B I B L I O T E C A
INSTITUTO DE QUÍMICA
Universidade de São Paulo
20795

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

**"Estudos de danos em biomoléculas promovidos
pelo ácido indol-3-acético"**

Tedra Madeiral Mendonça

Prof. Dr. Paolo Di Mascio

Orientador

**Dissertação de Mestrado apresentada
ao Departamento de Bioquímica**

**São Paulo
2002**

DEDALUS - Acervo - CQ

30100006048

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Mendonça, Tedra Madeiral
M539e Estudos de danos em biomoléculas promovidos pelo ácido
indol-3-acético / Tedra Madeiral Mendonça. -- São Paulo,
2002.
105p.

Dissertação (mestrado) – Instituto de Química da Universidade
Universidade de São Paulo. Departamento de Bioquímica.
Orientador : Di Mascio, Paolo

1. Radical livre : Bioquímica 2. Espécies reativas de oxigênio
no ser vivo : Bioquímica I. T. II. Di Mascio, Paolo, orientador.

574.192 CDD

“Estudos de Danos em Biomoléculas Promovidos pelo Ácido Indol-3-Acético”

TEDRA MADEIRAL MENDONÇA

Dissertação de Mestrado submetida ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciências – Área: Bioquímica.

Aprovada por:

Prof. Dr. PAOLO DI MASCIO
IQ – USP
(Orientador e Presidente)

Prof. Dr. JOSEF WILHELM BAADER
IQ - USP

Profa. Dra. ANA CAMPA
FCF – USP

SÃO PAULO
04 DE OUTUBRO 2002.

Ao Jefferson e aos meus pais, por tudo...

A minha família e aos meus amigos que são o sentido da minha vida.

O tempo não muda o ser humano,
Apenas o amor pode transformá-lo.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Paolo Di Mascio pela orientação científica, pela oportunidade de desenvolvimento do trabalho, confiança e incentivo para a conclusão da dissertação e ao longo desses anos.

À Profa. Dra. Marisa H. G. Medeiros pela colaboração científica imprescindível, pela amizade, pelo incentivo e pelas discussões e correções em todas as etapas.

À Dra. Helena Ferraz pela disponibilização do laboratório e ao Fernando Luiz Cardoso Pereira pelo auxílio no estudo de adutos.

À Profa. Dra. Ana Campa pelo auxílio nos experimentos com neutrófilos.

Aos Profs. Dr. Etelvino Bechara e Dra. Ohara Augusto pelo exemplo, dedicação e incentivo constantes em nosso departamento e entusiasmo durante as aulas.

Também à Profa. Dra. Ohara Augusto pela disponibilização de equipamentos de seu laboratório para a realização de experimentos.

Aos técnicos dos laboratórios, principalmente à Christiane Cardoso e ao Osmar F. Gomes pela ajuda constante, amizade e pelo apoio técnico no tratamento dos ratos.

A todos os funcionários do Instituto de Química, principalmente ao Francisco e ao Jailton pelo cuidado nas cópias xerográficas.

A todos professores e alunos que participam do grupo de estudos de Radicais Livres, pelo convívio agradável e discussões teóricas.

A todos meus colegas e amigos dos laboratórios do Paolo e da Marisa: Ana Paula, Christiane, Clécio, Eduardo, Flávio, Janice, Gláucia, Lydia, Osmar, Priscila, Sabrina, e Valdemir, pela colaboração diária e pela convivência bem humorada.

À Janice Onuki, que sempre com seu equilíbrio, me orientou, apoiou e incentivou em todos os momentos.

À Ana Paula de Melo Loureiro, pela valiosa ajuda científica, pela sua amizade e companherismo em nossas divertidas aulas de dança.

À Gláucia Martinez pela amizade, cumplicidade, apoio e discussões científicas.

Ao Valdemir Carvalho pela cooperação e discussões críticas, também pela amizade e companherismo.

