

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

PATRÍCIA DA SILVA PERES

**EFEITO DA GLUTATIONA NA OXIDAÇÃO DA  
2'-DESOXIGUANOSINA PELO OXIGÊNIO  
MOLECULAR SINGLETE**

CURITIBA

2012

PATRÍCIA DA SILVA PERES

**EFEITO DA GLUTATIONA NA OXIDAÇÃO DA  
2'-DESOXIGUANOSINA PELO OXIGÊNIO  
MOLECULAR SINGLETE**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós Graduação em Ciências - Bioquímica, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção de título de mestre em Ciências - Bioquímica.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Glaucia Regina Martinez.

CURITIBA

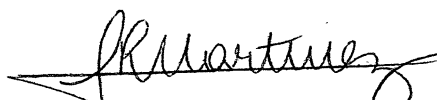
2012

TERMO DE APROVAÇÃO

PATRICIA DA SILVA PERES

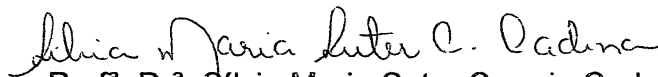
EFEITO DA GLUTATIONA NA OXIDAÇÃO DA 2'-DESOXIGUANOSINA PELO  
OXIGÊNIO MOLECULAR SINGLETE

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências – Bioquímica, no Programa de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:



Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Glauca Regina Martinez (Orientadora)

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – Setor de Ciências Biológicas  
UFPR



Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Silvia Maria Suter Correia Cadena

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – Setor de Ciências Biológicas  
UFPR



Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Silvia Romão

Universidade Federal da Fronteira Sul  
Campus Laranjeira do Sul

Curitiba, 23 de fevereiro de 2012.

Aos meus pais, Ildfonso e Maria Isabel, e  
às minhas irmãs, Renata e Fernanda.  
Pelo apoio incondicional em todas as  
minhas decisões.

## **AGRADECIMENTOS**

À pós-graduação em Ciências – Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, pela oportunidade.

À professora Dra. Glaucia Regina Martinez, pela excelente orientação e confiança em meu trabalho.

A todas as professoras do grupo de Oxidações Biológicas do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, pelo incentivo e colaboração na análise dos resultados desta dissertação.

Ao professor Paolo di Mascio, do Instituto de Química da Universidade de São Paulo e a sua aluna de doutorado Alessandra Scalfò, pela síntese de DHPN, composto essencial para o cumprimento desta pesquisa.

Ao núcleo de Fixação de Nitrogênio do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, pela cessão de equipamentos fundamentais para a conclusão de meus experimentos.

A todos os meus colegas e amigos do grupo de Oxidações Biológicas, pelo apoio e companhia. Em especial à Anna, Beth, Carina, Carol, Deinha, Ju, Maria Carol e Thiago, pela ajuda nas mais diversas etapas deste projeto.

Às minhas amigas da turma de mestrado 2010, especialmente Louise e Rhayla, por tornarem o trabalho muito mais ameno e agradável.

À Capes, CNPq e INCT-Redoxoma, pelo auxílio financeiro.

*"We're never gonna survive unless we get a little crazy."*

Seal.

## RESUMO

O oxigênio molecular singlete ( $^1\text{O}_2$ ) é a forma mais reativa do oxigênio molecular e pode ser gerado por diversos processos, inclusive pela decomposição térmica do endoperóxido DHPNO<sub>2</sub>. Ele é uma espécie reativa de oxigênio (ROS) do tipo não radicalar e possui alta capacidade de danificar todos os tipos de biomoléculas por oxidação. Dentre as biomoléculas, o DNA merece especial atenção devido ao seu papel crucial na replicação e, conseqüentemente, na hereditariedade. Embora outras ROS possam reagir de diferentes formas com as quatro bases do DNA, o  $^1\text{O}_2$  interage especificamente com a base púrica guanina. Isto ocorre em virtude do seu menor potencial de redução e também da energia de seu orbital molecular. O mecanismo de oxidação do nucleosídeo livre 2'-desoxiguanosina (dGuo) por  $^1\text{O}_2$  foi extensivamente estudado e foi mostrado que os produtos principais são os diastereoisômeros da espiroiminodihidantoína (dSp) e a 8-oxodesoxiguanosina (8-oxodGuo). Esta, após adição de nova molécula de  $^1\text{O}_2$ , gera um 5-hidroperóxido capaz de formar imidazolona (dlz) ou guanidinodantoína oxidada. A primeira se transforma em oxazolona por hidrólise e a última se estabiliza em ácido oxalúrico na fita de DNA. A glutationa reduzida (GSH) é um tiol de baixo peso molecular de reconhecida capacidade antioxidante. Ela age principalmente como co-fator para a redução de peróxidos com alteração simultânea para sua forma dissulfeto, a GSSG. O presente trabalho teve como principal objetivo o estudo da reação de oxidação da dGuo por  $^1\text{O}_2$  e o papel que a adição de GSH ou GSSG implicaria ao sistema. Os produtos de oxidação da dGuo foram detectados por cromatografia líquida de alta *performance* (HPLC). Outra abordagem foi a de oxidar a GSH com DHPNO<sub>2</sub> ou H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e depois procurar a geração de GSSG e ácidos sulfínico (GSO<sub>2</sub>H) e sulfônico (GSO<sub>3</sub>H) por HPLC acoplado à espectrometria de massas. Os resultados mostraram que a concentração de DHPNO<sub>2</sub> próxima da mínima necessária para gerar produtos de oxidação da dGuo é de 1 mmol/L. Os produtos de oxidação detectados foram dSp e, em menor quantidade, 8-oxodGuo. A dlz não foi encontrada em nenhuma das incubações testadas. A adição de GSH ao sistema pareceu proteger, num primeiro momento, a oxidação da dGuo, e depois foi bastante eficiente em proteger a oxidação de 8-oxodGuo a dSp, provocando acúmulo de 8-oxodGuo. A GSSG teve pouco ou nenhum efeito sobre o consumo de dGuo e sobre a formação de 8-oxodGuo, mas alterou a geração de dSp, principalmente prevenindo-a. O único produto encontrado após a oxidação da GSH por DHPNO<sub>2</sub> nas condições testadas foi GSSG, enquanto a oxidação deste tiol por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> favoreceu a formação de GSSG, GSO<sub>2</sub>H e GSO<sub>3</sub>H. Juntos, estes resultados indicam que a GSH amplifica os efeitos danosos da interação entre dGuo e  $^1\text{O}_2$  ao provocar o acúmulo de 8-oxodGuo, produto altamente mutagênico que pode ser inserido pela DNA polimerase e provocar uma transversão G → T, ou seja, de guanina para timina.

Palavras-chave: oxigênio singlete, dGuo, GSH, GSSG.

## ABSTRACT

Singlet molecular oxygen ( $^1\text{O}_2$ ) is the most reactive form of molecular oxygen and can be generated by several processes, including thermal decomposition of the endoperoxide DHPNO<sub>2</sub>. It is a non-radical reactive oxygen species (ROS) and it is able to damage all kinds of biomolecules through oxidation. Among all biomolecules, DNA deserves special attention due to its decisive role in replication and in heredity. Although other ROS can react in different ways with the four DNA bases,  $^1\text{O}_2$  interacts specifically with guanine. It occurs due to its lower reduction potential and molecular orbital energy. The mechanisms of oxidation of the free nucleoside 2'-deoxyguanosine (dGuo) by  $^1\text{O}_2$  have been widely studied and it has been showed that its main products are the diastereoisomers of spiroiminodihydantoin (dSp) and the 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxodGuo). This product, after new  $^1\text{O}_2$  addition, generates a 5-hidroperoxide able to form imidazolone (dlz) or oxidized guanidinohydantoin. The former is transformed in oxazolone by hydrolysis and the latter can stabilize in oxaluric acid in the DNA strand. Reduced glutathione (GSH) is a low molecular weight thiol that has acknowledged antioxidant ability. It acts mainly as a co-factor for peroxides reduction, shifting to its disulfide form GSSG. This work had as main goal to study the dGuo oxidation reaction by  $^1\text{O}_2$  and the role of GSH or GSSG in the system. All dGuo oxidation products were detected by high performance liquid chromatography (HPLC). Another approach was to oxidize GSH with DHPNO<sub>2</sub> or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and search for GSSG and sulfinic (GSO<sub>2</sub>H) or sulfonic (GSO<sub>3</sub>H) acids through HPLC coupled to mass spectrometry. Results show that the DHPNO<sub>2</sub> concentration near of the minimal necessary for generating dGuo oxidation products was 1 mmol/L. The oxidizing products detected were dSp and, in less extension, 8-oxodGuo. Imidazolone was not found in any tested incubations. Adding GSH to the system seemed to protect, at first sight, dGuo oxidation. Later, it was very efficient in protecting 8-oxodGuo oxidation to dSp, causing 8-oxodGuo accumulation. GSSG had little or no effect on dGuo consumption and 8-oxodGuo formation, but interfered with dSp generation, mostly preventing it. The single product found after GSH oxidation by DHPNO<sub>2</sub> was GSSG, while this thiol oxidation by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> favored the formation of GSSG, GSO<sub>2</sub>H and GSO<sub>3</sub>H. Taken together, these results indicate that GSH amplifies the harmful effects of the interaction between dGuo e  $^1\text{O}_2$  by provoking 8-oxodGuo accumulation. This is especially dangerous because this product is highly mutagenic and can be inserted by the DNA polimerase, causing a G → T transversion, what means an exchange from guanine to thymine.

Keywords: molecular singlet oxygen, dGuo, GSH, GSSG.

## LISTA DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| FIGURA 1 - CISTEÍNA .....  | 17 |
| FIGURA 2 - OXIDAÇÃO DA CISTEÍNA.....   | 18 |
| FIGURA 3 - TRANSVERSÃO DE GUANINA PARA TIMINA ORIGINADA A PARTIR DA FORMAÇÃO DE 8-OXOdGUO .....  | 23 |
| FIGURA 4 - MECANISMOS DE OXIDAÇÃO DA dGUO POR $^1O_2$ EM MEIO AQUOSO.....  | 24 |
| FIGURA 5 - PRINCIPAIS PRODUTOS DA OXIDAÇÃO DA dGUO POR $^1O_2$ .....   | 25 |
| FIGURA 6 - GLUTATIONA .....  | 27 |
| FIGURA 7 - CICLO CATALÍTICO DA GLUTATIONA .....  | 28 |
| FIGURA 8 - RELAÇÃO M/Z DA GSH E DE SEUS PRODUTOS DE OXIDAÇÃO .....   | 37 |
| FIGURA 9 - CROMATOGRAMA E ESPECTRO DE ABSORÇÃO DA dGUO .....   | 38 |
| FIGURA 10 - CROMATOGRAMA E ESPECTRO DE ABSORÇÃO DA 8-OXOdGUO .....   | 39 |
| FIGURA 11 - CROMATOGRAMA E ESPECTRO DE ABSORÇÃO DOS DIASTEREISÔMEROS DA dSP.....   | 40 |
| FIGURA 12 - CROMATOGRAMA E ESPECTRO DE ABSORÇÃO DA dIZ .41   |    |
| FIGURA 13 - PORCENTAGEM DE dGUO E DE SEUS PRODUTOS DE OXIDAÇÃO 8-OXOdGUO E dSP APÓS A ADIÇÃO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE DHPNO <sub>2</sub> ..... | 43 |
| FIGURA 14 - CONCENTRAÇÃO DE 8-OXOdGUO E DE dSP APÓS A ADIÇÃO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE DHPNO <sub>2</sub> .....                                 | 44 |
| FIGURA 15 - EFEITO DA GSH SOBRE A OXIDAÇÃO DA dGUO COM DHPNO <sub>2</sub> 0,1 mmol/L .....   | 46 |
| FIGURA 16 - EFEITO DA GSH SOBRE A OXIDAÇÃO DA dGUO COM DHPNO <sub>2</sub> 1 mmol/L .....   | 48 |
| FIGURA 17 - EFEITO DA GSSG SOBRE A OXIDAÇÃO DA dGUO COM DHPNO <sub>2</sub> 1 mmol/L .....  | 49 |

|  |    |
|--|----|
| FIGURA 18 - EFEITO DA GSH SOBRE A OXIDAÇÃO DA dGUO COM DHPNO <sub>2</sub> 5 mmol/L .....                 | 51 |
| FIGURA 19 - EFEITO DA GSSG SOBRE A OXIDAÇÃO DA dGUO COM DHPNO <sub>2</sub> 5 mmol/L .....                | 52 |
| FIGURA 20 - EFEITO DA GSH SOBRE A OXIDAÇÃO DA dGUO COM DHPNO <sub>2</sub> 10 mmol/L .....                | 54 |
| FIGURA 21 - EFEITO DA GSSG SOBRE A OXIDAÇÃO DA dGUO COM DHPNO <sub>2</sub> 10 mmol/L .....               | 55 |
| FIGURA 22 - EFEITO DA GSH SOBRE A OXIDAÇÃO DA dGUO.....  | 56 |
| FIGURA 23 - PRODUTOS DA OXIDAÇÃO DA GSH POR <sup>1</sup> O <sub>2</sub> .....                            | 57 |
| FIGURA 24 - PICOS DETECTADOS EM HPLC A PARTIR DA OXIDAÇÃO DA GSH COM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ..... | 58 |
| FIGURA 25 - PRODUTOS DO PICO 1 DA OXIDAÇÃO DA GSH POR H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....                | 59 |
| FIGURA 26 - PRODUTOS DO PICO 2 DA OXIDAÇÃO DA GSH POR H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....                | 59 |

**LISTA DE TABELAS**

|   |    |
|---|----|
| TABELA 1 - DISTRIBUIÇÃO ELETRÔNICA NOS ORBITAIS MOLECULARES ( $\Pi^*$ ) DO OXIGÊNIO NO ESTADO EXCITADO SINGLETE ( $^1\Sigma_g^-$ E $^1\Delta_g$ ) E NO ESTADO FUNDAMENTAL TRIPLETE ( $^3\Sigma_g^-$ ) ..... | 21 |
| TABELA 2 – COMPARAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE dGUO, 8-OXOdGUO E dSP (EM mmol/L) GERADAS POR DHPN E DHPNO <sub>2</sub> 5 mmol/L .....   | 50 |

## LISTA DE SIGLAS

- 8-oxoGua – 8-oxo-7,8-dihidroguanina
- 8-oxodGuo – 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina
- $\gamma$ -GCS -  $\gamma$ -glutamil cisteinil sintetase
- $\gamma$ -GT -  $\gamma$ -glutamiltranspeptidase
- ACN - acetonitrila
- cDNA - DNA complementar
- cGMP - guanosina monofosfato cíclica
- Cys-S<sup>-</sup> - íon tiolato-cisteína
- dGuo – 2'-desoxiguanosina
- DETAPAC – ácido dietilenotriaminopentacético
- DHPN – *N,N'*-di(2,3-dihidropropil)-3,3'-(1,4-naftilideno)dipropanamida
- DHPNO<sub>2</sub> – endoperoxido da *N,N'*-di(2,3-dihidropropil)-3,3'-(1,4-naftilideno)dipropanamida
- dlz - diastereoisômeros de 2-amino-5-[(2-deoxi- $\beta$ -D-eritropentofuranosil) amino]-4*H*-imidazolona-4
- DNA - ácido desoxirribonucléico
- dOz - diastereoisômeros de 2,2-diamino-4-[2-deoxi- $\beta$ -D-eritropentofuranosil amino]-5-(2*H*)-oxazolona
- dSp – diastereoisômeros espiroiminodihidantoína desoxirribose
- EC – eletroquímico
- EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético
- endo III – endonuclease III
- FPG - formamidopirimidina glicosilase
- Gh<sup>ox</sup> - guanidinodantoína oxidada
- GPx ou GSH-Px - glutaciona peroxidase
- GR - glutaciona redutase
- GS - glutaciona sintetase
- GSH – glutaciona
- GSSG - glutaciona dissulfeto
- GSTs - glutaciona-S-transferases

HPLC – cromatografia líquida de alta *performance*  
HPLC-ESI/MS/MS - espectrometria de massa *electrospray* em tandem  
MeOH - metanol  
Mn-TMPyP - porfirina diaqua-meso-tetrakis(4-N-metilpiridiniumil) de manganês  
NADPH – nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato  
NDPO<sub>2</sub> – endoperóxido de 3,3'-(1,4-naftilideno) dipropanoato de sódio  
Oxa – ácido oxalúrico  
PhGPx - lipoperóxido glutaciona peroxidase  
pK<sub>a</sub> - constante de dissociação do ácido  
RNHCl - N-cloroaminas  
ROS – espécies reativas de oxigênio  
ROOH - peróxidos orgânicos  
RSCI - cloretos de sulfenila  
RSNO - proteínas S-nitrosotióis  
RSNOH• - radical tionitróxido  
RSOH - ácido sulfênico  
RSO<sub>2</sub>H - ácido sulfínico  
RSO<sub>3</sub>H – ácido sulfônico  
T4-endo V – T4 dímero de pirimidina glicosilase endonuclease V  
UV - ultravioleta

## SUMÁRIO

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1. INTRODUÇÃO .....</b>   | <b>15</b> |
| <b>2. REVISÃO DA LITERATURA.....</b>   | <b>17</b> |
| 2.1 TIÓIS E ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO.....   | 17        |
| 2.2 OXIGÊNIO MOLECULAR SINGLETE .....  | 20        |
| 2.3 DANOS AO DNA PELO $^1\text{O}_2$ .....   | 22        |
| 2.4 A GLUTATIONA E SUA RELAÇÃO COM OXIGÊNIO SINGLETE .....   | 27        |
| <b>3. OBJETIVOS.....</b>   | <b>32</b> |
| 3.1 Objetivo geral.....  | 32        |
| 3.2 Objetivos específicos.....   | 32        |
| <b>4. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>  | <b>33</b> |
| 4.1 Síntese de endoperóxido de <i>N,N'</i> -di(2,3-dihidroxiopropil)-3,3'-(1,4-naftilideno) dipropanamida (DHPNO <sub>2</sub> )..... | 33        |
| 4.2 Incubação de GSH ou GSSG com dGuo e DHPNO <sub>2</sub> .....   | 33        |
| 4.3 Detecção de 8-oxodGuo.....   | 34        |
| 4.4 Síntese de dSp .....   | 34        |
| 4.5 Detecção da dGuo e de dSp .....  | 35        |
| 4.6 Síntese de imidazolona .....   | 35        |
| 4.7 Detecção de imidazolona .....  | 35        |
| 4.8 Incubação de GSH com DHPNO <sub>2</sub> ou H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....   | 36        |
| 4.9 Detecção dos produtos de oxidação da GSH.....  | 36        |
| 4.10 Análise estatística.....  | 37        |
| <b>5. RESULTADOS.....</b>  | <b>38</b> |
| 5.1 Espectros de absorção e cromatogramas representativos.....   | 38        |
| 5.2 Efeito de diferentes concentrações de $^1\text{O}_2$ sobre a oxidação da dGuo ..   | 42        |
| 5.3 Efeito de diferentes concentrações de GSH e GSSG sobre a oxidação da dGuo com DHPNO <sub>2</sub> 0,1 mmol/L .....                | 45        |
| 5.4 Efeito de diferentes concentrações de GSH e GSSG sobre a oxidação da dGuo com DHPNO <sub>2</sub> 1 mmol/L .....                  | 47        |
| 5.5 Efeito de diferentes concentrações de GSH e GSSG sobre a oxidação da dGuo com DHPNO <sub>2</sub> 5 mmol/L .....                  | 50        |
| 5.6 Efeito de diferentes concentrações de GSH e GSSG sobre a oxidação da dGuo com DHPNO <sub>2</sub> 10 mmol/L .....                 | 53        |

|   |           |
|---|-----------|
| 5.7 Efeito de diferentes concentrações de GSH e GSSG sobre a dGuo ..... | 55        |
| 5.8 Oxidação de GSH.....  | 57        |
| <b>6. DISCUSSÃO .....</b>   | <b>60</b> |
| <b>7. CONCLUSÕES .....</b>  | <b>66</b> |
| <b>REFERÊNCIAS.....</b>   | <b>68</b> |

## 1. INTRODUÇÃO

A glutathiona reduzida (GSH) é um composto que possui um grupamento tiol, o qual lhe confere reconhecida capacidade antioxidante (BALD *et al.*, 2004). Por sua vez, o oxigênio molecular singlete ( $^1\text{O}_2$ ) é uma espécie reativa de oxigênio não radicalar com alto potencial de promover danos ao ácido desoxirribonucléico (DNA) (RAVANAT *et al.*, 2004). Porém, foi mostrado por DEVASAGAYAM *et al.* (1991c) que a presença de GSH no sistema de reação contendo  $^1\text{O}_2$  e o nucleosídeo 2'-desoxiguanosina (dGuo), resulta no aumento de um dos produtos de oxidação da dGuo, a 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina (8-oxodGuo). Do mesmo modo, a formação de quebras em DNA plasmidial foi aumentada na presença de GSH e  $^1\text{O}_2$  (DEVASAGAYAM *et al.*, 1991b). Os mecanismos envolvidos e o modo como este tiol reduzido pode afetar esse sistema já foram parcialmente estudados, mas ainda carecem de um esclarecimento mais profundo. No caso específico da sua relação com o  $^1\text{O}_2$ , já foi reportada sua ação como *quencher* desta espécie reativa (DEVASAGAYAM *et al.*, 1991a), e foi proposto que a atuação da GSH como pró-oxidante na reação do  $^1\text{O}_2$  com o DNA seria, na verdade, devida aos tióis oxidados gerados a partir da reação entre a GSH e  $^1\text{O}_2$ , como ácidos sulfínico ( $\text{GSO}_2\text{H}$ ) e sulfônico ( $\text{GSO}_3\text{H}$ ), glutathiona oxidada (GSSG) e glutathiona oxidada sulfóxido (GSSOG); porém, esta hipótese não foi confirmada experimentalmente.

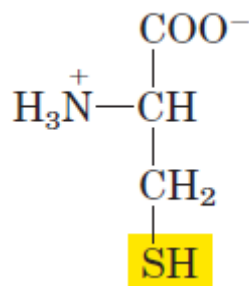
O que parece estar de certa forma esclarecido até o momento é que são distintos os mecanismos através dos quais GSH e  $^1\text{O}_2$  em conjunto provocam quebras no DNA plasmidial e geram produtos de oxidação a partir de dGuo. Inclusive, os próprios caminhos de oxidação por  $^1\text{O}_2$  são diferentes para DNA plasmidial e para nucleosídeos livres (MARTINEZ *et al.*, 2002), de modo que a adição de GSH deve agir de forma diferenciada nestes dois casos.

Desta forma, este trabalho teve como justificativa principal tentar fornecer dados que colaborassem para a elucidação dos mecanismos através dos quais a interação entre o  $^1\text{O}_2$  e a glutathione, nas suas formas reduzida (GSH) e oxidada (GSSG), se comportaria frente à formação de produtos de oxidação formados a partir do nucleosídeo 2'-desoxiguanosina livre (dGuo). Haja vista a complexidade de todas as informações acima e o papel crucial do DNA na replicação celular, é de suma importância compreender como tal interação interfere no DNA, danificando-o.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 TIÓIS E ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

Os tióis são compostos orgânicos que possuem o grupo funcional sulfidril ligado a uma cadeia carbônica. São semelhantes aos alcoóis e possuem odor característico. Dentre todos os aminoácidos, a cisteína é o único que contém o grupo tiol (figura 1), que lhe confere características estruturais, catalíticas e regulatórias únicas (KETTENHOFEN e WOOD, 2010). O fato de o grupo sulfidril ser extremamente nucleofílico torna os resíduos de cisteína muito sensíveis a modificações pós-traducionais por oxidantes ou por eletrófilos (COOPER *et al.*, 2002). Tais modificações, quando reversíveis, podem funcionar como um meio de alterar vias transdutoras de sinais (WINTERBOURN e HAMPTON, 2008) e, quando irreversíveis, podem funcionar como biomarcadores de estresse oxidativo (WOOD *et al.*, 2004; MATSUYAMA, 2009).

