

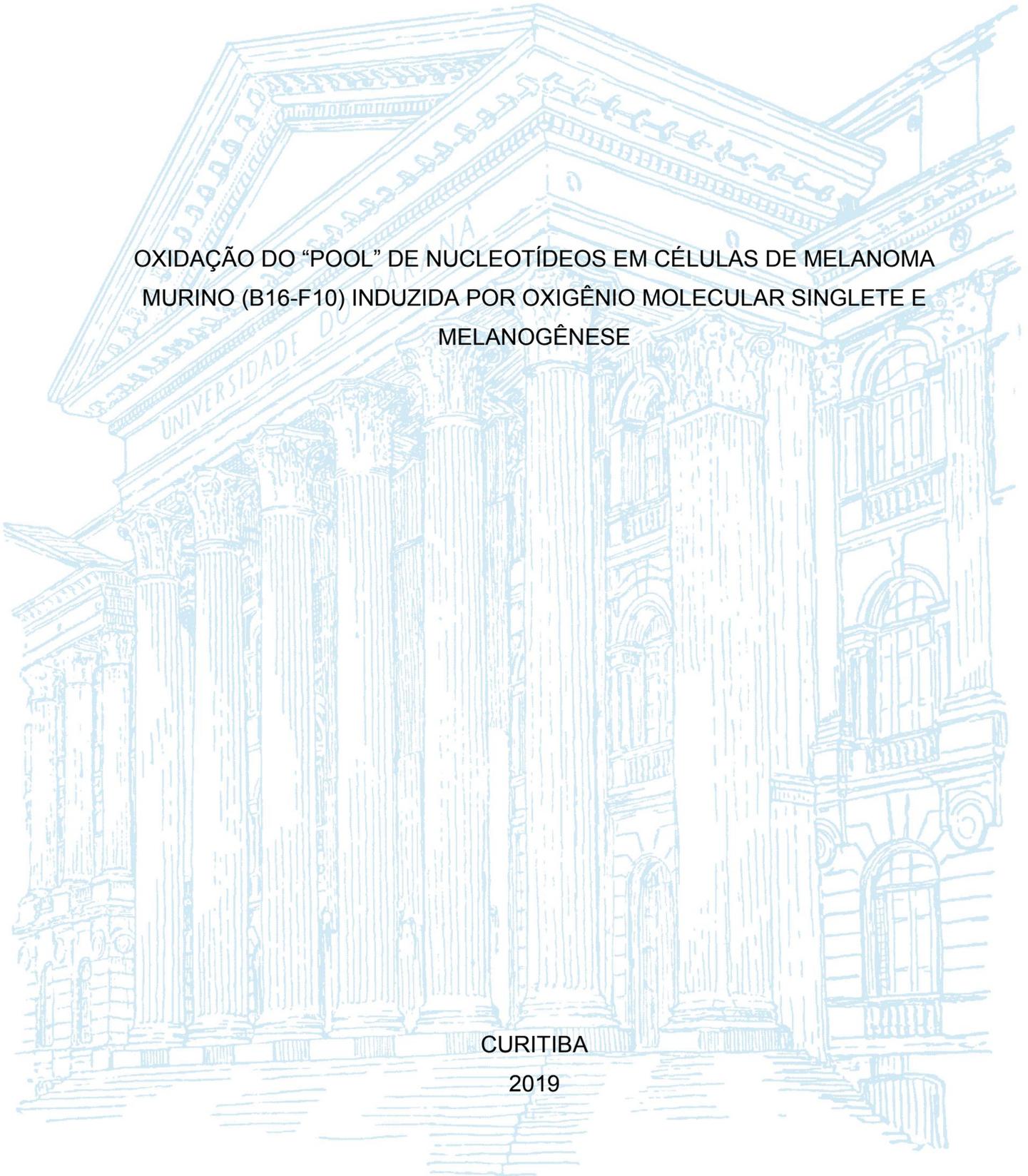
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JULIANA DE CARVALHO SILVA

OXIDAÇÃO DO “POOL” DE NUCLEOTÍDEOS EM CÉLULAS DE MELANOMA
MURINO (B16-F10) INDUZIDA POR OXIGÊNIO MOLECULAR SINGLETE E
MELANOGÊNESE

CURITIBA

2019



JULIANA DE CARVALHO SILVA

OXIDAÇÃO DO “POOL” DE NUCLEOTÍDEOS EM CÉLULAS DE MELANOMA
MURINO (B16-F10) INDUZIDA POR OXIGÊNIO MOLECULAR SINGLETE E
MELANOGÊNESE

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências - Bioquímica.

Orientadora: Profa. Dra. Glaucia Regina Martinez
Coorientadora: Dra. Elizabeth Sousa da Cunha

CURITIBA

2019

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas.
(Giana Mara Seniski Silva – CRB/9 1406)

Silva, Juliana de Carvalho

Oxidação do “pool” de nucleotídeos em células de melanoma murino (B16-F10) induzida por oxigênio molecular singlete e melanogênese. / Juliana de Carvalho Silva. – Curitiba, 2019.

72 p.: il.

Orientadora: Glaucia Regina Martinez

Coorientadora: Elizabeth Sousa da Cunha

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica.

1. Melanoma 2. Melanina 3. Nucleotídeos 3. Oxigênio singleto I. Título II. Martinez, Glaucia Regina III. Cunha, Elizabeth Sousa da IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências- Bioquímica.

CDD (22. ed.) 614.5999477



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS
(BIOQUÍMICA) - 40001016003P2

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS (BIOQUÍMICA) da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **JULIANA DE CARVALHO SILVA** intitulada: **OXIDAÇÃO DO "POOL" DE NUCLEOTÍDEOS EM CÉLULAS DE MELANOMA MURINO (B16-F10) INDUZIDA POR OXIGÊNIO MOLECULAR SINGLETE E MELANOGÊNESE**, sob orientação da Profa. Dra. **GLAUCIA REGINA MARTINEZ**, que após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua **APROVAÇÃO** no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 27 de Setembro de 2019.



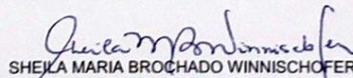
GLAUCIA REGINA MARTINEZ

Presidente da Banca Examinadora (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)



LIA SUMIE NAKAO

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)



SHEIKHA MARIA BROCHADO WINNISCHER

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus, pela vida e por me conceder saúde e força para superar as dificuldades.

Aos meus pais, Ivana e Sergio, meus maiores exemplos, e à minha irmã Caroline, que sempre esteve ao meu lado, pelo amor, apoio e incentivo incondicional. Agradeço também a toda a minha família.

Aos meus amigos Alana, Alysson e Julia, que me acompanham desde a graduação, pela amizade, apoio, ajuda e incentivo.

Ao meu namorado, Bruno, pelo apoio, carinho e por aguentar minhas reclamações na fase final do mestrado.

À minha orientadora, professora Dra. Glaucia Regina Martinez, pela ótima orientação, apoio, dedicação, confiança e esforço para a realização deste trabalho.

À minha coorientadora e amiga, Dra. Elizabeth Sousa da Cunha, pela ótima coorientação, amizade, conselhos, ensinamentos, ajuda na execução dos experimentos, incentivo e apoio incondicional.

À professora Dra. Sheila Winnischofer, pela correção do projeto e do relatório, e pela ajuda com as dúvidas de PCR.

À professora Dra. Ana Paula de Melo Loureiro e seu aluno de mestrado Matheus Relvas, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, pelo processamento das amostras e análises no HPLC-MS/MS.

Aos professores Marisa Helena Gennari de Medeiros e Paolo Di Mascio do Instituto de Química da USP por permitirem o uso do equipamento HPLC-MS/MS.

Às professoras do Grupo de Oxidações Biológicas, pelo apoio e contribuição.

Às amigas do laboratório, Dainesy Martins, pela amizade, apoio e ajuda na execução dos experimentos, e Hulyana Brum, pela amizade, apoio, ajuda e ensinamentos no HPLC.

À todos os colegas do laboratório, que se tornaram amigos e contribuíram para que esses anos fossem mais divertidos, as semanas mais doces, com o dia do bolo, e a rotina mais fácil pela companhia de todos. Agradeço imensamente pela amizade, apoio e incentivo.

Às técnicas do laboratório, Jainy e Elizabete, pelo apoio, contribuição e amizade.

À pós-graduação em Ciências - Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, pela oportunidade de realizar o mestrado.

À CAPES, CNPq e Fundação Araucária pelo suporte financeiro.

Por fim, agradeço a todos que direta ou indiretamente fizeram parte deste trabalho, o meu muito obrigada.

Quero pedir desculpa a todas as mulheres
Que descrevi como bonitas
Antes de dizer inteligentes ou corajosas
Fico triste por ter falado como se
Algo tão simples como aquilo que nasceu com você
Fosse seu maior orgulho quando seu
Espírito já despedaçou montanhas
De agora em diante vou dizer coisas como
Você é forte ou você é incrível
Não porque eu não te ache bonita
Mas porque você é muito mais do que isso.
(RUPI KAUR, 2017, p. 179)

RESUMO

O melanoma é o tipo de câncer de pele mais agressivo que tem origem nos melanócitos, as células produtoras do pigmento melanina. A radiação UV tem sido considerada um importante agente etiológico da doença. Neste contexto, a melanina desempenha um papel fotoprotetor, devido sua capacidade de absorver a luz UVB. Entretanto, ela também pode atuar como fotossensibilizador sob radiação UVA e luz visível, contribuindo para a geração de espécies reativas de oxigênio, principalmente oxigênio molecular singlete ($^1\text{O}_2$), que é formado por transferência de energia de excitação para o O_2 no estado fundamental triplete, e é a forma mais reativa do oxigênio molecular capaz de oxidar biomoléculas. No DNA, $^1\text{O}_2$ reage exclusivamente com a base guanina, formando 8-oxoguanina que pode parear com as bases citosina e adenina, e então a transversão G•C para T•A é induzida. A guanina também pode ser oxidada no *pool* de desoxinucleotídeos celular formando 8-oxo-dGTP, um potente substrato mutagênico para a síntese de DNA, e neste caso, ambas as transversões seriam induzidas: A•T para C•G e G•C para T•A. A enzima 8-oxo-dGTPase, produto do gene humano *MTH1*, impede a incorporação de 8-oxo-dGTP no DNA. 8-oxo-dGTPase hidrolisa 8-oxo-dGTP a 8-oxo-dGMP, que não pode ser refosforilada, e pela ação da 8-oxo-dGMPase é ainda degradada a 8-oxo-dG, que é excretada para o meio extracelular. O objetivo deste estudo foi avaliar a oxidação de dGTP em células de melanoma murino (B16-F10), causada por $^1\text{O}_2$ e/ou melanogênese estimulada. Para gerar $^1\text{O}_2$ pelo processo de fotossensibilização do tipo II, as células B16-F10 foram previamente incubadas com 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Rosa Bengala Acetato (RBAC) e posteriormente irradiadas com luz visível verde ($526 \pm 20 \text{ nm}$), e o estímulo da melanogênese foi realizado utilizando meio de cultura RPMI 1640 suplementado com 0,4 mM de L-tirosina e 10 mM de NH_4Cl . As células foram submetidas a condições de claro (irradiadas) e escuro, e as amostras coletadas em 0h e 18h. Então, foram realizadas análises de determinação intra e extracelular de 8-oxo-dG por HPLC-MS/MS, bem como atividade e expressão das enzimas de sanitização, por HPLC-PDA e RT-qPCR, respectivamente. Foi demonstrado que os níveis de 8-oxo-dG excretados das células foram elevados 18 h após a realização dos tratamentos, em comparação ao tempo de 0 h e à quantidade de 8-oxo-dG intracelular. A única alteração observada se refere à ação do RBAC nas células sem estímulo da melanogênese, nas quais promoveu uma retenção da 8-oxo-dG no meio intracelular. Também foi demonstrado que a atividade das enzimas 8-oxo-dGTPase e 8-oxo-dGMPase não sofreram modulação significativamente estatística, bem como a expressão do gene *MTH1*. Sendo assim, $^1\text{O}_2$ e o estímulo da produção de melanina não promoveram alterações no sistema de sanitização e por consequência não se observaram alterações correspondentes nos níveis de produtos de oxidação do *pool* de nucleotídeos secretados pelas células.

Palavras-chave: *Pool* de nucleotídeos. Espécies Reativas de Oxigênio. Melanina. Melanoma. Oxigênio Molecular Singlete.

ABSTRACT

Melanoma is the most aggressive type of skin cancer that originates in melanocytes, the melanin pigment-producing cells. UV radiation has been considered an important etiological agent of the disease. In this context, melanin plays a photoprotective role, due to its ability to absorb UVB light. However, it can also act as photosensitizer under UVA radiation and visible light, contributing to the generation of reactive oxygen species, mainly singlet molecular oxygen ($^1\text{O}_2$) that is formed by the transference of excitation energy to the O_2 in the triplet ground state, and it is the most reactive form of O_2 , capable of oxidizing biomolecules. In DNA, the $^1\text{O}_2$ reacts exclusively with the guanine base, forming 8-oxoguanine that can pair with cytosine and adenine bases, generating G•C to T•A transversion. Guanine can also be oxidized in the cellular deoxynucleotide pool forming 8-oxo-dGTP, a potent mutagenic substrate for DNA synthesis and in this case both transversions would be induced: A•T for C•G and G•C for T•A. The 8-oxodGTPase enzyme, a product of the human *MTH1* gene, prevents the incorporation of 8-oxodGTP into the DNA. The 8-oxodGTPase hydrolyzes 8-oxodGTP to 8-oxodGMP, which cannot be rephosphorylated, and by the action of the 8-oxodGMPase it is further degraded to 8-oxodG and excreted to the extracellular medium. The objective of this study was to evaluate the deoxynucleotides pool oxidation in murine melanoma cells (B16-F10) caused by $^1\text{O}_2$ and/or stimulated melanogenesis. To generate $^1\text{O}_2$ by the type II photosensitization process, B16-F10 cells were previously incubated with 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Rose Bengal Acetate (RBAc) and posteriorly irradiated with green visible light (526 ± 20 nm), and the melanogenesis stimulation was performed using RPMI 1640 culture medium supplemented with 0.4 mM L-tyrosine and 10 mM NH_4Cl . The cells were submitted to light (irradiated) and dark conditions, and the samples collected at 0h and 18h. Then, intra and extracellular determination analyzes of 8-oxo-dG were performed by HPLC-MS/MS, as well as activity and expression of sanitizing enzymes by HPLC-PDA and RT-qPCR, respectively. The excreted 8-oxo-dG levels of the cells were shown to be elevated 18 h after testing, compared to the time of 0 h and the amount of intracellular 8-oxo-dG. A single observed change refers to the action of RBAc in cells without melanogenesis stimulation, in which it promotes a retention of 8-oxo-dG in the intracellular environment. It has also been shown that the activity of 8-oxo-dGTPase and 8-oxo-dGMPase enzymes did not undergo significantly statistical modulation, as well as an expression of the *MTH1* gene. Thus, $^1\text{O}_2$ and the stimulation of melanin production do not promote alterations in the sanitization system and consequently do not corresponding changes were observed in the levels of oxidation products of the nucleotide pool secreted by the cells.

Keywords: Nucleotide Pool. Reactive Oxygen Species. Melanin. Melanoma. Singlet Molecular Oxygen.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – VIAS DE REDUÇÃO DO OXIGÊNIO À ÁGUA, LEVANDO À FORMAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO INTERMEDIÁRIAS	24
FIGURA 2 – DISTRIBUIÇÃO ELETRÔNICA DO OXIGÊNIO MOLECULAR NOS ESTADOS FUNDAMENTAL E SINGLETE	25
FIGURA 3 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO PROCESSO DE FOTOSSENSIBILIZAÇÃO.....	27
FIGURA 4 – ESTRUTURA QUÍMICA DO ROSA BENGALA DIACETATO	29
FIGURA 5 – MUTAÇÕES INDUZIDAS NO DNA PELA FORMAÇÃO DE 8-OXOGUANINA E INCORPORAÇÃO DE 8-oxo-dGTP	30
FIGURA 6 – AÇÃO DAS ENZIMAS DE REPARO NO POOL DE NUCLEOTÍDEOS: 8-oxo-dGTPase E 8-oxo-dGMPase.....	31
FIGURA 7 – AÇÃO DAS ENZIMAS DE REPARO NO DNA, hOGG1 e MutYH, ENVOLVIDAS NA VIA DE REPARO POR EXCISÃO DE BASES (BER)	32
FIGURA 8 – QUANTIFICAÇÃO DE 8-oxo-dG EXTRACELULAR	45
FIGURA 9 – QUANTIFICAÇÃO DE 8-oxo-dG INTRACELULAR	46
FIGURA 10 – CURVAS DE <i>MELTING</i>	48
FIGURA 11 – EXPRESSÃO DO GENE <i>MTH1</i> NORMALIZADA PELO GENE <i>HPRT</i>	49
FIGURA 12 – ESPECTRO DE ABSORÇÃO DO 8-oxo-dGTP E 8-oxo-dGMP EM 254 nm	51
FIGURA 13 – CROMATOGRAMAS DOS PRODUTOS 8-oxo-dGTP E 8-oxo-dGMP E DOS PADRÕES dGTP E dGMP	51
FIGURA 14 – CURVA PADRÃO DE 8-oxo-dG	53
FIGURA 15 – CROMATOGRAMAS DE AMOSTRA COM E SEM ADIÇÃO DE 8-oxo-dGMP	53
FIGURA 16 – CROMATOGRAMAS DOS PADRÕES DE 8-oxo-dGMP e 8-oxo-dG.54	
FIGURA 17 – ESPECTRO DE ABSORÇÃO DO 8-oxo-dG EM 254 nm	54
FIGURA 18 – ATIVIDADE DA ENZIMA 8-oxo-dGMPase EM CÉLULAS B16-F10 ...	55
FIGURA 19 – ATIVIDADE DA ENZIMA 8-oxo-dGTPase EM CÉLULAS B16-F10	57

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – MODO DE MONITORAMENTO DE REAÇÃO MÚLTIPLA.....	39
TABELA 2 – OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES UTILIZADOS PARA A REAÇÃO DE RT-qPCR.....	41

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

8-oxo-dG - 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina

8-oxo-dGMP - 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina 5'-monofosfato

8-oxo-dGTP - 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina 5'-trifosfato

8-oxoguanina - 8-oxo-7,8-dihidroguanina

A - base nitrogenada adenina

C - base nitrogenada citosina

DHI - dihidroxi-indol

DHICA - ácido 5,6-dihidroxi-indol-2-carboxílico

dGMP - 2'-desoxiguanosina-5'-monofosfato

dGTP - 2'-desoxiguanosina-5'-trifosfato

dNTPs - desoxinucleotídeos trifosfato

EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético

EROs - espécies reativas de oxigênio

G - base nitrogenada guanina

HBSS - solução balanceada de Hanks

HPLC - *high performance liquid chromatography*

HPLC-EC - HPLC acoplado ao detector eletroquímico

HPLC-PDA - HPLC acoplado ao detector de arranjo de diodos

HPLC-MS - HPLC acoplado ao espectrômetro de massas

M++ - melanogênese estimulada

PBS - tampão fosfato salino

PDT - terapia fotodinâmica

PPi - pirofosfato inorgânico

RB - Rosa Bengala

RBAc - Rosa Bengala Acetato

RT-qPCR - PCR quantitativo em tempo real, do inglês: reverse transcription quantitative polymerase chain reaction

T- base nitrogenada timina

UV - radiação ultravioleta

UVA - radiação ultravioleta A

UVB - radiação ultravioleta B

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 JUSTIFICATIVA	18
1.2 OBJETIVOS	19
1.2.1 Objetivo geral	19
1.2.2 Objetivos específicos.....	19
1.3 ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL	20
2 REVISÃO DE LITERATURA	21
2.1 MELANOMA.....	21
2.1.1 Melanina.....	22
2.2 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (EROS).....	23
2.2.1 Oxigênio Molecular Singlete ($^1\text{O}_2$).....	24
2.3 FOTOSSENSIBILIZAÇÃO E TERAPIA FOTODINÂMICA.....	26
2.3.1 Rosa Bengala.....	28
2.4 DANOS NO DNA E NO <i>POOL</i> DE NUCLEOTÍDEOS.....	29
2.5 ENZIMAS DE SANITIZAÇÃO DO <i>POOL</i> DE NUCLEOTÍDEOS	33
3 MATERIAL E MÉTODOS	36
3.1 MATERIAIS	36
3.2 CULTIVO DE CÉLULAS B16-F10.....	36
3.3 ESTÍMULO DA MELANOGÊNESE E FOTOSSENSIBILIZAÇÃO	36
3.4 DETERMINAÇÃO DE 8-OXO-DG (EXTRA E INTRACELULAR)	38
3.4.1 HPLC-EC e HPLC-PDA.....	38
3.4.2 HPLC-MS/MS.....	38
3.5 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DE <i>MTH1</i> POR RT-QPCR.....	40
3.6 ANÁLISE DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE 8-OXO-DGMPASE E 8-OXO-DGTPASE	41
3.6.1 Síntese e purificação de 8-oxo-dGMP e 8-oxo-dGTP	41
3.6.2 Atividade de 8-oxo-dGMPase.....	42
3.6.3 Atividade de 8-oxo-dGTPase	42
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	43
4 RESULTADOS	44
4.1 DETERMINAÇÃO DE 8-OXO-DG (EXTRA E INTRACELULAR)	44
4.1.1 8-oxo-dG Extracelular.....	44
4.1.2 8-oxo-dG Intracelular.....	45

4.2 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DE <i>MTH1</i> POR RT-QPCR.....	47
4.2.1 Padronização da temperatura de anelamento dos <i>primers</i>	47
4.2.2 Expressão do gene <i>MTH1</i>	48
4.3 ANÁLISE DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA.....	50
4.3.1 Síntese e purificação de 8-oxo-dGMP e 8-oxo-dGTP	50
4.3.2 Atividade de 8-oxo-dGMPase.....	52
4.3.3 Atividade de 8-oxo-dGTPase	56
5 DISCUSSÃO	58
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	62
REFERÊNCIAS.....	63

1 INTRODUÇÃO

O melanoma é um tipo de câncer de pele considerado a forma mais grave das neoplasias malignas do órgão, devido a alta possibilidade de metástase (INCA, 2019). O melanoma se origina nos melanócitos, as células produtoras de melanina, pigmento não proteico sintetizado a partir da L-tirosina.