À Priscila Camillo Teixeira pela ajuda na realização de experimentos com plasmídios.

À Lydia Yamaguchi pelos primeiros passos em HPLC e pelas discussões filosóficas.

À Sabrina Marques pela amizade, pelo incentivo e convivência divertida em todos os momentos.

A TODOS os colegas e amigos do Instituto de Química que direta ou indiretamente contribuíram de alguma forma para a conclusão deste trabalho.

Ao Jefferson, presente em todos os momentos, sempre com compreensão, carinho e amor, me ajudou a trilhar meu caminho.

Aos meus pais, Luci, Expedito, Ronaldo, Carvalho, Fátima, Carmem e Brás, ao meus irmãos, Raony e Kayalú, aos meus avôs e avós, tios, tias, à minha segunda família, Flavio, Rose, Peki, Thânia e aos meus primos pelo apoio e carinho incondicionais.

A todos meus novos amigos, Bárbara, Adriana, Andréa, Wilza, Débora, Luciana e Ricardo, cada um especial e único, pelo incentivo e amizade.

MUITO OBRIGADA A TODOS!

BIBLIOTECA
INSTITUTO DE QUÍMICA
Universidade de São Paulo

APOIO FINANCEIRO

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

CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

USP-COFECUB/UC-23/96 e UC/98 - Universidade de São Paulo/Comité Français d'Evaluation de la Coopération Universitaire avec le Brésil

PRONEX/FINEP - Programa de Apoio aos Núcleos de Excelência

PADCT - Programa de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico

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

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	IV
ABREVIACÕES.....	IX
RESUMO	XI
ABSTRACT	XII
 I. INTRODUÇÃO	 1
I.1 O ÁCIDO INDOL-3-ACÉTICO (IAA)	1
I.2 A OXIDAÇÃO DO IAA CATALISADA POR PEROXIDASE.....	3
I.3 FORMAÇÃO DE ESPÉCIES ELETRONICAMENTE EXCITADAS	6
I.4 FORMAÇÃO DE RADICAIS LIVRES	13
I.5 FORMAÇÃO DE ADUTOS DE DNA	16
 II. OBJETIVOS	 20
 III. MATERIAIS E MÉTODOS	 21
III.1 REAGENTES	21
III.2 EQUIPAMENTOS.....	22
III.3 MÉTODOS	23
III.3.1 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA PERFORMANCE (HPLC)	23
III.3.1.1 Medida de 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina (8-oxodGuo)	23
III.3.2 ESPECTROMETRIA DE MASSAS (MS)	23

III.3.3 FORMAÇÃO DE ADUTOS	24
III.3.3.1 Incubações com indol-3-carboxialdeído (ICA).....	24
III.3.3.2 Incubações com IAA/HRP	25
III.3.3.3 Incubações com ICA/H ₂ O ₂	26
III.3.3.4 Incubações com IAA/H ₂ O ₂	26
III.3.3.5 Redução com NaBH ₄	26
III.3.3.6 Sistema em benzeno anidro	26
III.3.3.7 Sistema em acetonitrila (ACN) anidra e peneira molecular 4Å	27
III.3.3.8 Epoxidação do ICA por dioxirano gerado <i>in situ</i>	27
III.3.3.9 Sistema em tetrahidrofurano (THF)	28
III.3.3.10 Ativação do ICA com H ₂ O ₂ /OH ⁻	28
III.3.3.11 Ativação do IAA com ¹ O ₂	29
III.3.4 ESTUDO DA CAPTAÇÃO DE ¹ O ₂ GERADO NO SISTEMA IAA/HRP/O ₂ PELA REAÇÃO COM EAS	30
III.3.4.1 Preparação do padrão de EASO ₂	30
III.3.4.2 Incubação de IAA/HRP/O ₂ com EAS	31
III.3.5 INCUBAÇÕES COM DNA PLASMIDIAL.....	31
III.3.5.1 Extração de DNA plasmidial pBR322	31
III.3.5.2 Extração de DNA plasmidial pUC19	32
III.3.5.3 Incubações	32
III.3.5.4 Eletroforese	33
III.3.6 CULTURA CELULAR.....	33
III.3.6.1 Repique das células	33
III.3.6.2 Citotoxicidade do ICA e do sistema IAA/HRP	34
III.3.6.3 Tratamento para verificação da formação de 8-oxodGuo.....	34
III.3.6.4 Extração de DNA	34
III.3.6.5 Hidrólise do DNA	35
III.3.6.6 Tratamento para verificação de lipoperoxidação	36
III.3.7 MEDIDAS DE LIPOPEROXIDAÇÃO	36
III.3.7.1 Dosagem de proteínas.....	36
III.3.7.2 Preparação da solução de cobre-tartarato-carbonato (CTC) e do reagente de Lowry.....	37
III.3.8 NEUTRÓFILOS.....	37

