

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

Investigação de lesões em DNA induzidas pelo
Hidrocarboneto policíclico aromático antantreno

Igo Dutra

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

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

São Paulo
2007

Igo Dutra

Investigação de lesões em DNA induzidas pelo hidrocarboneto
policíclico aromático antantreno

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

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

Prof^a. Dr^a. Tania Marcourakis
1^o. examinador

Dr^a. Janice Onuki
2^o. examinador

São Paulo, _____ de _____.

Dedicatória

A DEUS QUE NOS DEU A VIDA.

Ao meu pai, Geraldo Dutra,

e

À minha mãe Maria Aparecida Andreazi Dutra, cujos ensinamentos, exemplo de vida e dedicação me inspiram à ser um ser humano melhor.

À Sheyla Aki Watanabe, a namorada, companheira, amiga fiel sempre presente nos melhores momentos da minha vida.

À minha querida irmã Vanessa Dutra, cuja amizade e amor fraternal jamais me faltaram.

“Os laços que nos unem são de sangue, respeito, amor e alegria pela vida de cada um de nós” – Autor desconhecido.

Agradecimentos

“As pessoas entram em nossas vidas por acaso, mas não é por acaso que elas permanecem.” Dostoyevsky.

A minha orientadora Prof. Dr^a Ana Paula de Melo Loureiro, exemplo de dedicação ao ensino e por ter me aceitado em seu laboratório.

“Tenho amigos que não sabem o quanto são meus amigos. Não percebem o amor que lhes devoto e a necessidade que tenho deles. **Vinicius de Moraes (1913-1980)**.”

Aos meus amigos e moradores da Abádia dos Dourados, Zé Luis (Piranha), Rodrigo (Louco, Festa) e quarto elemento.

As funcionárias do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (USP) Dalva, Luzia, Roseli, Helena e Karla (SBTOX) pelo imprescindível e delicioso café e pelas conversas descontraídas.

A todas as pessoas do núcleo de análises instrumental (NAI), por terem me ajudado no início da minha caminhada.

A Daniela (Dani) e Vânia (Vaninha) só uma palavra: CONSEGUIMOS.

As minhas colegas de laboratório Silvia, Julita, Mariana, Carol, Luan e a minha amiga Paula Carpes.

Aos meus amigos da época da graduação de Farmácia, Gustavo (Urso), Gláucio (Wolverine), da graduação de Direito, Eduardo (Chapado), Cleverson (Cuba), Osmael (Tata), Márcio (Guima), João Petrolini pelos inesquecíveis momentos e festas que passamos juntos, lembranças que sempre permanecerão.

A Prof^a. Dra. Marisa H. G. Medeiros e ao Prof^o. Dr. Paolo Di Mascio por “emprestar” seus equipamentos e laboratórios para a realização dos meus experimentos.

Ao Osmar sempre dando dicas e sendo uma pessoa importante para a realização dos experimentos e pela amizade.

E a todos aqueles que de alguma forma me ajudou para a conclusão deste trabalho, o meu muito obrigado.

Apoio Financeiro

FAPESP- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

CNPq- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

Pró-Reitoria de Pesquisa – Universidade de São Paulo

Agradecimento especial à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (**FAPESP**) pela bolsa concedida e pelo financiamento do projeto de pesquisa

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS, TABELAS E ESQUEMAS	i
ABREVIACÕES	iii
RESUMO	v
ABSTRACT	vi
1 INTRODUÇÃO	1
1.1. Carcinogênese Química	1
1.2. Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs)	4
1.3. Biotransformação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) e lesões em DNA	8
1.4. Adutos de DNA como biomarcadores	14
1.5. Danos ao DNA por produtos de origem endógena	18
1.6. Métodos empregados para detecção de adutos de DNA	21
1.7. Efeitos epigenéticos de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs)	23
2. OBJETIVOS	26
2.1. Objetivos específicos	26
3. MATERIAIS E MÉTODOS	27
3.1. Reagentes	27
3.2. Equipamentos	27
3.3. Oxidação do antantreno para obtenção de quinonas e hidroquinonas	28
3.3.1. Análise dos produtos de oxidação do antantreno por HPLC/PDA e HPLC/ESI/MS	30
3.3.1.a. Condição cromatográfica	30
3.3.1.b Condição cromatográfica	30
3.4. Danos celulares induzidos pelo antantreno e seus produtos de oxidação	31
3.4.1. Cultivo das células	31
3.4.2. Tratamento das células com antantreno, antantreno-quinonas e antantreno-hidroquinonas	32
3.4.2.1. Incubações para determinação da viabilidade celular	32
3.4.2.1.1. Determinação da viabilidade celular pelo ensaio	

do brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT)	33
3.4.2.2. Incubações para extração do DNA e determinação de dano oxidativo (8-oxodGuo)	34
3.4.2.2.1. Extração do DNA	34
3.4.2.2.2. Hidrólise enzimática do DNA	35
3.4.2.2.3. Análise de 8-oxodGuo por HPLC/detecção eletroquímica	35
3.5. Análise de formação de adutos a partir de incubações <i>in vitro</i> de DNA ou 2'-desoxiguanosina com produtos de oxidação do antantreno	36
3.5.1. Incubações de dGuo com antantreno + H ₂ O ₂	36
3.5.1.1. Análise dos produtos das incubações por HPLC/UV/ESI/MS	36
3.5.1.1.a: Condição cromatográfica	37
3.5.2. Incubações de DNA comercial com antantreno e seus produtos de oxidação na presença de peroxidase de rábano (HRP)	37
3.5.2.1. Análise da formação de produtos fluorescentes no DNA por espectrofluorimetria	37
3.5.2.2. Hidrólise enzimática do DNA e análise da formação de adutos por HPLC/UV/Fluorescência e HPLC/ESI/MS	38
3.5.2.2.a: Condição cromatográfica	38
3.6. Análise estatística dos dados	38
4. RESULTADOS	38
4.1. Oxidação do antantreno para quinonas e hidroquinonas	39
4.2. Investigação da toxicidade do antantreno e seus produtos de oxidação em células humanas em cultura	42
4.3. Análise de formação de adutos a partir de incubações <i>in vitro</i> de 2'-desoxiguanosina ou DNA com produtos de oxidação do antantreno	47
5. DISCUSSÃO	56
6. CONCLUSÕES	63
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64