Este pigmento desempenha um papel importante na proteção da pele, devido sua capacidade de absorver a luz ultravioleta (UV) (YAMAGUCHI et al, 2006), que é considerada o principal agente etiológico ambiental do melanoma (SKIN CANCER FOUNDATION, 2017). O seu papel fotoprotetor é geralmente associado a absorção da radiação UVB (280-320 nm), entretanto, a melanina também pode atuar como fotossensibilizador sob radiação UVA (320-400 nm) e luz visível (400-700 nm), levando a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) que podem danificar as biomoléculas (HALLIDAY et al, 2005, CHIARELLI-NETO et al, 2014).

EROs são moléculas instáveis derivadas de oxigênio, que incluem radicais e não- radicais. O oxigênio molecular singlete ($^1\text{O}_2$) é uma espécie não-radicalar que pode ser formada por radiação UVA na pele (por fotossensibilizadores endógenos) (BAIER et al, 2007). O $^1\text{O}_2$ é um potente oxidante, capaz de oxidar principalmente ácidos nucleicos (MARTINEZ, 2003). O $^1\text{O}_2$ pode ser gerado por vários processos, e dentre eles a fotossensibilização tem sido utilizada como uma terapia para o tratamento de alguns tipos de câncer de pele, denominada terapia fotodinâmica (PDT) (DAVIDS; KLEEMANN, 2011). Este processo acontece quando um fotossensibilizador absorve luz visível ou luz UV e essa energia é transferida para outras moléculas, produzindo EROs (mecanismo do tipo I) e especificamente $^1\text{O}_2$ no mecanismo do tipo II (KOCHEVAR et al, 1996; OLIVEIRA, 2006; RONSEIN et al, 2006; DAI et al, 2012). Um fotossensibilizador muito conhecido é o Rosa Bengala (RB), que é um corante sintético utilizado para matar microorganismos e células tumorais (PANZARINI; INGUSCIO; DINI, 2011; KOEVARY, 2012). Devido sua natureza aniônica, O RB não consegue atravessar as membranas celulares e entrar nas células. Então, o desenvolvimento de derivados hidrofóbicos do RB, como o Rosa Bengala Acetato (RBAc), favoreceu seu acúmulo intracelular e a remoção dos grupos acetatos restaura as propriedades do RB (PANZARINI; INGUSCIO; DINI, 2011).

Algumas EROs reagem com o DNA e causam danos oxidativos nas suas bases nitrogenadas, sendo que o $^1\text{O}_2$ reage com o DNA exclusivamente na base

guanina, gerando 8-oxoguanina (RAVANAT et al, 2000), que pode parear com as bases citosina e adenina, e então a transversão G•C para T•A é induzida. A oxidação da guanina também pode ocorrer no *pool* de nucleotídeos celular, sendo que a oxidação de dGTP forma 8-oxo-dGTP, que é um potente substrato mutagênico para a síntese de DNA, pois pode ser incorporado oposto à citosina e adenina no DNA, durante a replicação, com eficiências quase iguais. Neste caso, ambas as transversões seriam induzidas: T•A para G•C e G•C para T•A.

As células possuem mecanismos elaborados que impedem as mutações causadas por oxidação da guanina no DNA e na sua forma de nucleotídeo livre (HAYAKAWA et al, 1995). Duas enzimas DNA glicosilases estão envolvidas na correção do pareamento errôneo de bases no DNA e elas são codificadas pelos genes *mutM* (Fpg) e *mutY* em *E. coli*, e *OGG1* e *MYH*, respectivamente, em células humanas. Uma terceira enzima, 8-oxo-dGTPase, produto do gene *mutT* em *E. coli* e *MTH1* em humanos, é uma pirofosfohidrolase, que impede a incorporação de 8-oxo-dGTP no DNA (MICHAELS; MILLER, 1992).

A 8-oxo-dGTPase é uma enzima de sanitização do *pool* de nucleotídeos e possui uma atividade enzimática que hidrolisa 8-oxo-dGTP a 8-oxo-dGMP (MO; MAKI; SEKIGUCHI, 1992), que não pode ser refosforilada, e pela ação de uma nucleotidase (8-oxo-dGMPase) é ainda degradada a 8-oxo-dG (HAYAKAWA et al, 1995), que passa através da membrana plasmática e é excretada para o meio extracelular (FOTOUHI et al, 2011). O gene *MTH1* é regulado positivamente em muitos tipos de cânceres como em carcinomas de células renais humanas (OKAMOTO et al, 1996), tumores de mama (WANIA; MILOB; D'AMBROSIO, 1998) e linhagens de células de câncer de pulmão (HIBI et al, 1998; KENNEDY et al, 1998), sugerindo que os tumores têm uma dependência maior da função de *MTH1*, do que as células normais.

Dessa forma, se tornou interessante investigar como a produção $^1\text{O}_2$, via fotossensibilização com RB, interfere no sistema de reparo do *pool* nucleotídeos, após o possível dano causado, considerando também o papel fotossensibilizador ou fotoprotetor da melanina. Para isso, foram utilizadas células de melanoma murino (B16-F10), com e sem indução de melanogênese.

1.1 JUSTIFICATIVA

O $^1\text{O}_2$ é a forma mais reativa do oxigênio molecular e um potente oxidante, conhecido por ser mutagênico e genotóxico. Essa espécie pode reagir e danificar o DNA na base guanina (RAVANAT et al, 2000), que também pode ser oxidada na forma de nucleotídeo livre (2'-desoxiguanosina 5'-trifosfato - dGTP) no *pool* de nucleotídeos celular formando 8-oxo-dGTP, um potente substrato mutagênico para a síntese de DNA (HAYAKAWA et al, 1995). As enzimas de sanitização, 8-oxo-dGTPase e 8-oxo-dGMPase, degradam 8-oxo-dGTP a 8-oxo-dG, uma forma facilmente excretada para fora da célula (HAYAKAWA et al, 1995), e previnem a incorporação de 8-oxo-dGTP no DNA durante a replicação. Essa eliminação de desoxinucleotídeos trifosfato (dNTPs) danificados do *pool* de nucleotídeos tem recebido menos atenção do que o papel das vias de reparo do DNA (SPEINA et al, 2005). No entanto, estudos têm mostrado que o *pool* de nucleotídeos é um alvo altamente sensível para EROs (HAGHDOOST et al., 2005; HAGHDOOST et al, 2006), pois é menos protegido devido à proximidade com as fontes primárias geradoras de EROs: mitocôndria e peroxissomos intracelulares (SVOBODA; HARMS-RINGDAHL, 1999), enquanto o DNA é protegido pela cromatina (LJUNGMAN et al, 1991).

Além do papel de $^1\text{O}_2$ na oxidação do *pool* de nucleotídeos, a melanina pode exercer tanto um papel fotoprotetor (YAMAGUCHI et al, 2006) quanto fotossensibilizador sob radiação UV (KORYTOWSKI et al, 1987) e luz visível (CHIARELLI-NETO et al, 2014), o que contribui para a geração de EROs, juntamente com o estímulo da melanogênese (CUNHA et al, 2012). Kvam e Tyrrell (1999) relataram que células de melanoma humano com alto teor de melanina acumularam duas vezes mais 8-oxo-dG no DNA após irradiação com UVA do que células com baixo teor de melanina. Dessa forma, é importante entender os efeitos do $^1\text{O}_2$, da melanina e da interação de ambos na oxidação de dGTP, e como o sistema de reparo do *pool* de nucleotídeos se comporta frente a ação desses agentes oxidativos.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

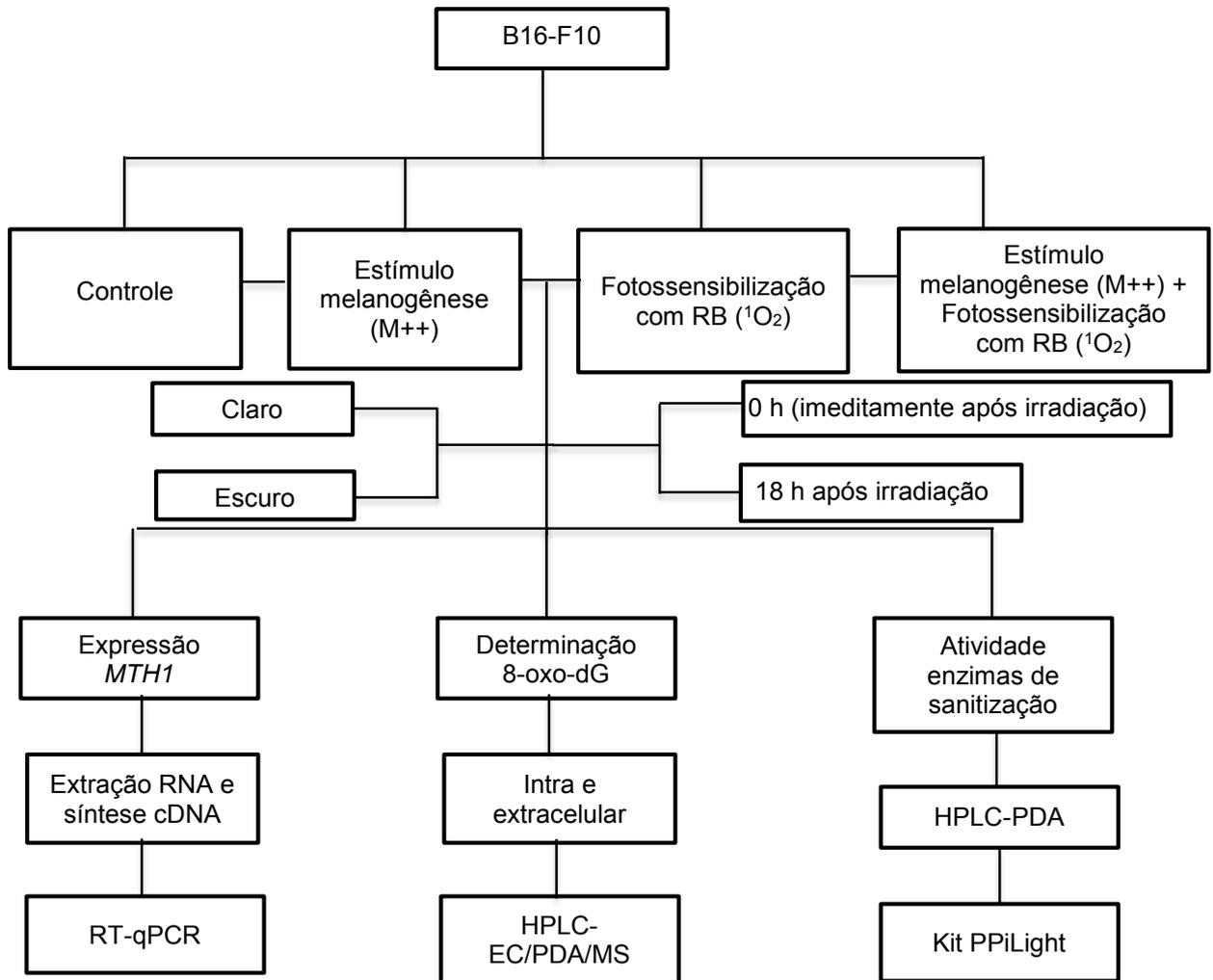
Avaliar a oxidação de dGTP em células de melanoma murino (B16-F10), causada por $^1\text{O}_2$ e/ou melanogênese, bem como a atividade e a expressão das enzimas de sanitização.

1.2.2 Objetivos específicos

Em células de melanoma murino B16-F10 com melanogênese estimulada, submetidas à fotossensibilização como fonte geradora de $^1\text{O}_2$ e com a combinação de ambos, os objetivos específicos desse estudo são:

- Detectar e quantificar 8-oxo-dG no *pool* de nucleotídeos e excretado das células;
- Avaliar a atividade enzimática de 8-oxo-dGTPase e 8-oxo-dGMPase, e expressão de *MTH1*.

1.3 ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL



2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 MELANOMA

O melanoma é um tipo de câncer de pele que se origina nos melanócitos, as células produtoras de melanina. O câncer de pele é o mais frequente no Brasil e corresponde a 30% de todos os tumores malignos registrados. Embora o melanoma represente apenas 3% das neoplasias malignas do órgão, ele é a forma mais grave de câncer de pele devido a alta possibilidade de metástase (INCA, 2019).

A radiação UV é o principal agente etiológico ambiental do melanoma, especialmente naqueles que são geneticamente predispostos à doença (SKIN CANCER FOUNDATION, 2017). As radiações UVB e UVA agem nas células por mecanismos diferentes na geração de danos. Os raios UVB são diretamente absorvidos pelo DNA e causam danos diretos ao DNA, os quais induzem alterações genéticas que promovem a carcinogênese (LARSSON et al, 2005). Diferentemente, os raios UVA induzem a formação de EROs, principalmente 1O_2 , através de fotossensibilizadores endógenos. 1O_2 reage com várias biomoléculas, incluindo membranas, proteínas e DNA, o que também pode levar a carcinogênese (LARSSON et al, 2005; CADET; DOUKI, 2011).

Além dos fatores ambientais, como a radiação UV, o desenvolvimento do melanoma também pode estar associado a fatores individuais, como fatores genéticos, histórico de melanoma e fenótipo. Alguns genes mutados ou deletados estão presentes com mais frequência em pacientes portadores de melanoma, incluindo o gene supressor de tumor CDKN2A (inibidor de quinase dependente de ciclina 2A) e os protooncogenes B-Raf e Cdk4 (quinase dependente de ciclina 4) (GRUBER et al, 2008). Além disso, indivíduos com histórico familiar da doença, e que possuem pele, olhos e cabelos claros (loiros e ruivos) são mais suscetíveis ao desenvolvimento deste tipo de câncer (GANDINI et al, 2005; BERWICK; ERDEI; HAY, 2009), pois este fenótipo está associado com uma menor quantidade de melanina e também difere quanto ao tipo de melanina, possuem mais feomelanina que exibe coloração amarela/vermelha, do que a eumelanina que apresenta coloração marrom/preta (SALOPEK et al, 1991).

2.1.1 Melanina

A melanina é o pigmento responsável pela coloração da pele, olhos e cabelos, e sintetizada pelos melanócitos no interior de organelas, chamadas melanossomos. A síntese da melanina, denominada melanogênese, inicia-se com a oxidação da L-tirosina em dopaquinona, catalisada pela enzima tirosinase, e é seguida de outras etapas que originam, a eumelanina ou a feomelanina, os 2 principais tipos de melanina que derivam do mesmo precursor, a dopaquinona (ITO; WAKAMATSU, 2003).

A classificação do tipo de melanina depende principalmente da cor, presença de enxofre na molécula e solubilidade. A eumelanina exibe coloração marrom ou preta, apresenta o heteroátomo nitrogênio em sua estrutura e é insolúvel na maioria dos solventes. É formada, predominantemente, por dihidroxi-indol (DHI) e ácido 5,6-dihidroxi-indol-2-carboxílico (DHICA) (CHEDEKEL; AHENE; ZEISE, 1992). A feomelanina exibe coloração vermelha ou amarela, possui nitrogênio e enxofre em sua estrutura e é solúvel em soluções alcalinas. Possui uma estrutura formada por unidades de benzotiazinas, decorrente de cisteinil-DOPAs formadas pela ligação de resíduos de cisteína com a dopaquinona no processo de polimerização (MARS; LARSSON, 1999).

A melanina desempenha um papel importante na proteção da pele, devido sua capacidade de absorver a luz UV (YAMAGUCHI et al, 2006), através da sua condensação e formação de uma “capa” que envolve o núcleo celular dos queratinócitos para proteger o DNA, efeito conhecido como *blackout* (YAMAGUCHI; BRENNER; HEARING, 2007). Juntamente com a absorção de fótons, a possibilidade da melanina atuar removendo EROs ou inibir sua formação, contribui para seu efeito protetor (HOOGDUIJN et al, 2004).

Além do seu papel fotoprotetor, a melanina também pode atuar como fotossensibilizador sob radiação UV (KORYTOWSKI et al, 1987). Atribui-se à melanina a fotoproteção principalmente contra a radiação UVB, enquanto o papel fotossensibilizador está relacionado com a radiação UVA e luz visível, levando a geração de EROs que podem danificar as biomoléculas (HALLIDAY et al, 2005).

Chiarelli-neto et al (2014) demonstraram que a luz visível pode danificar os melanócitos através da fotossensibilização da melanina e geração de $^1\text{O}_2$, provocando a fotooxidação do DNA e a morte celular necro-apoptótica. Sendo assim, a exposição à luz visível também pode contribuir para o câncer de pele. Além disso, Cunha et al

(2012) relataram que o estímulo da melanogênese (síntese de melanina), em células B16-F10, resultou em níveis aumentados de EROs, produzidos na via de síntese da melanina.

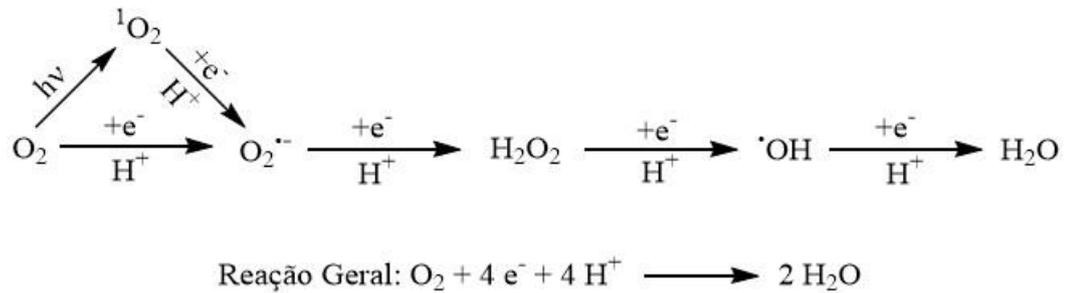
Kalegari (2017) avaliou a ocorrência de bases modificadas no DNA em células B16-F10, utilizando ensaio cometa modificado com a enzima de reparo hOGG1. Foi demonstrado que o estímulo da melanogênese juntamente com a geração de $^1\text{O}_2$ provocou aumento nos níveis de danos no DNA, em 0 e 18 h após irradiação com luz visível verde (526 ± 20 nm). Adicionalmente, também foi demonstrada a redução da viabilidade celular, em 0 e 18 h, por ensaios de MTT e cristal violeta.

2.2 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (EROs)

EROs são moléculas instáveis formadas pela excitação (transferência de energia) ou redução (transferência de elétrons) parcial do oxigênio molecular. Essas moléculas derivadas de oxigênio incluem radicais como hidroxila ($^{\bullet}\text{OH}$), superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), alcoxila (RO^{\bullet}) e peroxila (RO_2^{\bullet}), e não-radicais, que são agentes oxidantes ou convertidos facilmente em radicais, como ácido hipocloroso (HOCl), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ozônio (O_3) e oxigênio molecular singlete ($^1\text{O}_2$). EROs em níveis elevados são considerados oncogênicos e por isso são associados ao câncer (MOLONEY; COTTER, 2017; PRASAD; GUPTA; TYAGI, 2017).

As EROs são geradas dentro das células, tanto por fontes exógenas quanto endógenas. As fontes exógenas são poluentes, xenobióticos, fumaça, radiação, entre outros. O oxigênio molecular (O_2) pode absorver radiação e formar $^1\text{O}_2$, ou ganhar elétrons e ser sequencialmente reduzido a $\text{O}_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , $^{\bullet}\text{OH}$ e H_2O (FIGURA 1). As EROs endógenas são produzidas como um subproduto em organelas celulares como mitocôndrias, peroxissomos e citocromo P-450 (ACHARYA et al, 2010, PRASAD; GUPTA; TYAGI, 2017). Elas atuam como moléculas de sinalização, mas também são considerados subprodutos tóxicos inevitáveis do metabolismo de organismos aeróbicos (MITTLER, 2017). EROs também são produzidas em condições inflamatórias, durante processos patológicos. Sendo que uma reação inflamatória não controlada pode provocar uma inflamação crônica que pode contribuir para a iniciação de um tumor (VALAVANIDIS et al, 2013; WU et al, 2014).

FIGURA 1 – VIAS DE REDUÇÃO DO OXIGÊNIO À ÁGUA, LEVANDO À FORMAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO INTERMEDIÁRIAS



FONTE: Adaptado de Scandalios (2002), com permissão da Elsevier (nº de licença: 4681481328074).

LEGENDA: O oxigênio molecular O_2 pode absorver energia ($h\nu$) e formar oxigênio molecular singlete (${}^1\text{O}_2$), ou ganhar elétrons e ser sequencialmente reduzido a: radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet -}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila ($\cdot\text{OH}$) e água (H_2O).

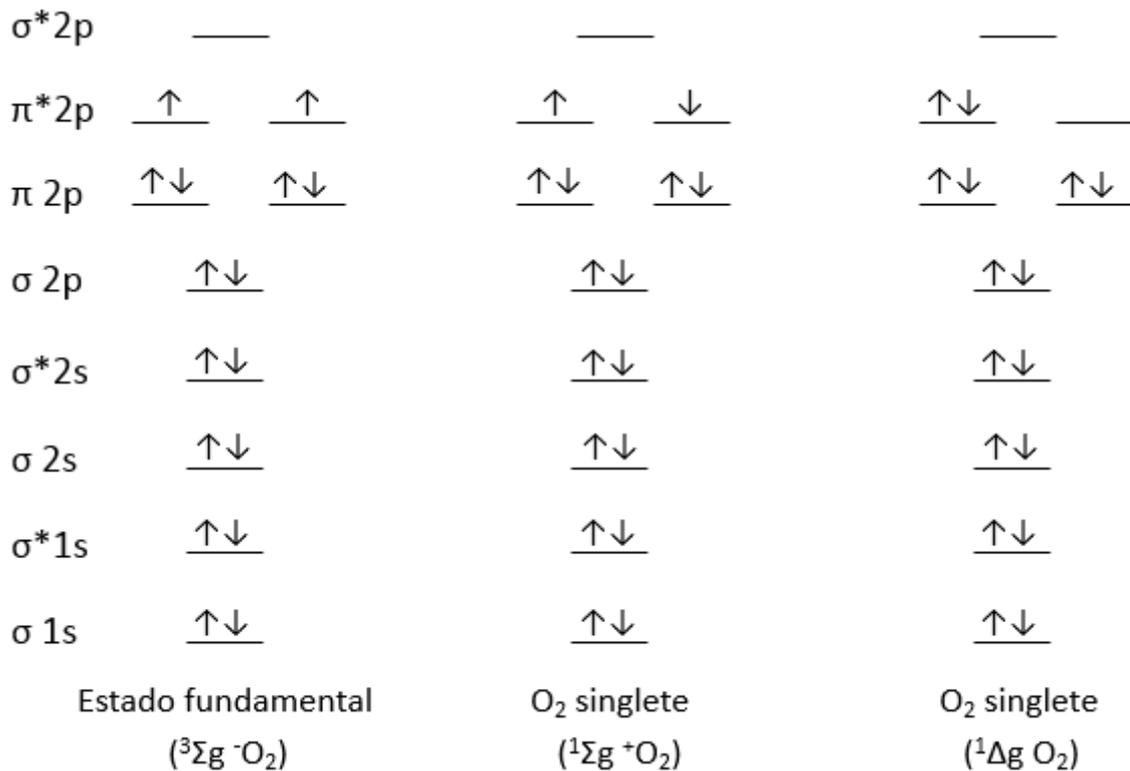
Em níveis baixos, as EROs apresentam efeitos benéficos regulando a homeostase e a sinalização intracelular, entretanto, quando são excessivamente geradas, ou inadequadamente eliminadas, desempenham um papel importante no dano de lipídeos, proteínas e DNA (PRASAD; GUPTA; TYAGI, 2017). As células possuem sistemas de defesa antioxidante que mantêm o equilíbrio entre a produção e a eliminação de EROs. Quando este equilíbrio é interrompido devido ao excesso de EROs, depleção de antioxidantes ou ambos, ocorre o estresse redox (SIES; BERNDT; JONES, 2017). Dessa forma, o dano causado, principalmente no DNA intracelular, pelas EROs, é conhecido por ser mutagênico e provavelmente contribui para a perda da estabilidade genômica das células (MÜLLER et al, 1990).