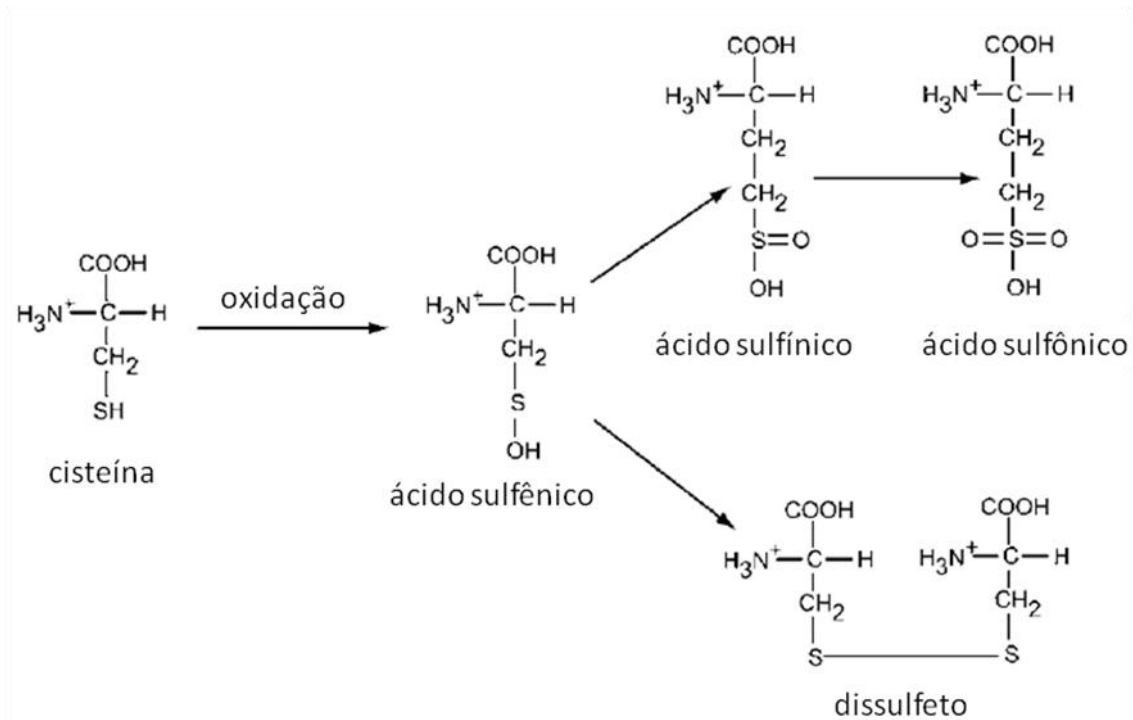


**FIGURA 1 - CISTEÍNA**

FONTE: Nelson e Cox, 2007.

Espécies reativas de oxigênio (ROS) podem atacar os resíduos de cisteína e formar, por oxidação branda, o ácido sulfênico (RSOH), o qual pode formar uma ponte dissulfeto com outro tiol acessível ou pode ser ainda oxidado a ácido sulfínico (RSO<sub>2</sub>H) ou sulfônico (RSO<sub>3</sub>H) (MEN e WANG, 2005). O ácido sulfênico é bastante instável e tende a reagir rapidamente, diferentemente dos ácidos sulfínico e sulfônico (CLAIBORNE *et al.*, 1999), conforme demonstrado na figura 2. Muitos tióis

também reagem com ROS para neutralizá-las totalmente ou para convertê-las em produtos relativamente menos tóxicos. Estas reações são possíveis em virtude do poder redutor do tiol (BALD *et al.*, 2004).



**FIGURA 2 - OXIDAÇÃO DA CISTEÍNA**

FONTE: Adaptada (Griffiths *et al.*, 2002).

NOTA: A primeira oxidação da cisteína gera o instável ácido sulfênico, o qual pode ser reoxidado aos ácidos sulfínico e sulfônico, ou ainda formar dissulfetos.

Compostos tióis, como a GSH, podem atuar como tampão-redox, sendo o conceito de tampão-redox análogo ao de tampão de pH. (MARTINOVICH *et al.*, 2010). Ou seja, quando a célula se torna mais oxidada, a razão de GSH para GSSG diminui e reações de troca entre estas duas moléculas permitem o equilíbrio com proteínas tióis para aumentar seu conteúdo dissulfeto.

Há fortes evidências que a sinalização redox seja parte do metabolismo normal e, deste modo, a produção de radicais livres não seria apenas prejudicial às células. Winterbourn e Hampton, em 2008, relataram que oxidantes gerados endogenamente poderiam atuar como segundos mensageiros; sendo inclusive capazes de modular fatores de transcrição, canais de membrana, enzimas metabólicas e vias de sinalização. Ainda, de acordo com os mesmos autores, a

oxidação e a redução de grupamentos tióis de proteínas parecem ser os principais mecanismos através dos quais os processos redox agem nas vias de transdução de sinais celulares.

Dentre os oxidantes gerados de maneira endógena, um dos mais importantes, por sua alta difusão entre os diversos compartimentos celulares, é o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), o qual tem sido descrito tanto como um segundo mensageiro quanto como um agente tóxico capaz de danificar os mais variados componentes celulares. Provavelmente, seus efeitos tóxicos apareçam em situações de maior concentração e sua atuação como segundo mensageiro seja restrita a níveis basais de  $H_2O_2$ , ou seja, em concentração inferior a micromolar, conforme observado por Kettenhofen e Wood, em 2010. Os mesmos autores ligam sua atividade biológica a sua habilidade de oxidar o grupo tiol de resíduos de cisteína críticos em proteínas, formando inicialmente um ácido sulfênico. Assim como o  $H_2O_2$ , peróxidos orgânicos (ROOH) também são capazes de oxidar resíduos de cisteína de proteínas através de uma oxidação que envolve dois elétrons. Tal mecanismo envolve o ataque nucleofílico do tiolato ao oxigênio do peróxido, oxidando a cisteína a ácido sulfênico e reduzindo o peróxido orgânico ao seu álcool correspondente (KETTENHOFEN e WOOD, 2010).

A produção de oxidantes derivados do cloro, como o ácido hipocloroso (HOCl) e as *N*-cloroaminas (RNHCl), fornece outra via de oxidação de resíduos de cisteína. Ambos compostos parecem gerar indiretamente ácido sulfênico por hidrólise dos compostos cloretos de sulfenila (RSCl), os quais são formados após reagirem com tióis (FOLKES *et al.*, 1995; KETTENHOFEN e WOOD, 2010).

O óxido nítrico (NO) é um radical livre cujas funções como segundo mensageiro são mais bem estudadas, estando envolvido nos mais variados processos regulatórios e também em muitas respostas a situações de estresse. Além de sua conhecida atuação via ativação da cascata dependente de guanosina monofosfato cíclica (cGMP), há antigas evidências de que o NO também possa agir ao oxidar diversos compostos tióis a seus dissulfetos correspondentes, conforme relatado por Pryor *et al.* em 1982. Neste mesmo estudo, os autores sugeriram um mecanismo no qual a adição nucleofílica do tiolato ao NO seria seguida por protonação, gerando o radical intermediário tionitróxido (RSNOH•). Este, por sua vez, poderia gerar dissulfetos através de adição de radicais e decomposição do produto formado. Além disso, também foi proposto um segundo mecanismo no qual

a formação de conjugados proteína-SOH mediada por NO fosse devida à formação de proteínas S-nitrosotióis (RSNO) e a sua posterior hidrólise (STAMLER e HAUSLADEN, 1998).

O peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) é uma espécie reativa formada pela união do superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) com o NO. Existem duas vias nas quais o mesmo parece reagir com tióis: 1) o  $\text{ONOO}^-$  poderia reagir com um tiol protonado em uma oxidação que envolve dois elétrons e gerar como produtos um intermediário ácido sulfênico (SOH) e um nitrito; ou 2) a espécie protonada do  $\text{ONOO}^-$  ( $\text{ONOOH}$ ) participaria de uma oxidação que envolveria apenas um elétron e originaria radical tiil e dióxido de nitrogênio (QUIJANO *et al.*, 1997).

A formação de dissulfetos e de derivados sulfônicos a partir da espécie reativa não-radicalar oxigênio singlete ( $^1\text{O}_2$ ) pode ocorrer em determinadas condições, mas seus mecanismos não estão bem estabelecidos; porém estudos qualitativos mostram que a oxidação da cisteína livre por  $^1\text{O}_2$  ocorreria através de um intermediário peroxil (DAVIES, 2004).

## 2.2 OXIGÊNIO MOLECULAR SINGLETE

O oxigênio molecular, no estado fundamental, possui dois elétrons com spins paralelos ocupando dois orbitais  $\pi$  de mesma energia, caracterizando um estado triplete ( $^3\Sigma_g^-$ ). Neste estado, a redução direta do oxigênio por dois elétrons é proibida pela regra de conservação do spin. Porém, com acréscimo de energia pode ser formado o oxigênio molecular singlete ( $^1\text{O}_2$ ), o qual não possui restrição por spin. O  $^1\text{O}_2$  pode se apresentar em dois estados excitados,  $^1\Delta_g$  e  $^1\Sigma_g^-$ , conforme pode se observado na tabela 1. O primeiro apresenta dois elétrons com spins opostos no mesmo orbital e possui uma energia de 22,5 kcal acima do estado fundamental. O segundo tem um elétron em cada orbital  $\pi$  degenerado, com spins opostos, e possui uma energia de 37,5 kcal acima do estado fundamental. O estado  $^1\Sigma_g^-$  tem um tempo de vida muito curto em meio aquoso ( $10^{-11}$  s), sendo rapidamente desativado para o estado  $^1\Delta_g$ , o qual é na verdade a espécie denominada por  $^1\text{O}_2$  (RONSEIN *et al.*, 2006).

| Estado         | Orbitais $\pi^*$            | Energia<br>(kcal/mol) | Tempo de<br>vida (s) |
|----------------|-----------------------------|-----------------------|----------------------|
| $^1\Sigma_g^+$ | $\uparrow \quad \downarrow$ | 37,5                  | $10^{-11}$           |
| $^1\Delta_g$   | $\uparrow\downarrow$        | 22,5                  | $10^{-6}$            |
| $^3\Sigma_g^-$ | $\uparrow \quad \uparrow$   |                       |                      |

**TABELA 1 - DISTRIBUIÇÃO ELETRÔNICA NOS ORBITAIS MOLECULARES ( $\pi^*$ ) DO OXIGÊNIO NO ESTADO EXCITADO SINGLETE ( $^1\Sigma_g^+$  E  $^1\Delta_g$ ) E NO ESTADO FUNDAMENTAL TRIPLETE ( $^3\Sigma_g^-$ )**

FONTE: Ronsein *et al.*, 2006.

O  $^1O_2$  pode ser gerado a partir de uma reação de fotossensibilização do tipo II. Tal reação ocorre quando a luz é absorvida por um fotossensibilizador (corantes como o azul de metileno ou o rosa bengala), originando primeiramente um estado excitado, o qual reage como oxigênio molecular e, por transferência de energia, forma  $^1O_2$ . Na reação do tipo I, o fotossensibilizador no estado excitado reage com um solvente ou com outro substrato orgânico, e não com o oxigênio, e por isso não há formação de  $^1O_2$  (FOOTE, 1991). Outros processos químicos capazes de gerar  $^1O_2$  incluem as reações de peróxido de hidrogênio com hipoclorito (HELD *et al.*, 1978) ou com peroxinitrito (DI MASCIO *et al.*, 1994), e também a decomposição térmica de endoperóxidos derivados do naftaleno (PIERLOT *et al.*, 2000). Dentre este derivados, encontra-se o endoperóxido de *N,N'*-di(2,3-dihidroxiopropil)-3,3'-(1,4-naftilideno)dipropanamida (DHPNO<sub>2</sub>) o qual é decomposto a  $^1O_2$  e a seu precursor *N,N'*-di(2,3-dihidroxiopropil)-3,3'-(1,4-naftilideno)dipropanamida (DHPN), com rendimento de 60% após incubação a 37°C por 2,5 horas (PIERLOT *et al.*, 2000).

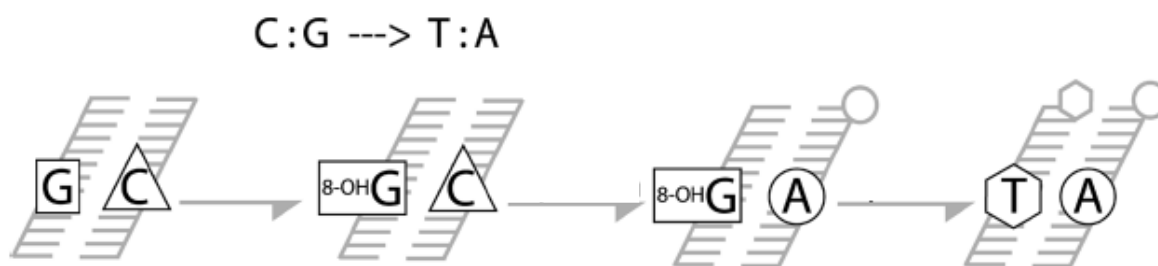
O  $^1O_2$  é considerado como sendo uma ROS e, como tal, é capaz de oxidar e danificar muitas biomoléculas. Sua interação com estas biomoléculas pode ocorrer por meio de reações químicas ou por supressão física. No último caso, o  $^1O_2$  transfere sua energia de excitação e retorna ao estado fundamental (RONSEIN *et al.*, 2006). Já no caso de reações químicas, as mais comuns são a adição a dienos

conjugados (cicloadição do tipo Diels-Alder, 2 + 4), geralmente resultando na formação de endoperóxidos (BLOODWORTH e EGGELTE, 1984) e a adição 1,3 a uma dupla ligação, formando “ene” hidroperóxidos (FOOTE e DENNY, 1971). O  $^1\text{O}_2$  pode ainda reagir com compostos fenólicos para formar hidropoxidienonas (FOOTE *et al.*, 1976) e com sulfetos, formando sulfóxidos (AKASAKA *et al.*, 1988).

### 2.3 DANOS AO DNA PELO $^1\text{O}_2$

Embora outras ROS reajam com todas as bases nitrogenadas do DNA, o  $^1\text{O}_2$  reage especificamente com a guanina, pois a energia de seu orbital molecular é a única que permite tal reação. Conforme previamente mostrado por Ravanat *et al.*, em 2001, através de análise de cromatografia líquida de alta *performance* (HPLC) acoplada à espectrometria de massa *eletrospray* em tandem (ESI/MS/MS) após digestão enzimática do DNA, um dos principais produtos desta oxidação é a 8-oxo-7,8-dihidroguanina (8-oxodGuo). A formação deste produto de oxidação parece ocorrer por cicloadição do tipo Diels-Alder no anel imidazol da guanina (SHEU e FOOTE, 1993; RAVANAT e CADET, 1995). Além do  $^1\text{O}_2$ , outras ROS como radical hidroxila ( $\text{OH}^\bullet$ ) e  $\text{ONOO}^-$ , assim como outros processos, tais quais oxidação por um elétron, são competentes em formar 8-oxodGuo (CADET *et al.*, 2010). Assim, esta lesão tem sido considerada como um putativo biomarcador de estresse oxidativo no DNA.

A 8-oxodGuo é um dano oxidativo especialmente importante porque possui um alto potencial mutagênico, uma vez que é capaz de parear com adenina e gerar uma transversão G → T, ou seja, de guanina para timina (BOITEUX *et al.*, 1992), conforme relatado na figura 3. Ademais, quando gerada no *pool* de nucleotídeos, a 8-oxodGuo é também genotóxica, pois pode ser inserida na nova fita pela DNA polimerase (SUZUKI *et al.*, 2007; SHIMIZU *et al.*, 2007).



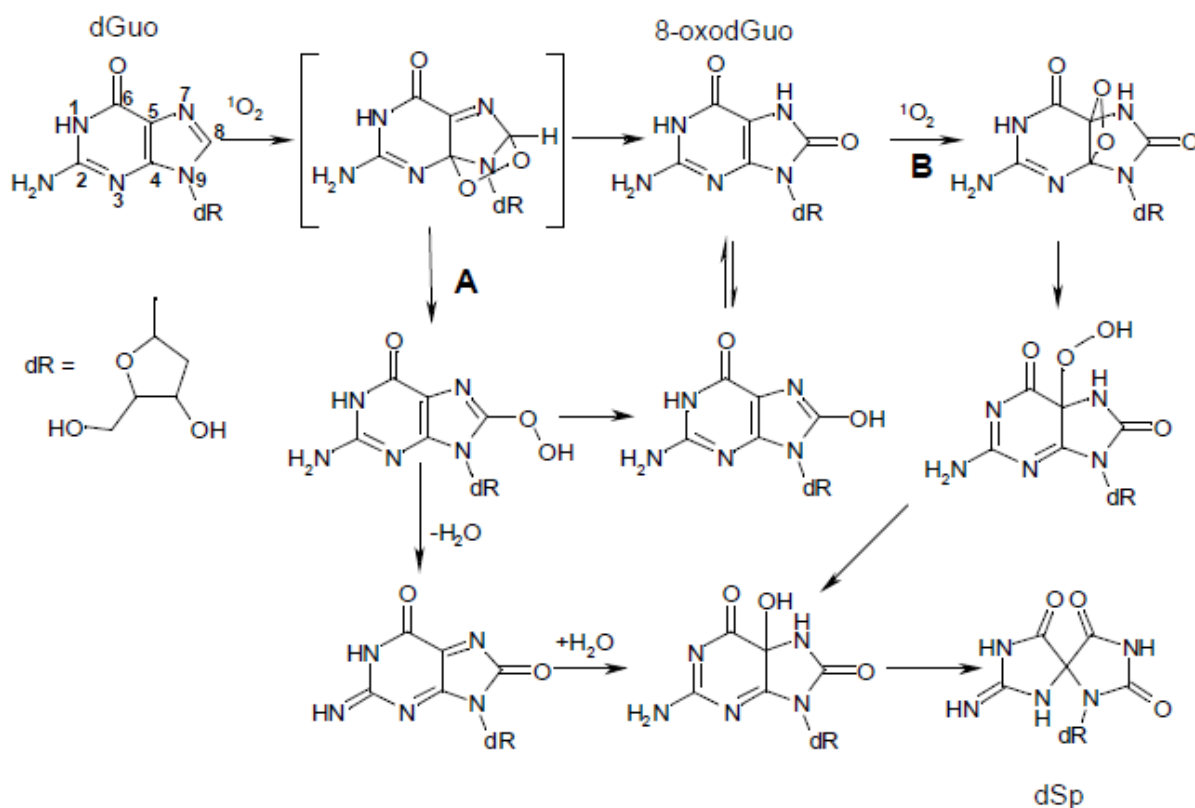
**FIGURA 3 - TRANSVERSÃO DE GUANINA PARA TIMINA ORIGINADA A PARTIR DA FORMAÇÃO DE 8-OXOdGUO**

FONTE: Adaptada (Hermes-Lima, 2004).

NOTA: A oxidação de guanina a 8-oxoguanina fará com que este produto pareie com adenina ao invés de citosina. Após uma segunda replicação, o par que era G:C se transforma em T:A, consolidando a mutação.

A reação entre  $^1\text{O}_2$  e o nucleosídeo 2'-desoxiguanosina livre (dGuo) também forma outros produtos de oxidação, como o par de diastereoisômeros de espiroiminodihidantoína (dSp), os quais são gerados ainda em maior quantidade do que a 8-oxodGuo (NILES *et al.*, 2001) – cerca de 7 vezes mais (RAVANAT e CADET, 1995).

Martinez *et al.*, em 2007, realizaram um importante estudo a respeito dos mecanismos de formação de dSp utilizando-se de um endoperóxido isotopicamente marcado com oxigênio-18 e de análises por espectrometria de massas. Neste trabalho, os autores demonstraram que há duas possíveis vias de formação desses diastereoisômeros: por oxidação direta da dGuo, através de um mecanismo que necessita apenas de uma molécula de  $^1\text{O}_2$  e envolve a adição de água a um intermediário reativo (trajetória A, figura 4), ou por oxidação da própria 8-oxodGuo (trajetória B, figura 4). De fato, a 8-oxodGuo tem reatividade de aproximadamente 2 ordens de magnitude maiores quando comparada à sua precursora dGuo (SHEU e FOOTE, 1995). Assim, o predomínio de dSp na oxidação da dGuo mediada por  $^1\text{O}_2$  em solução aquosa pode ser considerado, ao menos em parte, como consequência direta da oxidação secundária da 8-oxodGuo, e não apenas como se a dGuo simplesmente gerasse dSp em maior quantidade (RAVANAT *et al.*, 2004).



**FIGURA 4 - MECANISMOS DE OXIDAÇÃO DA dGUO POR  $^1\text{O}_2$  EM MEIO AQUOSO**

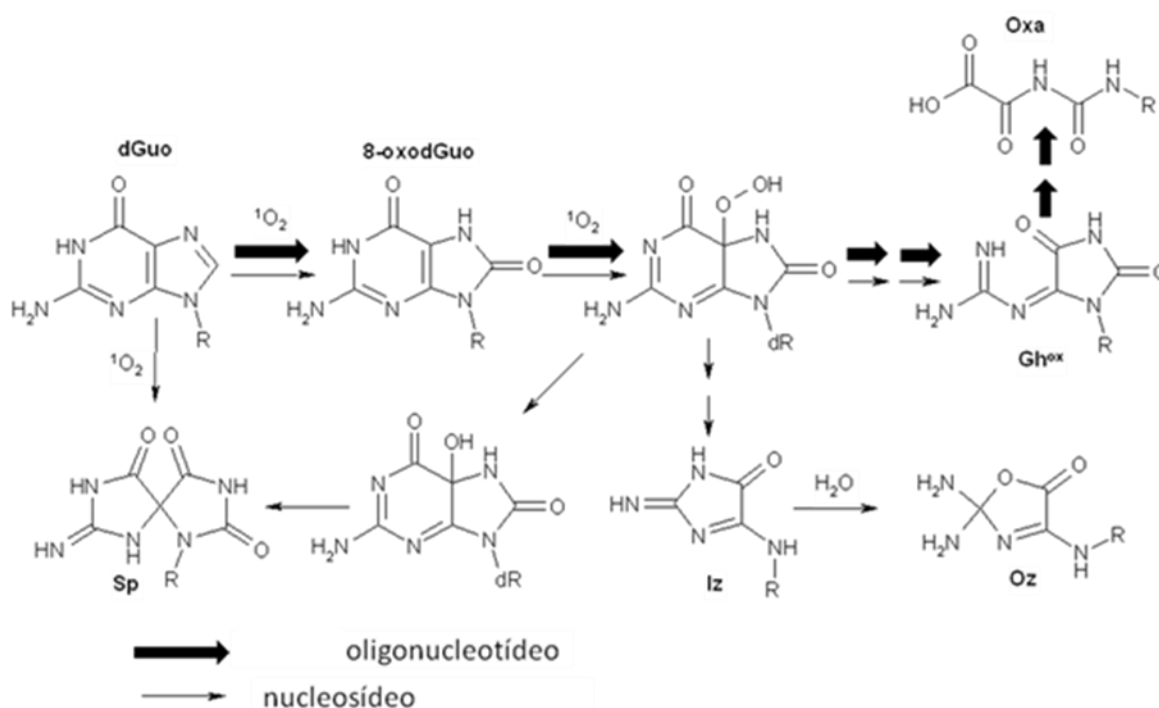
FONTE: Martinez *et al.*, 2007.

NOTA: Em A está representada a oxidação direta da dGuo a dSp e, em B, a oxidação da dGuo a 8-oxodGuo e desta a dSp.

Não há, até o momento, relatos na literatura de que os diastereoisômeros dSp sejam ou não substratos para a DNA polimerase, de modo que os mesmos não podem ser ainda afirmados como sendo agentes genotóxicos ou protetores. Caso futuramente sejam confirmados como substrato para a enzima, teriam um papel genotóxico, pois seriam adicionados à dupla fita do DNA em ocasião da sua replicação. Já no caso de não serem reconhecidos e utilizados pela DNA polimerase, desempenhariam função protetora, pois sua formação ocorreria em detrimento da de 8-oxodGuo, a qual, por sua vez, deixaria de ser aproveitada pela enzima em questão.