III.3.8.1 Tratamento dos ratos para extração dos neutrófilos.....	37
III.3.8.2 Tratamento dos neutrófilos para a extração de DNA.....	38
III.3.8.3 Análise da formação de 8-oxodGuo	38
III.3.8.4 Detecção do aduto 1,N ² - etenodesoxiguanosina (1,N ² -εdGuo)	38
 IV. RESULTADOS E DISCUSSÕES	 41
IV.1 FORMAÇÃO DE ADUTOS DE DNA <i>IN VITRO</i>	41
IV.2 FORMAÇÃO DE 8-OXODGUO <i>IN VITRO</i>	55
IV.3 ESTUDO DA CAPTAÇÃO DO ¹ O ₂ GERADO PELO SISTEMA IAA/HRP/O ₂ PELA REAÇÃO COM EAS.....	59
IV.4 VERIFICAÇÃO DE LESÕES EM DNA PLASMIDIAL	68
IV.5 VERIFICAÇÃO DE LESÕES EM CULTURA CELULAR.....	74
IV.5.1 CITOTOXICIDADE	74
IV.5.2 LIPOPEROXIDAÇÃO	79
IV.5.3 FORMAÇÃO DE 8-OXODGUO.....	81
IV.6 VERIFICAÇÃO DE LESÕES EM NEUTRÓFILOS	83
IV.6.1 FORMAÇÃO DE 8-OXODGUO.....	83
IV.6.2 FORMAÇÃO DE ETENOADUTOS	86
 V. CONCLUSÕES	 89
 VI. REFÊRENCIAS	 92

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Oxidação enzimática do isobutanal.....	6
Figura 2 – Oxidação do IAA catalisada por HRP/O ₂ formando o ICA no estado excitado (ICA [*]) e transferência de energia ao oxigênio fundamental formando o ¹ O ₂	8
Figura 3 – Estados eletrônicos do oxigênio molecular.	9
Figura 4 – Mecanismo de Russell para o radical peroxila formado a partir do radical escatol.	11
Figura 5 – Oxidação de dGuo por ¹ O ₂ formando 8-oxodGuo.	12
Figura 6 – Formação do radical escatol e propagação da cadeia radicalar.	14
Figura 7 – Formação de aduto entre o IAA e a dGuo.....	41
Figura 8 – Equação geral para a formação de uma imina (base de Schiff).....	41
Figura 9 – Cromatograma da incubação de 30 mM de dGuo e 50 mM ICA em DMSO por 1h a 60°C. Análise por HPLC de fase reversa em $\lambda = 254$ nm conforme descrito em Materiais e Métodos.	43
Figura 10 – Cromatograma da incubação de dGuo 1 mM, IAA 1 mM e 3 μ M HRP em 10% etanol/tampão acetato 100 mM pH 5,0, por 2 h a 37°C. Análise por HPLC de fase reversa em $\lambda = 254$ nm conforme descrito em Materiais e Métodos.....	43
Figura 11 – Cromatograma da incubação de 1 mM de dGuo, 1 mM de IAA, 3 μ M de HRP e 15 mM de H ₂ O ₂ em 10% etanol/ tampão acetato 100 mM pH 5,0 por 120 min a 37°C. Análise por HPLC de fase reversa em $\lambda = 254$ nm conforme descrito em Materiais e Métodos.	44
Figura 12 – Cromatogramas da incubação de 2 mM de ICA com 1 mM de dGuo e 50 mM de H ₂ O ₂ em 10% MeOH/ tampão fosfato 100 mM pH 7,4 por 10 dias a 50°C e de seus respectivos controles analisados por HPLC de fase reversa em $\lambda = 254$ nm conforme descrito em Materiais e Métodos.	45
Figura 13 – Redução de um possível aduto entre dGuo e ICA formando um produto estável.	45
Figura 14 – Cromatograma dos produtos de incubação da dGuo com o ICA em benzeno adquirido HPLC de fase reversa em $\lambda = 254$ nm conforme Materiais e Métodos. O produto X de interesse está indicado com a seta.	46
Figura 15 – Espectro de absorbância UV do produto X e da dGuo indicados no cromatograma acima (Figura 14).	47