2.2.1 Oxigênio Molecular Singlete (${}^1\text{O}_2$)

O ${}^1\text{O}_2$ é um tipo de EROs não-radicalar, formado por transferência de energia de excitação para o oxigênio molecular (O_2) no estado fundamental triplete (${}^3\Sigma_g^-$), que por sua vez, é um radical livre, pois possui dois elétrons desemparelhados com *spins* paralelos localizados em orbitais π^* distintos, como pode ser observado na FIGURA 2. Dessa forma, o O_2 apresenta baixa reatividade pois sua redução direta por 2 elétrons que também possuam *spins* paralelos, e consequente ação como agente oxidante, contraria o Princípio de Pauli (em orbitais atômicos ou moleculares um par de elétrons deve apresentar *spins* opostos). A regra de restrição de spin é removida

quando o O₂ recebe um acréscimo de energia e é gerado o oxigênio nas suas formas singlete (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

FIGURA 2 – DISTRIBUIÇÃO ELETRÔNICA DO OXIGÊNIO MOLECULAR NOS ESTADOS FUNDAMENTAL E SINGLETE



FONTE: O autor (2019).

LEGENDA: O oxigênio molecular no estado fundamental triplete ($^3\Sigma_g^-O_2$) possui dois elétrons desemparelhados com *spins* paralelos em orbitais π^*2p diferentes. Enquanto, nos estados singletes: $^1\Sigma_g^+O_2$ há dois elétrons desemparelhados com *spins* opostos em orbitais π^*2p distintos e $^1\Delta_gO_2$ não há elétrons desemparelhados.

Existem dois estados do oxigênio eletronicamente excitado (representados na FIGURA 2): $^1\Delta_g$ um estado menos energético (22 kcal/mol acima do fundamental), em que não existem elétrons desemparelhados, e de vida-média elevada (aproximadamente 2 a 4 μ s em H₂O), e $^1\Sigma_g^+$ um estado mais energético (37,5 kcal/mol acima do fundamental), que possui dois elétrons desemparelhados com *spins* opostos em orbitais π^* distintos e de vida-média muito inferior (10^{-11} s), que rapidamente decai ao estado $^1\Delta_g$. Então, somente a forma $^1\Delta_g$ do oxigênio singlete é considerada nos sistemas biológicos, denotada por 1O_2 (MARTINEZ, 2003).

O 1O_2 pode ser gerado por vários processos: fotossensibilização (KOCHEVAR; REDMOND, 2000), oxidação do peróxido de hidrogênio (H₂O₂) por

hipoclorito (ClO^-) (HELD; HALKO; HURST, 1978) ou peroxinitrito (ONOO^-) (DI MASCIO et al, 1994), decomposição térmica de endoperóxidos derivados do naftaleno, como *N,N'*-di(2,3-dihidroxipropil)-1,4-naftalenodipropanamida (DHPN) (MARTINEZ et al, 2000), peroxidação lipídica (MIYAMOTO et al, 2003), fagocitose de vírus e bactérias (mecanismo de defesa) (STEINBECK; KHAN; KARNOVSKY, 1992) e reações enzimáticas com peroxidases e oxigenases, entre outras enzimas (KANOFSKY, 1989).

O oxigênio molecular singlete é a principal espécie reativa formada por radiação UVA na pele (por fotossensibilizadores endógenos) (BAIER et al, 2007). UVA penetra mais profundamente na derme em comparação à UVB (AGAR et al, 2004), e é a principal fonte de UV responsável pelo fotoenvelhecimento da pele e o desenvolvimento de vários tipos de câncer de pele. Níveis aumentados de $^1\text{O}_2$ foram encontrados em queratinócitos humanos após exposição à radiação UVA (BAIER et al, 2007). O $^1\text{O}_2$ é a forma mais reativa do oxigênio molecular e um potente oxidante em relação aos compostos de alta densidade eletrônica, capaz de oxidar todos os tipos de biomoléculas, principalmente ácidos nucleicos (MARTINEZ, 2003), e conhecido por ser mutagênico e genotóxico (RAVANAT et al, 2000).

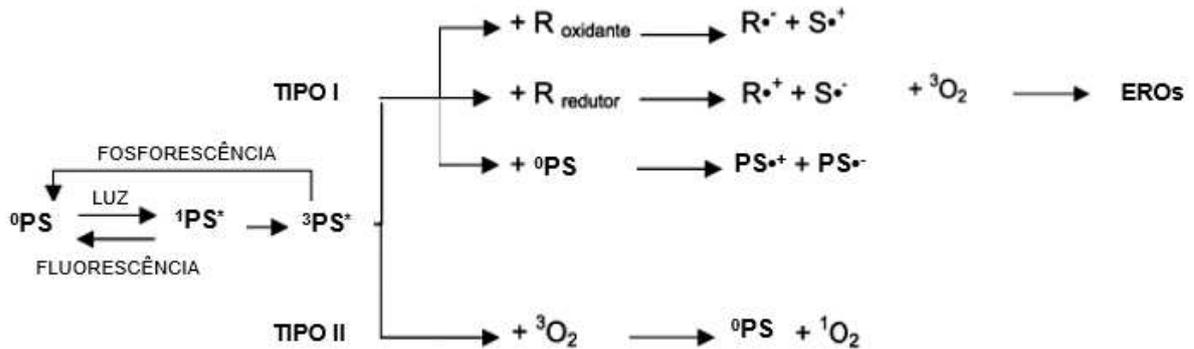
2.3 FOTOSSENSIBILIZAÇÃO E TERAPIA FOTODINÂMICA

Na fotossensibilização, uma molécula (fotossensibilizador) absorve luz visível ou luz UV e essa energia é transferida para outras moléculas, produzindo espécies reativas que modificam moléculas celulares (KOCHEVAR et al, 1996; OLIVEIRA, 2006). Então, o processo acontece quando um fotossensibilizador, luz de comprimento de onda adequado e oxigênio molecular estão presentes simultaneamente (KOCHEVAR; REDMOND, 2000).

Nas reações de fotossensibilização (FIGURA 3), os fotossensibilizadores absorvem energia quando são irradiados com luz UV ou visível, e passam a um estado excitado singlete ($^1\text{PS}^*$), o qual pode decair para o estado fundamental singlete (^0PS) emitindo fluorescência, ou ser convertido ao estado triplete excitado ($^3\text{PS}^*$) através da inversão espontânea do spin do elétron excitado. O estado $^3\text{PS}^*$ possui tempo de vida mais longo e pode decair ao estado ^0PS emitindo fosforescência, ou reagir por mecanismos fotoquímicos do tipo I ou II. Na reação do tipo I, pode reagir com um substrato orgânico (R) ou uma segunda molécula fotossensibilizadora, por

transferência de elétron, levando a formação de radicais que interagem com O_2 e geram EROs, como H_2O_2 , $O_2^{\cdot-}$ e $\cdot OH$. Alternativamente, na reação do tipo II, o fotossensibilizador no estado $^3PS^*$ pode transferir sua energia diretamente para o O_2 , gerando 0PS e 1O_2 (RONSEIN et al, 2006; DAI et al, 2012).

FIGURA 3 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO PROCESSO DE FOTOSSENSIBILIZAÇÃO



FONTE: Adaptado de Ronsein et al (2006), licenciado sob CC BY 3.0 BR.

LEGENDA: O fotossensibilizador (PS) é irradiado e absorve energia que o excita para a um estado excitado singlete ($^1PS^*$), podendo ser convertido ao estado tripleto excitado ($^3PS^*$) ou decair ao estado fundamental singlete (0PS). $^3PS^*$, pode então reagir com o oxigênio molecular (3O_2) por duas vias, tipo I e tipo II, levando à formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) e oxigênio molecular singlete (1O_2), respectivamente.

Os fotossensibilizadores são compostos sintéticos ou naturais, sendo que os comumente utilizados em laboratório para a geração de 1O_2 são: rosa bengala, azul de metileno, fenalenona e meso-tetrafenil porfirina (KOCHEVAR; REDMOND, 2000).

O processo de fotossensibilização tem sido utilizado como uma terapia para o tratamento de alguns tipos de câncer de pele, denominada terapia fotodinâmica (do inglês *photodynamic therapy* – PDT) (DAVIDS; KLEEMANN, 2011). Essa terapia possui vantagens como boa seletividade às células tumorais, mostra-se minimamente invasiva e pode ser utilizada sozinha ou juntamente com outras terapias como quimioterapia e imunoterapia (JUARRANZ et al, 2008).

A PDT tem sido utilizada com sucesso como terapia de primeira linha ou paliativa para o tratamento de câncer de pulmão, esôfago, bexiga, pele não melanoma, cabeça e pescoço, no entanto tem mostrado algumas desvantagens que limitam sua aplicação clínica no tratamento de melanoma. Neste caso, o desafio mais importante é superar a resistência ao melanoma devido ao aprisionamento

melanossômico do fotossensibilizador, a presença de melanina que atua na absorção da luz incidida, defesa antioxidante, defeitos nas vias apoptóticas, evasão imune e estímulo da neoangiogênese. Assim, os potenciais alvos para a PDT no melanoma são: indução de morte celular, redução do potencial antioxidante, inibição dos mecanismos endógenos de resistência a drogas e neoangiogênese, juntamente com a ativação de uma eficiente resposta imune anti-melanoma (BALDEA et al, 2018).

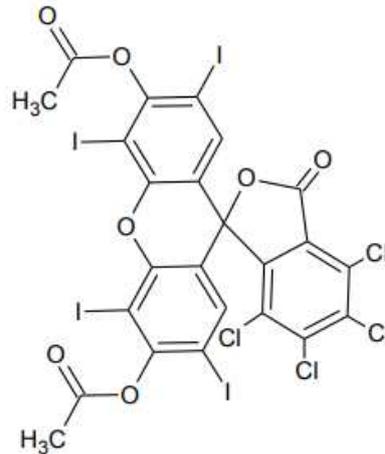
2.3.1 Rosa Bengala

O Rosa Bengala (RB) é um corante sintético que pertence à classe dos xantenos solúveis em água, e sua capacidade de converter o oxigênio triplete em seu estado singlete quando irradiado com luz verde, pela presença de átomos de cloro e iodo nos anéis de xanteno, levou à sua utilização como fotossensibilizador do tipo II para matar microorganismos e células tumorais (PANZARINI; INGUSCIO; DINI, 2011; KOEVARY, 2012). O rosa bengala mostrou-se ser tóxico e entrar preferencialmente em células tumorais e já foi relatado no tratamento de melanoma metastático (THOMPSON; HERSEY, WACHTER, 2008; FOOTE et al, 2010).

Este corante possui natureza aniônica, o que faz com que em baixas concentrações, o RB seja inibido de atravessar as membranas celulares e entrar nas células na ausência de um veículo. Assim, para favorecer o seu acúmulo intracelular, derivados hidrofóbicos do RB com acetato foram desenvolvidos. A adição de grupos acetatos ao anel xanteno converte a molécula RB em Rosa Bengala Acetato (RBAc) (FIGURA 4), tornando-a mais hidrofóbica e melhorando a sua capacidade de internalizar nas células. Ao mesmo tempo, as propriedades fotofísicas (emissão de fluorescência) e fotoquímicas (fotossensibilização) do RB são extintas. Após a internalização nas células, os grupos acetatos são removidos por esterases carboxílicas citoplasmáticas, restaurando a estrutura nativa, bem como as propriedades de fluorescência e fotossensibilização do RB. Conforme descrito por Panzarini, Inguscio e Dini (2011), em uma revisão sobre RBAc, o seu acúmulo intracelular depende do equilíbrio entre três processos: influxo de RBAc inativo, restauração de RB ativo e efluxo de RB (BOTTIROLI et al, 1997). Após a restauração das moléculas de RB fotoativas, elas permanecem por um longo tempo dentro das células. RB se localiza nos endossomos e depois apresenta uma redistribuição

intracelular para a região perinuclear e, por fim, para o aparelho de Golgi e retículo endoplasmático (PANZARINI; INGUSCIO; DINI, 2011).

FIGURA 4 – ESTRUTURA QUÍMICA DO ROSA BENGALA DIACETATO



FONTE: Kalegari (2017).

LEGENDA: Estrutura química do corante sintético rosa bengala, modificado com a adição de grupos acetato para favorecer seu acúmulo intracelular e utilização como fotossensibilizador na terapia fotodinâmica.

A produção de EROs por RB é obtida por irradiação com luz visível verde, cujo comprimento de onda varia entre 530 e 560 nm (PANZARINI; INGUSCIO; DINI, 2011). Soldani et al (2007) demonstraram que células HeLa fotossensibilizadas com RBAc-PDT (luz visível à 530 nm), sofreram danos generalizados em várias organelas e estruturas celulares, com uma indução preferencial de apoptose.

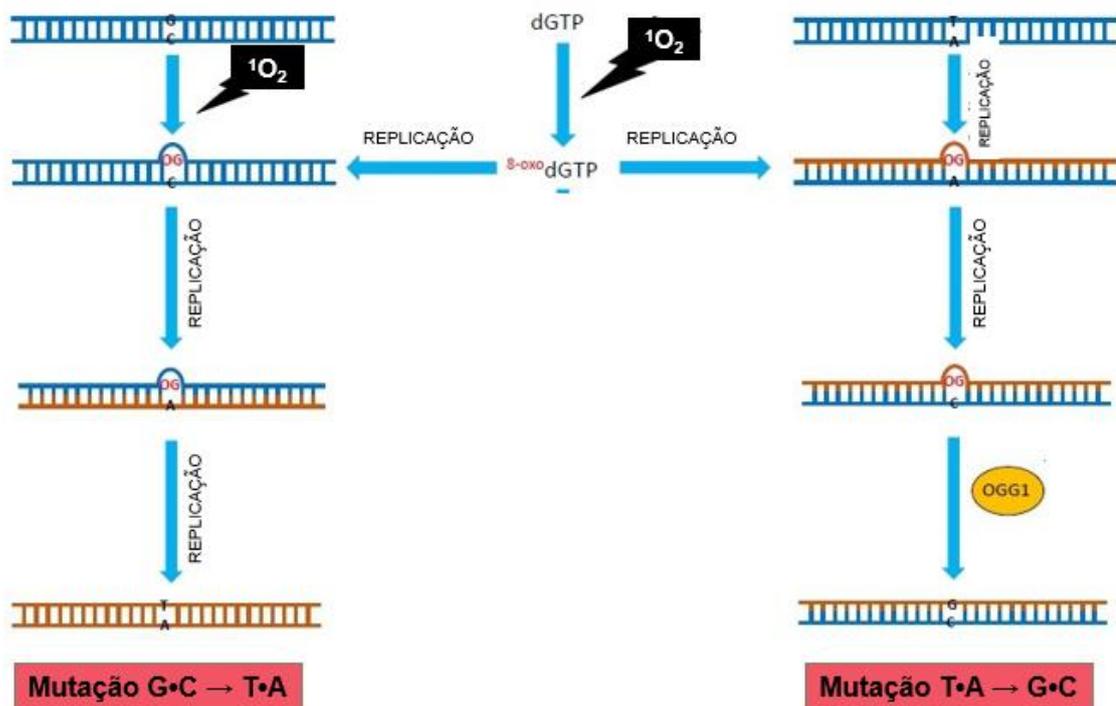
2.4 DANOS NO DNA E NO POOL DE NUCLEOTÍDEOS

Algumas EROs reagem com o DNA e causam danos oxidativos nas suas bases nitrogenadas, levando à formação de bases oxidadas, através da oxidação direta dos ácidos nucléicos e de quebras na molécula de DNA (BERRA, 2008). As quatro bases nitrogenadas são suscetíveis a oxidação, pois apresentam baixos potenciais de redução, sendo que a guanina possui o menor valor (STEENKEN; JOVANOVIC, 1997). Dessa forma, entre as bases oxidadas geradas, a 8-oxoguanina (8-oxo-7,8-dihidroguanina) é a mais abundante e parece desempenhar papéis críticos na carcinogênese e envelhecimento (HAYAKAWA et al, 1995), além de ser

frequentemente considerada um marcador geral de dano oxidativo no DNA (SPEINA et al, 2005).

O $^1\text{O}_2$ reage com o DNA exclusivamente na base guanina (RAVANAT et al, 2000). A 8-oxoguanina formada no DNA pode parear com as bases citosina e adenina, e então a transversoão G•C para T•A é induzida. A oxidação da guanina também pode ocorrer no *pool* de nucleotídeos celular (reservatório dos precursores dNTPs – desoxinucleotídeos trifosfato) formando 8-oxo-dGTP (8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina 5'-trifosfato), que é um potente substrato mutagênico para a síntese de DNA, pois pode ser incorporado oposto à citosina e adenina no DNA, durante a replicação, com eficiências quase iguais. Neste caso, ambas as transversoões seriam induzidas: T•A para G•C e G•C para T•A (FIGURA 5) (HAYAKAWA et al, 1995).

FIGURA 5 – MUTAÇÕES INDUZIDAS NO DNA PELA FORMAÇÃO DE 8-OXOGUANINA E INCORPORAÇÃO DE 8-oxo-dGTP

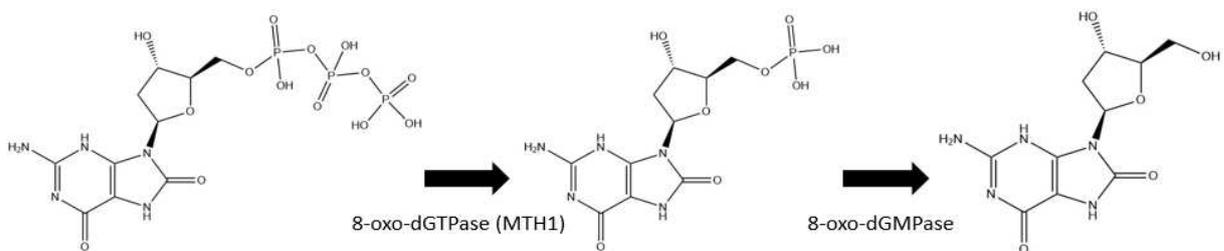


FONTE: Adaptado de Eshtad et al (2016), licenciado sob CC BY 4.0.

LEGENDA: Quando $^1\text{O}_2$ oxida a guanina (G) no DNA ocorre a formação de 8-oxoguanina (OG) que é pareada erroneamente com a adenina (A) após replicação, e assim a mutação G•C para T•A é induzida. Alternativamente, $^1\text{O}_2$ pode oxidar dGTP em 8-oxo-dGTP no *pool* de nucleotídeos, que é incorporado no DNA oposto a citosina (C) ou adenina (A), e assim ambas as mutações podem ser induzidas: G•C para T•A e T•A para G•C.

Estudos com *Escherichia coli* revelaram que as células possuem mecanismos elaborados que impedem as mutações causadas por oxidação da base guanina no DNA e na sua forma de nucleotídeo livre (HAYAKAWA et al, 1995). Duas enzimas DNA glicosilases estão envolvidas na correção do pareamento errôneo de bases no DNA e elas são codificadas pelos genes *mutM* (Fpg) e *mutY*. A *mutM* remove 8-oxoguanina quando pareada com a base citosina e a *mutY* remove a base adenina quando pareada com 8-oxoguanina. Uma terceira enzima, produto do gene *mutT*, é uma pirofosfohidrolase (8-oxo-dGTPase) que impede a incorporação de 8-oxo-dGTP no DNA (MICHAELS; MILLER, 1992). A 8-oxo-dGTPase possui uma atividade enzimática que hidrolisa 8-oxo-dGTP a 8-oxo-dGMP (8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina 5'-monofosfato) (MO; MAKI; SEKIGUCHI, 1992), que não pode ser refosforilada, e pela ação de uma nucleotidase (8-oxo-dGMPase) é ainda degradada a 8-oxo-dG (8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina) (FIGURA 6) (HAYAKAWA et al, 1995), que passa através da membrana plasmática e é excretada para o meio extracelular (FOTOUHI et al, 2011). As células humanas contêm enzimas que são análogas às de *E. coli* (FIGURA 7): hOGG1 possui função similar à *mutM* (RADICELLA et al, 1997), MYH (MutYH) é análoga à *mutY* bacteriana (MCGOLDRICK et al, 1995) e MTH1 é equivalente à *mutT* (FURUICHI et al, 1994).