O mecanismo de oxidação da dGuo é muito mais complexo do que está representado no esquema da figura 4: além de gerar dSp, a oxidação de 8-oxodGuo por  $^1\text{O}_2$  também é capaz de formar diastereoisômeros de 2-amino-5-[(2-desoxi-β-D-

eritro-pentafuranosil)-amino]-4*H*-imidazol-4-ona (dlz) e 2,2-diamino-4-[-(2-desoxi-β-D-eritropentafuranosil)amina]-5-(2*H*)-oxazolona (dOz) como produtos finais estáveis (MARTINEZ *et al.*, 2002). De acordo com os últimos autores e no caso de nucleosídeos; dSp, dlz e dOz poderiam ser formados por um intermediário 5-hidroperóxido. Em oligonucleotídeos, este hidroperóxido também poderia ser decomposto em guanidinodantoína oxidada (Gh<sup>ox</sup>) e em ácido oxalúrico (Oxa), conforme ilustrado na figura 5.



**FIGURA 5 - PRINCIPAIS PRODUTOS DA OXIDAÇÃO DA dGUA POR  $^1O_2$**

FONTE: Adaptada (Martinez *et al.*, 2002).

NOTA: No caso específico de nucleosídeos, a dGua pode ser diretamente oxidada a diastereoisômeros de espiroiminodihidantoína (nesta figura representados por Sp), ou a 8-oxodGua. Esta, após adição de nova molécula de  $^1O_2$ , gera um 5-hidroperóxido capaz de formar imidazolona (Iz) ou guanidinodantoína oxidada (Gh<sup>ox</sup>). A última se estabilizaria em ácido oxalúrico (Oxa) e a primeira, em oxazolona (Oz). No caso de oligonucleotídeos, não haveria oxidação a espiroiminodihidantoína, imidazolona ou oxazolona.

A imidazolona (dlz) pode ser originada tanto da oxidação direta da guanina quanto de reações de fotossensibilização da 8-oxoguanina com corantes dos tipos I ou II (VIALAS *et al.*, 1998), de modo que sua formação não está restrita à oxidação por  $^1O_2$ . Este produto de oxidação possui um tempo de meia vida de 10 horas em

solução aquosa a 20°C e após este período, é totalmente convertida a oxazolona (dOz) (CADET *et al.*, 1994).

Como a oxidação da dGuo segue caminhos diferentes em nucleosídeos livres e em oligonucleotídeos, a avaliação de seu mecanismo na fita do DNA deve ser estudada em paralelo às reações *in vitro* (neste caso, entende-se por reações *in vitro* aquelas que são realizadas apenas da combinação de reagentes comerciais, e não aquelas feitas do uso de cultura de células). Assim sendo, a utilização de plasmídeos é uma estratégia excelente, e bastante empregada, para o estudo do mecanismo de oxidação em DNA biologicamente ativo.

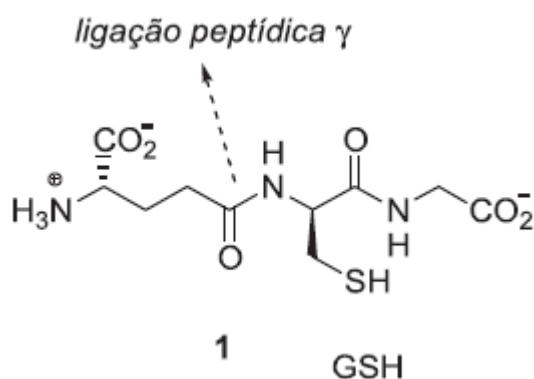
A quebra de fita simples de DNA plasmidial induzida por  $^1\text{O}_2$  já foi relatada em alguns trabalhos (DIMASCIO *et al.*, 1989; DEVASAGAYAM *et al.*, 1991b). O mecanismo de como esta ROS induz quebras no DNA é pouco esclarecido, porém é possível que tanto as quebras de fita simples quanto a formação de 8-oxodGuo sejam derivadas de um precursor comum. Esta última observação está em acordo com os dados encontrados por Devasagayam *et al.* em 1991c, os quais sustentam que (i) o curso de tempo dos dois efeitos são similares, e (ii) que as quebras de fita simples ocorrem seletivamente em resíduos de guanina; embora os autores sustentem que apenas a formação de 8-oxodGuo não seja motivo suficiente para haver quebra de fita simples de DNA. Inclusive, as quebras de fita simples seriam eventos que ocorrem com pequena frequência, cerca de 2-5% dos casos (DIMASCIO *et al.*, 1989). Muito mais freqüente seria a geração de sítio álcali-lábeis, os quais ocorreriam em cerca de 30% dos casos (NIEUWINT *et al.*, 1985).

Berra *et al.* (2010) trataram DNA plasmidial superenovelado com DHPNO<sub>2</sub> ou com azul de metileno fotossensibilizado para verificar a formação de lesões oxidativas e de quebras em fita simples induzidas por  $^1\text{O}_2$ . As últimas são detectadas diretamente em gel de agarose, mas as lesões precisam ser reconhecidas por enzimas de reparo específicas a fim de se tornarem evidentes, e, neste caso, os autores utilizaram as enzimas formamidopirimidina glicosilase (FPG) e T4 dímero de pirimidina glicosilase endonuclease V (T4-endo V). Como resultado, foi observado um pequeno aumento no número de quebras de fita simples por concentrações crescentes de DHPNO<sub>2</sub>. A T4-endo V promoveu leve acréscimo destes danos, porém o maior efeito foi o notado após adição de FPG. Efeitos semelhantes ocorreram com o azul de metileno, porém, em menor escala. Sendo a FPG específica para o reconhecimento e a remoção de diversas bases oxidadas e dentre

elas, a 8-oxodGuo, ficou claro que o  $^1\text{O}_2$  é capaz de promover tanto a formação de quebras de fita simples em DNA plasmidial quanto lesões prévias, passíveis de reparo. Outra enzima bastante utilizada para a detecção de tais lesões é a endo III, peculiar para danos em pirimidinas (IDE, 2001).

## 2.4 A GLUTATIONA E SUA RELAÇÃO COM OXIGÊNIO SINGLETE

A glutatona (figura 6) é reconhecida como um antioxidante biológico que não apenas detoxifica ROS diretamente, como também aumenta a habilidade funcional de outros antioxidantes cruciais, como as vitaminas C e E (BALD *et al.*, 2004). A glutatona reduzida (GSH) é um tripeptídeo ( $\gamma$ -L-Glu-L-Cys-Gly) e representa o mais importante tiol de baixo peso molecular presente nas células (HAYES e PULFORD, 1995), sendo também um elemento crítico na manutenção do balanço redox e das vias de regulação e de sinalização celular (CNUBBEN *et al.*, 2001).



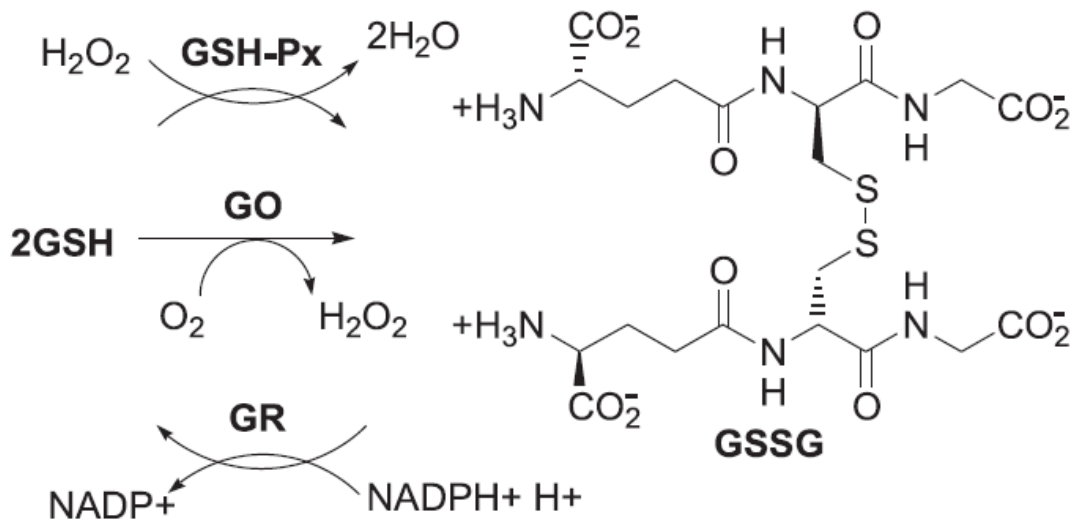
**FIGURA 6 - GLUTATIONA**

FONTE: Huber *et al.*, 2008.

Os níveis de GSH são sustentados por um sistema múltiplo de enzimas:  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase ( $\gamma$ -GT), glutatona sintetase (GS), glutatona peroxidase (GPx ou GSH-Px), glutatona redutase (GR) e  $\gamma$ -glutamyl cisteinil sintetase ( $\gamma$ -GCS). A última, a qual é composta por uma subunidade pesada catalítica e por uma

subunidade leve regulatória, é a de maior importância por ser limitante na reação de síntese. Os principais mecanismos de indução da transcrição da  $\gamma$ -GCS são modificações de tióis em sítios regulatórios críticos de proteínas e geração de ROS (WILD e MULCAHY, 2000). Contudo, já foi proposto que, sob certas circunstâncias, a síntese de glutatona possa ocorrer apenas na presença de  $\gamma$ -GT e GS, sem a necessidade de  $\gamma$ -GCS (HAYES e MCLELLAN, 1999).

A GSH pode agir como um antioxidante de primeira linha de defesa ao ser um co-fator para a redução de peróxidos com a concomitante formação de glutatona dissulfeto (GSSG) mediada por GPx (CNUBBEN *et al.*, 2001). Entretanto, para que a atividade protetora da glutatona expressa pela redução de espécies oxidantes, e conseqüente oxidação da GSH à glutatona dissulfeto (GSSG) seja mantida, a GSH precisa ser regenerada através do ciclo catalítico, representado na figura 7. Nele podemos identificar a atividade de três grupos de enzimas: a glutatona oxidase (GO), a glutatona peroxidase (GSH-Px) e a glutatona redutase (GR). As duas primeiras enzimas, GO e GSH-Px, catalisam a oxidação de GSH à GSSG e a última, GR, é responsável pela regeneração de GSH, a partir de GSSG, na presença de NADPH (HUBER *et al.*, 2008).



**FIGURA 7 - CICLO CATALÍTICO DA GLUTATIONA**

FONTE: Adaptada (Huber *et al.*, 2008).

Além de proteger as células contra ROS, a GSH também o faz contra outros produtos tóxicos com a participação das enzimas glutathione-S-transferases (GSTs). As GSTs são um conjunto de enzimas estruturalmente diversas que agem contra produtos reativos produzidos *in vivo* como resultado de quebras de macromoléculas resultantes de situações de estresse oxidativo. Elas também são capazes de detoxificar metabólitos de xenobióticos (HAYES e PULFORD, 1995).

A relação entre GSH e  $^1\text{O}_2$  é um pouco controversa. Já foi demonstrado que a própria GSH poderia gerar  $^1\text{O}_2$  quando em contato com ânion superóxido (WEFERS e SIES, 1983). Ela foi ainda reportada por DEVASAGAYAM *et al.* (1991a) como detentora de atividade *quencher* de  $^1\text{O}_2$ . Neste último trabalho, os autores geraram  $^1\text{O}_2$  através da decomposição térmica do endoperóxido de 3,3'-(1,4-naftilideno) dipropanoato de sódio (NDPO<sub>2</sub>, cujo rendimento de  $^1\text{O}_2$  é de 50%, conforme PIERLOT *et al.*, 2000) e testaram o efeito de diversos tióis, incluindo a GSH, em função do tempo e do pH. A participação de outras ROS foi descartada pela ausência de efeito de *scavengers* específicos como a superóxido dismutase ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) e o manitol ( $\text{OH}^{\cdot}$ ), e a de  $^1\text{O}_2$  foi confirmada pela ação de azida sódica ( $\text{NaN}_3$ ), a qual possui reconhecida ação supressora sobre esta espécie. Todos os tióis se mostraram *quenchers* efetivos de  $^1\text{O}_2$  e esta propriedade diminuiu com o aumento do pH. Em seguida foi avaliada, por HPLC, a formação de diferentes produtos de oxidação de GSH pelo  $^1\text{O}_2$  gerado por duas fontes distintas, a termodecomposição do NDPO<sub>2</sub> e a fotossensibilização do corante rosa bengala. No primeiro caso, GSH 10 mmol/L e NDPO<sub>2</sub> 5 mmol/L incubados por 90 minutos provocaram a oxidação de 58% da GSH total, produzindo 63% de GSSG, 14% de sulfóxido, 8% de sulfonato, 2% de sulfinato e 13% de quatro produtos não-identificados. No segundo, com o mesmo tempo de incubação de rosa bengala 4 mmol/L e GSH 10 mol/L, 98% da GSH foi convertida em produtos de oxidação, dos quais 46% eram GSSG, 26% eram sulfóxido, 24% eram sulfonato, 2% eram sulfinato e apenas 1% não pôde ser identificado. Estes distintos padrões de oxidação foram explicados em razão das diferentes quantidades de  $^1\text{O}_2$  formado pelos dois geradores.

Abordando mais especificamente a questão do efeito que a GSH poderia promover ao DNA biologicamente ativo danificado por  $^1\text{O}_2$ , Lafleur *et al.* (1994) trataram DNA de fita simples com NDPO<sub>2</sub> (gerador desta ROS), com GSH e também  $\text{NaN}_3$  e obtiveram resultados interessantes. Primeiramente, a GSH pareceu proteger o DNA na dose de 25 mmol/L, mas exercia efeitos danosos sobre o mesmo quando

aplicada em doses superiores a 40 mmol/L. De modo interessante, a dose de 25 mmol/L de GSH também foi capaz de aumentar a formação de quebras na fita simples de DNA. Entretanto, segundo os autores, apenas cerca de 2% do dano causado ao DNA por  $^1\text{O}_2$  é devido à quebra da fita simples e o dano gerado por GSH também seria pouco significativo, representando no máximo 10% do total. Além disso, é importante observar que o DNA fita simples é muito mais sensível a lesões letais quando comparado ao DNA dupla fita, o qual pode ter seus danos reparados por enzimas específicas. Portanto, a taxa de lesão a este ácido nucléico deveria ser muito mais baixa caso os protocolos fossem aplicados com o DNA na sua forma nativa. Porém, os experimentos realizados com estas doses de GSH em comparação com  $\text{NaN}_3$  implicaram que a proteção contra letalidade oferecida ao DNA fosse considerada mais baixa do que a esperada para um *scavenger* de  $^1\text{O}_2$ , e a partir destes resultados os autores deduziram que os produtos da reação entre GSH e  $^1\text{O}_2$  pudessem oferecer algum tipo de dano fatal ao DNA não relacionado com as quebras de fita, mas não o especificaram. Finalmente, quando os ensaios foram executados com concentrações fisiológicas de GSH ( $\leq 10$  mmol/L), a mesma protegeu o DNA de quebra tão bem quanto a  $\text{NaN}_3$ , mostrando que, *in vivo*, a GSH protege contra o dano oxidativo gerado  $^1\text{O}_2$ . O envolvimento de radicais do tipo  $\text{OH}^\bullet$  foi descartado pelo uso dos *scavengers* como *tert*-butanol e isopropanol e, ao final do trabalho, os autores concluíram que o papel da GSH na proteção ao dano ao DNA por  $^1\text{O}_2$  é ambíguo.

Entretanto, em contraste com alguns destes resultados, Devasagayam *et al.* (1991b) documentaram que doses crescentes e fisiológicas de GSH (0,1-10 mmol/L) concomitantes com  $\text{NDPO}_2$  já foram suficientes para aumentar a formação de quebra de fita simples de DNA plasmidial em porcentagem de até 27% acima da quebra derivada apenas do gerador de  $^1\text{O}_2$ . GSSG e outros sulfetos mostraram-se praticamente inativos. A adição de superóxido dismutase não evitou as quebras originadas por  $\text{NDPO}_2$  ou por  $\text{NDPO}_2$  e GSH, enquanto a adição de catalase ofereceu alguma proteção. Já a  $\text{NaN}_3$  inibiu em 73% as quebras induzidas por  $\text{NDPO}_2$  e em 47% aquelas promovidas por  $\text{NDPO}_2$  e GSH. O acréscimo de manitol ao sistema protegeu em menor extensão a formação de quebras de fita simples por  $^1\text{O}_2$  (20%) e em maior extensão as quebras originadas da interação entre  $^1\text{O}_2$  e GSH (55%). Juntos, estes resultados sugerem que pelo menos parte do aumento da produção de quebras no DNA plasmidial por GSH seja devido à produção de  $\text{OH}^\bullet$  na

reação entre  $^1\text{O}_2$  e GSH. Segundo os autores, tal reação não é mediada por metais, pois não foi modificada pela adição de EDTA, e parece gerar outros produtos, os quais seriam os responsáveis pelo agravamento dos danos ao DNA. Para tentar esclarecer esta hipótese, a GSH foi oxidada e seus produtos (novamente GSSG, sulfóxido, sulfinato, sulfonato e alguns outros não-identificados) foram detectados por HPLC, porém não foram testados.

Concentrações de GSH também condizentes com aquelas regularmente encontradas nos organismos (10 mmol/L) foram relatadas como sendo capazes de ampliar em aproximadamente quatro vezes a geração de 8-oxodGuo induzida por  $^1\text{O}_2$  gerado por NDPO<sub>2</sub> (DEVASAGAYAM *et al.*, 1991c). Os autores indicam que este acréscimo na formação de 8-oxodGuo não pode ser devido à formação de radicais de enxofre, pois a adição de ascorbato, um reconhecido *scavenger* de tais radicais, não foi capaz de reduzir este crescimento. Ao invés disso, propõem que a via de modificação covalente seja mais apropriada. A utilização de *scavengers* de radicais OH $\cdot$ , como tert-butanol, 2-propanol e formiato de sódio, assim como quelantes de metais (EDTA e DETAPAC), também revela a falta de envolvimento deste radical nos processos de formação de 8-oxodGuo por  $^1\text{O}_2$  ou  $^1\text{O}_2$  e GSH. É importante reforçar que o mesmo parece estar implicado na geração de quebras de fita simples de DNA (DEVASAGAYAM *et al.*, 1991b). Assim, os autores concluem que os mecanismos de formação destas duas lesões ao DNA, 8-oxodGuo e quebra de fita simples, sejam mediados por mecanismos distintos, embora não descartem intermediários comuns.

Ademais, há diversas evidências de que a GSH proteja contra o estresse oxidativo causado por  $^1\text{O}_2$  em células. Dentre estas, destaca-se o estudo realizado por Wang *et al.*, em 2001. Tais autores transfectaram células de câncer de mama humano da linhagem MCF-7 com DNA complementar (cDNA) para superexpressar a glutationa peroxidase de fosfolipídios (PhGPx), uma GPx específica para a remoção de hidroperóxidos lipídicos das membranas celulares. Seus dados revelaram que a PhGPx é capaz de fornecer uma proteção significativa contra lipoperoxidação causada por  $^1\text{O}_2$  gerado a partir de fotossensibilização de fotofrina removendo completamente os hidroperóxidos lipídicos formados.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Este trabalho teve como objetivo principal investigar o papel da glutathiona, nas suas formas reduzida (GSH) e oxidada (GSSG), na reação do oxigênio singlete ( $^1\text{O}_2$ ), gerado a partir do endoperóxido DHPNO<sub>2</sub>, com o nucleosídeo livre desoxiguanosina (dGuo).

#### **3.2 Objetivos específicos**

a) Detectar e quantificar os produtos 8-oxodGuo, dSp e dlz por HPLC após incubação de dGuo com diferentes concentrações de GSH e GSSG na presença do gerador de  $^1\text{O}_2$  DHPNO<sub>2</sub>.

b) Detectar a formação dos produtos de oxidação de GSH por DHPNO<sub>2</sub> ou H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por HPLC acoplado à espectrometria de massas.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Síntese de endoperóxido de *N,N'*-di(2,3-dihidroxiopropil)-3,3'-(1,4-naftilideno) dipropanamida (DHPNO<sub>2</sub>)

O reagente DHPN foi sintetizado em colaboração com o laboratório do Prof. Dr. Paolo Di Mascio, do Instituto de Química da Universidade de São Paulo pela doutoranda Alexandra Scalfio. O DHPNO<sub>2</sub> foi sintetizado por fotossensibilização do DHPN (PIERLOT *et al.*, 2000) num sistema contendo 2 mL de água deuterada (a qual aumenta o tempo de vida do <sup>1</sup>O<sub>2</sub>) e 5 µL de azul de metileno 10 mg/mL e 200 mg de DHPN. A reação se processou a 4°C, sob o borbulho de O<sub>2</sub> e irradiação de uma lâmpada de 500 W. Após 3 horas, a absorvância de uma alíquota diluída 5000x da solução começou a ser medida em 288 nm ( $\epsilon = 7780 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{L}$ ) e esta avaliação passou a ser refeita a cada 1 hora, até que estivessem em níveis aceitáveis a concentração ( $\geq 150 \text{ mmol/L}$ ) e o rendimento ( $\geq 85\%$ ) do DHPNO<sub>2</sub>, o qual foi posteriormente armazenado a -80°C.

### 4.2 Incubação de GSH ou GSSG com dGuo e DHPNO<sub>2</sub>

Para a posterior avaliação da formação dos produtos da oxidação da dGuo (8-oxodGuo, dSp e dlz), foram preparadas soluções contendo 1 mmol/L de dGuo, GSH ou GSSG e DHPNO<sub>2</sub> nas concentrações de 0,1; 1; 5 e 10 mmol/L em água deuterada. As soluções foram incubadas a 37°C sob agitação branda por 2,5 h, tempo necessário para completa decomposição do endoperóxido, com rendimento de geração de <sup>1</sup>O<sub>2</sub> de 60% (PIERLOT *et al.*, 2000). Os controles de reação variaram entre solução de dGuo 1 mmol/L e solução de dGuo 1 mmol/L acrescida de DHPNO<sub>2</sub> em cada uma das concentrações utilizadas, conforme indicado nas legendas de cada uma das figuras.

### 4.3 Detecção de 8-oxodGuo

A detecção de 8-oxodGuo, assim como a da dGuo e de seus outros produtos de oxidação, foi realizada por HPLC tendo como base o espectro de absorvância de cada uma destas substâncias. Estes estão previamente relatados na literatura e se comportam de maneira levemente diferente dependendo da fase móvel e das condições de fluxo e coluna utilizadas. A quantificação foi feita em comparação com uma curva de calibração com diferentes concentrações do padrão de cada produto, de forma que a concentração final foi obtida pela relação com a área do pico observado, com o devido espectro e tempo de retenção.

No caso específico da 8-oxodGuo, a análise foi realizada em conformidade com EBLIN *et al.* (2006). A formação de 8-oxodGuo foi revelada por HPLC com detector eletroquímico ESA Colouchem III (EC) com potenciais de 130 e 380 mV para E1 e E2, respectivamente. A coluna utilizada foi a ACE LC-18 (250 x 4,6 mm, 5  $\mu$ m), a qual foi mantida a 30°C sob fluxo de 0,8 mL/min com fase móvel constituída por 10% de metanol (MeOH) e 90% de solução 4 mmol/L de ácido cítrico, 8 mmol/L de acetato de amônio e EDTA 20 mg/L em pH 4,0. O tempo de cada corrida foi de 15 min. A cada quarteto de amostras foi realizada a limpeza da coluna através de um gradiente de MeOH entre 10 e 70% durante 25 minutos, para retirada de DHPN retido na coluna.

### 4.4 Síntese de dSp

Os diastereoisômeros dSp foram sintetizados em um sistema semelhante ao do DHPNO<sub>2</sub>, por fotossensibilização da dGuo e azul de metileno por uma lâmpada de 500 W, sob borbulho de O<sub>2</sub> e temperatura constante de 15°C (RAVANAT e CADET, 1995; NILES *et al.*, 2001). A solução resultante foi então purificada em HPLC por coluna Luna LC-NH<sub>2</sub> (250 x 4,6 mm, 5  $\mu$ m) sob fluxo de 0,8 mL/min e fase móvel constituída por 65 % de acetonitrila (ACN), 25% de formiato de amônio 25 mmol/L e 10% de metanol. Depois de liofilizada, esta solução teve sua absorvância aferida em espectrofotômetro em 230 nm e a partir deste valor e de seu coeficiente de absorvância ( $\epsilon = 5240 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{L}$ ), sua concentração foi calculada e a solução foi armazenada a -20°C.