Figura 16 – Espectro de massas obtido em modo ESI ⁺ do produto (X) purificado conforme Materiais e Métodos.	47
Figura 17 – Epoxidação por dioxirano esperado para o ICA.	48
Figura 18 – Cromatograma dos produtos da epoxidação do ICA pela metil(trifluorometil)dioxirano gerada <i>in situ</i> analisados por HPLC de fase reversa em $\lambda = 221$ nm conforme descrito em Materiais e Métodos.	49
Figura 19 – Espectros de absorbância UV dos produtos de epoxidação do ICA referentes ao cromatograma da Figura 18.	50
Figura 20 – Espectro de massa dos produtos de epoxidação do ICA adquiridos em modo ESI ⁺ conforme descrito em Materiais e Métodos.	50
Figura 21 – Cromatogramas da incubação da mistura de reação da epoxidação do ICA por dioxirano com dGuo em tampão fosfato 100 mM pH 7,4 e seus respectivos controles analisados por HPLC de fase reversa em $\lambda = 220$ nm conforme descrito em Materiais e Métodos.	51
Figura 22 – Cromatograma da incubação ICA em THF contendo peróxidos com a dGuo em tampão fosfato 100 mM pH 7,4 analisado por HPLC de fase reversa em $\lambda = 254$ nm descrito em conforme descrito em Materiais e Métodos.	52
Figura 23 – Mecanismo de Michael proposto para a formação de um epóxido no ICA.	53
Figura 24 – Cromatograma da incubação da fase orgânica de ICA/H ₂ O ₂ em meio alcalino com a dGuo em tampão acetato de sódio 100 mM pH 5 analisado por HPLC de fase reversa em $\lambda = 254$ nm conforme descrito em Materiais e Métodos.	53
Figura 25 – Abertura do anel indólico do IAA.	54
Figura 26 – Cromatograma da incubação de IAA/ ¹ O ₂ com dGuo em tampão fosfato de sódio 100 mM pH 7,4 analisado por HPLC de fase reversa em $\lambda = 254$ nm conforme descrito em Materiais e Métodos.	54
Figura 27 – Formação de 8-oxodGuo pelo sistema IAA/HRP/O ₂ com dGuo na ausência e presença de peróxido de hidrogênio (1mM). Incubação de IAA (1mM)/HRP (3 μ M)/O ₂ com dGuo (1mM) em tampão acetato de sódio 100 mM pH 5,0 (Volume final = 1500 μ L) por 2 h e 24 h a 37°C.	56
Figura 28 – Formação de 8-oxodGuo pelo sistema IAA/HRP/O ₂ com dGuo com variação de concentração de HRP e tempo de incubação. Incubação de IAA (1mM)/HRP (3, 6 e 10 μ M)/O ₂ em tampão acetato de sódio 100 mM pH 5,0 com a dGuo (1mM) (Volume final =1500 μ L) por 24 h a 37°C.	57
Figura 29 – Formação de 8-oxo-dGuo pelo sistema IAA/HRP/O ₂ em D ₂ O. Incubação de IAA(1mM)/HRP(6 μ M)/O ₂ em tampão acetato de sódio 100 mM pH 5,0 com	

