SILVA, A.L.M., LOUREIRO, A. P. M. CYTOTOXIC EFFECTS OF CI DB291 DYE IN THE HUMAN HEPATIC CELL LINE HEPG2 In: XVI Brazilian Congress of Toxicology, Ribeirão Preto, Brazil. *Brazilian Journal of Toxicology*.

2009, SILVA, A.L.M., BAGATTINI, R., OLIVEIRA, T. F., CAMPOS, I. P. A., BECHARA, E. J. H., LOUREIRO, A. P. M. TOXICIDADE DO CONTEÚDO DE LIGHT STICKS: FORMAÇÃO DE ADUTOS COM DNA E DANO OXIDATIVO EM CÉLULAS HEPG2 In: XVI Brazilian Congress of Toxicology, Ribeirão Preto, Brazil. *Brazilian Journal of Toxicology*.

2009, OLIVEIRA, T. F., SILVA, A.L.M., LOUREIRO, A. P. M. CYTOTOXIC EFFECTS OF THE CI DB291 DYE AND THEIR REDUCTION PRODUCTS In: XIV Technology and Pharmaceutical Science Week - SFCT, São Paulo, Brazil. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*.

2009, SILVA, A.L.M., BAGATTINI, R., OLIVEIRA, T. F., CAMPOS, I. P. A., BECHARA, E. J. H., LOUREIRO, A. P. M. GENOTOXICITY AND CYTOTOXICITY OF “LIGHT STICKS” SOLUTIONS In: XIV Technology and Pharmaceutical Science Week - SFCT, São Paulo, Brazil. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*.

2009, SILVA, A.L.M., BAGATTINI, R., OLIVEIRA, T. F., CAMPOS, I. P. A., BECHARA, E. J. H., LOUREIRO, A. P. M. TOXICITY OF “LIGHT STICK” SOLUTIONS: DNA ADDUCT FORMATION AND CELL OXIDATIVE DAMAGE In: III Congress of the Brazilian Society of Mass Spectrometry, Campinas, Brazil. *BrMass Review*.

2008, OLIVEIRA, T. F., SILVA, A.L.M., LOUREIRO, A. P. M. CYTOTOXIC EFFECTS OF THE CI DB291 DYE AND THEIR REDUCTION / CHLORINATION PRODUCTS In: 14th Annual Meeting of the Society for Free Radical Biology and Medicine - SFRBM, Indianapolis, USA. *Free Radical Biology and Medicine*.

2008, SILVA, A.L.M., BAGATTINI, R., OLIVEIRA, T. F., CAMPOS, I. P. A., BECHARA, E. J. H., LOUREIRO, A. P. M. DNA ADDUCT FORMATION AND CELLULAR TOXICITY OF “LIGHT STICK” SOLUTIONS In: 14th

Annual Meeting of the Society for Free Radical Biology and Medicine - SFRBM, Indianapolis, USA. *Free Radical Biology and Medicine*.

2006, OLIVEIRA, T. F., BIANCHI, F. J. EFFECTS OF ALCOHOL ON INFLAMMATION CAUSED BY CARRAGEENAN IN RATS PLEURAL CAVITY. In: XXI Annual Meeting of the Federation of Experimental Biology Societies - Fesbe, 2006, Águas de Lindóia, Brazil. *Fesbe Review*.

2006, BIANCHI, F. J., OLIVEIRA, T. F. ASSOCIATION BETWEEN POLYMORPHISM IN THE PROMOTER REGION (G/C-915) OF PAX9 GENE AND THIRD MOLAR AGENESIS. In: XXI Annual Meeting of the Federation of Experimental Biology Societies - Fesbe, 2006, Águas de Lindóia, Brazil. *Fesbe Review*.