#### 4.5 Detecção da dGuo e de dSp

A detecção e a quantificação de dGuo e dos diastereoisômeros de dSp foram realizadas em HPLC, conforme já descrito por MARTINEZ *et al.* (2002). A coluna utilizada foi a Phenomenex LC-NH2 (250 x 4,6 mm, 5 µm). A mesma foi mantida a 30°C e submetida a um fluxo de 0,8 mL/min de fase móvel composta por 65 % de ACN, 25% de formiato de amônio 25 mmol/L e 10% de metanol. A detecção da dGuo foi acompanhada em detector UV a 254 nm e a formação de diastereoisômeros de dSp foi monitorada a 230 nm.

#### 4.6 Síntese de imidazolona

A imidazolona (dlz) foi sintetizada por fotossensibilização durante 5 minutos, com lâmpada de 500 W, de dGuo 7,5 mmol/L em solução de riboflavina 50 µmol/L, conforme previamente descrito (BUCHKO *et al.*, 1995). O produto final foi purificado por HPLC em coluna Luna LC-18 (250 x 4,6 mm, 5 µm), com gradiente de fase móvel ACN em formiato de amônio 10 mmol/L de 2 a 7% por 12 minutos, sob fluxo de 0,6 mL/min. A detecção foi acompanhada com detector UV em 260. Em seguida, a dlz teve sua concentração definida a partir da absorbância verificada em 254 nm ( $\epsilon = 5 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{L}$ ).

#### 4.7 Detecção de imidazolona

A detecção e a quantificação de dlz também foi executada em HPLC. Para tanto, foi utilizada uma coluna Luna LC-18 (250 x 4,6 mm, 5 µm), a qual recebeu um gradiente de fase móvel ACN em formiato de amônio 10 mmol/L de 2 a 7% por 12 minutos, sob fluxo de 0,6 mL/min. A detecção dos produtos foi alcançada por detector UV em 260 nm, conforme previamente descrito (MARTINEZ *et al.*, 2002).

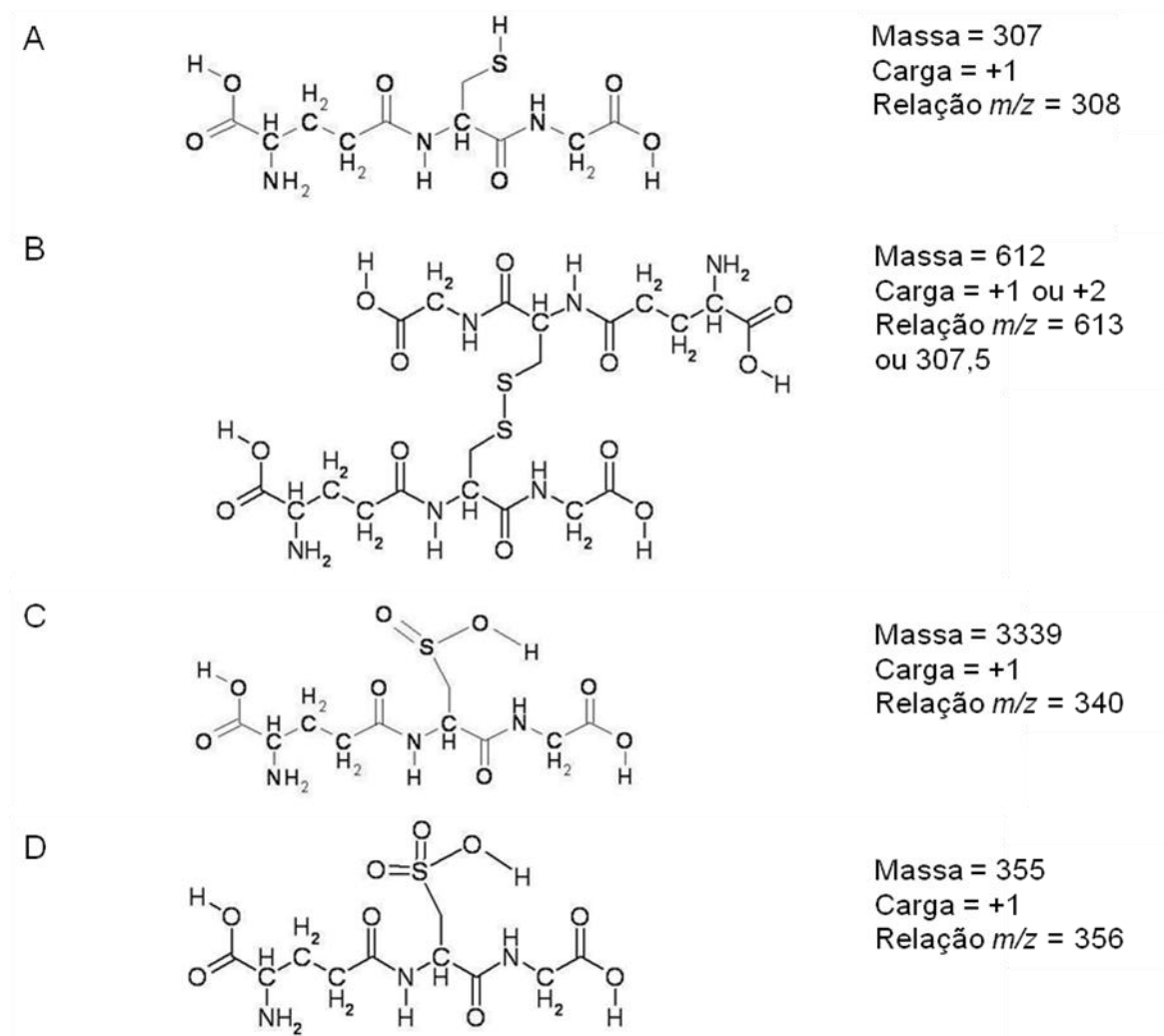
#### 4.8 Incubação de GSH com DHPNO<sub>2</sub> ou H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Para que a formação dos produtos da oxidação da GSH fosse avaliada, foram preparadas soluções contendo 0,25 mmol/L de GSH e 0,25 mmol/L de DHPNO<sub>2</sub> ou 2,225 mmol/L de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. As soluções foram incubadas a 37°C sob agitação branda por 2,5 h, tempo necessário para completa decomposição do endoperóxido (PIERLOT *et al.*, 2000). Os respectivos controles da reação foram testados sob as mesmas condições.

#### 4.9 Detecção dos produtos de oxidação da GSH

Os derivados da oxidação da GSH, GSSG, ácidos sulfínico (GSO<sub>2</sub>H) e sulfônico (GSO<sub>3</sub>H), foram detectados por HPLC acoplado à espectrometria de massa (aparelho micrOTOF II; Bruker, Daltonics). É importante ressaltar que o espectro fornece sempre a relação  $m/z$  de cada substância. No caso particular de oxidação da GSH, as relações  $m/z$  a serem buscadas foram:  $m/z_{\text{GSH}} = 308$ ,  $m/z_{\text{GSSG}} = 613$  ou  $307$ ,  $m/z_{\text{GSO}_2\text{H}} = 340$  e  $m/z_{\text{GSO}_3\text{H}} = 356$ , conforme pode ser observado na figura 8.

A detecção foi realizada conforme previamente descrito por Men e Wang (2005), porém com algumas modificações para adequação aos nossos objetivos. A purificação em HPLC foi feita utilizando-se de uma coluna Synergy (250 x 4,6 mm, 5 µm), submetida a um fluxo de 0,5 mL/min por 10 minutos. A fase móvel era composta apenas por água ultra pura cujo pH era de 2,7 em ácido fórmico. Os ácidos sulfínicos e sulfênicos foram revelados por detector UV em 215 nm.



**FIGURA 8 - RELAÇÃO M/Z DA GSH E DE SEUS PRODUTOS DE OXIDAÇÃO**

FONTE: O autor (2012).

NOTA: **(A)** GSH. **(B)** GSSG. **(C)** GSO<sub>2</sub>H. **(D)** GSO<sub>3</sub>H. Possíveis cargas com o aparelho ligado no modo positivo.

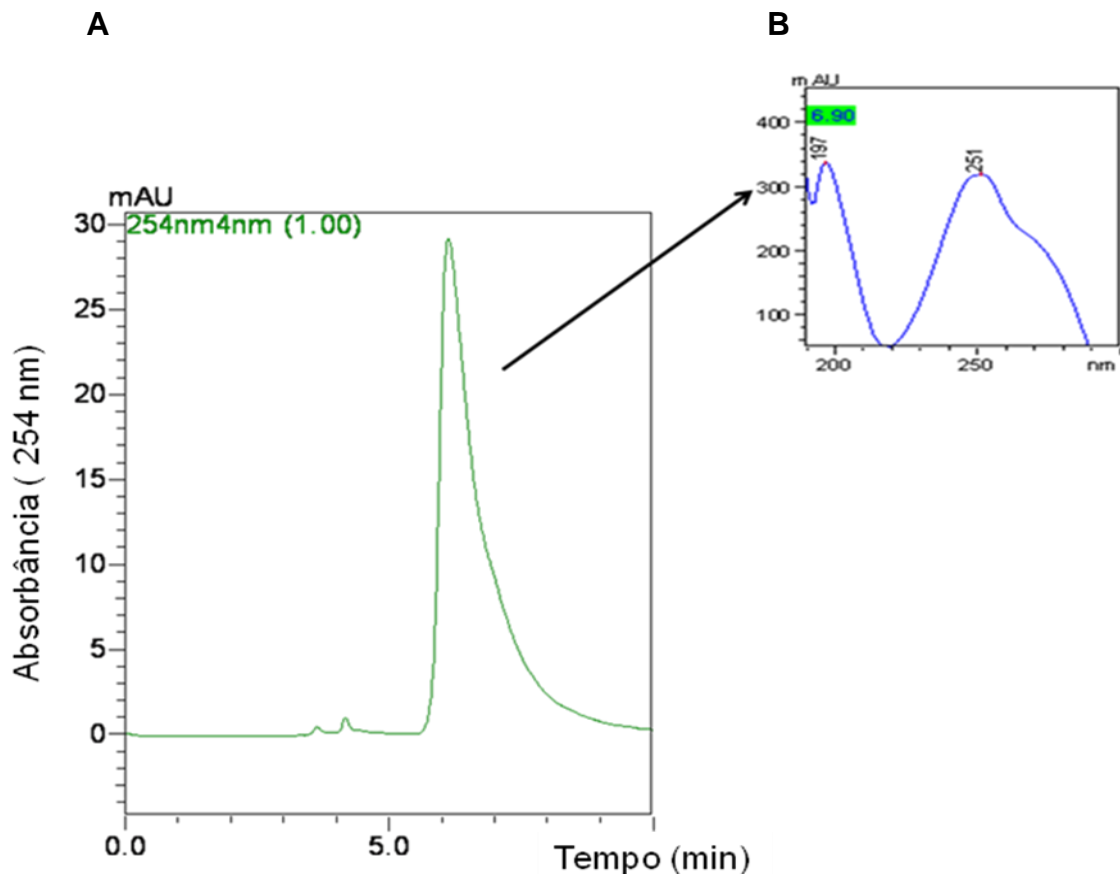
#### 4.10 Análise estatística

A análise estatística foi realizada por teste *one way* ANOVA seguido por Tukey como *post hoc*, através do programa *GraphPad Prism 5*. Foram considerados significativos valores de  $p \leq 0,05$ .

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Espectros de absorção e cromatogramas representativos

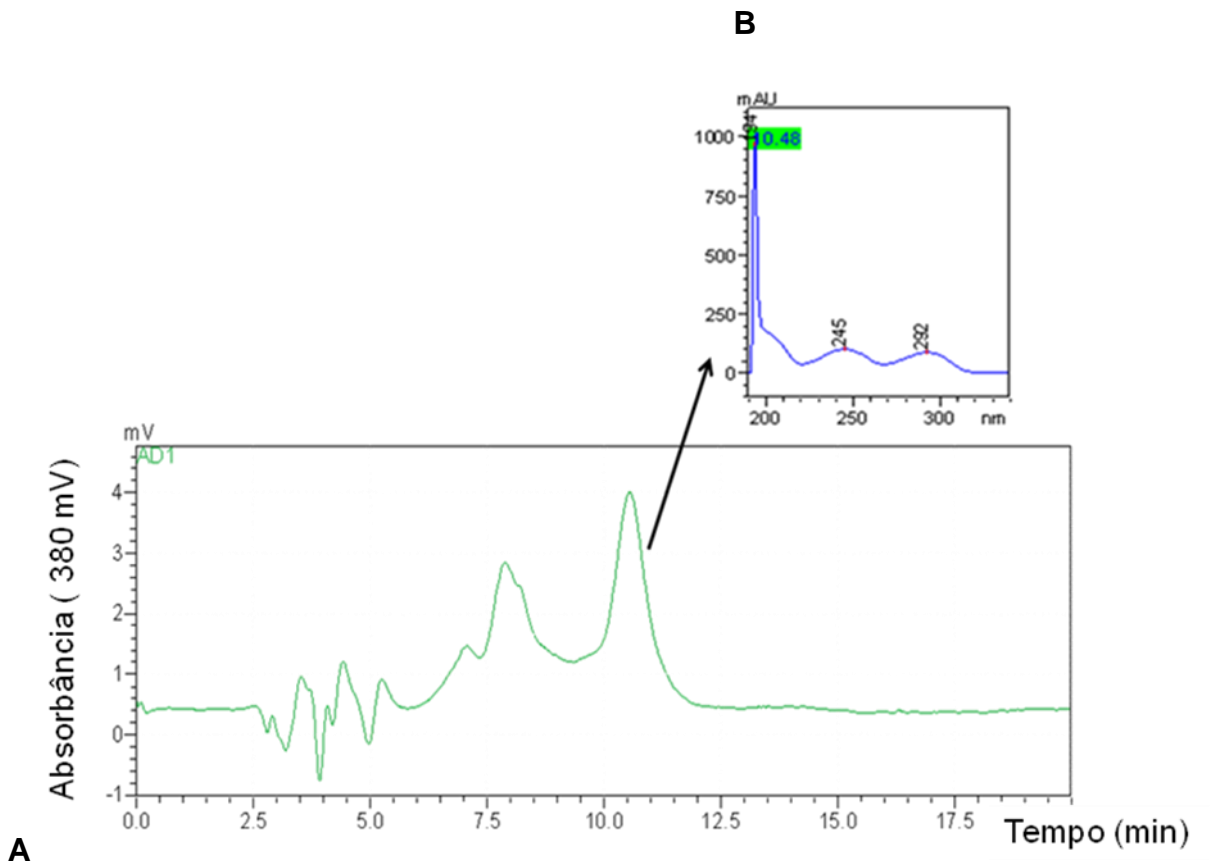
Conforme previamente descrito em Material e Métodos, a detecção da dGuo e de seus produtos de oxidação por HPLC é feita em função de seus espectros de absorção, os quais variam um pouco dependendo da fase móvel e das demais condições utilizadas. Assim sendo, neste estudo os cromatogramas representativos adequados à dGuo e a seus produtos de oxidação 8-oxodGuo, dSp e dlz, e também seus respectivos espectros de absorção são representados nas figuras 9, 10, 11 e 12.



**FIGURA 9 - CROMATOGRAMA E ESPECTRO DE ABSORÇÃO DA dGUO**

FONTE: O autor (2012).

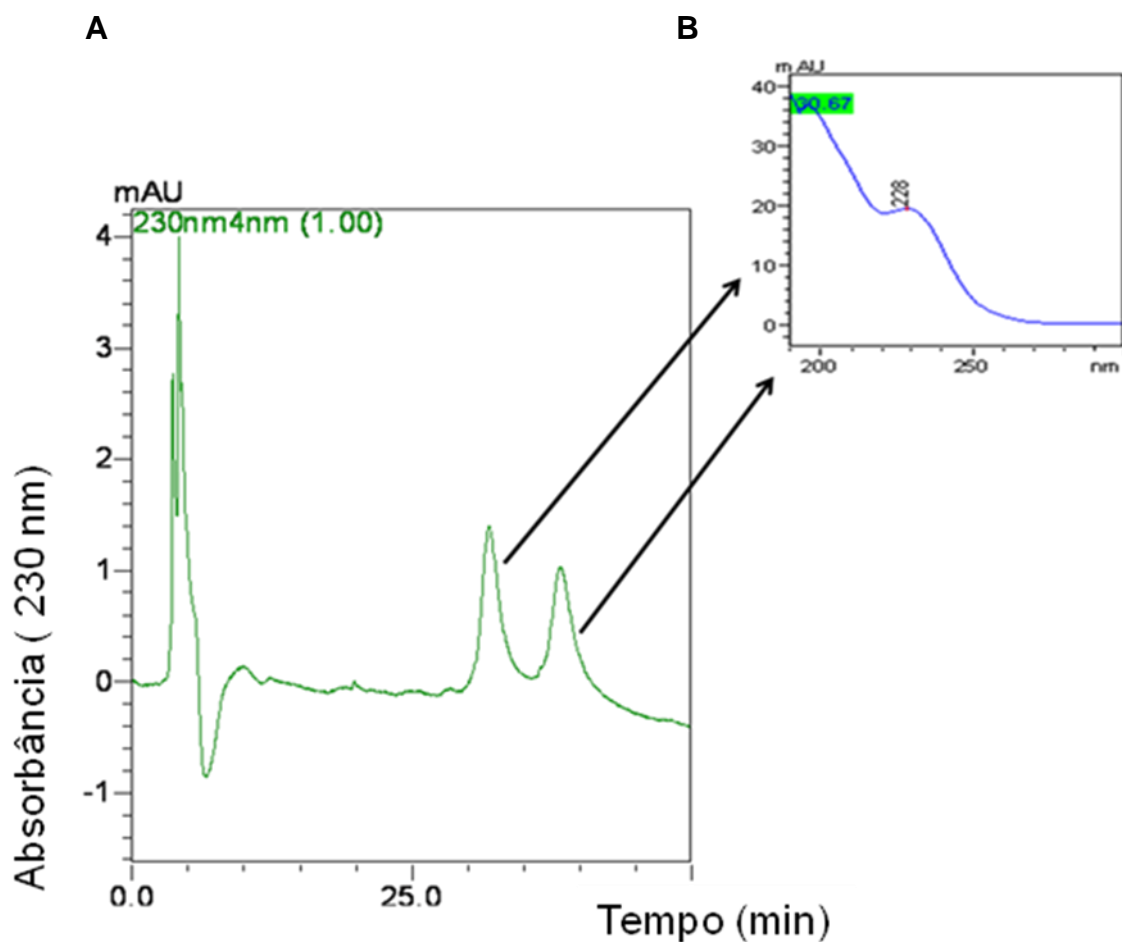
NOTA: (A) Cromatograma de padrão comercial de dGuo na concentração de 0,1 mmol/L. Detecção conforme descrito em Material e Métodos item 4.5. (B) Espectro de absorção do pico do mesmo cromatograma, o qual revela um tempo de retenção de aproximadamente 7 min.



**FIGURA 10 - CROMATOGRAMA E ESPECTRO DE ABSORÇÃO DA 8-OXOdGUO**

FONTE: O autor (2012).

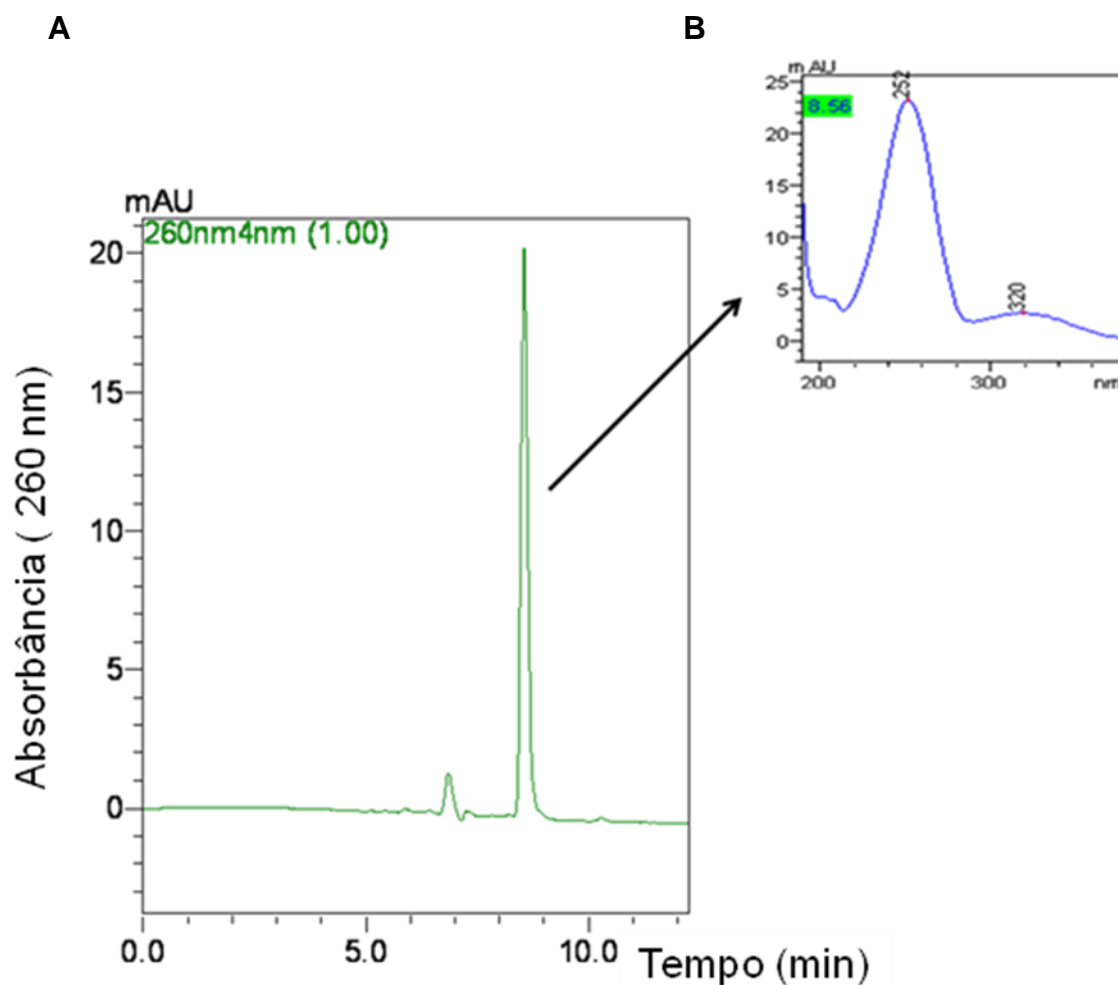
NOTA: (A) Cromatograma de padrão comercial de 8-oxodGuo na concentração de 0,1 mmol/L. Detecção conforme descrito em Material e Métodos item 4.3. (B) Espectro de absorção do pico do mesmo cromatograma, o qual revela um tempo de retenção de aproximadamente 10 min.



**FIGURA 11 - CROMATOGRAMA E ESPECTRO DE ABSORÇÃO DOS DIASTEREISÔMEROS DA dSP**

FONTE: O autor (2012).

NOTA: (A) Cromatograma de padrão de dSp na concentração de 0,09 mmol/L obtido conforme Material e Métodos item 4.4. Detecção conforme descrito em Material e Métodos item 4.5. (B) Espectro de absorção dos picos do mesmo cromatograma, o qual revela um tempo de retenção de aproximadamente 31 min para o primeiro pico.