a dGuo (1mM) realizadas em água e água deuterada (Volume final = 150 µL) por 3 h a 37°C.	58
Figura 30 – Reação do EAS com $^1\text{O}_2$ gerando o EASO ₂ (Martinez e col., 2000 ^b).	59
Figura 31 – Cromatogramas dos controles (a) EAS/HRP; (b) EAS; (c) EASO ₂ e (d) IAA/HRP incubados por 3,5 h a 37°C em D ₂ O e analisados por HPLC em λ = 230 nm conforme descrito em Materiais e Métodos.	60
Figura 32 – Cromatogramas da reação de IAA (1 mM)/HRP (10 µM)/O ₂ na presença de EAS (2,4 mM) por 3,5 h a 37°C em D ₂ O e analisados por HPLC λ =230 nm conforme descrito em Materiais e Métodos.	61
Figura 33 – Espectros de absorbância dos produtos A, B, C e EASO ₂ com seus respectivos tempos de retenção (TR).	62
Figura 34 – Curvas de calibração construídas com padrões e utilizadas na quantificação de EAS e EASO ₂	62
Figura 35 – Quantificação do EAS nas incubações de IAA/HRP com (1) 1,2; (2) 2,4 e (3) 4,8 mM de EAS e nos controles de EAS e EAS/HRP nas mesmas condições.	63
Figura 36 – Quantificação do EASO ₂ nas incubações de IAA/HRP com (1) 1,2; (2) 2,4 e (3) 4,8 mM de EAS e nos controles de EAS e EAS/HRP nas mesmas condições.	63
Figura 37 – Áreas dos produtos desconhecidos A, B e C nas incubações de IAA/HRP com (1) 1,2; (2) 2,4 e (3) 4,8 mM de EAS e nos controles de EAS e EAS/HRP nas mesmas condições.	64
Figura 38 – Espectro de massas do pico A adquirido em modo ES ⁺ conforme descrito em Materiais e Metodos.	65
Figura 39 – Cromatogramas das incubações de IAA/HRP e IAA/HRP/EAS realizadas nas mesmas condições e concentrações.	66
Figura 40 – Espectro de um produto da reação entre IAA/HRP, provavelmente o OIC e sua estrutura química.	66
Figura 41 – Eletroforese em gel de agarose: <i>Linha 1</i> : plasmídio para controle; <i>Linha 2</i> : plasmídio com 1 mM IAA; <i>Linha 3</i> : plasmídio com 10µM HRP; <i>Linha 4</i> : plasmídio, 1 mM IAA/10 µM HRP e <i>Linha 5</i> : os plasmídios acrescentados após a incubação de IAA/HRP por 2 h a 37°C conforme descrito em Materiais e Métodos. SC: “supercoiled” (forma enovelada); OC: “open circle” (forma circular aberta).	68
Figura 42 – Eletroforese em gel de agarose - <i>Linha 1</i> : plasmídios para controle; <i>Linha 2</i> : plasmídios com 1mM IAA; <i>Linha 3</i> : plasmídios com 10µM HRP; <i>Linha 4</i> : 1 mM IAA/10 µM HRP na ausência de plasmídios; <i>Linha 5</i> : plasmídios com	