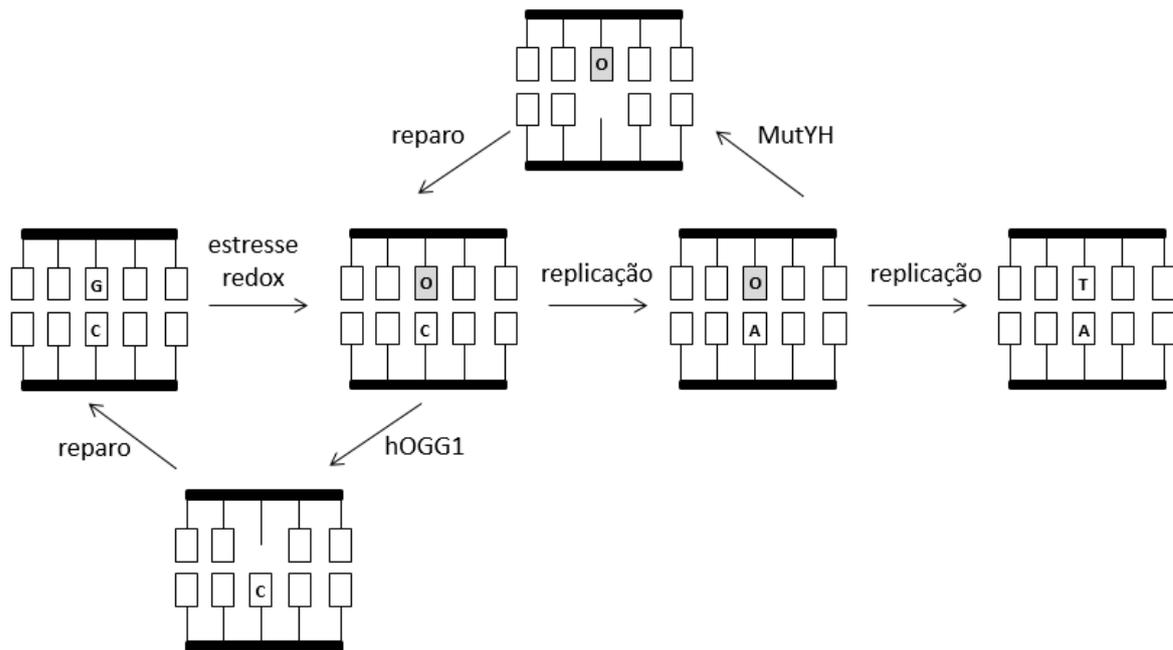
FIGURA 6 – AÇÃO DAS ENZIMAS DE REPARO NO POOL DE NUCLEOTÍDEOS: 8-oxo-dGTPase E 8-oxo-dGMPase



FONTE: O autor (2019).

LEGENDA: Quando ocorre a oxidação de dGTP no *pool* de nucleotídeos, 8-oxo-dGTP é formado e a enzima de reparo 8-oxo-dGTPase (codificada pelo gene *mutT* em *E. coli* e *MTH1* em humanos) age removendo dois grupos fosfatos da molécula formando assim 8-oxo-dGMP. Em seguida, a ação da enzima 8-oxo-dGMPase é necessária para a remoção do grupo fosfato restante e há a formação de 8-oxo-dG, molécula mais facilmente excretada da célula.

FIGURA 7 – AÇÃO DAS ENZIMAS DE REPARO NO DNA, hOGG1 e MutYH, ENVOLVIDAS NA VIA DE REPARO POR EXCISÃO DE BASES (BER)



FONTE: O autor (2019).

LEGENDA: Quando ocorre a oxidação da guanina (G) no DNA, 8-oxoguanina (O) é formada e a enzima de reparo hOGG1 age removendo a 8-oxoguanina, dessa forma nenhuma mutação é induzida no DNA. MutYH, outra enzima de reparo, remove a adenina (A) pareada erroneamente com a 8-oxoguanina (O), e a ação de hOGG1 ainda é necessária para haver o reparo no DNA.

O papel da eliminação de dNTPs danificados do *pool* de nucleotídeos celular recebeu menos atenção do que o papel das vias de reparo do DNA. No entanto, a eliminação dos dNTPs danificados é muito importante para a manutenção da integridade genômica (SPEINA et al, 2005). Além disso, estudos têm mostrado que o *pool* de nucleotídeos é um alvo altamente sensível (HAGHDOOST et al., 2005; HAGHDOOST et al, 2006), pois diferentemente do DNA, que é protegido pela cromatina (LJUNGMAN et al, 1991), os dNTPs são menos protegidos devido à proximidade com as fontes primárias de EROs: mitocôndria e peroxissomos. Foram apresentadas evidências de que o nucleotídeo de guanina livre (dGTP) é mais acessível aos radicais livres do que dG no DNA (SVOBODA; HARMS-RINGDAHL, 1999). Por consequência, a enzima MTH1 age sobre 8-oxo-dGTP de forma a minimizar seus níveis e então, sua possível incorporação no DNA durante a replicação. Já foi relatado que ratos deficientes dessa enzima apresentam maior incidência de câncer em comparação a ratos com expressão do tipo selvagem de MTH1 (TSUZUKI et al, 2001).

Fotouhi et al (2011) em seu estudo com linhagem celular de linfoblastóide humano TK6, relataram que o *pool* de nucleotídeos é um alvo significativo para as mutações induzidas por UVA e que MTH1 desempenha um papel importante na proteção de células contra o estresse redox induzido por UVA e conseqüentemente contra o câncer de pele. Os resultados obtidos mostraram aumento na frequência mutante juntamente com maior concentração intracelular de 8-oxo-dGTP em células com *MTH1* silenciado e menor concentração de 8-oxo-dG extracelular, sugerindo que, pelo menos em parte, a atividade mutagênica da UVA é mediada pela produção de 8-oxo-dGTP.

MTH1 mostrou-se superexpressado no nível de mRNA em carcinomas de células renais humanas (OKAMOTO et al, 1996), tumores de mama (WANIA; MILOB; D'AMBROSIO, 1998) e linhagens de células de câncer de pulmão (HIBI et al, 1998; KENNEDY et al, 1998; KENNEDY; PASS; MITCHELL, 2003). Sendo assim, é sugerido que os tumores têm uma dependência maior da função de MTH1, do que as células normais.

2.5 ENZIMAS DE SANITIZAÇÃO DO *POOL* DE NUCLEOTÍDEOS

A superfamília de hidrolases NUDIX é encontrada em mais de 250 espécies em eucariontes, bactérias e arqueas. Os membros dessa família consistem, principalmente, de pirofosfohidrolases que atuam sobre os nucleosídeos difosfatos ligados à outra porção X, incluindo nucleotídeos danificados por oxidação. O genoma humano possui 24 genes dessas enzimas e pelo menos 5 pseudogenes que apresentam uma considerável diversidade de substrato (CARTER et al, 2015). Foram sugeridos homólogos humanos funcionais de mutT: *NUDT1* (*MTH1*), *NUDT15* (*MTH2*) e *NUDT18* (*MTH3*), que assemelham-se em suas sequências, mas diferem consideravelmente em suas especificidades de substratos (TAKAGI et al, 2012).

A proteína MTH1 é a melhor caracterizada dos homólogos, e cliva 8-oxo-dGTP a 8-oxo-dGMP, mas não aceita 8-oxo-dGDP como substrato. Semelhante a MTH1, outras proteínas NUDIX, a NUDT15 e a NUDT18 foram propostas como sanitizantes do *pool* de nucleotídeos e podem funcionar em conjunto com MTH1 ou atuar como enzimas compensatórias se a atividade de MTH1 for perdida (CARTER et al, 2015). A proteína MTH2 é descrita como o segundo homólogo humano de mutT bacteriano com atividade de 8-oxo-dGTPase, que pode converter tanto 8-oxo-dGTP

quanto 8-oxo-dGDP a 8-oxo-dGMP, mas possui atividade enzimática contra 8-oxo-dGTP muito menor do que a de MTH1 (TAKAGI et al, 2012; CARTER et al, 2015). NUDT18 possui uma sequência intimamente relacionada a MTH1 e MTH2, por isso foi proposto que ela deveria ser nomeada MTH3. Essa proteína é especificamente ativa contra 8-oxo-dGDP e dificilmente cliva 8-oxo-dGTP (TAKAGI et al, 2012).

Carter et al (2015) demonstraram que NUDT15 tem uma atividade consideravelmente menor para espécies de guanina oxidadas do que para os nucleotídeos não danificados. Enquanto MTH1 demonstrou uma forte atividade em relação a 8-oxo-dGTP, nenhuma das outras enzimas propostas mostrou atividade apreciável com nucleotídeos oxidados. No geral, foi concluído que MTH1 é o principal, e talvez o único, membro da família NUDIX com papel celular como sanitizante do *pool* de dNTP oxidado.

MTH1 é regulado positivamente em muitos tipos de cânceres, sugerindo que os tumores têm uma dependência maior da função de MTH1, do que as células normais. Isso levou ao desenvolvimento de inibidores de MTH1 no tratamento do câncer. No entanto, mesmo que alguns inibidores como o TH588 e TH1579 tenham exibido potente atividade antitumoral com tolerável toxicidade em estudos pré-clínicos (GAD et al, 2014; SAMARANAYAKE; HUYNH; RAI, 2017), outros não conseguiram matar células tumorais (KAWAMURA et al, 2016; WARPMAN BERGLUND et al, 2016).

Wang et al (2016) demonstraram que a apoptose de células de melanoma humano é determinada por níveis endógenos de EROs e que a inibição de MTH1 com TH588 contribui para uma maior sensibilização dessas células. No entanto, havia pouca compreensão de como MTH1 é regulado nas células tumorais. Então, em seguida, Wang et al (2017) investigaram os mecanismos regulatórios que sustentam a expressão de MTH1 em células de melanoma, e relataram que MTH1 é regulado por poliubiquitinação mediada por E3 ligase Skp2. Em linhagens de células de melanoma e amostras de pacientes, foi observada uma correlação positiva da expressão de Skp2 e MTH1. Investigações mecanísticas mostraram que Skp2 limitou o dano ao DNA e a apoptose desencadeada por estresse redox e que MAPK regulou positivamente Skp2 e MTH1 para tornar as células mais resistentes a esse estresse.

Hu et al (2019), desenvolveram uma estratégia de dano oxidativo amplificado para terapia tumoral focada no aumento da geração de EROs, através de um processo fotodinâmico, e na inibição da atividade da enzima MTH1, simultaneamente. O inibidor

de MTH1, TH287, foi encapsulado com revestimento de sílica mesoporosa modificado com tetrafenilporfirina-zinco (Zn-Por) via coordenação metalo-supramolecular (PMPT). Zn-Por se comportou como fotossensibilizador para geração de EROs sob irradiação com laser e o TH287 liberado age impedindo o processo de reparo de danos mediado por MTH1, para agravar o dano oxidativo, resultando assim em toxicidade celular e inibição do crescimento do tumor.

Outra estratégia para atacar o sistema de defesa de células tumorais contra EROs, envolvendo uma melhor eficácia da terapia fotodinâmica e a supressão de MTH1, foi mostrada por Fan et al (2018). O estudo demonstrou a síntese e aplicação de nanopartículas de sílica mesoporosa, utilizadas como veículo multifuncional para o fornecimento simultâneo de siRNA *MTH1* e o fotossensibilizador Clorina e6 (Ce6), em linhagem celular humana de osteosarcoma e camundongos. Portanto, a supressão da função de MTH1 pode fornecer outra estratégia para melhorar a eficácia da PDT, melhorando a sensibilidade celular às EROs em células tumorais e, ao mesmo tempo, não modificando a regulação redox em células normais.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS

Os materiais utilizados para o cultivo celular, como meio de cultura RPMI 1640 e soro fetal bovino foram adquiridos da Gibco (Paisley, UK), e o bicarbonato de sódio, penicilina e estreptomicina da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). A estufa umidificada foi adquirida da Panasonic Healthcare Co (USA). Os reagentes ácido cítrico, acetato de amônio, EDTA, Sacarose, Tris, desferroxamina, ácido ascórbico, NaCl, NH₄Cl, albumina bovina, DTT, glicerol, Tween-20, MES, L-tirosina, 8-oxo-dG, dGTP, dGMP foram comprados da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Metanol grau HPLC, H₂O₂, CuSO₄ foram adquiridos da Merck (Darmstadt, Alemanha). Ácido fórmico e MgCl₂ foram comprados da Synth (Diadema, SP, Brasil), Triton X 100 da Vetec (Duque de Caxias, RJ, Brasil) e acetonitrila grau HPLC da JT-Baker (Phillipsburg, NJ, USA). Os *primers* utilizados para os genes *MTH1* e *HPRT* foram adquiridos da Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). A água ultrapura foi obtida por um sistema da GEHAKA (São Paulo, Brasil).

3.2 CULTIVO DE CÉLULAS B16-F10

As células de melanoma murino, cedidas pelo Prof. Dr. Roger Chammas (Escola de Medicina da Universidade de São Paulo, Brasil) foram cultivadas em garrafas estéreis com meio de cultura RPMI 1640 suplementado com 7,5% (v/v) de soro fetal bovino, 8 mM de bicarbonato de sódio, 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina, e mantidas em estufa umidificada contendo 5% (v/v) de CO₂ a 37 °C (CUNHA et al, 2012).

3.3 ESTÍMULO DA MELANOGÊNESE E FOTOSSENSIBILIZAÇÃO

O estímulo da síntese de melanina foi realizado com a incubação das células por 48 h (em estufa umidificada contendo 5% (v/v) de CO₂ a 37 °C) em meio de cultura RPMI 1640 suplementado com 0,4 mM de L-tirosina e 10 mM de NH₄Cl (KONGSHOJ et al, 2007), além da suplementação com 7,5% (v/v) de soro fetal bovino, 8 mM de bicarbonato de sódio, 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina (meio de

estímulo). O controle foi realizado com a incubação das células em meio RPMI 1640 com suplementação de 7,5% (v/v) de soro fetal bovino, 8 mM de bicarbonato de sódio, 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina, mas sem adição de L-tirosina e NH₄Cl (meio controle).

De acordo com Cunha et al (2012), as células estimuladas possuem menores taxas de proliferação, então, após 48 h, há aproximadamente 30% menos células em comparação com o controle. Assim, as células submetidas às condições de estímulo foram plaqueadas com um incremento de 15% em relação à condição controle: $5,75 \cdot 10^5$ e $5 \cdot 10^5$ células/placa, respectivamente. As células foram plaqueadas, com meio de cultura controle, 24 h antes do estímulo para adesão nas placas de cultura de células de 100 mm estéreis, e mantidas em estufa umidificada contendo 5% (v/v) de CO₂ a 37 °C (KALEGARI, 2017).

Com o objetivo de gerar oxigênio singlete (¹O₂) por fotossensibilização, as células B16-F10 foram incubadas com Rosa Bengala Acetato (RBAC), disponível no laboratório (sintetizado anteriormente conforme descrito em Suzukawa, 2012 e Webers, 2017) e luz visível verde, utilizando lâmpadas de diodo emissor de luz (LED), doadas pela empresa Cromatek - Cromax Eletrônica LTDA (São Paulo, Brasil), com pico de emissão em 526 ± 20 nm (KALEGARI, 2017). A irradiação ocorreu em uma câmara construída em MDF, formato cúbico e com dimensões internas de 22,5 cm (SUZUKAWA, 2012).

Após plaqueamento e adesão das células B16-F10, a melanogênese foi estimulada como descrito acima. Após 48 h, os meios de cultura foram substituídos por meio controle ou meio de estímulo (ambos sem RBAC) e pelo meio controle com adição de RBAC 10 µg/mL ou meio de estímulo com RBAC 10 µg/mL e as células incubadas em estufa durante 2 h. Após isso, todos os meios foram substituídos por HBSS e as células irradiadas com luz visível verde durante 15 min (condição claro) ou mantidas em estufa com papel alumínio (condição escuro) durante 15 min. Em seguida, para realizar análises imediatamente após o tratamento (0 h) o HBSS foi removido e para realizar 18 h após a irradiação, o HBSS foi substituído por meio de cultura controle e meio de estímulo, conforme o grupo, e as células mantidas em estufa umidificada contendo 5% (v/v) de CO₂ a 37 °C (KALEGARI, 2017).

3.4 DETERMINAÇÃO DE 8-oxo-dG (EXTRA E INTRACELULAR)

3.4.1 HPLC-EC e HPLC-PDA

Para determinar 8-oxo-dG excretado das células, foram coletados os sobrenadantes do tempo 0 h (HBSS) e do tempo 18h (meio controle e meio de estímulo). As amostras foram centrifugadas a 3000 xg por 5 min e o sobrenadante foi usado para a detecção e a quantificação de 8-oxo-dG em HPLC (Shimadzu, LC-20AD) com detector eletroquímico (130 e 380 mV; ESA Coulochem III, modelo 5011A/5020) e detector PDA (254 nm; Shimadzu SPD-M20A), conforme descrito por Shigenaga et al (1990) e Eblin et al (2006).

Os sobrenadantes (20 µL) foram injetados no HPLC utilizando uma coluna analítica de fase reversa C-18 (250 x 4,6 mm, 5 µm; Agilent), sob fluxo de 0,8 mL/min, fase móvel constituída por 90% de ácido cítrico 4 mmol/L, acetato de amônio 8 mmol/L, EDTA 20 mg/L, pH 4,0, e 10% de metanol grau HPLC, e tempo de corrida de 15 min. O sistema foi calibrado com solução padrão de 8-oxo-dG.

Para determinar 8-oxo-dG intracelular, as células foram retiradas das placas com tripsina, lavadas com PBS e centrifugadas a 3000 xg por 5 min para obter os *pellets* de células. Aos *pellets* adicionou-se tampão de lise (Sacarose 320 mmol/L, MgCl₂ 5 mmol/L, Tris HCl 10 mmol/L, desferroxamina 0,1 mmol/L, Triton X 100 1%, pH 7,5), e foram centrifugados a 5000 xg por 5 min. Em seguida, o sobrenadante obtido foi injetado no HPLC (20 µL), para detectar e quantificar 8-oxo-dG como descrito acima.

3.4.2 HPLC-MS/MS

Alternativamente, os sobrenadantes foram processados da seguinte forma: adição de 1,5 µL de solução contendo 750 fmol/µL de [¹⁵N₅]8-oxo-dG, homogeneização em vórtex e secagem completa a vácuo (em baixa temperatura); adição de 500 µL de metanol, homogeneização em vórtex e centrifugação por 10 min a 16000 xg; secagem completa a vácuo (em baixa temperatura) do sobrenadante obtido; e, por fim, as amostras foram ressuspensas em 75 µL de H₂O e centrifugadas por 5 min a 16000 xg. Em seguida, 50 µL foram injetados no sistema HPLC-ESI-

MS/MS (HPLC, Agilent 1200 series; ESI-MS/MS, Applied Biosystems/MDS Sciex Instruments).

As análises foram conduzidas com ionização por *electrospray* em modo positivo (ESI+, [M+H]⁺), utilizando os seguintes parâmetros otimizados: gás de interface (CUR), 15 psi; gás de nebulização (GS1), 45 psi; gás na fonte de íons (GS2), 50 psi; gás de dissociação induzida por colisão (CAD), LOW; temperatura da fonte do ESI (TEM), 650 °C; potencial de entrada (EP), 10 V; tensão do spray de íons (IS), 5500 V e foi utilizado o modo de monitoramento de reação múltipla (MRM) (TABELA 2). As razões entre as áreas (aduto/padrão interno) foram utilizadas para quantificação. Para as quantificações foram injetadas curvas de calibração no intervalo de 50 a 4000 fmol de 8-oxo-dG (750 fmol de [¹⁵N₅]8-oxo-dG).

TABELA 1 – MODO DE MONITORAMENTO DE REAÇÃO MÚLTIPLA

	Transição do MRM
¹⁵ N ₅ -8-oxodG	<i>m/z</i> 289,197 → <i>m/z</i> 173,000
8-oxodG	<i>m/z</i> 284,197 → <i>m/z</i> 167,900
8-oxodG	<i>m/z</i> 284,197 → <i>m/z</i> 140,000

FONTE: O autor (2019).

A seguinte condição cromatográfica foi utilizada: coluna Luna C-18 (150 x 2,0 mm, 3,0 μm, 100A; Phenomenex) com pré-coluna C-18 4,0 x 3,0 mm (Phenomenex, Torrance, CA), e eluição com um gradiente de ácido fórmico 0,1% em H₂O (Solução A) e metanol (Solução B), a 35 °C, com fluxo de 130 μL/min (0 - 30 min, 0 - 50% de B; 30 - 31 min, 50 - 80% de B; 31 - 36 min, 80% de B; 36 - 38 min, 80 - 0% de B; 38 - 48 min, 0% de B). A válvula de comutação de fluxo foi configurada para permitir a entrada de eluentes no espectrômetro de massas durante o intervalo de 13 a 28 min.

Os *pellets* de células foram ressuspendidos em 200 μL de solução de acetonitrila e H₂O (9:1; v/v) para a completa inibição do metabolismo celular, e processados da seguinte forma: adição de 800 μL de solução de solvente de extração (40% acetonitrila, 40% metanol e 20% H₂O) e os padrões internos, homogeneização em vórtex e secagem completa a vácuo (em baixa temperatura); adição de 1 mL de metanol, homogeneização em vórtex e centrifugação por 10 min a 16000 xg; secagem completa a vácuo (em baixa temperatura) do sobrenadante obtido; e, por fim, as amostras foram ressuspendidas em 75 μL de H₂O e centrifugadas por 5 min a 16000 xg. Em seguida, 50 μL foram injetados no sistema HPLC-ESI-MS/MS.

As análises no espectrômetro de massas foram conduzidas como descrito anteriormente, e para as quantificações foram injetadas curvas de calibração no intervalo de 50 a 1000 fmol de 8-oxo-dG (1000 fmol de [¹⁵N₅]8-oxo-dG). A seguinte condição cromatográfica foi utilizada: coluna Luna C-18 (150 x 2,0 mm, 3,0 µm, 100A; Phenomenex) com pré-coluna C-18 4,0 x 3,0 mm (Phenomenex, Torrance, CA), e eluição com um gradiente de ácido fórmico 0,1% em H₂O (Solução A) e ácido fórmico 0,1% em metanol (Solução B), a 35 °C, com fluxo de 130 µL/min (0 - 30 min, 0 - 50% de B; 30 - 31 min, 50 - 80% de B; 31 - 36 min, 80% de B; 36 - 38 min, 80 - 0% de B; 38 - 48 min, 0% de B). A válvula de comutação de fluxo foi configurada para permitir a entrada de eluentes no espectrômetro de massas durante o intervalo de 8 a 43 min.

3.5 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DE *MTH1* POR RT-qPCR

Após a realização dos tratamentos, as células foram retiradas das placas com tripsina, lavadas com PBS e centrifugadas a 3000 xg por 5 min para obter os *pellets* de células. Em seguida, o RNA foi extraído utilizando o kit ilustra RNASpin Mini (GE-Healthcare, UK), de acordo com as instruções do fabricante, quantificado através da medida de absorvância em 260 e 280 nm (Nanodrop 1000 – Thermo Scientific), e armazenado a - 80 °C.