**FIGURA 12 - CROMATOGRAMA E ESPECTRO DE ABSORÇÃO DA dlz**

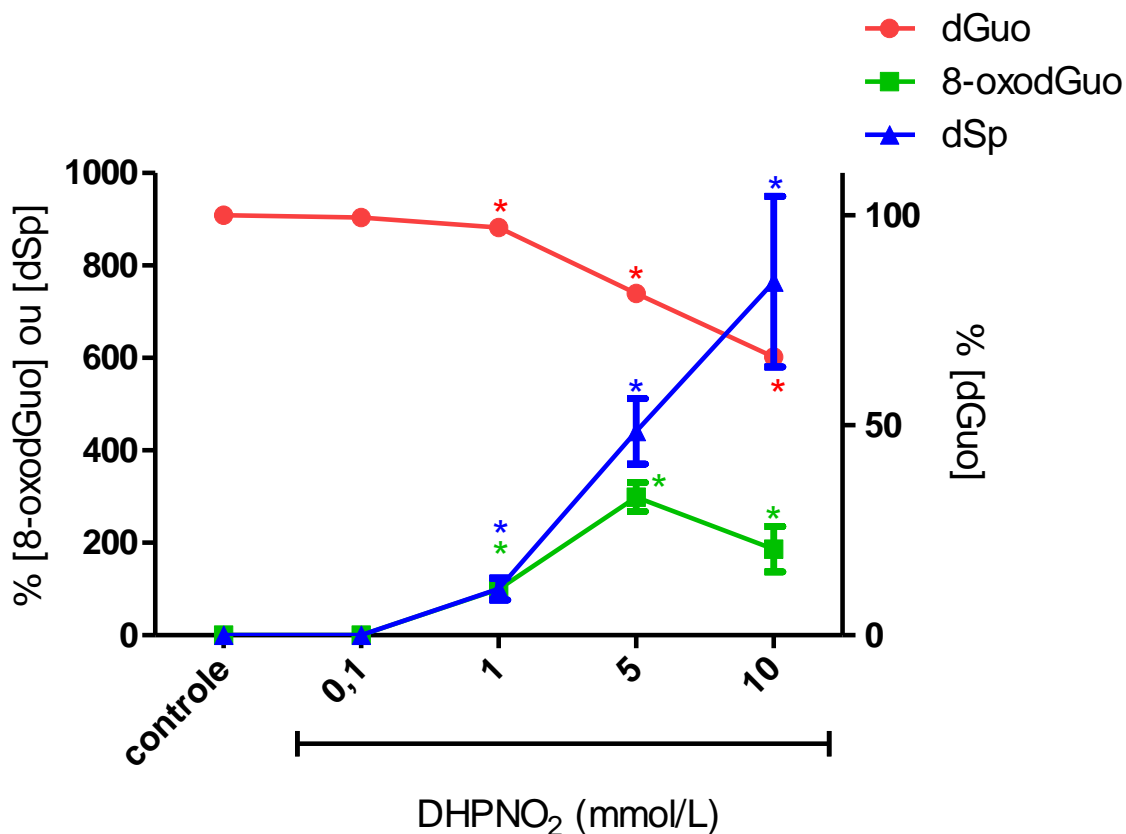
FONTE: O autor (2012).

NOTA: (A) Cromatograma de padrão de dlz na concentração de 0,032 mmol/L obtido conforme Material e Métodos item 4.6. Detecção conforme descrito em Material e Métodos item 4.7. (B) Espectro de absorção do pico do mesmo cromatograma, o qual revela um tempo de retenção de aproximadamente 8 min.

## 5.2 Efeito de diferentes concentrações de $^1\text{O}_2$ sobre a oxidação da dGuo

Foram testadas concentrações crescentes de DHPNO<sub>2</sub> (0,1; 1; 5 e 10 mmol/L) sobre 1 mmol/L de dGuo. Conforme destacado na figura 13, a partir de 1 mmol/L de gerador de  $^1\text{O}_2$  (DHPNO<sub>2</sub>), houve um consumo significativo de dGuo, o qual se estendeu para as concentrações maiores. O consumo do nucleosídeo livre foi cerca de 3, 19 e 34% nas respectivas concentrações de 1, 5 e 10 mmol/L de DHPNO<sub>2</sub>.

Quanto à formação do produto de oxidação 8-oxodGuo, os resultados também foram semelhantes, com detecção destes produtos a partir da concentração de 1 mmol/L de DHPNO<sub>2</sub>, cujo valor de detecção (1,32  $\mu\text{mol/L}$ ) foi considerado 100%. Houve um aumento de cerca de 300% na formação de 8-oxodGuo na incubação com 5 mmol/L de DHPNO<sub>2</sub> e de aproximadamente 186% com 10 mmol/L de DHPNO<sub>2</sub> (figura 13). Além de seguir a mesma tendência observada para os níveis de 8-oxodGuo a partir da adição de DHPNO<sub>2</sub> 1 mmol/L, a formação de dSp aumentou muito mais em porcentagem, chegando a cerca de 440% com a adição de DHPNO<sub>2</sub> 5 mmol/L e aproximadamente 765% quando a reação se processou com DHPNO<sub>2</sub> 10mmol/L, como também pode ser observado na figura 13. A dlz não foi detectada nestas condições.



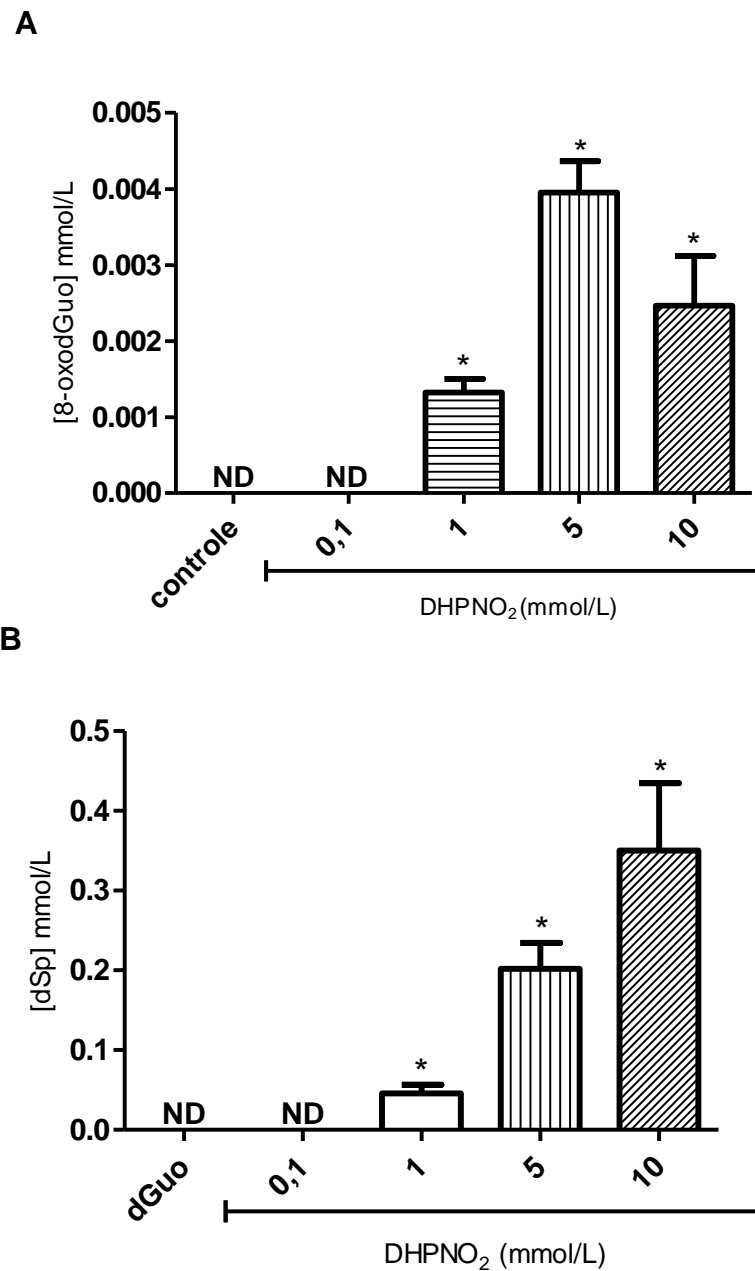
**FIGURA 13 - PORCENTAGEM DE dGUO E DE SEUS PRODUTOS DE OXIDAÇÃO 8-OXODGUO E dSP APÓS A ADIÇÃO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE DHPNO<sub>2</sub>**

FONTE: O autor (2012).

NOTA: Incubação e detecção conforme descrito em Material e Métodos itens 4.2, 4.3 e 4.5. Os resultados são representados como média  $\pm$  desvio padrão de 2 experimentos independentes em triplicata. (\*) Valores estatisticamente diferentes do controle com  $p < 0,001$ . A concentração da média de 8-oxodGuo considerada como 100% é de  $0,35 \pm 0,06 \mu\text{mol/L}$  e a de dSp é de  $45,77 \pm 10,69 \mu\text{mol/L}$ . A barra de erro também está representada para a dGuo, porém seu valor é muito pequeno para ser percebido na escala apresentada. O controle se refere ao sistema contendo apenas dGuo 1 mmol/L.

Embora o aumento na formação de 8-oxodGuo e de dSp tenha sido expressivo em porcentagem em relação aos seus respectivos controles, a análise dos mesmos resultados em função da concentração dos produtos revela um valor menor. Ou seja, como pode ser visto na figura 14A, o aumento de 100 para 300% na formação de 8-oxodGuo representa apenas um ganho de concentração da ordem

de 0,003 mmol/L. Enquanto que o salto de cerca de 765% de dSp representa um aumento de 0,3 mmol/L deste produto de oxidação (figura 14B).



**FIGURA 14 - CONCENTRAÇÃO DE 8-OXODGUO E DE dSP APÓS A ADIÇÃO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE DHPNO<sub>2</sub>**

FONTE: O autor (2012).

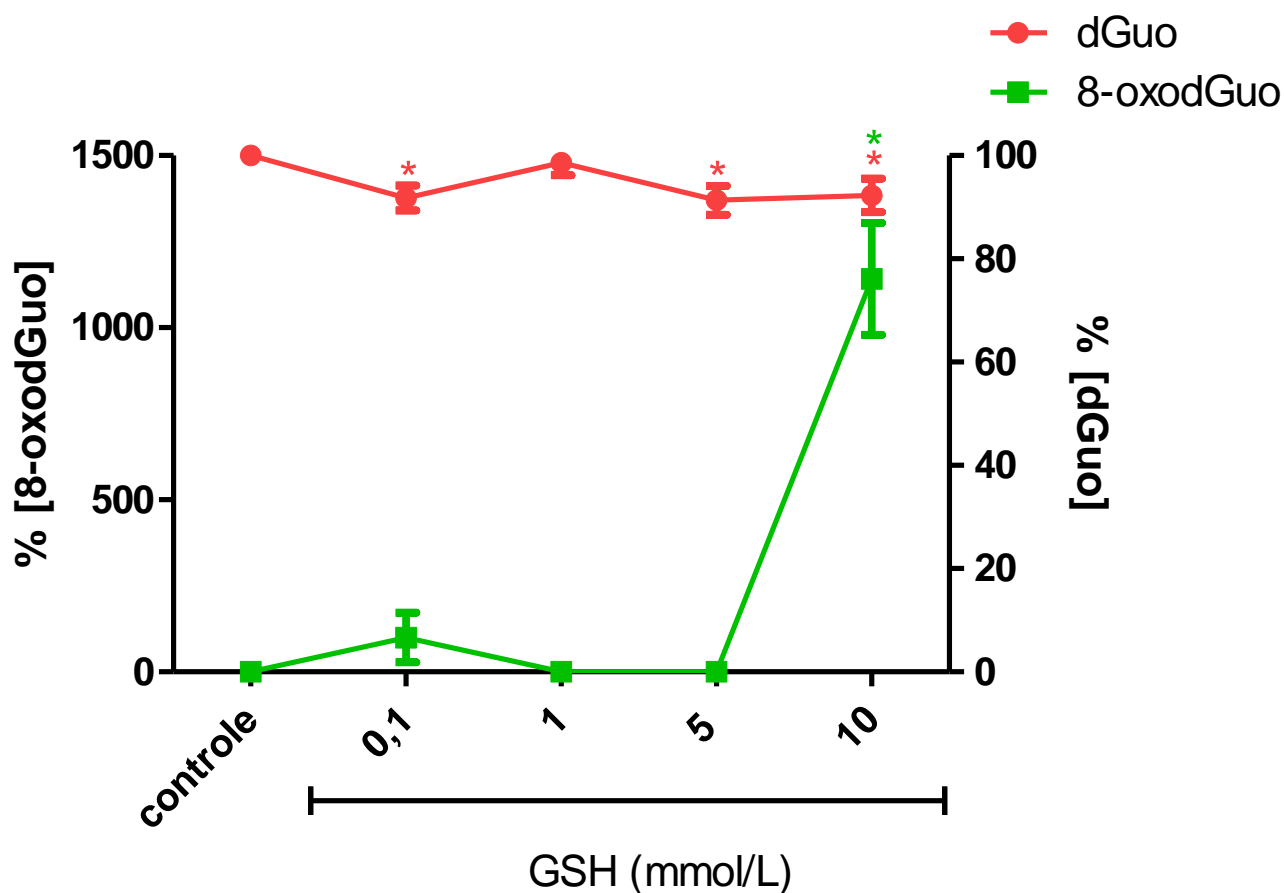
NOTA: Incubação e detecção conforme descrito em Material e Métodos itens 4.2, 4.3 e 4.5. Os resultados são representados como média  $\pm$  desvio padrão de 2 experimentos independentes em triplicata. Em **A**, concentração de 8-oxodGuo e em **B**, de dSp, ambas em mmol/L. (\*) Valores estatisticamente diferentes do controle com  $p < 0,001$ . ND: não detectado. O controle se refere ao sistema contendo apenas dGuo 1 mmol/L.

### **5.3 Efeito de diferentes concentrações de GSH e GSSG sobre a oxidação da dGuo com DHPNO<sub>2</sub> 0,1 mmol/L**

Conforme já foi apresentado, DHPNO<sub>2</sub> na concentração de 0,1 mmol/L não foi suficiente para alterar significativamente as concentrações de dGuo e gerar os produtos oxidados 8-oxodGuo, dSp ou dlz (figura 13). Acrescentando-se GSH ou GSSG em diferentes concentrações à reação, pode-se perceber um pequeno efeito apenas de GSH sobre as concentrações de dGuo, com uma leve diminuição (cerca de 8,5% em todos os casos) ao ser incubada com 0,1 mmol/L de DHPNO<sub>2</sub> na presença de 0,1; 5 e 10 mmol/L deste tiol (figura 15).

Tratando-se da formação dos produtos de oxidação, pode-se perceber que GSH nas concentrações de 0,1 e 10 mmol/L permitiu a detecção de um aumento dos níveis de 8-oxodGuo (figura 15), embora não tenha tido efeito algum sobre a geração de dSp e dlz.

A adição de GSSG não modificou os níveis de dGuo, 8-oxodGuo, dSp ou dlz em nenhuma das concentrações testadas (dados não mostrados).



**FIGURA 15 - EFEITO DA GSH SOBRE A OXIDAÇÃO DA dGUO COM DHPNO<sub>2</sub> 0,1 mmol/L**

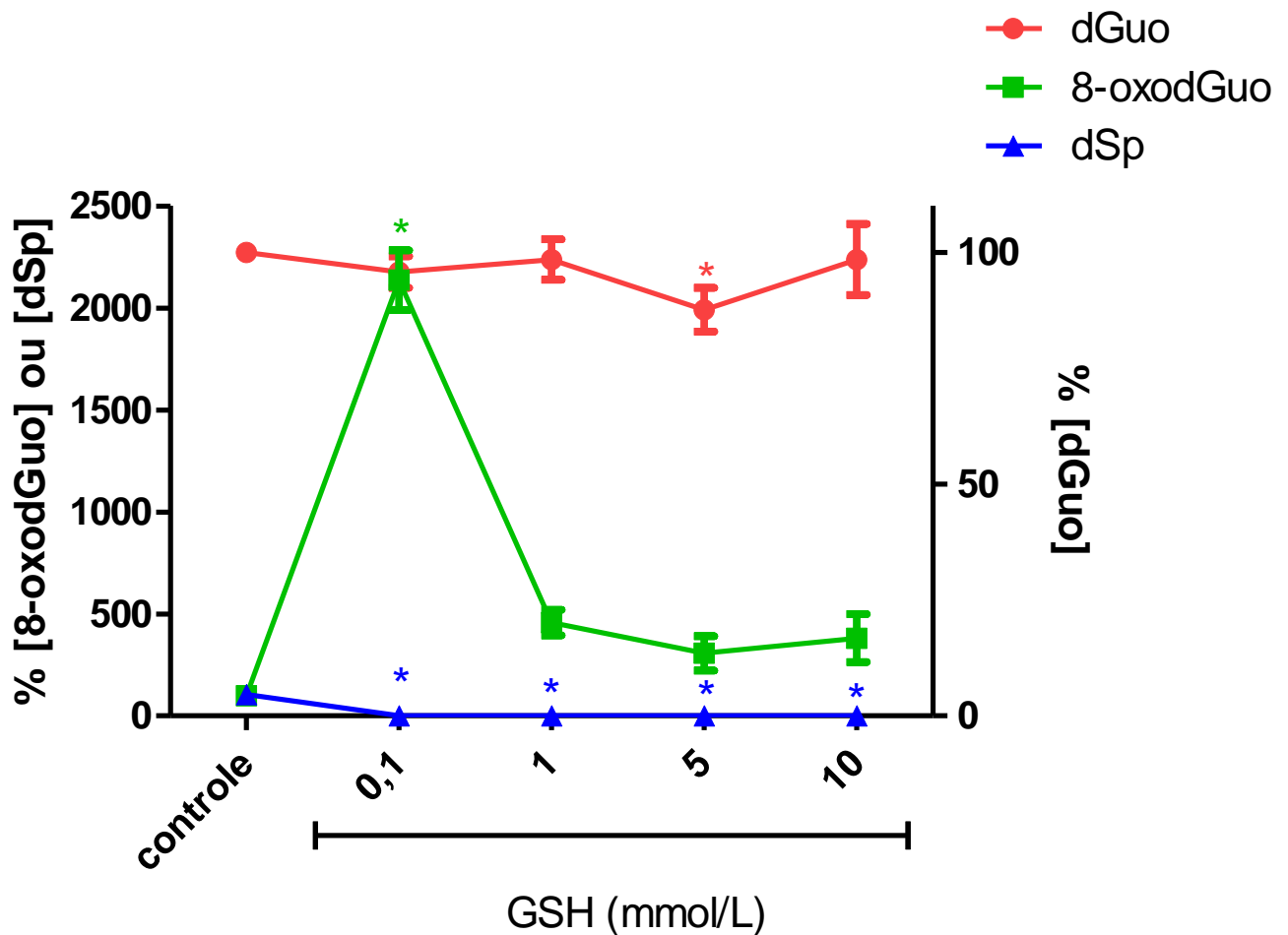
FONTE: O autor (2012).

NOTA: Incubação e detecção conforme descrito em Material e Métodos itens 4.2, 4.3 e 4.5. Os resultados são representados como média  $\pm$  desvio padrão de 2 experimentos independentes em triplicata. (\*) Valores estatisticamente diferentes do controle com  $p < 0,001$ . A concentração da média de 8-oxodGuo considerada como 100% é de  $0,35 \pm 0,06 \mu\text{mol/L}$ . No caso da porcentagem de dGuo, a barra de erro também está representada, porém, em alguns momentos seu valor é muito pequeno para ser percebido na escala apresentada. O controle se refere ao sistema na presença de DHPNO<sub>2</sub> 0,1 mmol/L.

Embora a adição de GSH 10 mmol/L tenha promovido um aumento de mais de 1000% em relação à GSH 0,1 mmol/L, esta elevação não chega a ser tão alta ao ser analisada em função da concentração de 8-oxodGuo, pois representa apenas um aumento da ordem de 0,004 mmol/L deste produto de oxidação.

#### **5.4 Efeito de diferentes concentrações de GSH e GSSG sobre a oxidação da dGuo com DHPNO<sub>2</sub> 1 mmol/L**

A adição de diferentes concentrações de GSH à incubação da dGuo com DHPNO<sub>2</sub> 1 mmol/L resultou em um leve consumo de dGuo (cerca de 13%) detectável apenas na presença de GSH 5 mmol/L, conforme indicado na figura 16. A inclusão de 0,1 mmol/L deste tiol ao meio de reação promoveu ainda um incremento na formação de 8-oxodGuo, o qual ultrapassou em 200 vezes o valor sem adição de tióis (figura 16). Nas concentrações posteriores houve uma tendência ao acréscimo, mas o mesmo não foi significativamente diferente do controle. A GSH teve efeito contrário na produção de dSp, anulando-a desde a adição da menor concentração de GSH à reação (figura 16), e não promoveu a geração do produto de oxidação dlz.



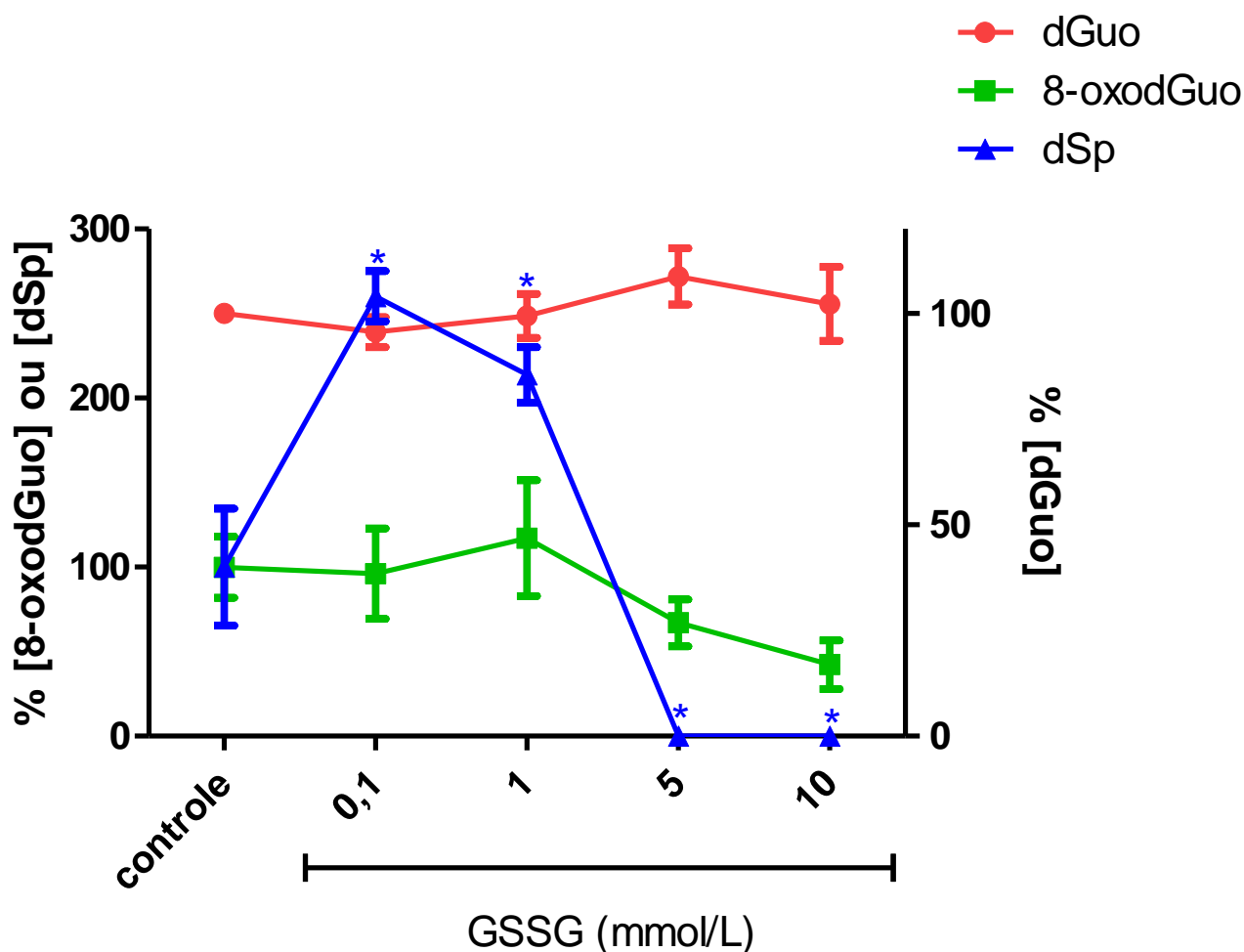
**FIGURA 16 - EFEITO DA GSH SOBRE A OXIDAÇÃO DA dGUO COM DHPNO<sub>2</sub> 1 mmol/L**

FONTE: O autor (2012).

NOTA: Incubação e detecção conforme descrito em Material e Métodos itens 4.2, 4.3 e 4.5. Os resultados são representados como média  $\pm$  desvio padrão de 2 experimentos independentes em triplicata. (\*) Valores estatisticamente diferentes do controle com  $p < 0,001$ . A concentração da média de 8-oxodGuo considerada como 100% é de  $1,32 \pm 0,17 \mu\text{mol/L}$  e de dSp é de  $45,77 \pm 10,69 \mu\text{mol/L}$ . No caso das porcentagens de dGuo e de dSp, a barra também está de erro representada, porém, em alguns pontos seu valor é muito pequeno para ser percebido na escala apresentada. O controle se refere ao sistema na presença de DHPNO<sub>2</sub> 1 mmol/L.