1 mM IAA/10 μ M HRP e <i>Linha 6</i> : plasmídios com 2 mM IAA/10 μ M HRP. SC: "supercoiled" (forma enovelada); OC: "open circle" (forma circular aberta).....	69
Figura 43 – Eletroforese em gel de agarose - <i>Linha 1</i> : plasmídios para controle; <i>Linha 2</i> : plasmídios com etanol para controle; <i>Linha 3</i> : plasmídios com 1 μ M HRP; <i>Linha 4</i> : plasmídios com 1 μ M HRP e 10 mM BHT e <i>Linha 5</i> : 1 μ M HRP para controle. SC: "supercoiled" (forma enovelada); OC: "open circle" (forma circular aberta).....	70
Figura 44 – Eletroforese em gel de agarose - <i>Linha 1</i> : controle de plasmídios; <i>Linha 2</i> : controle de plasmídios com 1 μ M de HRP; <i>Linha 3</i> : controle de plasmídios com 5 mM de IAA; <i>Linhas 4 a 7</i> : plasmídios com 1 μ M de HRP e 0,2, 0,5, 1 e 5 mM de IAA respectivamente. SC: "supercoiled" (forma enovelada); OC: "open circle" (forma circular aberta).....	72
Figura 45 – Eletroforese em gel de agarose - Plasmídio pBR322 após incubação com ICA em várias concentrações.....	73
Figura 46 – Citotoxicidade do ICA em células CV1- P, após 5 h (análises em triplicata).....	75
Figura 47 – Citotoxicidade do ICA em células CV1-P, após 5 h (análises em triplicata).....	75
Figura 48 – Citotoxicidade do sistema IAA em células CV1-P, na presença de 1,7 μ g/mL de HRP, após 2 h (análises em triplicata).....	76
Figura 49 – Citotoxicidade do sistema IAA em células CV1-P nas concentrações de 0,05, 0,20, 0,50 e 1,00 mM com 1,5 μ g/mL HRP e 0,5 e 1,0 com 3,0 μ g/mL HRP (análises em triplicata).	77
Figura 50 – Citotoxicidade do sistema IAA em células CV1-P com 1,5 μ g/mL de HRP (análises em triplicata).	78
Figura 51 – Produtos de lipoperoxidação detectados em células CV1-P após tratamento com IAA (1 mM)/HRP (1,5 μ g/ μ L) por 24 h (análises em triplicata).	79
Figura 52 – Formação de 8-oxodGuo em células de fibroblastos CV1-P tratadas com IAA (1 mM) e HRP (1,5 μ g/mL) por 14 h de tratamento em condições de cultura celular.	81
Figura 53 – Curvas de calibração construídas com padrões e utilizadas na quantificação de dGuo e 8-oxodGuo.....	84
Figura 54 – Formação de 8-oxodGuo em neutrófilos tratados em cultura com IAA conforme descrito em Materiais e Métodos.....	85
Figura 55 – Formação de 8-oxodGuo em neutrófilos em cultura tratados com IAA (1 mM) por 12 e 36 h conforme descritos em Materiais e Métodos.	85

- Figura 56 – Estruturas tautoméricas entre os adutos 1,N²-εdGuo e A1 (Loureiro e col., 2000)..... 87
- Figura 57 – Cromatogramas das análises de A1 em DNA de neutrófilos controle (A) e tratados com 1mM de IAA (B) por LC/MS (módulo MRM), com seus respectivos padrões de adutos que foram incorporados ao DNA previamente..... 88
-