Posteriormente, a síntese do cDNA, a partir do RNA extraído, foi realizada utilizando um kit convencional ImProm II Reverse Transcription System (Promega, EUA), seguindo as especificações do fabricante, que contém a enzima transcriptase reversa e um conjunto de reagentes projetados para a síntese de DNA a partir de um mRNA poli (A), em termociclador: 5 min a 25 °C (incubação); 1 h a 42 °C (síntese); 15 min a 70 °C (inativação da enzima) e 10 min a 4 °C. O cDNA recém sintetizado foi armazenado a - 20 °C (CUNHA, 2012).

O cDNA sintetizado foi então submetido a análise de expressão gênica através de PCR Quantitativo em tempo real (qPCR), utilizando iniciadores específicos (TABELA 1) para o gene de interesse *MTH1* e o gene de controle interno *HPRT*.

Primeiramente, foram realizados testes iniciais e padronização dos *primers* *MTH1* e *HPRT* no equipamento Rotor-Gene Q (Corbett Research), e a mistura de reação constituiu-se por: 5 µL de cDNA 1:50; 5 µL de *primer* (combinação F (forward) e R (reverse)); e 10 µL de BrightGreen 2X qPCR MasterMix-No Dye (abm). Alternativamente, foi utilizado o equipamento StepOnePlus Real-Time PCR System

(Applied Biosystems) para verificar a eficiência dos *primers* e analisar a expressão de *MTH1* nas amostras. A mistura de reação constituiu-se por: 1 µL de cDNA 1:5; 1 µL de *primer* (combinação F (forward) e R (reverse)); 0,5 µL de H₂O *nuclease free*; e 2,5 µL de Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), composto por AmpliTaq Gold® DNA Polimerase altamente purificada, corante ROX™, mistura de dNTPs e tampões otimizados.

A reação, nos dois equipamentos, ocorreu com 50 ciclos de amplificação, alternando-se a temperatura de: 1) Desnaturação do DNA molde: 10 s a 95 °C; 2) Anelamento dos *primers*: 20 s a 57-60 °C; 3) Temperatura ótima da Taq polimerase: 20 s a 72 °C. .

A expressão do gene *MTH1* foi normalizada pelo gene de referência *HPRT*, e obtida utilizando o método $\Delta\Delta CT$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001), considerando a eficiência dos *primers* utilizados. $\Delta\Delta CT$ representa a razão da eficiência do gene alvo elevada ao ΔCT do gene alvo, pela eficiência do gene de referência elevada ao ΔCT do gene referência ($\Delta\Delta CT = (E_{MTH1})^{\Delta CT_{MTH1}} / (E_{HPRT})^{\Delta CT_{HPRT}}$), e ΔCT representa o valor de CT do controle subtraído pelo valor de CT de cada amostra ($\Delta CT = CT_{controle} - CT_{amostra}$).

TABELA 2 – OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES UTILIZADOS PARA A REAÇÃO DE RT-qPCR

Gene	Concentração	Sequência
<i>MTH1-F</i>	800 nM	5'-AAGGTGCAGGAAGGAGAGAC-3'
<i>MTH1-R</i>	800 nM	5'-GCCGAGAAGATATGCACGTC-3'
<i>HPRT-F</i>	800 nM	5'-TCCCTGGTTAAGCAGTACAGCCCC-3'
<i>HPRT-R</i>	800 nM	5'-AGTCTGGCCTGTATCCAACACTTCG-3'

FONTE: O autor (2019).

3.6 ANÁLISE DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE 8-oxo-dGMPase E 8-oxo-dGTPase

3.6.1 Síntese e purificação de 8-oxo-dGMP e 8-oxo-dGTP

Para sintetizar ambos os substratos foi utilizada uma mistura reacional contendo: 3,7 mmol/L de dGTP ou dGMP, 140 mmol/L de ácido ascórbico, H₂O₂ 5% v/v e 1,3 mmol/L de CuSO₄. Em seguida, a amostra reacional foi mantida a 37 °C sob agitação branda durante 1 h no escuro (PERES, 2016).

Para purificar os compostos sintetizados, utilizou-se o HPLC com detector PDA (254 nm), coluna analítica de fase reversa C-18 (250 x 4,6 mm, 5 µm; Agilent),

sob fluxo de 0,8 mL/min, e um gradiente linear de fase móvel partindo de 2% de metanol e 98% de trietilamina hidrogenocarbonato 0,1M, a 10% de metanol de 5 a 15 min e retorno para 2% de metanol de 15 a 20 min, finalizando a corrida em 25 min. Os volumes coletados de 8-oxo-dGTP e 8-oxo-dGMP foram liofilizados e, em seguida, dissolvidos em 1 mL de água ultrapura.

A concentração dos compostos foi determinada em espectrofotômetro UV-VIS (Shimadzu, UV-2450), através da medida de absorbância, utilizando o coeficiente de extinção molar ϵ_{296} 8-oxo-dGTP = $7868 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{L}$ (TRILINK BIOTECHNOLOGIES, 2019) para os dois compostos.

3.6.2 Atividade de 8-oxo-dGMPase

A atividade de 8-oxo-dGMPase foi analisada através da formação de 8-oxo-dG a partir de 8-oxo-dGMP. Ao *pellet* de células obtido foi adicionado 100 μL de tampão, contendo 20 mM de MES-NaOH (pH 6,5), 4 mM MgCl_2 , 80 $\mu\text{g/mL}$ de albumina bovina, 8mM de DTT, 2% de glicerol e 0,005% de Tween-20. Após centrifugação por 5 min a 5000 xg, adicionou-se 10 μL de 8-oxo-dGMP 0,13 mM a 50 μL do sobrenadante, a fim de obter 22 μM do substrato na reação. A reação ocorreu por 20 min a 37 °C, sob agitação branda (HAYAKAWA et al, 1995). Em seguida, 20 μL da mistura reacional foi injetada no HPLC-PDA, para detectar e quantificar a formação do produto 8-oxo-dG, como já descrito anteriormente. O sistema foi calibrado com solução padrão de 8-oxo-dG, de 25 a 0,25 μM .

Os valores de concentração de 8-oxo-dG obtidos foram normalizados por quantidade total de proteínas, utilizando-se o método de Bradford (1976). 20 μL de amostra foram adicionados a 180 μL do reagente de Bradford, e após 10 min, realizou-se leitura espectrofotométrica em 595 nm (leitor de microplacas, Epoch Biotek). A concentração de proteínas foi calculada com base na utilização de uma curva-padrão de albumina serina bovina (BSA) de 0,8 a 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

3.6.3 Atividade de 8-oxo-dGTPase

A atividade de 8-oxo-dGTPase foi analisada através da formação de 8-oxo-dG a partir de 8-oxo-dGTP. Ao *pellet* de células obtido foi adicionado 100 μL de tampão, contendo 20 mM de Tris-HCl (pH 8), 4 mM MgCl_2 , 40 mM NaCl, 80 $\mu\text{g/mL}$ de

albumina bovina, 8mM de DTT, 10% de glicerol e 0,005% de Tween-20. Após centrifugação por 5 min a 5000 xg, 5 μ L de 8-oxo-dGTP 0,44 mM a 50 μ L do sobrenadante, a fim de obter 40 μ M do substrato na reação. A reação ocorreu por 20 min a 30 °C, sob agitação branda (MO; MAKI; SEKIGUCHI, 1992). Em seguida, 50 μ L da mistura reacional foi injetada no HPLC-PDA, para detectar e quantificar a formação do produto 8-oxo-dG, como já descrito anteriormente. O sistema foi calibrado com solução padrão de 8-oxo-dG, de 25 a 0,25 μ M.

Alternativamente, a atividade de 8-oxo-dGTPase também foi analisada através da detecção de pirofosfato inorgânico (PPi) utilizando o kit *PPiLight inorganic pyrophosphate assay* (Lonza; Basel, Switzerland). Ao *pellet* de células obtido foi adicionado 100 μ L de tampão, contendo 20 mM de Tris-HCl (pH 8), 4 mM MgCl₂, 40 mM NaCl, 80 μ g/mL de albumina bovina, 8mM de DTT, 10% de glicerol e 0,005% de Tween-20. Após centrifugação por 5 min a 5000 xg, adicionou-se 5 μ L de 8-oxo-dGTP 0,44 mM a 50 μ L do sobrenadante, a fim de obter 40 μ M do substrato na reação. A reação ocorreu por 20 min a 30 °C, sob agitação branda (MO; MAKI; SEKIGUCHI, 1992). Em seguida, em uma placa branca de 96 poços foram adicionados 40 μ L da mistura reacional, 20 μ L do reagente *converting* e após incubação por 30 min a temperatura ambiente, 20 μ L do reagente *detection*. Após 30 min de incubação a temperatura ambiente, foi realizada a leitura de luminescência (leitor de microplacas, Tecan) em 0,1 s (tempo de integração). Para quantificar o PPi formado, foi utilizada uma curva-padrão de pirofosfato de sódio de 0,2 a 0,04 μ M.

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram analisados com o *software* Prisma 6. As repetições e tratamentos foram avaliados pela análise de variância (ANOVA). As diferenças entre os tratamentos e controle foram avaliadas pelo teste Tukey, com nível de significância $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

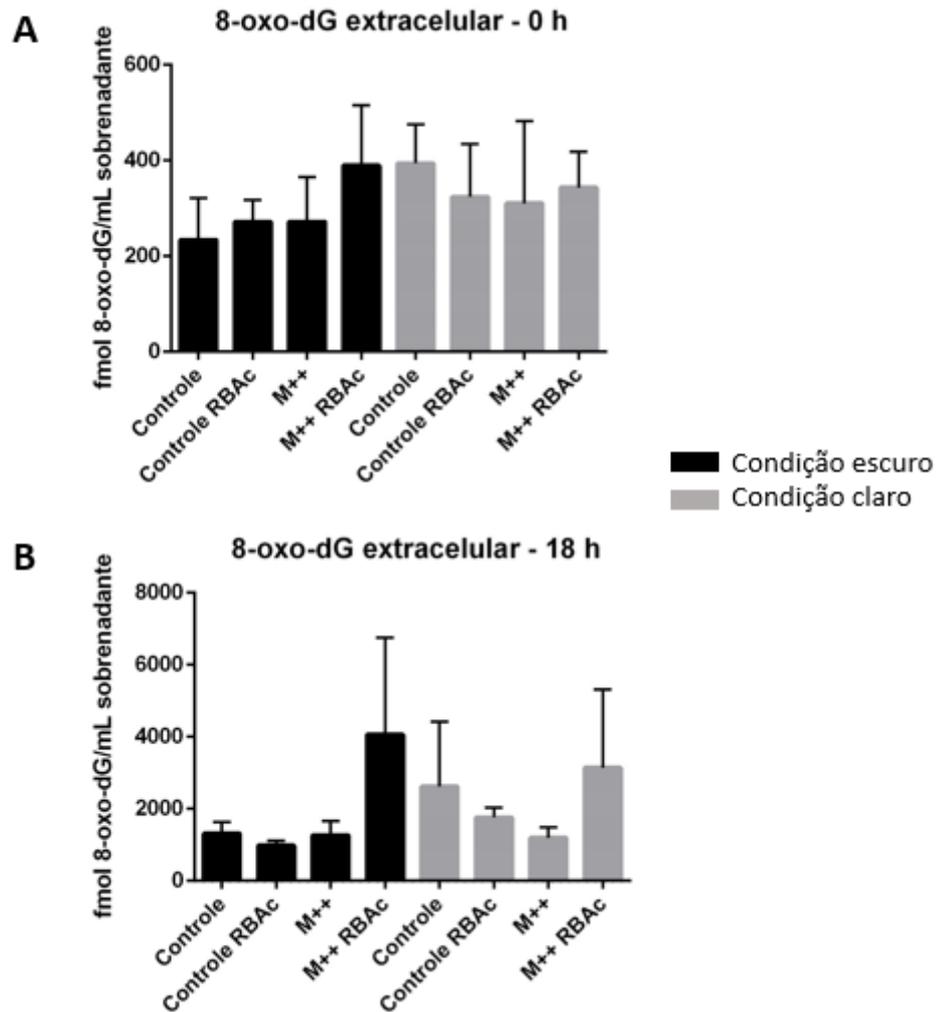
4.1 DETERMINAÇÃO DE 8-oxo-dG (EXTRA E INTRACELULAR)

4.1.1 8-oxo-dG Extracelular

Para determinar a quantidade de 8-oxo-dG excretada das células, no tempo de 0 h após os tratamentos, foi coletado e analisado o HBSS após os 15 min de irradiação, enquanto no tempo de 18 h após o tratamento, foi coletado e analisado o meio de cultura utilizado durante este período de incubação das células. As tentativas iniciais de detectar e quantificar 8-oxo-dG por HPLC com os detectores eletroquímico e PDA não foram satisfatórios, pois o limite de detecção não foi suficiente (dados não mostrados). Então, alternativamente, as amostras foram enviadas para a Universidade de São Paulo para serem processadas e analisadas por HPLC-MS/MS, onde foi possível obter uma sensibilidade suficiente para detectar e quantificar 8-oxo-dG nos sobrenadantes.

A quantidade de 8-oxo-dG obtida em cada grupo de tratamento está demonstrada na FIGURA 8, de acordo com os tempos de coleta das amostras (0 e 18 h) e condições submetidas de claro (irradiadas) e escuro. Os resultados mostraram que a quantidade de 8-oxo-dG formada e excretada das células incubadas com RBAC com e sem a melanogênese estimulada (M++ RBAC e Controle RBAC, respectivamente) ou só com estímulo de melanogênese (M++), não apresentou diferença estatística entre os grupos e o controle, tanto submetidas a irradiação (claro) quanto não submetidas (escuro). Após 18 h também não houve diferença estatística entre os grupos e o controle. Entretanto, pode-se observar e ressaltar a diferença na quantidade de 8-oxo-dG entre os tempos de 0 e 18 h, sendo que 18 h após os tratamentos os valores de 8-oxo-dG excretados foram aproximadamente 10 x superiores que os de 0 h. Esse resultado era esperado, já que os níveis detectados em 0h representam o total excretado em 15 min, enquanto que os níveis detectados em 18h representam o saldo de uma crescente formação do dano oxidativo ao longo do tempo, a ação das enzimas de sanitização e também processos de degradação da 8-oxodGuo, já que é um produto suscetível a subsequente oxidação (MARTINEZ et al, 2002).

FIGURA 8 – QUANTIFICAÇÃO DE 8-oxo-dG EXTRACELULAR



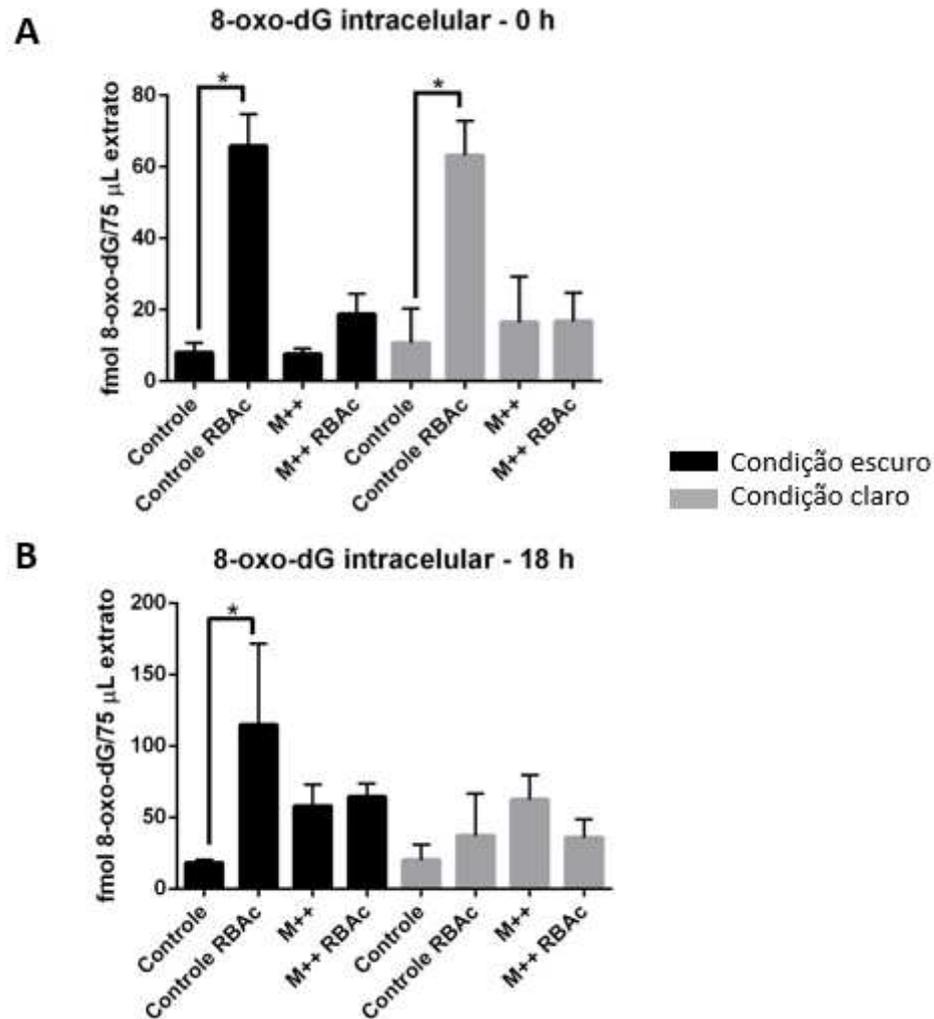
FONTE: O autor (2019).

LEGENDA: As células B16-F10 foram plaqueadas ($5 \cdot 10^5$ células na condição controle e $5,75 \cdot 10^5$ células na condição de estímulo da melanogênese) e incubadas para adesão a 37°C e 5% de CO_2 por 24 h. Em seguida, a melanogênese foi estimulada por 48 h utilizando 0,4 mM L-Tirosina e 10 mM NH_4Cl e a fotossensibilização foi realizada. A quantidade de 8-oxo-dG extracelular foi determinada por HPLC-MS/MS nos tempos 0 h (A) e 18 h (B) após os tratamentos. Os dados são apresentados como a média \pm DP de três experimentos independentes.

4.1.2 8-oxo-dG Intracelular

Para determinar a quantidade de 8-oxo-dG produzida nas células, nos tempos de 0 e 18 h após a realização dos tratamentos, foram obtidos os *pellet* de células, os quais foram processados e analisados no HPLC-MS/MS. A quantidade de 8-oxo-dG obtida em cada grupo de tratamento está demonstrada na FIGURA 9, de acordo com os tempos de coleta das amostras (0 e 18 h) e condições submetidas de claro (irradiadas) e escuro.

FIGURA 9 – QUANTIFICAÇÃO DE 8-oxo-dG INTRACELULAR



FONTE: O autor (2019).

LEGENDA: As células B16-F10 foram plaqueadas ($5 \cdot 10^5$ células na condição controle e $5,75 \cdot 10^5$ células na condição de estímulo da melanogênese) e incubadas para adesão a 37°C e 5% de CO_2 por 24 h. Em seguida, a melanogênese foi estimulada por 48 h utilizando 0,4 mM L-Tirosina e 10 mM NH_4Cl e a fotossensibilização foi realizada. A quantidade de 8-oxo-dG intracelular foi determinada por HPLC-MS/MS nos tempos 0 h (A) e 18 h (B) após os tratamentos. Os dados são apresentados como a média \pm DP de três experimentos independentes. * $p < 0,05$.

De maneira geral, as quantidades de 8-oxo-dG formadas foram muito baixas e próximas ao limite de detecção da curva de calibração (50 a 1000 fmol). Entretanto, os valores obtidos nos grupos em que as células foram incubadas com RBAC (Controle RBAC) e sem irradiação (condição escuro) apresentaram diferença estatística em relação ao controle em 0 e 18 h. Este mesmo grupo (Controle RBAC) na condição claro, também apresentou diferença estatística em relação ao seu respectivo controle, imediatamente após a realização da fotossensibilização (0 h). Este resultado pode indicar que apenas a presença do corante pode estar gerando dano oxidativo na célula

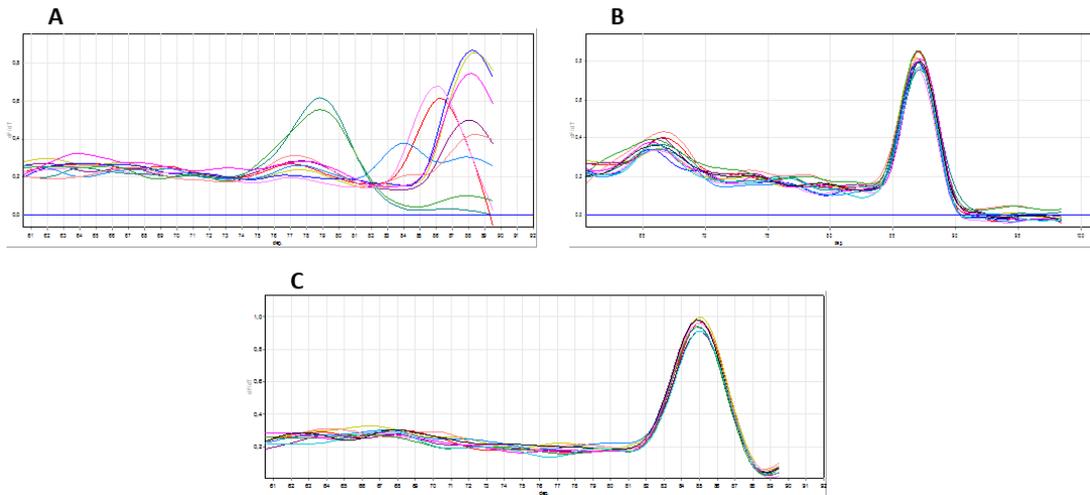
e que a geração de $^1\text{O}_2$ (na condição claro 0 h) não aumentou o nível de 8-oxo-dG intracelular em relação ao dano já gerado na condição escuro 0 h, ou ainda, que o $^1\text{O}_2$ possa também ter reagido com a 8-oxodGuo (MARTINEZ et al, 2002) formando outros produtos que não foram monitorados neste trabalho.