A adição de GSSG não teve efeito sobre a produção de 8-oxodGuo (figura 17) e não promoveu a geração de dlz. Quanto à formação de dSp, a mesma aumentou com a adição de GSSG 0,1 mmol/ e 1 mmol/L (cerca de 2,5 e 2,1 vezes,

respectivamente) e zerou com a adição da forma dissulfeto nas duas maiores concentrações (figura 17).



**FIGURA 17 - EFEITO DA GSSG SOBRE A OXIDAÇÃO DA dGUO COM DHPNO<sub>2</sub> 1 mmol/L**

FONTE: O autor (2012).

NOTA: Incubação e detecção conforme descrito em Material e Métodos itens 4.2, 4.3 e 4.5. Os resultados são representados como média  $\pm$  desvio padrão de 2 experimentos independentes em triplicata. (\*) Valores estatisticamente diferentes do controle com  $p < 0,001$ . A concentração da média de 8-oxodGuo considerada como 100% é de  $3,51 \pm 0,63 \mu\text{mol/L}$  e de dSp é de  $31,87 \pm 11,02 \mu\text{mol/L}$ . No caso das porcentagens de dGuo e de 8-oxodGuo, a adição de GSSG não provocou diferenças significativas. O controle se refere ao sistema na presença de DHPNO<sub>2</sub> 1 mmol/L.

### 5.5 Efeito de diferentes concentrações de GSH e GSSG sobre a oxidação da dGuo com DHPNO<sub>2</sub> 5 mmol/L

Quando a dGuo foi oxidada por <sup>1</sup>O<sub>2</sub> gerado com decomposição térmica do DHPNO<sub>2</sub> na concentração de 5 mmol/L, foi adicionado um experimento controle, no qual o DHPNO<sub>2</sub> foi substituído pelo DHPN obtido por uma decomposição térmica anterior à incubação com dGuo. O objetivo desta abordagem foi o de confirmar que todos os efeitos observados na adição de DHPNO<sub>2</sub> eram, na realidade, decorrentes do <sup>1</sup>O<sub>2</sub> gerado pela decomposição térmica deste endoperóxido. De fato, os resultados mostraram que o consumo de dGuo e a formação dos produtos permaneceu igual à situação controle (tabela 2) e a interpretação destes resultados podem ser estendida para todas as outras concentrações de DHPNO<sub>2</sub>.

|                             | <i>dGuo</i> | <i>8-oxodGuo</i> | <i>dSp</i> |
|-----------------------------|-------------|------------------|------------|
| Controle                    | 1 mmol/L    | ND               | ND         |
| DHPN 5 mmol/L               | 1 mmol/L    | ND               | ND         |
| DHPNO <sub>2</sub> 5 mmol/L | 0,76 mmol/L | 0,004 mmol/L     | 0,2 mmol/L |

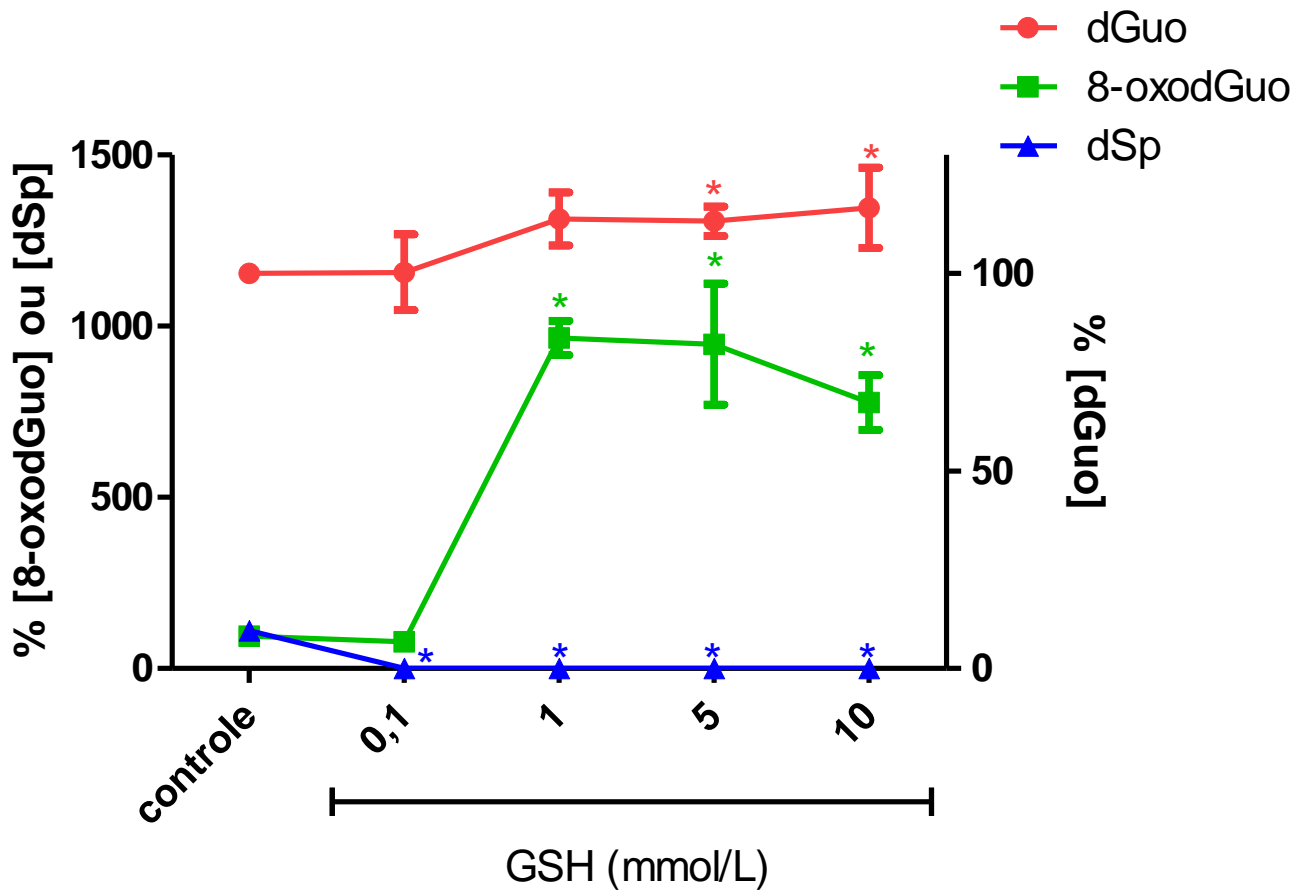
**TABELA 2 – COMPARAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE dGUO, 8-OXOdGUO E dSP (EM mmol/L) GERADAS POR DHPN E DHPNO<sub>2</sub> 5 mmol/L**

FONTE: O autor (2012).

NOTA: Incubação e detecção conforme descrito em Material e Métodos itens 4.2, 4.3 e 4.5. O controle dGuo se refere ao sistema contendo apenas dGuo 1 mmol/L ND: não detectado.

O acréscimo tanto de GSH quanto de GSSG em suas maiores concentrações (5 e 10 mmol/L) foi suficiente para prevenir a oxidação que a dGuo sofreu com a adição de 5 mmol/L de DHPNO<sub>2</sub> (figuras 18 e 19, respectivamente). Inclusive, a adição de GSH ou GSSG à reação permitiu que a dGuo voltasse aos mesmos níveis alcançados na ausência destas substâncias. A formação de 8-oxodGuo foi elevada em torno de 100 vezes por GSH nas concentrações de 1, 5 e 10 mmol/L (figura 18) e aproximadamente em 4 vezes por GSSG apenas na concentração de 5 mmol/L (figura 19). Como indicado na figura 18, todas as

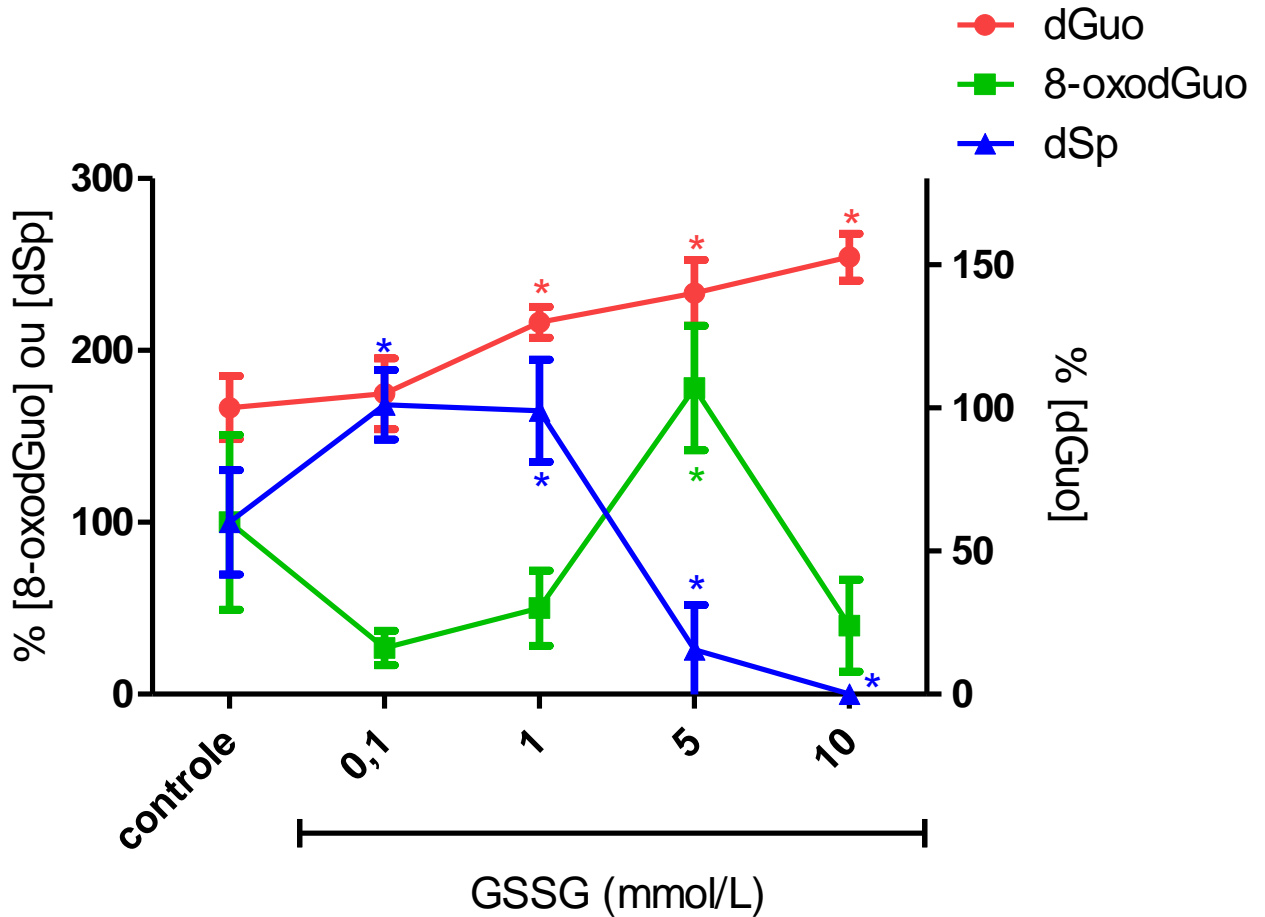
concentrações de GSH preveniram a oxidação da dGuo a dSp. As concentrações de 5 e 10 inclusive impediram em 100% a formação deste produto. A GSSG nas concentrações de 0,1 e 1 mmol/L, de modo oposto, dobrou a geração de dSp (figura 19). Porém, 5 mmol/L de GSSG diminuiu significativamente a formação de dSp inclusive a níveis menores do que o controle (redução de cerca de 75%), e 10 mmol/L preveniu totalmente que a dSp fosse originada. O produto de oxidação dlz permaneceu não sendo detectado após a adição de GSH ou GSSG.



**FIGURA 18 - EFEITO DA GSH SOBRE A OXIDAÇÃO DA dGUO COM DHPNO<sub>2</sub> 5 mmol/L**

FONTE: O autor (2012).

NOTA: Incubação e detecção conforme descrito em Material e Métodos itens 4.2, 4.3 e 4.5. Os resultados são representados como média  $\pm$  desvio padrão de 2 experimentos independentes em triplicata. (\*) Valores estatisticamente diferentes do controle com  $p < 0,001$ . A concentração da média de 8-oxodGuo considerada como 100% é de  $3,95 \pm 0,41 \mu\text{mol/L}$  e de dSp é de  $0,20 \pm 0,03 \text{ mmol/L}$ . No caso das porcentagem de dGuo e de dSp, a barra de erro também está representada, porém, em alguns pontos seu valor é muito pequeno para ser percebido na escala apresentada. O controle se refere ao sistema na presença de DHPNO<sub>2</sub> 5 mmol/L.



**FIGURA 19 - EFEITO DA GSSG SOBRE A OXIDAÇÃO DA dGUO COM DHPNO<sub>2</sub> 5 mmol/L**

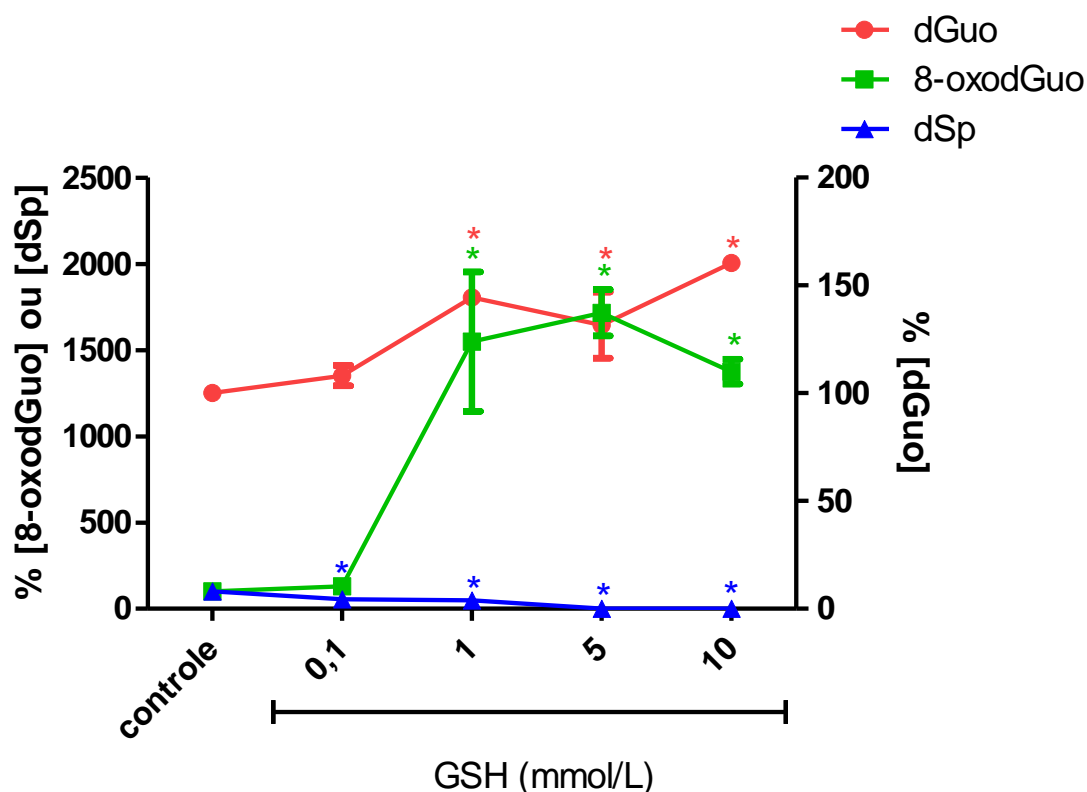
FONTE: O autor (2012).

NOTA: Incubação e detecção conforme descrito em Material e Métodos itens 4.2, 4.3 e 4.5. Os resultados são representados como média  $\pm$  desvio padrão de 2 experimentos independentes em triplicata. (\*) Valores estatisticamente diferentes do controle com  $p < 0,001$ . A concentração da média de 8-oxodGuo considerada como 100% é de  $1,55 \pm 0,79 \mu\text{mol/L}$  e de dSp é de  $0,11 \pm 0,03 \text{ mmol/L}$ . O controle se refere ao sistema na presença de DHPNO<sub>2</sub> 5 mmol/L.

## **5.6 Efeito de diferentes concentrações de GSH e GSSG sobre a oxidação da dGuo com DHPNO<sub>2</sub> 10 mmol/L**

Os efeitos de GSH e GSSG sobre oxidação da dGuo com DHPNO<sub>2</sub> 10 mmol/L foram bastante semelhantes àqueles observados na oxidação com 5 mmol/L. Novamente, o acréscimo de GSH à reação nas maiores concentrações preveniu totalmente o consumo da dGuo observado após sua oxidação com DHPNO<sub>2</sub> 10 mmol/L (figura 20).

Também de modo análogo ao que ocorreu na oxidação da dGuo com DHPNO<sub>2</sub> 5 mmol/L, a GSH aumentou sobremaneira a formação de 8-oxodGuo (aproximadamente em 150 vezes) e diminuiu bastante a geração de dSp, chegando a zerá-la, quando nas maiores concentrações deste tiol (figura 20).



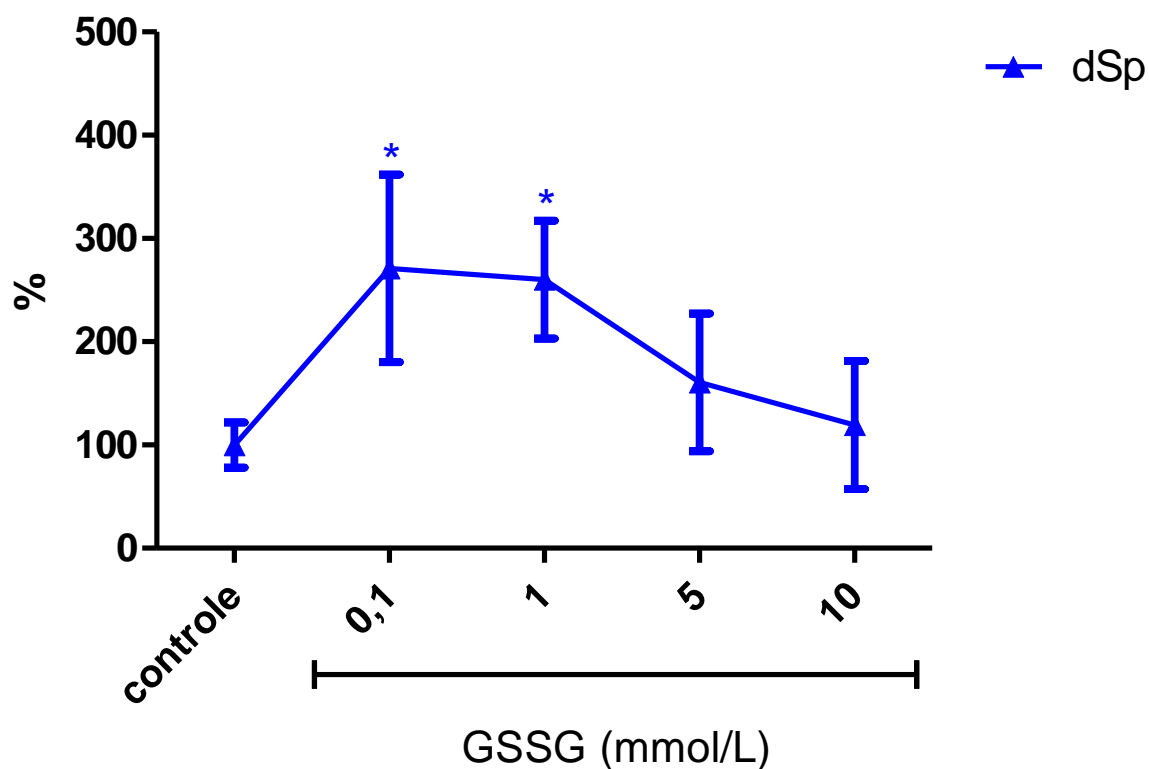
**FIGURA 20 - EFEITO DA GSH SOBRE A OXIDAÇÃO DA dGUO COM DHPNO<sub>2</sub> 10 mmol/L**

FONTE: O autor (2012).

NOTA: Incubação e detecção conforme descrito em Material e Métodos itens 4.2, 4.3 e 4.5. Os resultados são representados como média  $\pm$  desvio padrão de 2 experimentos independentes em triplicata. (\*) Valores estatisticamente diferentes do controle com  $p < 0,001$ . A concentração da média de 8-oxodGuo considerada como 100% é de  $2,46 \pm 0,65 \mu\text{mol/L}$  e de dSp é de  $0,35 \pm 0,08 \text{ mmol/L}$ . No caso das porcentagem de dGuo e de dSp, a barra de erro também está representada, porém, em algum momentos seu valor é muito pequeno para ser percebido na escala apresentada. O controle se refere ao sistema na presença de DHPNO<sub>2</sub> 10 mmol/L.

O efeito da GSSG sobre a dGuo não pode ser quantificado devido à presença de um segundo pico não identificado, mas na região de detecção de dOz, o qual impediu a quantificação correta da área do pico do nucleosídeo livre. O resultado da adição de GSSG foi nulo sobre a 8-oxodGuo e sobre a dlz, as quais já não haviam sido formadas nestas condições. Em relação à dSp, do mesmo modo como ocorreu na oxidação com DHPNO<sub>2</sub> 5 mmol/L, a GSSG provocou um aumento

na formação deste produto apenas nas concentrações de 0,1 e 1 mmol/L (cerca de 170 e 160 vezes, respectivamente; figura 21).



**FIGURA 21 - EFEITO DA GSSG SOBRE A OXIDAÇÃO DA dGUO COM DHPNO<sub>2</sub> 10 mmol/L**

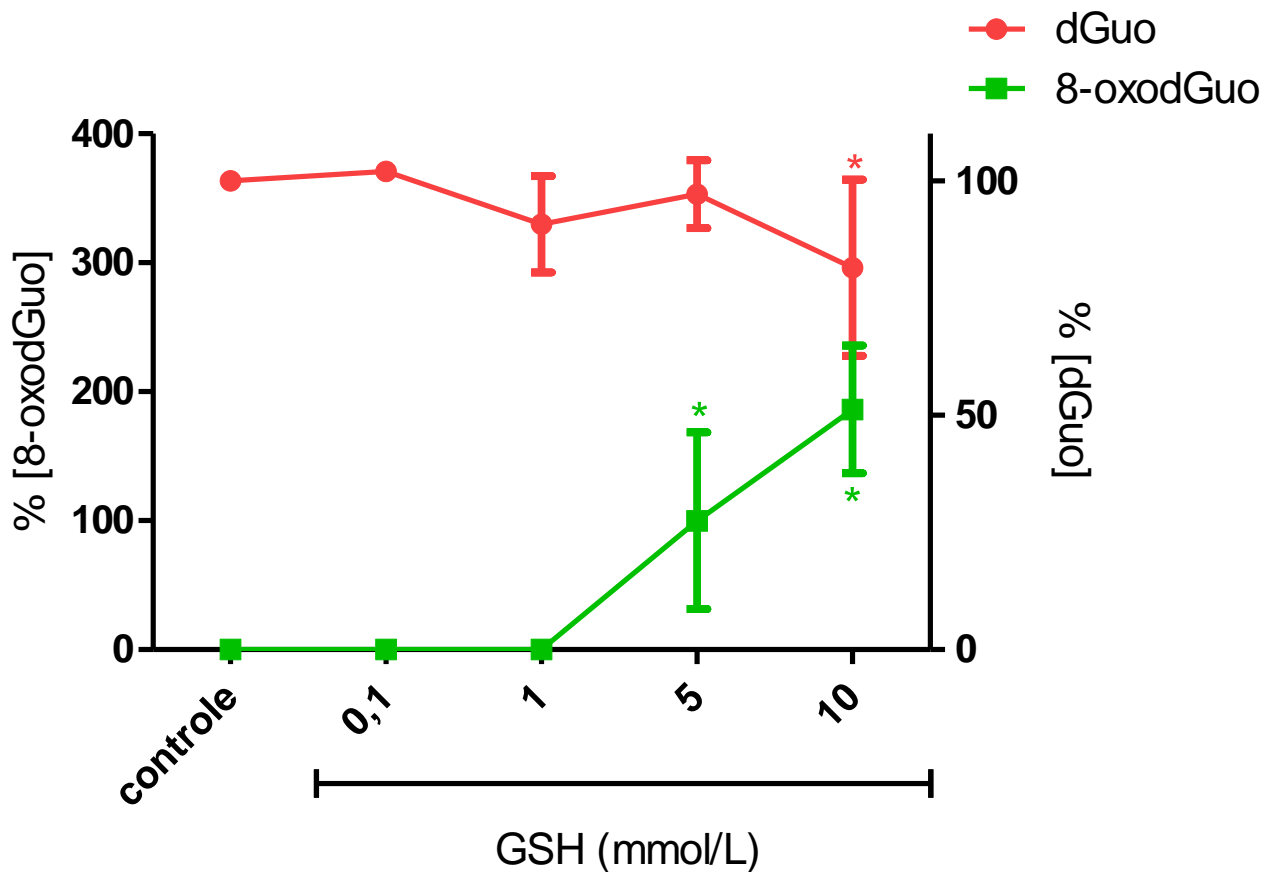
FONTE: O autor (2012).