ABREVIações

1,N²-ϵdGuo	1,N ² -etenodesoxiguanosina
8-oxodAdo	8-oxodesoxiadenosina
8-oxodGuo	8-oxodesoxiguanosina
ACN	acetonitrila
AM	azul de metileno
APcl	ionização química a pressão atmosférica
BHT	hidroxitolueno butilado
CTC	cobre-tartarato-carbonato
dAdo	2'-desoxiadenosina
dCit	2'-desoxicitosina
dGuo	2'-desoxiguanosina
DME	meio de cultura Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	ácido desoxiribonucleico
EAS	9,10-dietilantraceno disulfonato
EASO₂	endoperóxido do 9,10-dietilantraceno disulfonato
EC	detector eletroquímico
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	ácido etilenediaminotetraacético
EPR	ressonância paramagnética eletrônica
ESI	ionização por "spray" de elétrons
HPLC	cromatografia líquida de alta performance
HRP	peroxidase de raiz forte
IAA	ácido indol-3-acético

BIBLIOTECA
INSTITUTO DE QUÍMICA
Universidade de São Paulo

IBAL	isobutanal
ICA	indol-3-carboxialdeído
ICA*	ICA excitado triplete
LC/MS	cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas
MeOH	metanol
MDA	malonaldeído
MRM	monitoramento de reação múltipla
MS	espectrometria de massas
MTT	brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil-2,5-difenil-2H)-tetrazolium
OIC	oxindol-3-carbinol
PDA	detector de fotodiodos em série
PBS	solução salina tamponada com fosfato
SFB	soro fetal bovino
S⁴U	4-tiouridina
SDS	dodecil sulfato de sódio
TBARS	espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico
TBA	ácido tiobarbitúrico
TCA	ácido tricloroacético
THF	tetrahidrofurano
TR	tempo de retenção na coluna cromatográfica
Tris	tris (hidroximetil) aminometano
Trp	triptofano
UV	ultra violeta

RESUMO

O ácido 3-indol acético (IAA), um conhecido hormônio de planta, e seu metabólito indol-3-carboxialdeído (ICA) têm sido envolvidos em várias patologias humanas como fenilcetonúria e doenças renais. A formação de espécies reativas de oxigênio e de estados eletronicamente excitados, como o oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) e a carbonila triplete ($\text{R}_2\text{-C=O}^*$), durante a oxidação aeróbica do IAA catalisada por peroxidase de raiz forte (HRP) têm sido relacionada com efeitos citotóxicos do IAA.

Nossos resultados indicam aumento na formação de 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina (8-oxodGuo) após o tratamento da base com o sistema IAA/HRP/ O_2 *in vitro*, medido por um detector eletroquímico acoplado a um sistema de cromatografia líquida de alta performance (HPLC-EC). O tratamento de células de mamíferos (CV1-P e neutrófilos) com este sistema induziu o aumento na formação de 8-oxodGuo no DNA, assim como o aumento no nível de lipoperoxidação das células CV1-P quando comparadas ao controle. Detectamos a presença do aduto 1, N^2 -etenodesoxiguanosina em DNA de neutrófilos submetidos ao IAA. Portanto, neste estudo, apresentamos evidências de danos em biomoléculas promovidos pelo sistema IAA/HRP/ O_2 .

ABSTRACT

Indole-3-acetic acid (IAA), a plant hormone, and its metabolite indole-3-carboxialdehyde (ICA) has been involved in several human pathologies as phenylketonuria and renal diseases. Formation of reactive oxygen species and electronically excited states as singlet oxygen ($^1\text{O}_2$) and triplet carbonyl ($\text{R}_2\text{-C=O}^*$), during the aerobic oxidation catalyzed by horseradish peroxidase (HRP) has been reported to be involved in the IAA cytotoxic effects.

Our results show an increase in the formation of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxodGuo) after IAA/HRP/ O_2 system treatment *in vitro* as inferred from high performance liquid chromatography-electrochemical detection (HPLC-EC) measurements. Treatment of mammalian cells (CV1-P and neutrophils) with the system induces 8-oxodGuo formation in DNA as well increased levels of lipid peroxidation CV1-P cells when compared to controls. The 1, N^2 -etenodeoxyguanosine was detected in neutrophils DNA. Therefore, in this study, we presented evidence of biomolecule damage by IAA/HRP/ O_2 system.