4.2 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DE *MTH1* POR RT-qPCR

4.2.1 Padronização da temperatura de anelamento dos *primers*

Inicialmente, foram realizados testes com temperaturas diferentes de anelamento para cada *primer* (FIGURA 10), a fim de obter a formação de apenas um pico na curva de *melting*, o que representa a formação de apenas um produto e assim especificidade do *primer*. Primeiramente foi testada a temperatura padrão (comumente utilizada) de 60 °C, e foi adequada ao gene *HPRT* (controle interno), como pode ser visualizado na FIGURA 10 – C, em que todas as amostras testadas apresentaram a formação de um único pico. Porém, esta temperatura não funcionou para o gene *MTH1* (FIGURA 10 – A), pois vários picos foram formados. Após testes, a temperatura foi ajustada para 57 °C, em que conseguiu-se a formação de um único pico (FIGURA 10 – B), como para o gene *HPRT*.

FIGURA 10 – CURVAS DE MELTING

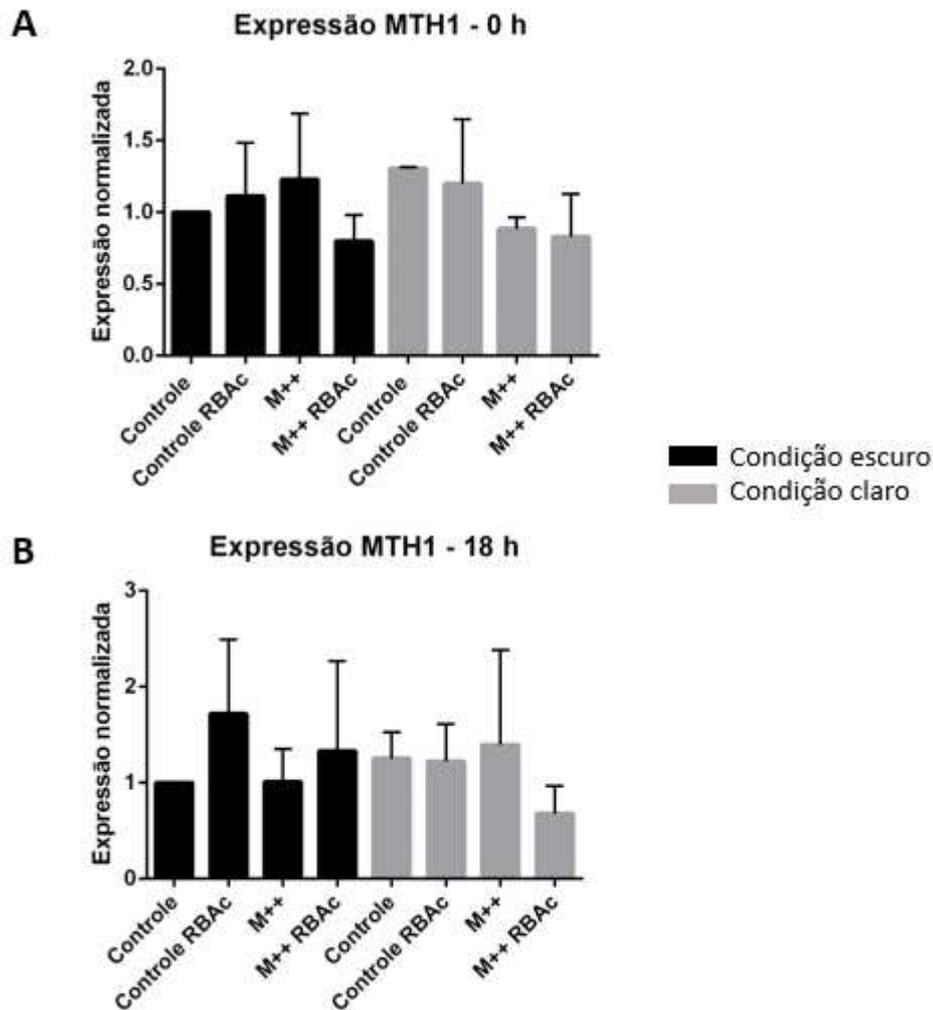


FONTE: O autor (2019).

LEGENDA: As curvas de *melting* apresentadas correspondem aos *primers* do gene *MTH1* à temperatura de anelamento de 60 °C (A) e à 57 °C (B), e do gene *HPRT* (C) à temperatura de anelamento de 60 °C.

4.2.2 Expressão do gene *MTH1*

Para analisar a expressão gênica de *MTH1* nas células por PCR em tempo real, foi utilizado o cDNA sintetizado a partir do RNA extraído nos tempos 0 e 18 h após a realização dos tratamentos: estímulo da melanogênese, fotossensibilização com RBAC e ambos simultaneamente. Os valores obtidos de expressão do gene *MTH1*, em cada grupo de tratamento, foram normalizados pelo gene de controle interno *HPRT* e estão demonstrados na FIGURA 11.

FIGURA 11 – EXPRESSÃO DO GENE *MTH1* NORMALIZADA PELO GENE *HPRT*

FONTE: O autor (2019).

LEGENDA: As células B16-F10 foram plaqueadas ($5 \cdot 10^5$ células na condição controle e $5,75 \cdot 10^5$ células na condição de estímulo da melanogênese) e incubadas para adesão a 37°C e 5% de CO_2 por 24 h. Em seguida, a melanogênese foi estimulada por 48 h utilizando 0,4 mM L-Tirosina e 10 mM NH_4Cl e a fotossensibilização foi realizada. A expressão de *MTH1* foi determinada por RT-qPCR nos tempos 0 h (A) e 18 h (B) após os tratamentos. Os dados são apresentados como a média \pm DP de três experimentos independentes.

Os dados de avaliação da expressão do gene *MTH1* imediatamente (0 h) após as células serem incubadas com RBAC e irradiadas (com e sem a melanogênese estimulada) (M++ RBAC e Controle RBAC, respectivamente) ou só com estímulo de melanogênese (M++), não apresentou diferença estatística entre os grupos e o controle, tanto submetidas a irradiação (claro) quanto não submetidas (escuro). Após 18 h também não houve diferença estatística entre os grupos e o controle, mesmo que seja observada uma tendência de diminuição na expressão de *MTH1* no grupo com RBAC e melanogênese estimulada (M++ RBAC) na condição claro (com irradiação).

Dessa forma, não se pode alegar que houve alguma modulação na transcrição do gene *MTH1* de células de melanoma B16-F10 quando comparadas a células tratadas com RBAC com ou sem irradiação, mesmo em condições de melanogênese estimulada.

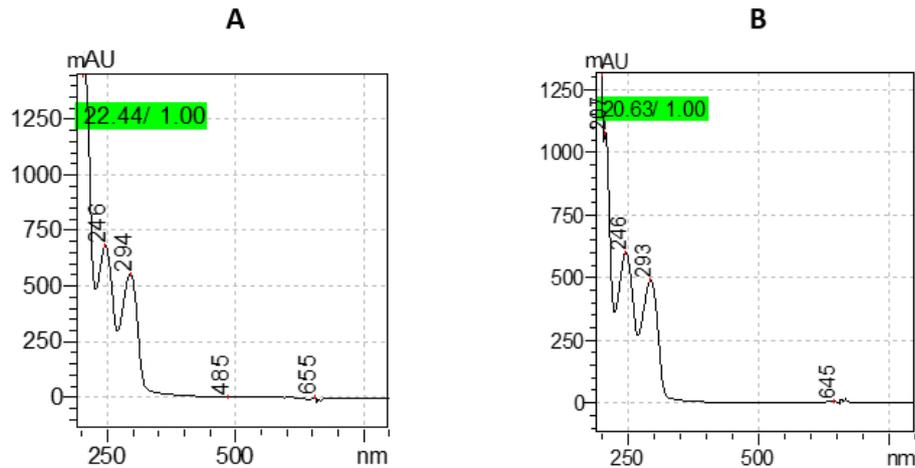
4.3 ANÁLISE DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

4.3.1 Síntese e purificação de 8-oxo-dGMP e 8-oxo-dGTP

Com o intuito de obter 8-oxo-dGMP e 8-oxo-dGTP em quantidades suficientes para realizar os experimentos de atividade das enzimas 8-oxo-dGMPase e 8-oxo-dGTPase, respectivamente, foi utilizada a metodologia desenvolvida pela Dra. Patrícia da Silva Peres, no próprio laboratório, para a síntese de 8-oxo-dG (PERES; VALERIO; MARTINEZ, 2016). Esta metodologia visou a síntese mais eficiente e simples do nucleosídeo modificado 8-oxo-dG, e também mostrou-se eficiente para os nucleosídeos fosfatados 8-oxo-dGMP e 8-oxo-dGTP, utilizando uma reação composta por dGMP ou dGTP 3,7 mmol/L, ácido ascórbico 140 mmol/L, CuSO_4 1,3 mmol/L e H_2O_2 5% v/v, e incubação a 37 °C durante 1 h.

Após a realização das sínteses, as amostras foram injetadas em HPLC e os produtos 8-oxo-dGMP e 8-oxo-dGTP foram separados, dos seus precursores dGMP e dGTP, e coletados sob fluxo de 0,8 mL/min de um gradiente linear de fase móvel partindo de 2% de metanol e 98% de trietilamina hidrogenocarbonato 0,1M, a 10% de metanol de 5 a 15 min e retorno para 2% de metanol de 15 a 20 min, finalizando a corrida em 25 min. A formação dos produtos foi observada e confirmada pelo seu espectro UV em 254 nm (FIGURA 12).

FIGURA 12 – ESPECTRO DE ABSORÇÃO DO 8-oxo-dGTP E 8-oxo-dGMP EM 254 nm

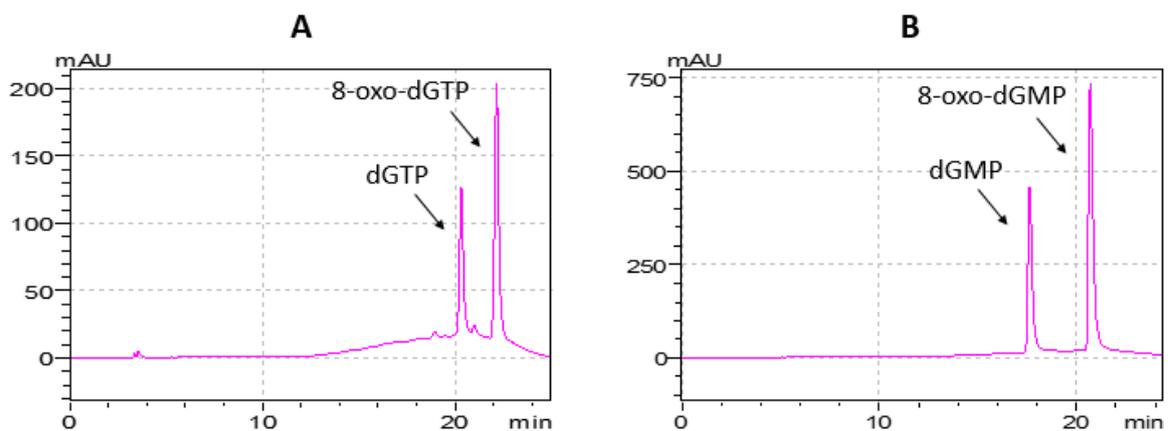


FONTE: O autor (2019).

LEGENDA: Perfil de escaneamento por detecção PDA dos produtos sintetizados 8-oxo-dGTP (A) e 8-oxo-dGMP (B) em HPLC utilizando gradiente de trietilamina hidrogenocarbonato 0,1 M e metanol (C) como segue: 0 – 5 min, 2% C; 5 – 15 min, 10% C; 15 – 20 min, 2% C até 25 min.

O produto 8-oxo-dGTP foi coletado entre 22 e 23 min de corrida, enquanto dGTP eluiu entre 20 e 21 min, e o produto 8-oxo-dGMP foi coletado entre 20 e 21 min de corrida e dGMP eluiu entre 17 e 18 min (FIGURA 13). Portanto, ambos os produtos obtidos apresentaram boa separação cromatográfica dos seus respectivos precursores.

FIGURA 13 – CROMATOGRAMAS DOS PRODUTOS 8-oxo-dGTP E 8-oxo-dGMP E DOS PADRÕES dGTP E dGMP



FONTE: O autor (2019).

LEGENDA: Cromatogramas das injeções de 20 μ L de 8-oxo-dGTP 0,858 mM juntamente com o padrão comercial de dGTP 0,1 mM (A) e 20 μ L de 8-oxo-dGMP 1mM juntamente com o padrão comercial de dGMP 1mM (B) utilizando gradiente de trietilamina hidrogenocarbonato 0,1 M e metanol (C) como segue: 0 – 5 min, 2% C; 5 – 15 min, 10% C; 15 – 20 min, 2% C até 25 min.

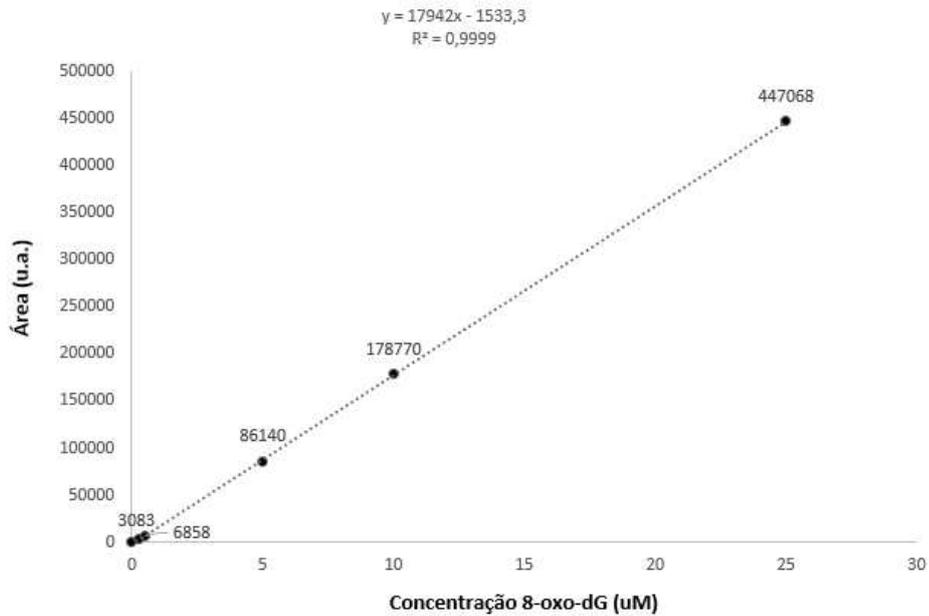
Após a coleta dos produtos, eles foram liofilizados, dissolvidos em 1 mL de água ultrapura e as concentrações obtidas foram 8-oxo-dGMP 3,27 mM e 8-oxo-dGTP 0,858 mM. Em seguida, foram armazenados em temperatura de - 20 °C.

4.3.2 Atividade de 8-oxo-dGMPase

Para analisar a atividade da enzima 8-oxo-dGMPase, foi realizada a quantificação do produto da ação enzimática 8-oxo-dG após incubação com o substrato 8-oxo-dGMP, por HPLC-PDA. Primeiramente, obteve-se uma curva padrão de 8-oxo-dG comercial, nas concentrações de 25, 10, 5, 0,5 e 0,25 μ M (FIGURA 14), abrangendo as condições de 100 a 1% de conversão enzimática, considerando a concentração de 22 μ M de 8-oxo-dGMP na reação.

Em seguida, foram realizadas as injeções no HPLC de 4 réplicas biológicas das amostras incubadas com o substrato e sem adição do substrato, como controle negativo de cada amostra. O produto desejado 8-oxo-dG foi eluído entre 10 e 11 min de corrida, apresentando boa separação do substrato 8-oxo-dGMP que obteve tempo de eluição entre 5 e 6 min (FIGURA 15). Também foi realizada a injeção de 8-oxo-dGMP diluído no tampão de lise, para confirmar o tempo de retenção do substrato. A formação de 8-oxo-dG foi observada através do tempo de retenção do padrão comercial de 8-oxo-dG, em comparação com o padrão de 8-oxo-dGMP (FIGURA 16), e confirmada pelo seu espectro UV em 254 nm (FIGURA 17). A quantificação foi realizada utilizando-se a equação da reta obtida através da curva padrão demonstrada (FIGURA 14).

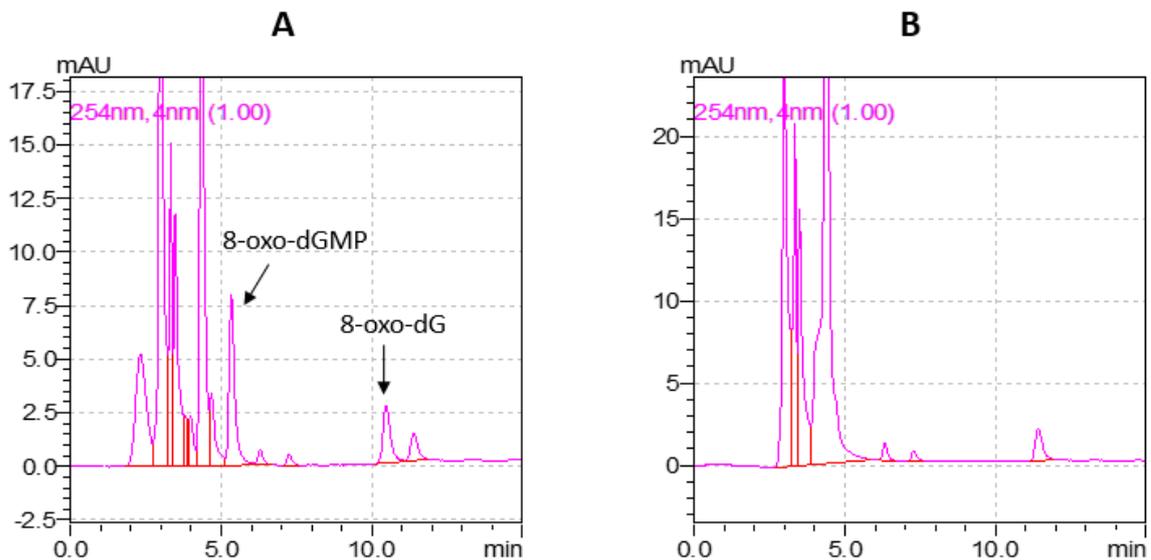
FIGURA 14 – CURVA PADRÃO DE 8-oxo-dG



FONTE: O autor (2019).

LEGENDA: Curva padrão obtida com injeções de 20 µL do padrão comercial de 8-oxo-dG de 25 a 0,25 µM em HPLC-PDA utilizando fase móvel constituída por 90% de ácido cítrico 4 mmol/L, acetato de amônio 8 mmol/L, EDTA 20 mg/L, e 10% de metanol.

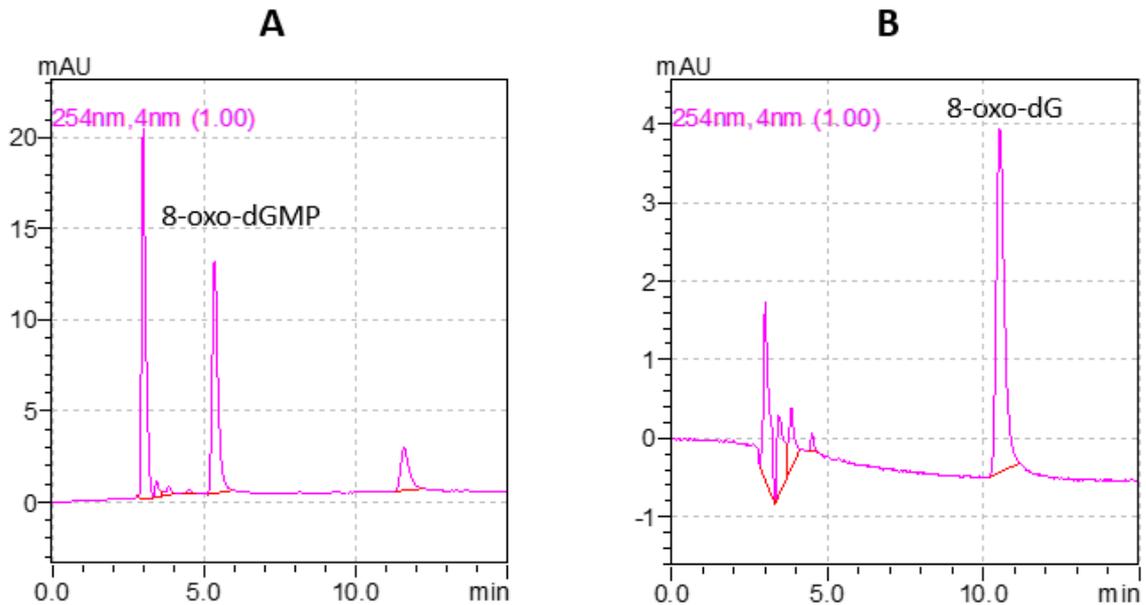
FIGURA 15 – CROMATOGRAMAS DE AMOSTRA COM E SEM ADIÇÃO DE 8-oxo-dGMP



FONTE: O autor (2019).

LEGENDA: Cromatogramas das injeções de 20 µL de amostra incubada com o substrato 8-oxo-dGMP e formação de 8-oxo-dG (A) e 20 µL de amostra sem incubação com o substrato 8-oxo-dGMP como controle negativo (B), utilizando fase móvel constituída por 90% de ácido cítrico 4 mmol/L, acetato de amônio 8 mmol/L, EDTA 20 mg/L, e 10% de metanol.

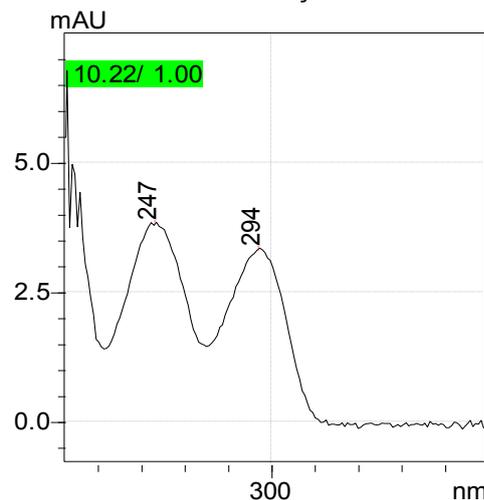
FIGURA 16 – CROMATOGRAMAS DOS PADRÕES DE 8-oxo-dGMP e 8-oxo-dG



FONTE: O autor (2019).

LEGENDA: Cromatogramas das injeções de 20 μ L de 8-oxo-dGMP 0,12 mM diluído em 50 μ L do tampão de lise (A) e 20 μ L de 8-oxo-dG comercial 5 μ M (em água) (B), utilizando fase móvel constituída por 90% de ácido cítrico 4 mmol/L, acetato de amônio 8 mmol/L, EDTA 20 mg/L, e 10% de metanol. No cromatograma (A) o pico que aparece entre 11 e 12 min de corrida é referente a algum composto presente no tampão de lise.