NOTA: Incubação e detecção conforme descrito em Material e Métodos itens 4.2 e 4.5. Os resultados são representados como média  $\pm$  desvio padrão de 2 experimentos independentes em triplicata. (\*) Valores estatisticamente diferentes do controle com  $p < 0,001$ . A concentração da média de dSp é de  $0,11 \pm 0,02$  mmol/L. O controle se refere ao sistema na presença de DHPNO<sub>2</sub> 10 mmol/L.

### 5.7 Efeito de diferentes concentrações de GSH e GSSG sobre a dGuo

Os níveis da dGuo e de seus produtos de oxidação também foram testados na reação apenas entre 1 mmol/L do nucleosídeo e 0,1; 1; 5 e 10 mmol/L de GSH ou GSSG. Esta última substância não teve efeito algum sobre a dGuo e, conseqüentemente, não gerou nenhum dos produtos analisados. Interessantemente,

a maior concentração de GSH provocou ligeiro consumo da dGuo e formação de 8-oxodGuo (figura 22), embora não tenha gerado dSp ou dlz.



**FIGURA 22 - EFEITO DA GSH SOBRE A OXIDAÇÃO DA dGUO**

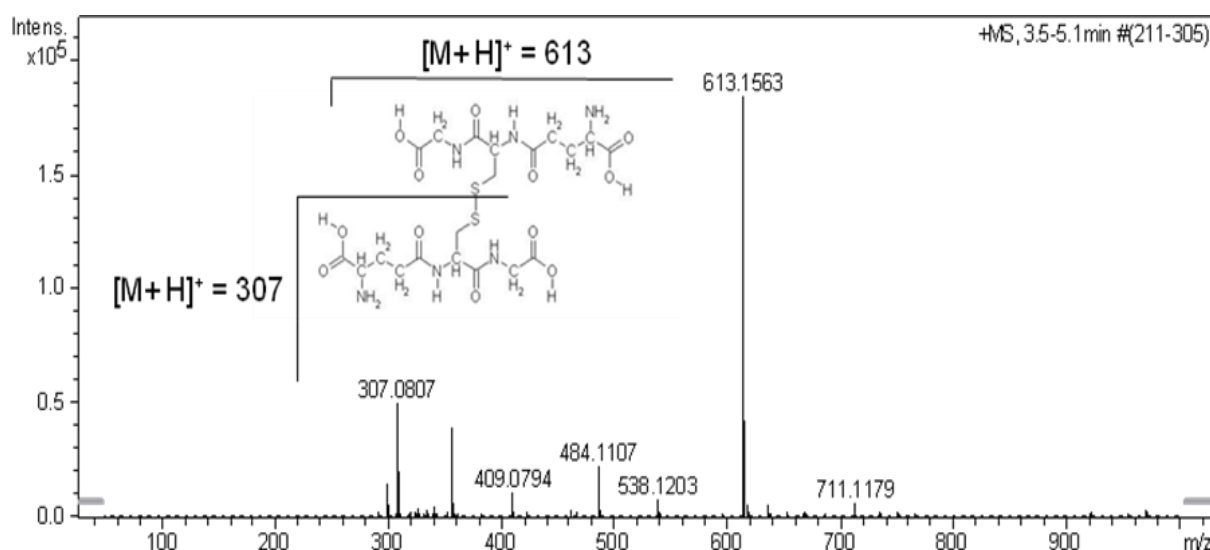
FONTE: O autor (2012).

NOTA: Incubação e detecção conforme descrito em Material e Métodos itens 4.2 (porém, desta vez sem a adição de DHPNO<sub>2</sub>) e 4.3. Os resultados são representados como média ± desvio padrão de 2 experimentos independentes em triplicata. (\*) Valores estatisticamente diferentes do controle com  $p < 0,001$ . A concentração da média de 8-oxodGuo considerada 100% é de  $0,37 \pm 0,25 \mu\text{mol/L}$ . O controle se refere ao sistema contendo apenas dGuo 1 mmol/L.

A análise dos dados da última figura em termos das concentrações de 8-oxodGuo em mmol/L fornecem uma melhor percepção do real efeito da GSH sobre a dGuo. Há sim formação de 8-oxodGuo, mas ela é bastante baixa, da ordem de 0,0007 mmol/L. Mesmo assim, por se tratar de um dado bastante curioso, o mesmo foi investigado mais profundamente, por meio da oxidação da GSH.

## 5.8 Oxidação de GSH

A reação de oxidação de GSH foi primeiramente realizada com gerador de oxigênio singlete na proporção de 1:1, ou seja, GSH 0,25 mmol/L e DHPNO<sub>2</sub> também 0,25 mmol/L. A amostra foi então analisada por espectrometria de massas acoplada ao HPLC para a procura de seus produtos de oxidação, através de sua relação *m/z*. Os picos de *m/z* 307 e 613 correspondem à molécula de GSSG, como pode ser observado na figura 23. As demais relações *m/z* presentes no espectro não puderam ser associadas a nenhum produto esperado.

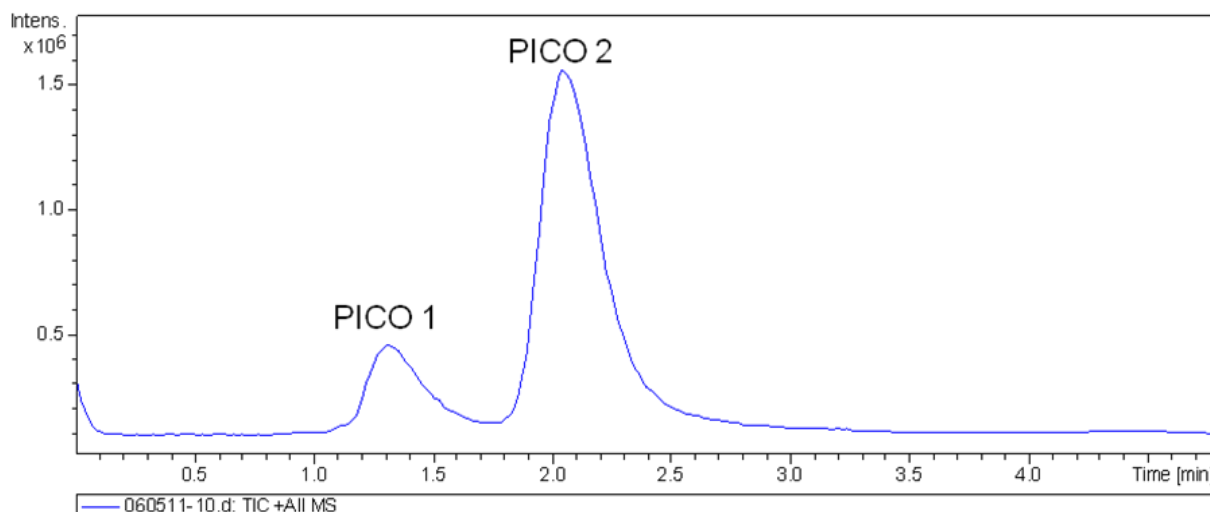


**FIGURA 23 - PRODUTOS DA OXIDAÇÃO DA GSH POR <sup>1</sup>O<sub>2</sub>**

FONTE: O autor (2012).

NOTA: Incubação e detecção conforme descrito em Material e Métodos itens 4.8 e 4.9. Aparelho no modo positivo, temperatura da fonte de 250°C, injeção de 100 µL de amostra sob fluxo de 1 mL/minuto. As duas únicas relações *m/z* encontradas foram aquelas correspondentes ao produto de oxidação GSSG (307 e 613).

Ainda que o resultado acima não tenha esclarecido completamente o consumo da dGuo e a formação de 8-oxodGuo na reação entre o nucleosídeo livre e a GSH (figura 22), foi praticada nova reação de oxidação da GSH, desta vez através de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em excesso em relação ao tiol reduzido. Foram então observados dois picos em HPLC (figura 24), os quais também seguiram para detecção por espectrometria de massas.

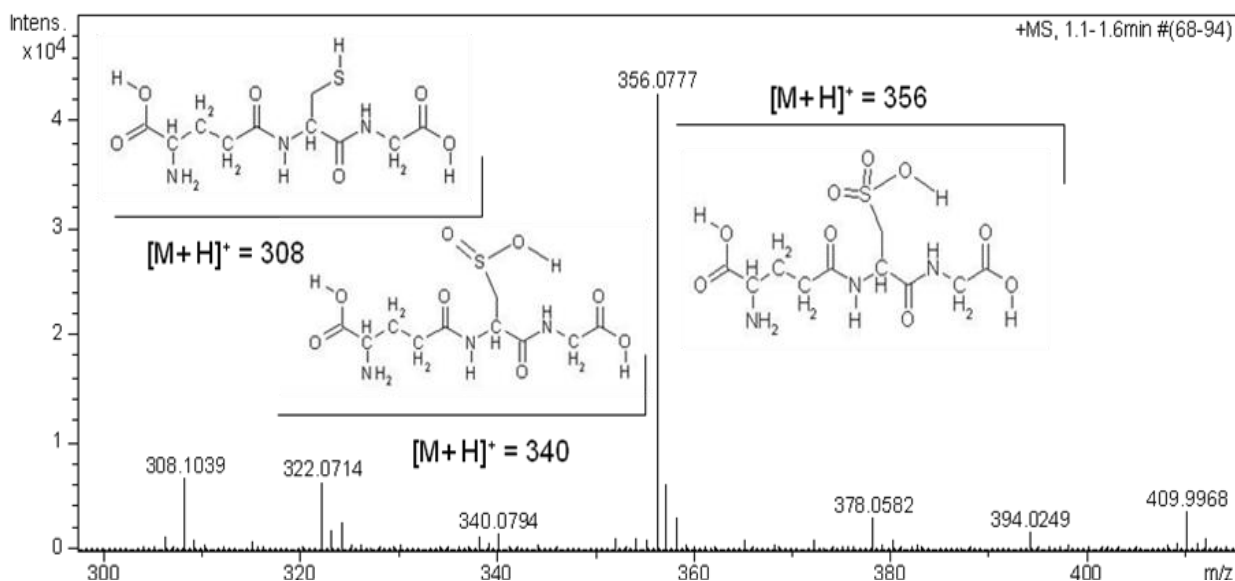


**FIGURA 24 - PICOS DETECTADOS EM HPLC A PARTIR DA OXIDAÇÃO DA GSH COM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

FONTE: O autor (2012).

NOTA: Incubação e detecção conforme descrito em Material e Métodos itens 4.8 e 4.9. Injeção de 100 µL de amostra sob fluxo de 1 mL/minuto.

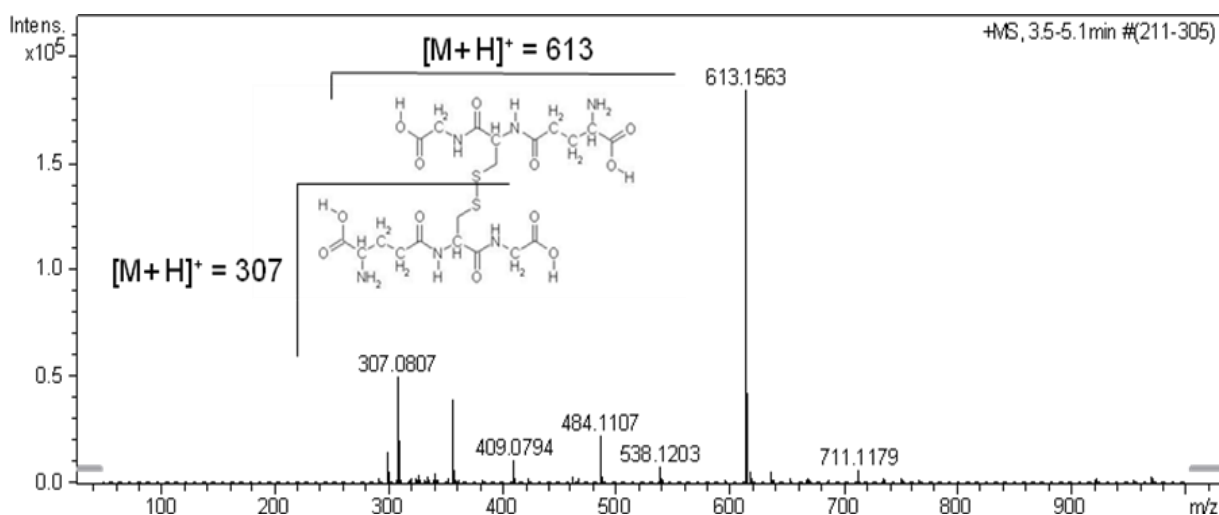
Conforme destacado na figura 25, o espectro de massas do primeiro pico revelou a presença de GSH e de ácidos sulfínico (GSO<sub>2</sub>H) e sulfônico (GSO<sub>3</sub>H) como produtos de oxidação. Já segundo pico, por sua vez, apontou a existência apenas de GSSG (figura 26).



**FIGURA 25 - PRODUTOS DO PICO 1 DA OXIDAÇÃO DA GSH POR H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

FONTE: O autor (2012).

NOTA: Incubação e detecção conforme descrito em Material e Métodos itens 4.8 e 4.9. Aparelho no modo positivo, temperatura da fonte de 250°C, injeção de 100 µL de amostra sob fluxo de 1 mL/minuto. As relações *m/z* encontradas foram aquelas correspondentes à GSH (308) e aos produtos de oxidação GSO<sub>2</sub>H (340) e GSO<sub>3</sub>H (356).



**FIGURA 26 - PRODUTOS DO PICO 2 DA OXIDAÇÃO DA GSH POR H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

FONTE: O autor (2012).

NOTA: Incubação e detecção conforme descrito em Material e Métodos itens 4.8 e 4.9. Aparelho no modo positivo, temperatura da fonte de 250°C, injeção de 100 µL de amostra sob fluxo de 1 mL/minuto. As duas únicas relações *m/z* encontradas foram aquelas correspondentes ao produto de oxidação GSSG (307 e 613).

## 6. DISCUSSÃO

Para um melhor entendimento do papel da GSH e da GSSG sobre a oxidação da dGuo, primeiramente fez-se necessário compreender o efeito de diferentes concentrações de  $^1\text{O}_2$  sobre este nucleosídeo livre. Para isso, foram testadas as concentrações de 0,1; 1; 5 e 10 mmol/L de DHPNO<sub>2</sub>. Entretanto, deve ser considerado que o rendimento de  $^1\text{O}_2$  a partir da termólise completa deste endoperóxido em solução aquosa a 37°C é de cerca de 60% (PIERLOT *et al.*, 2000), de modo que as concentrações finais de  $^1\text{O}_2$  nestes sistemas eram, na verdade, em torno de 0,06; 0,6; 3 e 6 mmol/L, respectivamente. De qualquer forma, a menor concentração de DHPNO<sub>2</sub> não teve efeito algum sobre a oxidação da dGuo (figura 13), a qual só passou a ser consumida e a formar os produtos 8-oxodGuo e dSp a partir da decomposição térmica de 1 mmol/L de endoperóxido, enquanto a formação de dlz não foi observada em nenhuma concentração de DHPNO<sub>2</sub> usada. A geração de 8-oxodGuo continuou aumentando com a adição de DHPNO<sub>2</sub> 5 mmol/L, mas este valor diminuiu um pouco com a maior concentração de endoperóxido. Já a formação de dSp foi sempre crescente com maiores concentrações de DHPNO<sub>2</sub> no sistema. Diversos outros trabalhos também investigaram a formação de produtos de oxidação da dGuo por  $^1\text{O}_2$  (DEVASAGAYAM *et al.*, 1991c; RAVANAT e CADET, 1995; MARTINEZ *et al.*, 2002; RAVANAT *et al.*, 2004; MARTINEZ *et al.*, 2007; CARNEIRO *et al.*, 2010), com resultados similares aos aqui apresentados. Carneiro *et al.* incubaram dGuo 1 mmol/L com o gerador de  $^1\text{O}_2$  NDPO<sub>2</sub> 5 mmol/L, cujo rendimento de  $^1\text{O}_2$  é de cerca de 50% (PIERLOT *et al.*, 2000), e também detectaram a presença de 8-oxodGuo e dSp, porém sem informar os valores de concentração de tais produtos. Martinez *et al.*, em 2007, utilizaram 5 mmol/L do nucleosídeo livre e 20 mmol/L de DHPNO<sub>2</sub> e também identificaram qualitativamente, através de espectrometria de massas, a formação de 8-oxodGuo e dSp. A formação de dlz só foi observada por Ravanat *et al.* (2004) e por Martinez *et al.*, em 2002, após a incubação de 8-oxodGuo 2 mmol/L e DHPNO<sub>2</sub> 10 mmol/L. Ravanat e Cadet (1995) formaram  $^1\text{O}_2$  por fotossensibilização do tipo II com azul de metileno 0,5 mmol/L incubado com dGuo 1 mmol/L, obtendo 8-oxodGuo e dSp, sendo este último produto encontrado 7 vezes mais que o primeiro. É interessante ressaltar que, no presente trabalho, a quantidade de dSp encontrada foi cerca de 100 vezes mais abundante quando comparada à de 8-oxodGuo. Já Devasagayam *et al.* quantificaram a

formação de 8-oxodGuo na concentração de 15,2  $\mu\text{mol/L}$  após a reação entre 1 mmol/L do nucleosídeo livre e 40 mmol/L de NDPO<sub>2</sub>.

A detecção e quantificação dos produtos de oxidação da dGuo a partir de diferentes concentrações de DHPNO<sub>2</sub> é relevante porque permite fazer uma correlação direta entre os produtos formados e a concentração do gerador de <sup>1</sup>O<sub>2</sub>. Os dados aqui apresentados nos permitem inferir que:

i) 1 mmol/L é a concentração de DHPNO<sub>2</sub> próxima da mínima para que os produtos oxidados de dGuo sejam detectados por HPLC-UV ou HPLC-EC;

ii) a adição de DHPNO<sub>2</sub> 5 mmol/L permite a formação tanto de dSp quanto de 8-oxodGuo, sendo a geração da primeira cerca de 62 vezes maior;

iii) a partir da concentração de 10 mmol/L, o DHPNO<sub>2</sub> ainda gera estes dois produtos, mas a formação de dSp passa a ser ainda mais favorecida, chegando a formar 160 vezes mais este produto quando em comparação com a 8-oxodGuo.

É bastante provável que este favorecimento da produção de dSp à de 8-oxodGuo esteja ocorrendo em virtude de a própria 8-oxodGuo recém-formada estar sendo imediatamente reoxidada a dSp, por uma segunda molécula de <sup>1</sup>O<sub>2</sub>. O fato de o potencial de redução da 8-oxodGuo ser bem menor do que a dGuo (+0,7 V contra +1,3 V, respectivamente; DELANEY *et al.*, 2012) certamente contribui para isso. De fato, Martinez *et al.* (2007) mostraram com uso de marcação isotópica do <sup>1</sup>O<sub>2</sub> que os níveis de 8-oxodGuo aumentam nos primeiros 10 minutos e depois diminuem consideravelmente, enquanto que os níveis de dSp sobem de maneira mais linear e estabilizam depois de cerca de 20 minutos de incubação de dGuo (5 mmol/L) com DHPNO<sub>2</sub> (20 mmol/L). A proporção dos produtos marcados mostrou que existe uma contribuição muito importante da oxidação de 8-oxodGuo, pois cerca de 50% da dSp foi formada por essa via.

A falta de resposta positiva em todas as tentativas de detecção de dlz não significa exatamente que apenas 8-oxodGuo e dSp estejam sendo formadas como resultado da oxidação da dGuo. Sabe-se que a dlz possui uma meia vida de aproximadamente 10 horas a 20°C e pH neutro, sendo depois disso hidrolisada a dOz, num processo favorecido pelo calor e pela presença de bases (CADET *et al.*, 1994). As amostras do presente estudo possuíam pH em torno de 5,5 e foram mantidas a 37° por pelo menos 2,5 horas, tempo necessário para a decomposição completa do DHPNO<sub>2</sub> (PIERLOT *et al.*, 2000). Assim sendo, é muito provável que a

dlz inicialmente formada por oxidação da dGuo tenha sido hidrolisada ao seu produto estável dOz.

A discussão do efeito da GSH sobre a oxidação de dGuo por  $^1\text{O}_2$  pode ser dividida em termos das diferentes concentrações de DHPNO<sub>2</sub> adicionadas ao sistema. A adição de GSH 0,1 e 10 mmol/L foi suficiente para oxidar a dGuo tratada com DHPNO<sub>2</sub> 0,1 mmol/L, permitindo a formação de 8-oxodGuo (figura 15). Como a geração de  $^1\text{O}_2$  a partir de 0,1 mmol/L de DHPNO<sub>2</sub> não foi suficiente para oxidar a dGuo, não tendo nenhum efeito sobre ela ou sobre a formação de seus produtos de oxidação (figura 13), estes dados podem perfeitamente ser comparados àqueles relacionados ao efeito exclusivo da GSH sobre a dGuo (figura 22). Ambos os resultados estão em conformidade entre si quanto à geração de 8-oxodGuo e poderiam ser explicados pela proposta de outros autores que afirmam que a GSH poderia ter preferência quanto à oxidação sobre a dGuo, gerando GSSG, ácidos sulfínico (GSO<sub>2</sub>H) e sulfônico (GSO<sub>3</sub>H), os quais agiriam sobre o nucleosídeo livre (DEVASAGAYAM *et al.*, 1991a/b). De fato, o potencial de redução da GSH foi calculado como sendo de -0,24 V (ROST e RAPOPORT, 1964) contra +1,3 V da dGuo (DELANEY *et al.*, 2012), o que indica que o tiol tenha preferência de oxidação sobre o nucleosídeo. Para confirmar esta hipótese, foi então realizada a incubação da GSH por DHPNO<sub>2</sub> seguida de análise em HPLC acoplado ao espectrômetro de massas para procura das relações *m/z* referentes aos produtos de oxidação GSSG, GSO<sub>2</sub>H e GSO<sub>3</sub>H. Curiosamente só foi encontrado GSSG (figura 23) na incubação de GSH e DHPNO<sub>2</sub> na razão 1:1. Para confirmar que, uma vez formados, esses produtos iriam ser detectados nessas condições, foi realizada uma incubação com excesso de oxidante, desta vez o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Assim foi então obtido, além de GSSG, GSO<sub>2</sub>H e GSO<sub>3</sub>H.