FIGURA 17 – ESPECTRO DE ABSORÇÃO DO 8-oxo-dG EM 254 nm

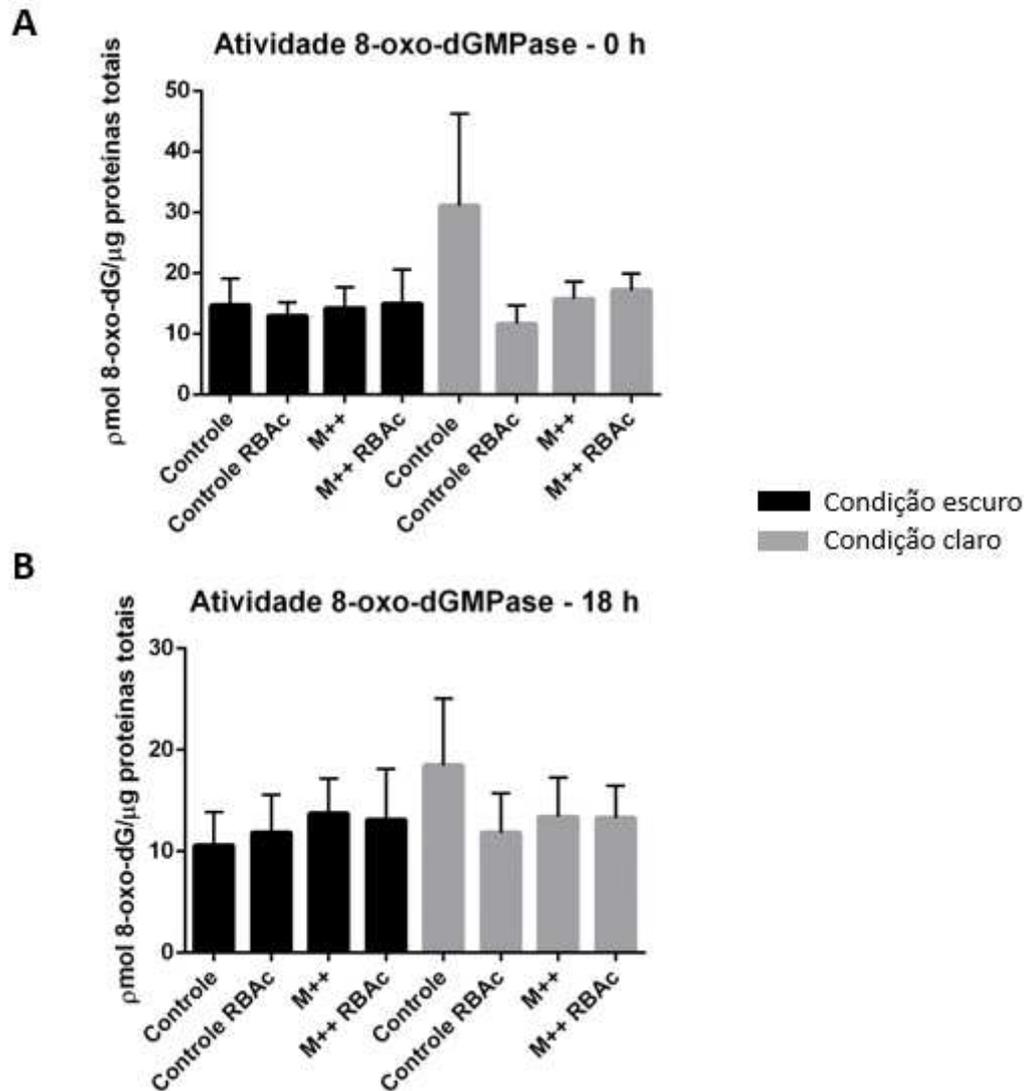


FONTE: O autor (2019).

LEGENDA: Perfil de escaneamento por detecção PDA do padrão de 8-oxo-dG 5 μ M em HPLC utilizando fase móvel constituída por 90% de ácido cítrico 4 mmol/L, acetato de amônio 8 mmol/L, EDTA 20 mg/L, e 10% de metanol.

A quantidade de 8-oxo-dG obtida em cada grupo de tratamento foi normalizada pela quantidade de proteínas totais, e está demonstrada na FIGURA 18, de acordo com os tempos de coleta das amostras (0 e 18 h) e condições submetidas de claro (irradiadas) e escuro.

FIGURA 18 – ATIVIDADE DA ENZIMA 8-oxo-dGMPase EM CÉLULAS B16-F10



FONTE: O autor (2019).

LEGENDA: As células B16-F10 foram plaqueadas ($5 \cdot 10^5$ células na condição controle e $5,75 \cdot 10^5$ células na condição de estímulo da melanogênese) e incubadas para adesão a 37°C e 5% de CO_2 por 24 h. Em seguida, a melanogênese foi estimulada por 48 h utilizando 0,4 mM L-Tirosina e 10 mM NH_4Cl e a fotossensibilização foi realizada. A atividade da enzima 8-oxo-dGMPase foi determinada através da quantificação de 8-oxo-dG por HPLC-PDA nos tempos 0 h (A) e 18 h (B) após os tratamentos. Os dados são apresentados como a média \pm DP de quatro experimentos independentes.

Os resultados mostraram que a quantidade de 8-oxo-dG formada pela ação da enzima 8-oxo-dGMPase nas células incubadas com RBAC com e sem a melanogênese estimulada (M++ RBAC e Controle RBAC, respectivamente) ou só com estímulo de melanogênese (M++), não apresentou diferença estatística entre os grupos e o controle, tanto submetidas a irradiação (claro) quanto não submetidas (escuro). Após o tempo de recuperação de 18 h, também não houve diferença estatística, portanto a atividade da enzima 8-oxo-dGMPase em células B16-F10 não apresentou modulação pela ação oxidante de $^1\text{O}_2$ e pela ação fotoprotetora ou fotossensibilizadora da melanina, até 18 h após os tratamentos.

4.3.3 Atividade de 8-oxo-dGTPase

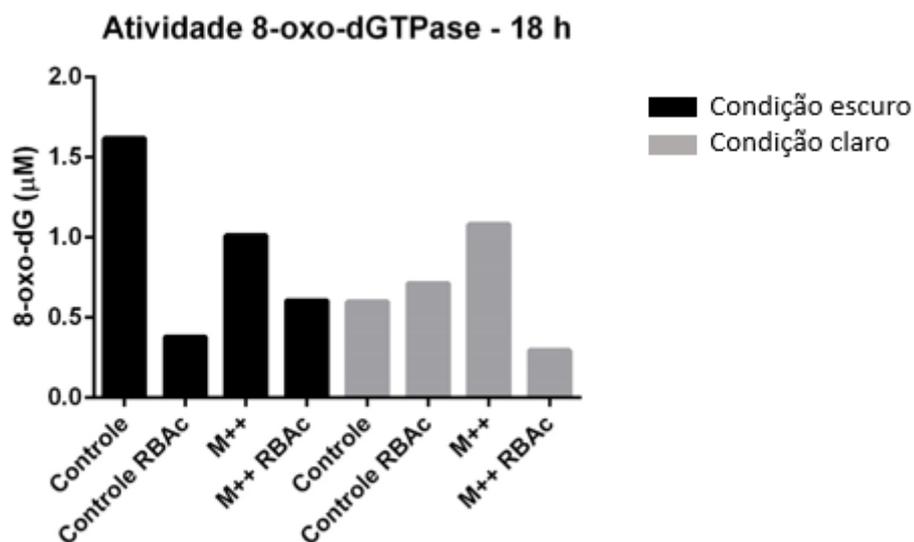
Para analisar a atividade da enzima 8-oxo-dGTPase, inicialmente, foi realizada a tentativa de quantificar o produto da ação enzimática 8-oxo-dGMP após incubação com o substrato 8-oxo-dGTP, por HPLC-PDA (dados não mostrados). Porém, a formação de 8-oxo-dGMP mostrou-se muito instável e de fácil degradação, portanto esta detecção e quantificação não foi possível através desta metodologia.

Em seguida, buscou-se quantificar o produto final, 8-oxo-dG, da degradação enzimática envolvendo 8-oxo-dGTPase e 8-oxo-dGMPase, após incubação com o substrato 8-oxo-dGTP, por HPLC-PDA. Primeiramente, utilizou-se a concentração de 20 μM de substrato na reação, porém, não houve detecção de 8-oxo-dG nas amostras (dados não mostrados). Em seguida, utilizou-se a concentração de 40 μM de substrato na reação e conseguiu-se detectar e quantificar 8-oxo-dG apenas nas amostras coletadas 18 h após a realização dos tratamentos, e em uma réplica biológica, de duas que foram realizadas. A formação do produto 8-oxo-dG foi observada e confirmada como descrito na atividade de 8-oxo-dGMPase. A quantificação foi realizada utilizando-se a equação da reta obtida através da curva padrão demonstrada (FIGURA 14).

A quantidade de 8-oxo-dG obtida está demonstrada na FIGURA 19, de acordo com as condições submetidas de claro (irradiadas) e escuro. Com o resultado de apenas uma réplica biológica não se pode afirmar se ocorreu alguma modulação da atividade da enzima 8-oxo-dGTPase nas células B16-F10 incubadas com RBAC com e sem a melanogênese estimulada (M++ RBAC e Controle RBAC, respectivamente) ou só com estímulo de melanogênese (M++), tanto submetidas a irradiação (claro)

quanto não submetidas (escuro), após o tempo de 18 h. Pode-se observar uma tendência de diminuição na quantidade de 8-oxo-dG formada, no grupo em que as células foram incubadas com RBAC (Controle RBAC) e sem exposição à luz e, principalmente, no grupo em que as células foram incubadas com RBAC com a melanogênese estimulada (M++ RBAC) e irradiadas para a produção de $^1\text{O}_2$. No entanto, outras réplicas biológicas são necessárias para confirmar esta tendência.

FIGURA 19 – ATIVIDADE DA ENZIMA 8-oxo-dGTPase EM CÉLULAS B16-F10



FONTE: O autor (2019).

LEGENDA: As células B16-F10 foram plaqueadas ($5 \cdot 10^5$ células na condição controle e $5,75 \cdot 10^5$ células na condição de estímulo da melanogênese) e incubadas para adesão a 37°C e 5% de CO_2 por 24 h. Em seguida, a melanogênese foi estimulada por 48 h utilizando 0,4 mM L-Tirosina e 10 mM NH_4Cl e a fotossensibilização foi realizada. A atividade da enzima 8-oxo-dGTPase foi determinada através da quantificação de 8-oxo-dG por HPLC-PDA no tempo de 18 h após os tratamentos. Os dados são apresentados como os valores obtidos em apenas um experimento.

Alternativamente, buscou-se outro método para analisar a atividade enzimática de 8-oxo-dGTPase, através da detecção de pirofosfato inorgânico formado, utilizando o kit *PPi Light inorganic pyrophosphatase assay*. Foram realizadas 3 réplicas biológicas, porém foram enfrentados problemas com o kit e os resultados não foram conclusivos (dados não mostrados).

5 DISCUSSÃO

O *pool* de nucleotídeos é um alvo altamente sensível e menos protegido devido à proximidade com as fontes primárias de EROs: mitocôndria e peroxissomos intracelulares. A eliminação de dNTPs danificados do *pool* de nucleotídeos recebeu menos atenção do que o papel das vias de reparo do DNA ao longo dos anos, entretanto, mais recentemente, vários trabalhos tem se voltado ao estudo da oxidação do pool de nucleotídeos, sua sanitização e as consequências desses processos em relação às respostas celulares (NAKABEPPU; OHTA; ABOLHASSANI, 2017).

A principal enzima de sanitização, 8-oxo-dGTPase, é codificada pelo gene *MTH1* que é regulado positivamente em muitos tipos de tumores, sugerindo que essas células possuem uma dependência maior da função de *MTH1* do que as células normais (KENNEDY et al, 1998, WANG et al, 2017). Portanto, *MTH1* pode desempenhar um papel crucial na sobrevivência de muitos tipos de tumores, como melanoma e câncer de mama (CHEN et al, 2019).

Dessa forma, tornou-se interessante investigar o papel de *MTH1* em células de melanoma murino, B16-F10, após geração de $^1\text{O}_2$ por fotossensibilização, uma EROs que possui elevado poder oxidante e conhecida capacidade de gerar 8-oxo-dG, em combinação com o estímulo da produção de melanina, considerando que a melanogênese que ocorre em células de melanoma diminui a resposta à quimioterapia (CHEN et al, 2009).

A análise da expressão de *MTH1* mostrou uma tendência de regulação negativa da enzima em nível de mRNA 18 h após a geração de $^1\text{O}_2$ em condição de estímulo da melanogênese (M++ RBAC e condição claro) (FIGURA 11). Da mesma forma, a atividade da enzima 8-oxo-dGTPase mostrou uma tendência de modulação negativa neste mesmo grupo (FIGURA 19), em que se esperava um aumento de expressão e atividade de *MTH1*, considerando que a melanina sob luz visível pode exercer um papel fotossensibilizador e contribuir para a geração de danos. Este conjunto de resultados não permite afirmar que esteja ocorrendo uma modulação efetiva, mas pode indicar que a oxidação de dGTP possa não estar sendo reparada tão efetivamente como nas outras condições, podendo gerar um cenário em que mais 8-oxo-dGTP possa estar disponível como substrato mutagênico para a síntese de DNA.

Em trabalho anterior realizado no laboratório (KALEGARI, 2017), foi avaliado através de ensaio cometa (alcalino e alcalino modificado com a enzima de reparo hOGG1), o nível de quebra do DNA e estimada a ocorrência de bases modificadas que não geram rupturas espontâneas pelo uso de enzimas de reparo. Para a versão alcalina, todos os grupos de células B16-F10 em 0 h e 18 h não apresentaram diferenças estatísticas. Ou seja, o tratamento com $^1\text{O}_2$ (RBAC na condição claro) não induziu um aumento significativo de quebra de fita de DNA. Uma vez que esta versão do ensaio cometa não é capaz de detectar bases oxidadas (8-oxodGuo), que é a lesão genotóxica formada por $^1\text{O}_2$. Então, as análises da versão alcalina modificada por hOGG1 mostraram que o grupo M++ RBAC na condição claro apresentou um aumento nos níveis de danos no DNA, em relação ao mesmo grupo na condição escuro, imediatamente após a irradiação e níveis de dano ainda maiores após 18 h. Esses resultados indicam que $^1\text{O}_2$ gerado por fotossensibilização estaria oxidando o DNA e gerando a lesão 8-oxodGuo e que, na presença de melanina, a enzima de reparo hOGG1 poderia não estar agindo eficientemente ou que o não funcionamento ou baixa eficiência das enzimas de sanitização do *pool* de nucleotídeos em reparar o dano oxidativo causado, poderia fazer com que o substrato mutagênico, 8-oxo-dGTP, fosse inserido ao DNA gerando os danos observados pelo ensaio cometa. Adicionalmente, Suzukawa et al (2012), utilizando plasmídeo de DNA *in vitro*, mostraram que ambos os tipos de melanina (eumelanina e feomelanina) podem levar à quebra do DNA, e que a eumelanina, presente nas células B16-F10 é a mais prejudicial. Os autores também mostraram que a interação das melaninas com DNA pode prejudicar o acesso de enzimas de reparo às lesões, contribuindo para a perpetuação de danos no DNA. Então, esse cenário de uma possível maior disponibilidade de substrato oxidado (8-oxo-dGTP) e menor reparo do dano inserido no DNA vão de encontro aos níveis aumentados detectados pelo ensaio cometa.

Wang et al (2017) mostraram que nas células de melanoma, MTH1 é regulada positivamente por poliubiquitinação mediada por E3 ligase Skp2 e, dessa forma, promove a sobrevivência das células após estresse oxidativo. No nosso modelo de estudo, o estresse gerado pela melanogênese e/ou pelo $^1\text{O}_2$, como demonstrado por Kalegari (2017), reduziu a viabilidade celular das células na condição de tratamento M++ RBAC (claro), em cerca de 55-60% para ambos os tempos 0 e 18 h, por ensaio de MTT. Estudos em andamento do nosso laboratório buscam avaliar se a condição de estímulo de melanogênese poderia afetar o sistema de ubiquitinação e

proteossoma da B16-F10, o que poderia também estar relacionado aos resultados obtidos.

Uma porção substancial de dano oxidativo ao DNA genômico tem sua origem em precursores do *pool* de nucleotídeos oxidados. Foi relatado que a atividade de MTH1 é o principal contribuinte para a manutenção de baixos níveis genômicos de 8-oxo-dG em vez da atividade do reparo por excisão de base (BER). A inibição da sanitização do *pool* de nucleotídeos através da supressão de MTH1 induz uma resposta antiproliferativa nos fibroblastos da pele e pulmão humanos (RAI, 2010). Dessa forma, os resultados obtidos neste trabalho, podem nos indicar que o $^1\text{O}_2$ gerado por fotossensibilização, o estímulo da produção de melanina e ambas as condições em conjunto, não causam oxidação excessiva no *pool* de nucleotídeos a ponto de se observar um maior nível de 8-oxo-dG excretado, entretanto, vale destacar que a tendência de níveis maiores do dano e menor expressão e atividade da MTH1 no grupo M++ RBAC claro não exclui a possibilidade de um acúmulo de 8-oxo-dGTP intracelular que estaria disponível para incorporação no DNA.

A condição de fotossensibilização com RB conhecidamente produz $^1\text{O}_2$ que então gera oxidação da guanina, entretanto, em nossos resultados não se observou um aumento significativo dos níveis de 8-oxo-dG nos grupos correspondentes (RBAC claro, com ou sem melanogênese estimulada), apenas uma tendência de aumento. Isso se deve provavelmente ao fato da disponibilidade de diferentes substratos para essa espécie reativa, a qual pode reagir com proteínas, ácidos nucleicos e outros compostos biológicos como glutathiona (DEVASAGAYAM; KAMAT, 2002).

Um resultado interessante que se obteve no presente estudo foi em relação ao um aumento significativo dos níveis intracelulares de 8-oxo-dG nos grupos das células sem o estímulo da melanogênese e incubadas com RBAC na condição de escuro ou claro para o tempo de 0 h (ou seja, após 15 min de irradiação) e também na condição de escuro no tempo de 18 h após irradiação (FIGURA 9). Destaca-se que não se observa um aumento concomitante nos níveis extracelulares de 8-oxo-dG nesses grupos. Como o efeito foi observado também nos grupos do escuro, não se pode atribuir esse resultado a uma maior oxidação de dGTP pelo $^1\text{O}_2$. Sendo assim, uma hipótese para explicar esses resultados estaria relacionada ao processo de excreção de 8-oxo-dG da célula. A literatura não traz muitas informações sobre como seria exatamente esse processo, apenas se assume que o nucleosídeo formado é excretado. Entretanto, uma possibilidade seria sua excreção pelo transportador de

nucleosídeos equilibrativo (BOSWELL-CASTEEL; HAYS, 2017), e nesse caso, o RB poderia estar de alguma forma perturbando esse processo pela inibição do transportador, por exemplo. De forma interessante, no grupo Controle RBAc/claro/18 h os níveis voltaram para o basal do controle. Nesse caso, a fotossensibilização do RB possa ter promovido alterações na localização celular do corante, aliviando a retenção de 8-oxo-dG dentro da célula. Por sua vez, nas células com melanogênese estimulada não se observa esse comportamento. Não sabemos se as condições de estímulos podem influenciar a atividade do transportador, e outra possibilidade seria a retenção do RB nos melanossomos, de forma que sua ação sobre o transportador não fosse efetiva, considerando que RB restaurado dentro das células se localiza nos endossomos e depois é redistribuído para a região perinuclear, aparelho de Golgi e retículo endoplasmático (PANZARINI; INGUSCIO; DINI, 2011). Essa questão merece novos estudos, uma vez que não se conhece as consequências de níveis maiores de 8-oxo-dG em outros processos celulares.

Ressalta-se ainda que neste trabalho foram realizadas as sínteses de 8-oxo-dGMP e 8-oxo-dGTP, utilizando uma metodologia desenvolvida no laboratório por Peres (2016) para a síntese de 8-oxo-dG, em que foram realizados testes envolvendo diferentes misturas reacionais, tempos e temperaturas de incubação, visando uma síntese que fosse a mais eficiente e a mais simples possível. Igualmente no presente trabalho, esta mesma metodologia também foi satisfatória para a síntese de nucleosídeos fosfatados, como demonstrado na FIGURA 13. A realização desta síntese possibilitou a utilização de 8-oxo-dGMP e 8-oxo-dGTP como substratos nos ensaios de atividade das enzimas 8-oxo-dGMPase e 8-oxo-dGTPase, respectivamente.

Em relação à metodologia utilizada para avaliar a atividade da enzima 8-oxo-dGMPase, também se pode ressaltar a utilização de HPLC-PDA para detectar e quantificar a formação de 8-oxo-dG, após incubação com o substrato sintetizado 8-oxo-dGMP. O que tinha se visto na literatura, era apenas a metodologia utilizada por Hayakawa et al (1995), em que se mediu a formação de fosfato inorgânico por Cromatografia em Camada Delgada em placa de PEI-celulose. Logo, a metodologia utilizada neste trabalho mostrou-se satisfatória para avaliar a atividade enzimática de 8-oxo-dGMPase.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com a realização deste estudo, buscou-se avaliar a possível oxidação de dGTP e ação das enzimas de sanitização do *pool* de nucleotídeos em células de melanoma murino (B16-F10) com melanogênese estimulada e submetidas à fotossensibilização, como fonte geradora de $^1\text{O}_2$. Foi demonstrado que os níveis de 8-oxo-dG excretados das células foram elevados 18 h após a realização dos tratamentos, em comparação ao tempo de 0 h e à quantidade de 8-oxo-dG intracelular. Também foi demonstrado que a atividade das enzimas 8-oxo-dGTPase e 8-oxo-dGMPase não sofreram modulação significativamente estatística, bem como a expressão do gene *MTH1*, mesmo que tenha sido observada uma tendência de regulação negativa da enzima a nível de mRNA e da atividade 8-oxo-dGTPase 18 h após a geração de $^1\text{O}_2$ e estímulo da melanogênese. De forma geral, o sistema de sanitização em todas as condições se mostrou aparentemente equivalente.