O efeito da GSH sobre a oxidação da dGuo por DHPNO<sub>2</sub> 1 mmol/L foi o de levemente aumentar o consumo de dGuo e a formação de 8-oxodGuo, além de zerar a formação de dSp (figura 16). Já nas reações com 5 e 10 mmol/L de endoperóxido gerador de  $^1\text{O}_2$ , o consumo de dGuo foi prevenido e novamente a concentração de 8-oxodGuo foi aumentada e a de dSp foi zerada, desta vez apenas com a adição de GSH nas maiores concentrações (figuras 18 e 20, respectivamente). Este comportamento repetido do tiol adicionado às diferentes concentrações de DHPNO<sub>2</sub> capazes de oxidar a dGuo (lembrando que a concentração de 0,1 mmol/L não o foi) pode ser explicado pelo fato de a GSH estar protegendo a oxidação de 8-oxodGuo a

dSp, fazendo com que aquela se acumule. Este resultado acrescenta uma importante contribuição ao estudo da ação desses compostos, pois pela atividade antioxidante da GSH sempre se acreditou que a mesma agiria prevenindo a oxidação da dGuo. De fato, parece também haver uma tendência de a GSH prevenir, em menor extensão, a oxidação do nucleosídeo livre, haja vista que nas concentrações de 5 e 10 mmol/L de endoperóxido o consumo de dGuo foi prevenido pela adição deste tiol. Os valores dos potenciais de redução das espécies envolvidas podem estar intimamente ligados à hipótese de que a GSH previne a oxidação de 8-oxodGuo em detrimento da oxidação de dGuo. Conforme mencionado anteriormente, o potencial de redução da 8-oxodGuo é o menor entre as espécies em questão (ROST e RAPOPORT, 1964; DELANEY *et al.*, 2012), o que infere que ela oxide mais rapidamente que a dGuo. O que pode estar ocorrendo é que a dGuo primeiro se oxide a 8-oxodGuo e depois esta se oxide a dSp numa velocidade muito maior. Por conta desta velocidade, a GSH que estaria num primeiro momento prevenindo a oxidação da dGuo (o que explica este comportamento quando da reação entre dGuo, DHPNO<sub>2</sub> 5 mmol/L e GSH também 5 mmol/L e da incubação de dGuo, DHPNO<sub>2</sub> 10 mmol/L e GSH 1, 5 ou 10mmol/L), passaria a prevenir a oxidação que ocorre com mais abundância, ou seja, a de 8-oxodGuo a dSp.

Outro fator que não pode deixar de ser considerado é o de a reação entre DHPNO<sub>2</sub> e GSH gerar GSSG (figura 23). Somado a isso está também a estimativa de que todas as preparações padrão de GSH tenham em média 0,5-1% de GSSG em seu conteúdo (ROST e RAPOPORT, 1964). Dessa forma, uma parte dos efeitos observados da incubação de GSH, dGuo e o endoperóxido podem ter uma contribuição da GSSG, por essa razão é que também foram feitas as incubações variando sua concentração no sistema.

O resultado da adição de GSSG diferiu do de GSH e também pode ser mais bem compreendido pela análise em separado de cada concentração de DHPNO<sub>2</sub> em solução. A primeira delas, 0,1 mmol/L, a qual já não tinha sido suficiente para oxidar a dGuo (figura 13), não sofreu nenhuma alteração após a adição de GSSG. Já a segunda, 1 mmol/L de DHPNO<sub>2</sub>, não teve efeito sobre a dGuo e a 8-oxodGuo, mas teve sua concentração de dSp aumentada com GSSG 0,1 e 1 mmol/L e zerada com GSSG 5 e 10 mmol/L (figura 17). O sistema de dGuo e DHPNO<sub>2</sub> 5 mmol/L (figura 19) registrou um aumento de 8-oxodGuo apenas na adição de GSSG 5 mmol/L. Quanto aos níveis de dSp, os mesmos aumentaram com 0,1 e 1 mmol/L de GSSG,

mas diminuíram com 5 e 10 mmol/L de GSSG, chegando a nível zero com a adição da maior concentração (figura 19). O efeito da glutathiona dissulfeto sobre a reação entre dGuo e DHPNO<sub>2</sub> 10 mmol/L foi nulo sobre a formação de 8-oxodGuo e gerou aumento de dSp com a adição de GSSG 0,1 e 1 mmol/L (figura 21). Não foi possível observar a implicação da GSSG sobre a dGuo devido a um pico que interferiu na correta quantificação deste nucleosídeo nessas amostras.

Alguns pontos devem ser considerados para uma melhor interpretação desses resultados:

i) O resultado referente à oxidação da dGuo com DHPNO<sub>2</sub> 5 mmol/L na presença de GSSG mostrou que ela é capaz de proteger a dGuo da oxidação diminuindo a formação de 8-oxodGuo e dSp na maior concentração.

ii) Já sobre a dSp, a GSSG sempre diminuiu suas concentrações, exceto nas reações entre dGuo, DHPNO<sub>2</sub> 1, 5 ou 10 mmol/L e GSSG 0,1 ou 1mmol/L.

iii) O pico que interferiu na quantificação de dGuo na reação com DHPNO<sub>2</sub> 10 mmol/L fica na região de identificação de dlz e de seu produto estável dOz.

Assim sendo, pode-se inferir que existe uma contribuição da GSSG nos efeitos observados para a incubação com GSH. Uma possibilidade é que a GSSG esteja sendo reduzida a GSH em alguma etapa do mecanismo e então essa seria a responsável pelos efeitos observados nas menores concentrações da forma dissulfeto. A quantificação de GSH e GSSG ao final da reação poderia contribuir para uma melhor compreensão do que está se processando no sistema. De qualquer forma, é importante ressaltar que se tratam de dados inéditos a respeito da interação entre dGuo, GSSG e <sup>1</sup>O<sub>2</sub>.

Considerando que o nosso organismo possui GSH e dGuo disponíveis e que o <sup>1</sup>O<sub>2</sub> pode ser facilmente gerado em situações específicas, como no *burst* respiratório decorrente de estados inflamatórios, ou através da própria transferência de energia ultravioleta solar para o O<sub>2</sub>, a reação entre estas três moléculas é bastante provável e suas implicações biológicas devem ser analisadas. É de especial importância a observação de tais efeitos pela oxidação com <sup>1</sup>O<sub>2</sub> haja vista que as demais ROS têm sido mais extensivamente estudadas. Os resultados aqui apresentados indicam que o efeito protetor da GSH sobre a oxidação de 8-oxodGuo a dSp por <sup>1</sup>O<sub>2</sub> podem ter consequências biológicas graves, pois o acúmulo de 8-oxodGuo aumenta a probabilidade deste produto de oxidação ser inserido pela DNA polimerase no lugar da dGuo. Desta forma, o papel da GSH, o qual geralmente é

tido como benéfico na maioria dos processos redox, neste caso apenas agravaria o efeito nocivo do  $^1\text{O}_2$ .

## 7. CONCLUSÕES

O presente trabalho teve como objetivo principal investigar o papel da GSH e da GSSG, na reação específica de oxidação da dGuo por  $^1\text{O}_2$  gerado a partir de diferentes concentrações do endoperóxido DHPNO<sub>2</sub>. Para tanto, primeiramente foi investigada a reação entre dGuo e DHPNO<sub>2</sub>, a qual se mostrou capaz de formar os produtos oxidados dSp e, em menor quantidade, 8-oxodGuo. A concentração mínima de endoperóxido para que isso pudesse acontecer foi de 1 mmol/L. O produto dlz não pôde ser identificado, muito provavelmente pelo fato de as condições de reação o direcionarem para sua forma hidrolisada mais estável dOz.

O efeito da GSH sobre a dGuo, sem adição de  $^1\text{O}_2$  ou com a adição de quantidades tão pequenas desta ROS que não permitiu a oxidação da dGuo (caso da incubação com DHPNO<sub>2</sub> 0,1 mmol/L) também foi analisado. O resultado foi oxidação de dGuo a 8-oxodGuo, mas não a dSp. Embora Devasagayam *et al.* tenham inferido que tal efeito fosse na verdade uma oxidação da GSH a GSO<sub>2</sub>H e GSO<sub>3</sub>H anterior à oxidação da dGuo, a reação entre DHPNO<sub>2</sub> e GSH na razão 1:1 não chegou a formar tais produtos, e sim apenas GSSG. Portanto, este trabalho não traz evidências de que os ácidos sulfínico e sulfônico estejam sendo formados, mas apenas alerta para o fato de que concentrações de GSSG sempre devem ter seu efeito considerado quando da incubação entre dGuo e DHPNO<sub>2</sub>.

A GSH adicionada à incubação de dGuo por DHPNO<sub>2</sub> mostrou proteger a oxidação da 8-oxodGuo a dSp, resultado que explica o acúmulo de 8-oxodGuo observado por outros autores que testaram a mesma incubação (DEVASAGAYAM *et al.*, 1991c). Já a substituição de GSH por GSSG no mesmo sistema revelou que a forma dissulfeto não é capaz de proteger a oxidação da 8-oxodGuo a dSp do mesmo modo como faz a GSH. Inclusive, os dados aqui apresentados apontam para um provável favorecimento da oxidação de dGuo à dOz ou outro produto não investigado, o qual permanece com a necessidade de ser testado experimentalmente.

É de extrema importância ressaltar que este trabalho mostra pela primeira vez as quantificações do efeito da GSSG sobre os produtos de oxidação da dGuo. Certamente os dados aqui apresentados direcionam a novas perguntas que em conjunto com os resultados aqui obtidos poderão futuramente contribuir para um esclarecimento da ação desses compostos no meio biológico. Por enquanto,

podemos afirmar que nossos resultados indicam que a GSH amplifica os efeitos danosos da interação entre dGuo e  $^1\text{O}_2$  ao provocar o acúmulo de 8-oxodGuo, produto altamente mutagênico que pode ser inserido pela DNA polimerase e provocar uma transversão G  $\rightarrow$  T, ou seja, de guanina para timina.

## REFERÊNCIAS

AKASAKA, T., KAKO, M., SONOBE, H. e ANDO, W. Reaction of singlet oxygen with thiirane: a peroxysulfenic acid intermediate as a new oxidizing species. *Journal of the American Chemical Society* 110, 2 (1988), 494-496.

BALD, E., CHWATKO, G., GLOWACKI, R. e KUSMIEREK, K. Analysis of plasma thiols by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *Journal of Chromatography* 1032, 1-2 (2004), 109-115.

BERRA, C. M., MENCK, C. F. M., MARTINEZ, G. R., OLIVEIRA, C. S. D., BAPTISTA, M. D. S. e DI MASCIO, P. Plasmid DNA damage induced by singlet molecular oxygen released from the naphthalene endoperoxide DHPNO<sub>2</sub> and photoactivated methylene blue. *Química Nova* 33 (2010), 279-283.

BLOODWORTH, A. J. e EGDELTE, H. J. Face selectivity in the reduction with dideuteriodi-imide of endoperoxides derived from the singlet oxygenation of cycloalka-1,3-dienes. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*, 12 (1984), 2069-2072.

BOITEUX, S., GAJEWSKI, E., LAVAL, J. e DIZDAROGLU, M. Substrate specificity of the Escherichia coli Fpg protein formamidopyrimidine-DNA glycosylase: excision of purine lesions in DNA produced by ionizing radiation or photosensitization. *Biochemistry* 31, 1 (1992), 106-110.

BUCHKO, G. W., WAGNER, J. R., CADET, J., RAOUL, S. e WEINFELD, M. Methylene blue-mediated photooxidation of 7,8-dihydro-8-oxo-2'-deoxyguanosine. *Biochim. Biophys. Acta-Gene Struct. Expression* 1263, 1 (1995), 17-24.

CADET, M. BERGER, G.W. BUCHKO, P. C., JOSH, S. RAOUL e RAVANAT, J.-L. 2,2-Diamino-4-[(3,5-di-O-acetyl-2-deoxy-β-d-erythro-pentofuranosyl)amino]-5-(2H)-oxazolone: A novel and predominant radical oxidation product of 3\_,5\_-di-O-acetyl-2\_deoxyguanosine. *Journal of American Chemical Society* 116 (1994), 7403-7404.

CADET, J., DOUKI, T. e RAVANAT, J.-L. Oxidatively generated base damage to cellular DNA. *Free Radical Biology and Medicine* 49, 1 (2010), 9-21.

CARNEIRO, C. D., AMORIM, J. C., CADENA, S. M. S. C., NOLETO, G. R., DI MASCIO, P., ROCHA, M. E. M. e MARTINEZ, G. R. Effect of flavonoids on 2'-deoxyguanosine e DNA oxidation caused by singlet molecular oxygen. *Food e Chemical Toxicology* 48 (2010), 2380-2387.

CLAIBORNE, A., YEH, J. I., MALLETT, T. C., LUBA, J., CRANE, E. J., CHARRIER, V. e PARSONAGE, D. Protein-Sulfenic Acids: Diverse Roles for an Unlikely Player in Enzyme Catalysis e Redox Regulation. *Biochemistry* 38, 47 (1999), 15407-15416.

CNUBBEN, N. H. P., RIETJENS, I. M. C. M., WORTELBOER, H., VAN ZEEN, J. e VAN BLADEREN, P. J. The interplay of glutathione-related processes in antioxidant defense. *Environmental Toxicology e Pharmacology* 10, 4 (2001), 141-152.

COOPER, C. E., PATEL, R. P., BROOKES, P. S. e DARLEY-USMAR, V. M. Nanotransducers in cellular redox signaling: modification of thiols by reactive oxygen e nitrogen species. *Trends in Biochemical Sciences* 27, 10 (2002), 489-492.

DAVIES, M. J. Reactive species formed on proteins exposed to singlet oxygen. *Photochemical & Photobiological Sciences* 3, 1 (2004), 17-25.

DELANEY, S., JAREM, D. A., VOLLE, C. B. e YENNIE, C. J. Chemical and Biological Consequences of Oxidatively Damaged Guanine in DNA. *Free Radical Research* (2012), 1-49. In press.

DEVASAGAYAM, T. P. A., SUNDQUIST, A. R., DI MASCIO, P., KAISER, S. e SIES, H. Activity of thiols as singlet molecular oxygen quenchers. *Journal of Photochemistry e Photobiology B: Biology* 9, 1 (1991a), 105-116.

DEVASAGAYAM, T. P. A., DI MASCIO, P., KAISER, S. e SIES, H. Singlet oxygen induced single-strand breaks in plasmid pBR322 DNA: the enhancing effect of thiols. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure e Expression* 1088, 3 (1991b), 409-412.

DEVASAGAYAM, T. P. A., STEENKEN, S., OBENDORF, M. S. W., SCHULZ, W. A. e SIES, H. Formation of 8-hydroxy(deoxy)guanosine e generation of strand breaks at guanine residues in DNA by singlet oxygen. *Biochemistry* 30, 25 (1991c), 6283-6289.

DI MASCIO, P., WEFERS, H., DO-THI, H.-P., LAFLEUR, M. V. M. e SIES, H. Singlet molecular oxygen causes loss of biological activity in plasmid e bacteriophage DNA e induces single-strand breaks. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure e Expression* 1007, 2 (1989), 151-157.

DI MASCIO, P., BECHARA, E. J. H., MEDEIROS, M. H. G., BRIVIBA, K. e SIES, H. Singlet molecular oxygen production in the reaction of peroxynitrite with hydrogen peroxide. *FEBS Letters* 355, 3 (1994), 287-289.

EBLIN, K. E., BOWEN, M. E., CROMEY, D. W., BREDFELDT, T. G., MASH, E. A., LAU, S. S. e GEOLFI, A. J. Arsenite e monomethylarsonous acid generate oxidative stress response in human bladder cell culture. *Toxicology e Applied Pharmacology* 217, 1 (2006), 7-14.

FOLKES, L. K., CEEIAS, L. P. e WARDMAN, P. Kinetics e Mechanisms of Hypochlorous Acid Reactions. *Archives of Biochemistry e Biophysics* 323, 1 (1995), 120-126.

FOOTE, C. S. e DENNY, R. W. Chemistry of singlet oxygen. XII. Electronic effects on rate e products of the reaction with olefins. *Journal of the American Chemical Society* 93, 20 (1971), 5162-5167.

FOOTE, C. S., THOMAS, M. e CHING, T. Y. Photooxidation of phenols. *Journal of Photochemistry* 5, 3 (1976), 172-172.

FOOTE, C. S. Definition of type I e type II photosensitized oxidation *Photochemistry e Photobiology* 54, 5 (1991), 659-659.

FORMAN, H. J., FUKUTO, J. M. e TORRES, M. Redox signaling: thiol chemistry defines which reactive oxygen e nitrogen species can act as second messengers. *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 287, 2 (2004), C246-C256.

GRIFFITHS, S. W., KING, J. e COONEY, C. L. The Reactivity e Oxidation Pathway of Cysteine 232 in Recombinant Human  $\alpha_1$ -Antitrypsin. *Journal of Biological Chemistry* 277, 28 (2002), 25486-25492.

HAYES, J. D. e PULFORD, D. J. The Glutathione S-Transferase Supergene Family: Regulation of GST e the Contribution of the Isoenzymes to Cancer Chemoprotection e Drug Resistance Part I. *Critical Reviews in Biochemistry e Molecular Biology* 30, 6 (1995), 445-520.

HAYES, J. D. e MCLELLAN, L. I. Glutathione e glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defence against oxidative stress. *Free Radical Research* 31, 4 (1999), 273-300.

HELD, A. M., HALKO, D. J. e HURST, J. K. Mechanism of chlorine oxidation of hydrogen peroxide. *American Chemical Society* 100 (1978), 5732-5741.

HERMES-LIMA, M. *Oxygen in Biology e Biochemistry: Role of Free Radicals* (2004).

HUBER, P. C., ALMEIDA, W. P. e FÁTIMA, Â. D. Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. *Química Nova* 31 (2008), 1170-1179.

IDE, H. DNA substrates containing defined oxidative base lesions e their application to study substrate specificities of base excision repair enzymes. *Progress in Nucleic Acid Research e Molecular Biology* Volume 68 (2001), 207-221.

KETTENHOFEN, N. J. e WOOD, M. J. Formation, Reactivity, e Detection of Protein Sulfenic Acids. *Chemical Research in Toxicology* 23, 11 (2010), 1633-1646.

LAFLEUR, M. V. M., HOORWEG, J. J., JOENJE, H., WESTMIJZE, E. J. e RETÈL, J. The Ambivalent Role of Glutathione in the Protection of Dna Against Singlet Oxygen. *Free Radical Research* 21, 1 (1994), 9-17.

MARTINEZ, G. R., MEDEIROS, M. H. G., RAVANAT, J. L., CADET, J. e MASCIO, P. D. [<sup>18</sup>O]-Labeled Singlet Oxygen as a Tool for Mechanistic Studies of 8-Oxo-7,8-Dihydroguanine Oxidative Damage: Detection of Spiroiminodihydantoin, Imidazolone e Oxazolone Derivatives. *Biological Chemistry* 383, 3-4 (2002), 607-617.

MARTINEZ, G. R., RAVANAT, J.-L., CADET, J., DE MEDEIROS, M. H. G. e DI MASCIO, P. Spiroiminodihydantoin nucleoside formation from 2'-deoxyguanosine oxidation by [<sup>18</sup>O-labeled] singlet molecular oxygen in aqueous solution. *Journal of Mass Spectrometry* 42, 10 (2007), 1326-1332.

MARTINOVICH, G., MARTINOVICH, I., CHERENKEVICH, S. e SAUER, H. Redox Buffer Capacity of the Cell: Theoretical e Experimental Approach. *Cell Biochemistry e Biophysics* 58, 2 (2010), 75-83.

MATSUYAMA, Y., TERAWAKI, H., TERADA, T. e ERA, S. Albumin thiol oxidation e serum protein carbonyl formation are progressively enhanced with advancing stages of chronic kidney disease. *Clinical e Experimental Nephrology* 13, 4 (2009), 308-315.

MEN, L. e WANG, Y. Further studies on the fragmentation of protonated ions of peptides containing aspartic acid, glutamic acid, cysteine sulfinic acid, e cysteine sulfonic acid. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 19, 1 (2005), 23-30.

NELSON, D. L. e COX, M. *Lehninger Princípios de Bioquímica*, Sarvier, São Paulo, (2007).

NIEUWINT , A., AUBRY, J., ARWERT, F., KORTBEEK, H., HERZBERG, S. e JOENJE, H. Inability of chemically generated singlet oxygen to break the DNA backbone. *Free Radical Research Communications* 1, 1 (1985), 1-9.

NILES, J. C., WISHNOK, J. S. e TANNENBAUM, S. R. Spiroiminodihydantoin Is the Major Product of the 8-Oxo-7,8-dihydroguanosine Reaction with Peroxynitrite in the Presence of Thiols e Guanosine Photooxidation by Methylene Blue. *Organic Letters* 3, 7 (2001), 963-966.

PIERLOT, C., AUBRY, J.-M., BRIVIBA, K., SIES, H., MASCIO, P. D. e LESTER PACKER, H. S. [1] *Naphthalene endoperoxides as generators of singlet oxygen in biological media*, Academic Press, 2000.

PRYOR, W. A., CHURCH, D. F., GOVINDAN, C. K. e CRANK, G. Oxidation of thiols by nitric oxide e nitrogen dioxide: synthetic utility e toxicological implications. *The Journal of Organic Chemistry* 47, 1 (1982), 156-159.

QUIJANO, C., ALVAREZ, B., GATTI, R. M., AUGUSTO, O., RADI, R. Pathways of peroxynitrite oxidation of thiol groups. *Biochemical Journal* 322 (1997), 167-173.

RAVANAT, J.-L. e CADET, J. Reaction of Singlet Oxygen with 2'-Deoxyguanosine e DNA. Isolation e Characterization of the Main Oxidation Products. *Chemical Research in Toxicology* 8, 3 (1995), 379-388.

RAVANAT, J.-L., DI MASCIO, P., MARTINEZ, G. R., MEDEIROS, M. H. G. e CADET, J. Singlet Oxygen Induces Oxidation of Cellular DNA. *Journal of Biological Chemistry* 275, 51 (2001), 40601-40604.

RAVANAT, J.-L., MARTINEZ, G. R., MEDEIROS, M. H. G., DI MASCIO, P. e E CADET, J. Mechanistic aspects of the oxidation of DNA constituents mediated by singlet molecular oxygen. *Archives of Biochemistry e Biophysics* 426 (2004), 23-30.

RONSEIN, G. E., MIYAMOTO, S., BECHARA, E., DI MASCIO, P. e MARTINEZ, G. R. Oxidação de proteínas por oxigênio singlete: mecanismos de dano, estratégias para detecção e implicações biológicas. *Química Nova* 29 (2006), 563-568.

ROST, J. e RAPOPORT, S. Reduction-potential of Glutathione. *Nature* 201, 4915 (1964), 185-185.

SHEU, C. e FOOTE, C. S. Endoperoxide formation in a guanosine derivative. *Journal of the American Chemical Society* 115, 22 (1993), 10446-10447.

SHEU, C., e FOOTE, C. S. Photosensitized oxygenation of a 7,8-dihydro-8-oxoguanosine derivative. Formation of dioxetane e hydroperoxide intermediates. *Journal of American Chemical Society* 117 (1995), 474-477.

SHIMIZU, M., GRUZ, P., KAMIYA, H., MASUTANI, C., XU, Y., USUI, Y., SUGIYAMA, H., HARASHIMA, H., HANAOKA, F. e NOHMI, T. Efficient e erroneous incorporation of oxidized DNA precursors by human DNA polymerase  $\eta$ . *Biochemistry* 46 (2007), 5515-5522.

STAMLER, J. S., e HAUSLADEN, A. Oxidative modifications in nitrosative stress. *Nature Structural Biology* 5, 4 (1998), 267-271.

SUZUKI, T., YAMAMOTO, K., HARASHIMA, H. e KAMIYA, H. Base excision repair system suppresses mutagenesis caused by 8-hydroxy-dGTP in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Symposium Series* 51 (2007), 51-52.

VIALAS, C., PRATVIEL, G. V., CLAPAROLS, C. e MEUNIER, B. Efficient oxidation of 2'-deoxyguanosine by Mn-TMPyP/KHSO<sub>5</sub> to imidazolone dlz without formation of 8-Oxo-dG. *Journal of the American Chemical Society* 120, 45 (1998), 11548-11553.

WANG, H. P., QIAN, S. Y., SCHAFFER, F. Q., DOMANN, F. E., OBERLEY, L. W. e BUETTNER, G. R. Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase protects against singlet oxygen-induced cell damage of photodynamic therapy. *Free Radical Biology e Medicine* 30, 8 (2001), 825-835.

WEFERS, H. e SIES, H. Oxidation of glutathione by the superoxide radical to the disulfide e the sulfonate yielding singlet oxygen. *European Journal of Biochemistry* 137, 1-2 (1983), 29-36.

WILD, A. C. e MULCAHY, R. T. Regulation of gamma-glutamylcysteine synthetase subunit gene expression: Insights into transcriptional control of antioxidant defenses. *Free Radical Research* 32, 4 (2000), 281-301.

WINTERBOURN, C. C. e HAMPTON, M. B. Thiol chemistry e specificity in redox signaling. *Free Radical Biology e Medicine* 45, 5 (2008), 549-561.

WOOD, M. J., STORZ, G. e TJERA, N. Structural basis for redox regulation of Yap1 transcription factor localization. *Nature* 430, 7002 (2004), 917-921.