Por outro lado, foi mostrado um papel anteriormente desconhecido do fotossensibilizador Rosa Bengala, que poderia estar atuando sobre a excreção de 8-oxo-dG gerado pelo sistema de sanitização.

REFERÊNCIAS

- ACHARYA, A. et al. Redox Regulation in Cancer: A Double-edged Sword with Therapeutic Potential. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 3, n. 1, p. 23-34, Feb. 2010.
- AGAR, N. S. et al. The basal layer in human squamous tumors harbors more UVA than UVB fingerprint mutations: a role for UVA in human skin carcinogenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 14, p. 4954-4959, Apr. 2004.
- BAIER, J. et al. Direct Detection of Singlet Oxygen Generated by UVA Irradiation in Human Cells and Skin. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 127, p. 1498-1506, March 2007.
- BALDEA, I. et al. Photodynamic Therapy in Melanoma – Where do we Stand? **Currente Medicinal Chemistry**, v. 25, n. 40, p. 5540-5563, 2018.
- BERRA, C. M. **Estudos de reparo de DNA por excisão de nucleotídeos em lesões oxidativas em células de mamíferos**. 2008. 41 f. Tese (Doutorado em Ciência) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.
- BERWICK, M.; ERDEI, E.; HAY, J. Melanoma epidemiology and public health. **Dermatol Clinics**, v. 27, n. 2, p. 205-214, 2009.
- BOSWELL-CASTEEL, R. C.; HAYS, F. A. Equilibrative Nucleoside Transporters – A Review. **Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids**, v. 36, n. 1, p. 7-30, 2017.
- BOTTIROLI, G. et al. Enzyme-assisted cell photosensitization: a proposal for an efficient approach to tumor therapy and diagnosis. The Rose Bengal fluorogenic substrate. **Photochemistry and Photobiology**, v. 66, n. 3, p. 374-383, 1997.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v. 72, p. 248-54, 1976.
- CADET, J.; DOUKI, T. Oxidatively generated damage to DNA by UVA radiation in cells and human skin. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 131, n. 5, p. 1005-1007, May 2011.
- CARTER, M. et al. Crystal structure, biochemical and cellular activities demonstrate separate functions of *MTH1* and *MTH2*. **Nature Communications**, v. 6, n. 7871, Aug. 2015.
- CHEDEKEL, M. R.; AHENE, A. B.; ZEISE, L. Melanin standard method: empirical formula 2. **Pigment Cell Res**, v. 5, n. 5 Pt 1, p. 240-6, 1992.

CHEN, K. G. et al. Involvement of ABC transporters in melanogenesis and the development of multidrug resistance of melanoma. **Pigment Cell & Melanoma Research**, v. 22, n. 6, p. 740-749, 2009.

CHEN, C. et al. Biological characterisation and application of human *MTH1* and monoclonal antibody preparation. **Oncology Reports**, v. 41, p. 1851-1862, 2019.

CHIARELLI-NETO, O. et al. Melanin Photosensitization and the Effect of Visible Light on Epithelial Cells. **PLoS ONE**, v. 9, n. 11, p. e113266, Nov. 2014.

CUNHA, E. S. et al. Melanogenesis stimulation in B16-F10 melanoma cells induces cell cycle alterations, increased ROS levels and a differential expression of proteins as revealed by proteomic analysis. **Experimental Cell Research**, v. 318, n. 15, p. 1913-1925, June 2012.

CUNHA, E. S. **Estímulo da melanogênese e tratamento com oxigênio molecular singlete: efeitos em células MELAN-A e B16-F10**. 2012. 157 f. Tese (Doutorado em Ciências – Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

DAI, T.; FUCHS, B. B.; COLEMAN, J. J. et al. Concepts and principles of photodynamic therapy as an alternative antifungal discovery platform. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, n. APR, p. 1-16, 2012.

DAVIDS, L. M.; KLEEMANN, B. Combating melanoma: The use of photodynamic therapy as a novel, adjuvant therapeutic tool. **Cancer Treatment Reviews**, v. 37, n. 6, p. 465–475, 2011.

DEVASAGAYAM, T. P.; KAMAT, J. P. Biological significance of singlet oxygen. **Indian J Exp Biol.**, v. 40, n. 6, p. 680-92, 2002.

DI MASCIO, P. et al. Singlet molecular oxygen production in the reaction of peroxyxynitrite with hydrogen peroxide. **FEBS Letters**, v. 355, n. 3, p. 287-289, Dec. 1994.

EBLIN, K. E. et al. Arsenite and monomethylarsonous acid generate oxidative stress response in human bladder cell culture. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 217, p. 7-14, July 2006.

ESHTAD, S. et al. hMYH and h*MTH1* cooperate for survival in mismatch repair defective T-cell acute lymphoblastic leukemia. **Oncogenesis**, v. 5, e275, 2016.

FAN, H. et al. *MTH1*-Targeted Nanosystem for Enhanced PDT via Improving Cellular Sensitivity to Reactive Oxygen Species. **Chemical Communications**, v. 54, n. 34, p. 4310-4313, 2018.

FOOTE, M. C. et al. A novel treatment for metastatic melanoma with intralesional rose bengal and radiotherapy: a case series. **Melanoma Res.**, v. 20, n. 1, p. 48-51, 2010.

FOTOUHI, A. et al. Reduction of 8-oxodGTP in the nucleotide pool by hMTH1 leads to reduction in mutations in the human lymphoblastoid cell line TK6 exposed to UVA. **Mutation Research**, v. 715, p. 13-18, 2011.

FURUICHI, M. et al. Genomic structure and chromosome location of the human mutT homologue gene *MTH1* encoding 8-oxo-dGTPase for prevention of A:T to C:G transversion. **Genomics**, v. 24, n. 3, p. 485-490, Dec. 1994.

GAD H. et al. *MTH1* inhibition eradicates cancer by preventing sanitation of the dNTP pool. **Nature**, v. 508, n. 7495, p. 215-21, 2014.

GANDINI, S. et al. Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: III. Family history, actinic damage and phenotypic factors. **Eur J Cancer**, v. 41, n. 14, p. 2040-59, 2005.

GRUBER, F. et al. Molecular and genetic mechanisms in melanoma. **Coll Antropol**, v. 32 Suppl 2, p. 147-52, 2008.

HAGHDOOST, S. et al. Extracellular 8-oxodG as a sensitive parameter for oxidative stress in vivo and in vitro. **Free Radical Research**, v. 39, n. 2, p. 153-162, Feb. 2005.

HAGHDOOST, S. et al. The nucleotide pool is a significant target for oxidative stress. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 41, n. 4, p. 620-626, Aug. 2006.

HALLIDAY, G. et al. UV-A Fingerprint Mutations in Human Skin Cancer. **Photochemistry and Photobiology**, v. 81, n. 1, p. 3-8, Jan 2005.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 4. ed. Oxford: Oxford University Press, 2007.

HAYAKAWA, H. et al. Generation and Elimination of 8-Oxo-7,8-dihydro-2,-deoxyguanosine-5'-Triphosphate, a Mutagenic Substrate for DNA Synthesis, in Human Cells. **Biochemistry**, v. 34, n. 1, p. 89-95, 1995.

HELD, A. M.; HALKO, D. J.; HURST, J. K. Mechanisms of chlorine oxidation of hydrogen peroxide. **Journal of the American Chemical Society**, v. 100, n. 18, 5732-5740, Aug. 1978.

HIBI, K. et al. Serial analysis of gene expression in non-small cell lung cancer. **Cancer Research**, v. 58, p. 5690-5694, Dec. 1998.

HOOGDUIJN, M. J. et al. Melanin protects melanocytes and keratinocytes against H₂O₂-induced DNA strand breaks through its ability to bind Ca²⁺. **Experim Cell Res**, v. 294, n. 1, p. 60-67, 2004.

HÖHN, A.; KÖNIG, J.; GRUNE, T. Protein oxidation in aging and the removal of oxidized proteins. **Journal of Proteomics**, v. 92, p. 132-159, Oct. 2013.

HU, J. et al. Augment of Oxidative Damage with Enhanced Photodynamic Process and *MTH1* Inhibition for Tumor Therapy. **Nano Letters**, Publication Date (Web): 02 Jul 2019.

INCA. Instituto Nacional de Câncer. **Câncer de Pele Melanoma**. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/pele_melanoma>. Acesso em: 8 jul. 2019.

ITO, S.; WAKAMATSU, K. Quantitative analysis of eumelanin and pheomelanin in humans, mice, and other animals: a comparative review. **Pigment cell research/ sponsored by the European Society for Pigment Cell Research and the International Pigment Cell Society**, v. 16, n. 5, p. 523–531, 2003.

JUARRANZ, A. et al. Photodynamic therapy of cancer. Basic principles and applications. **Clin Transl Oncol.**, v. 10, n. 3, p. 148-154, Mar 2008.

KALEGARI, P. **Avaliação de danos e reparo do DNA em células de melanoma com diferentes conteúdos de melanina submetidas à terapia fotodinâmica**. 2017. 90 f. Dissertação (Mestrado em Ciências – Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2017.

KANOFISKY, J. R. Singlet oxygen production by biological systems. **Chemico-Biological Interactions**, v. 70, n. 1-2, p. 1-28, 1989.

KAWAMURA, T. et al. Proteomic profiling of small-molecule inhibitors reveals dispensability of *MTH1* for cancer cell survival. **Scientific reports**, v. 6, n. 26521, 2016.

KENNEDY, C. H. et al. Overexpression of h*MTH1* mRNA: a molecular marker of oxidative stress in lung cancer cells. **FEBS Letters**, v. 429, p. 17-20, April 1998.

KENNEDY, C. H.; PASS, H. I.; MITCHELL, J. B. Expression of human MutT homologue (h*MTH1*) protein in primary non-small-cell lung carcinomas and histologically normal surrounding tissue. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 34, n. 11, p. 1447-1457, 2003.

KOCHEVAR, I. E. et al. Comparison of photosensitized plasma membrane damage caused by singlet oxygen and free radicals. **Biochimica and Biophysica Acta**, v. 1280, n. 2, p. 223-30, April 1996.

KOCHEVAR, I. E.; REDMOND, R. W. Photosensitized production of singlet oxygen. **Methods in Enzymology**, v. 319, p. 20-28, 2000.

KOEVARY, S. B. Selective toxicity of rose bengal to ovarian cancer cells in vitro. **International Journal of Physiology, Pathophysiology and Pharmacology**, v. 4, n. 2, p. 99-107, 2012.

KONGSHOJ, B. et al. Ammonium chloride and l-tyrosine enhance melanogenesis in vitro but not in vivo even in combination with ultraviolet radiation. **Photodermatology, Photoimmunology and Photomedicine**, v. 23, n. 5, p. 197–202, 2007.

KORYTOWSKI, W. et al. Photoinduced generation of hydrogen peroxide and hydroxyl radicals in melanins. **Photochemistry and Photobiology**, v. 45, n. 2, p. 185-190, Feb 1987.

KVAM, E.; TYRRELL, R. M. The role of melanin in the induction of oxidative DNA base damage by ultraviolet A irradiation of DNA or melanoma cells. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 113, n. 2, p. 209-213, Aug. 1999.

LARSSON, P. et al. Ultraviolet A and B affect human melanocytes and keratinocytes differently. A study of oxidative alterations and apoptosis. **Experimental Dermatology**, v. 14, n. 2, p. 117-123, Feb. 2005.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using RealTime Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

LJUNGMAN, M. et al. DNA-bound proteins contribute much more than soluble intracellular compounds to the intrinsic protection against radiation-induced DNA strand breaks in human cells. **Radiation Research**, v. 127, n. 2, p. 171-176, Aug. 1991.

MARS, U.; LARSSON, B. S. Pheomelanin as a binding site for drugs and chemicals. **Pigment Cell Res**, v. 12, n. 4, p. 266-74, 1999.

MARTINEZ, G. R. et al. Synthesis of a Naphthalene Endoperoxide as a Source of ^{18}O -labeled Singlet Oxygen for Mechanistic Studies. **Journal of the American Chemical Society**, v. 122, n. 41, p. 10212-10213, Sep. 2000.

MARTINEZ, G. R.; MEDEIROS, M. H. G.; RAVANAT, J. L.; CADET, J.; MASCIO, P. D. [^{18}O]-Labeled Singlet Oxygen as a Tool for Mechanistic Studies of 8-Oxo-7,8-Dihydroguanine Oxidative Damage: Detection of Spiroiminodihydantoin, Imidazolone and Oxazolone Derivatives. **Biological Chemistry**, v. 383, n. 3-4, p. 607-617, 2002.

MARTINEZ, G. R. **Geração química de oxigênio-18 molecular no estado singleto, $^{18}\text{O}_2$ ($^1\Delta_g$), e estudos de lesões em DNA**. 2003. 241 f. Tese (Doutorado em Ciências – Área: Bioquímica) - Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

MCGOLDRICK, J. P. et al. Characterization of a mammalian homolog of the Escherichia coli MutY mismatch repair protein. **Molecular and Cellular Biology**, v. 15, n. 2, p. 989-996, Feb. 1995.

MICHAELS, M. L.; MILLER, J. H. The GO system protects organisms from the mutagenic effect of the spontaneous lesion 8-hydroxyguanine (7,8-dihydro-8-oxoguanine). **Journal of Bacteriology**, v. 174, n. 20, p. 6321-6325, Oct. 1992.

MITTLER, R. ROS Are Good. **Trends in Plant Science**, v. 22, n. 1, p. 11-19, Jan. 2017.

MIYAMOTO, S. et al. Singlet Molecular Oxygen Generated from Lipid Hydroperoxides by the Russell Mechanism: Studies Using ^{18}O -Labeled Linoleic Acid Hydroperoxide and Monomol Light Emission Measurements. **Journal of the American Chemical Society**, v. 125, n. 20, p. 6172-6179, May 2003.

MO, J.; MAKI, H.; SEKIGUCHI, M. Hydrolytic elimination of a mutagenic nucleotide, 8-oxodGTP, by human 18-kilodalton protein: Sanitization of nucleotide pool. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, n. 22, p. 11021-11025, Nov. 1992.

MÜLLER, E. et al. Enzymatic recognition of DNA modifications induced by singlet oxygen and photosensitizers. **Nucleic Acids Research**, v. 18, n. 20, p. 5969-5973, Oct. 1990.

NAKABEPPU, Y.; OHTA, E.; ABOLHASSANI, N. MTH1 as a nucleotide pool sanitizing enzyme: Friend or foe? **Free Radical Biology and Medicine**, v. 107, p. 151-158, 2017.

NELSON, J. S.; McCULLOUGH, J. L.; BERNS, M. W. Photodynamic therapy of human malignant melanoma xenografts in athymic nude mice. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 80, n. 1, p. 56-60, Mar 1988.

OKAMOTO, K. et al. Overexpression of human mutT homologue gene messenger RNA in renal-cell carcinoma: evidence of persistent oxidative stress in cancer. **International Journal of Cancer**, v. 65, n. 4, p. 437-441, Feb. 1996.

OLIVEIRA, C. S. D. **Propriedades fotoquímicas dos fotossensibilizadores Cristal Violeta e Azul de Metileno em sistemas microheterogêneos e em células cancerosas em cultura**. 2006. 177 f. Tese (Doutorado em Bioquímica) - Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

PANZARINI, E.; INGUSCIO, V.; DINI, L. Overview of cell death mechanisms induced by rose bengal acetate-photodynamic therapy. **International Journal of Photoenergy**, v. 2011, 2011.

PERES, P. S.; VALERIO, A.; MARTINEZ, G. R. Synthesis of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine from 2'-deoxyguanosine using $\text{Cu(II)/H}_2\text{O}_2/\text{ascorbate}$: A new strategy for an improved yield. **Biotechniques**, v. 60, n. 6, p. 279-84, 2016.

PERES, P. S. **Alterações nos níveis das lesões oxidativas da guanina pelo oxigênio singlete geradas na presença de glutathione**. 2016. 123 f. Tese (Doutorado em Ciências-Bioquímica). Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2016.

PRASAD, S.; GUPTA, S. C.; TYAGI, A. K. Reactive oxygen species (ROS) and cancer: Role of antioxidative nutraceuticals. **Cancer Letters**, v. 387, p. 95-105, Feb. 2017.

RADICELLA, J. P. et al. Cloning and characterization of hOGG1, a human homolog of the OGG1 gene of *Sacharomyces cerevisiae*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 15, p. 8010-8015, July 1997.

RAI, P. Oxidation in the nucleotide pool, the DNA damage response and cellular senescence: Defective bricks build a defective house. **Mutation Research**, v. 703, p. 71-81, 2010.

RAVANAT, J. et al. Singlet Oxygen Induces Oxidation of Cellular DNA. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 51, p. 40601-40604, Dec. 2000.

RONSEIN, G. E. et al. Oxidação de proteínas por oxigênio singleto: mecanismos de dano, estratégias para detecção e implicações biológicas. **Química Nova**, v. 29, n. 3, p. 563-568, 2006.

SALOPEK, T. G. et al. Dysplastic melanocytic nevi contain high levels of pheomelanin: quantitative comparison of pheomelanin/eumelanin levels between normal skin, common nevi, and dysplastic nevi. **Pigment Cell Res**, v. 4, n. 4, p. 172- 9, 1991.

SAMARANAYAKE, G. J.; HUYNH, M.; RAI, P. *MTH1* as a Chemotherapeutic Target: The Elephant in the Room. **Cancers (Basel)**, v. 9, n. 5, 2017.

SCANDALIOS, J. G. The rise of ROS. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 27, n. 9, p. 483-486, Sep. 2002.

SHIGENAGA, M. K. et al. In vivo oxidative DNA damage: measurement of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in DNA and urine by high performance liquid chromatography with electrochemical detection. **Methods in Enzymology**, v. 186, p. 521-530, 1990.

SIES, H.; BERNDT, C.; JONES, D. P. Oxidative Stress. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 86, p. 715-48, 2017.

SKIN CANCER FOUNDATION. **Melanoma**. Disponível em: <<http://www.skincancer.org/skin-cancer-information/melanoma>>. Acesso em: 13 nov. 2017.

SOLDANI, C. et al. Apoptosis in tumour cells photosensitized with Rose Bengal acetate is induced by multiple organelle photodamage. **Histochemistry and Cell Biology**, vol. 128, n. 5, p. 485-495, Nov 2007.

SPEINA, E. et al. Contribution of h*MTH1* to the Maintenance of 8-Oxoguanine Levels in Lung DNA of Non-Small-Cell Lung Cancer Patients. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 97, n. 5, p. 384-395, March 2005.

STEENKEN, S.; JOVANOVIC, S. V. How easily oxidizable is DNA? One-electron reduction potentials of adenosine and guanosine radicals in aqueous solution. **Journal of the American Chemical Society**, v. 119, n. 3, p. 617-618, 1997.

STEINBECK, M. J.; KHAN, A. U.; KARNOVSKY, M. J. Intracellular singlet oxygen generation by phagocytosing neutrophils in response to particles coated with a chemical trap. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 19, p. 13425-13433, July 1992.

SUZUKAWA, A. A. **Papel da feomelanina na formação de lesões oxidativas pelo oxigênio molecular singlete em DNA e em células de melanoma humano.** 2012. 194f. Tese (Doutorado em Ciências-Bioquímica) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

SUZUKAWA, A. A. et al. Novel properties of melanins include promotion of DNA strand breaks, impairment of repair, and reduced ability to damage DNA after quenching of singlet oxygen. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 52, n. 9, p. 1945-1953, Mar. 2012.

SVOBODA, P.; HARMS-RINGDAHL, M. Protection or sensitization by thiols or ascorbate in irradiated solutions of DNA or deoxyguanosine. **Radiation Research**, v. 151, n. 5, p. 605–616, May 1999.

TAKAGI, Y. et al. Human MTH3 (NUDT18) protein hydrolyzes oxidized forms of guanosine and deoxyguanosine diphosphates: comparison with *MTH1* and *MTH2*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 25, p. 21541-21549, June 2012.

THOMPSON, J. F.; HERSEY, P.; WACHTER, E. Chemoablation of metastatic melanoma using intralesional Rose Bengal. *Melanoma Res.* v. 18, n. 6, p. 405-411, 2008.

TRILINK BIOTECHNOLOGIES. **8-oxo-2'-desoxiguanosina-5'-trifosfato**. Disponível em: <<https://www.trilinkbiotech.com/cart/scripts/prodView.asp?idproduct=2746>>. Acesso em: 3 maio 2019.

TSUZUKI, T. et al. Spontaneous tumorigenesis in mice defective in the *MTH1* gene encoding 8-oxodGTPase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.**, v. 98, n. 20, p. 11456-11461, Sep. 2001.

VALAVANIDIS, A. et al. Pulmonary oxidative stress, inflammation and cancer: respirable particulate matter, fibrous dusts and ozone as major causes of lung carcinogenesis through reactive oxygen species mechanisms. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 10, n. 9, p. 3886-3907, Aug. 2013.

WANIA, G.; MILOB, G. E.; D'AMBROSIO, S. M. Enhanced expression of the 8-oxo-7,8-dihydrodeoxyguanosine triphosphatase gene in human breast tumor cells. **Cancer Letters**, v. 125, n. 1-2, p. 123-130, March 1998.

WANG, J. Y. et al. Reactive Oxygen Species Dictate the Apoptotic Response of Melanoma Cells to TH588. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 136, n.11, p. 2277-2286, 2016.

WANG, J. Y. et al. Skp2-Mediated Stabilization of *MTH1* Promotes Survival of Melanoma Cells upon Oxidative Stress. **Cancer Res.**, v. 77, n. 22, p. 6226-6239, 2017.

WARPMAN BERGLUND, L. et al. Validation and development of *MTH1* inhibitors for treatment of cancer. **Ann Oncol.**, v. 27, n. 12, p. 2275-2283, 2016.

WEBERS, F. W. **Efeito da melanogênese na resposta da terapia fotodinâmica com rosa bengala acetato**. 2016. 48 f. Dissertação (Mestrado em Ciências - Bioquímica) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2016.

WU, Y. et al. Molecular mechanisms underlying chronic inflammation-associated cancers, **Cancer Letters**, v. 345, n. 2, p. 164-173, April 2014.

YAMAGUCHI, Y. et al. Human skin responses to UV radiation: pigment in the upper epidermis protects against DNA damage in the lower epidermis and facilitates apoptosis. **The FASEB Journal**, v. 20, n. 9, p. 1486-1488, Jul. 2006.

YAMAGUCHI, Y., BRENNER, M., HEARING, V. J. The regulation of skin pigmentation. **J Biol Chem**, v. 282, n. 38, p. 27557-27561, 2007.