I. INTRODUÇÃO

I.1 O ÁCIDO INDOL-3-ACÉTICO (IAA)

O IAA é um importante hormônio de crescimento vegetal (auxina) que participa de diferentes processos de desenvolvimento e crescimento de plantas. O IAA é encontrado em níveis de picomoles em plantas podendo ser sintetizado *via* diversos mecanismos, dependentes de triptofano (Trp) ou utilizando o indol como precursor em um mecanismo independentemente de Trp. Entretanto, estes mecanismos ainda não estão completamente estabelecidos (Normanly e Bartel, 1999). A atividade do IAA é regulada metabolicamente através de duas *vias* irreversíveis: oxidação por peroxidases que resulta em descarboxilação e reações não descarboxilativas que formam conjugados não reativos (Folkes e Wardman, 2001 e referências citadas).

O conhecimento de mecanismos moleculares envolvidos na ação das auxinas é limitado. Entretanto, correlações positivas entre crescimento e a atividade de peroxidases demonstraram que uma peroxidase pode produzir derivados de auxina reativos capazes de ligar-se a nucleófilos celulares gerando reguladores moleculares finais de crescimento e de diferenciação *in vivo*. Os efeitos biológicos seriam provavelmente na maior parte governados pela proximidade do ambiente molecular na qual as espécies fossem geradas (Bednar e col., 1976).

O estudo do mecanismo de descarboxilação do IAA por peroxidase de raiz forte (HRP) é considerado extremamente complexo e apesar de estar sendo investigado extensivamente por décadas, ainda não está totalmente elucidado.

Em animais, o IAA pode ser obtido por ingestão de fibras vegetais contendo alta concentração desta substância, ser produzido por bactérias intestinais ou pela conversão do Trp em IAA em vários tecidos (Gordon e col., 1972; Mills e col., 1991). É encontrado no fluído espinhal, urina, sangue e em vários órgãos como o fígado, rim, pulmão e cérebro (Martínez e col., 1983).

Níveis plasmáticos de IAA, por exemplo, variam de 2 μM em condições fisiológicas a 11 μM em disfunções renais (Mabuchi e Nakahashi, 1988; Qureshi e Baig, 1993).

No sistema nervoso central de mamíferos, o IAA é predominantemente formado como resultado da desaminação oxidativa da triptamina, um suposto neurotransmissor ou neuromodulador, mediado pela monoamina oxidase (Gazarian e col., 1998). Embora seu papel biológico não seja conhecido até agora, alguns estudos relacionam os intermediários e os produtos formados pela oxidação do IAA a doenças neurodegenerativas tais como a de Alzheimer, de Parkinson e fenilcetonúria, onde a eliminação elevada de IAA é relatada podendo ser utilizada como um índice simples e sensível para essas alterações (Hu e Dryhurst, 1997).

A fenilcetonúria é uma doença hereditária do metabolismo que causa retardamento mental. O que ocorre, é o acúmulo de fenilalanina e de metabólitos anormais em todos os fluidos corporais e no cérebro devido a um bloqueio na conversão de fenilalanina em tirosina causada pela ausência ou deficiência de fenilalanina hidroxilase ou, mais raramente, de seu co-fator tetra-hidrobiopterina. O tratamento para esta doença é uma dieta com baixo teor de fenilalanina, que pode evitar esses danos cerebrais quando iniciada precocemente (Stryer, 1996).

A doença neurológica de Parkinson é associada à deficiência de dopamina causando rigidez muscular e tremores rítmicos progressivos, enquanto que o excesso de dopamina no cérebro é associado à esquizofrenia (Lehninger e col., 1993).

Foi demonstrado também que pacientes com a síndrome hereditária (H), com erupções cutâneas acompanhadas de ataxia cerebelar intermitente e com desorientação mental apresentam excreção de grandes quantidades deste indol acético assim como excesso de triptofano, indol-acetil-glutamina e indoxil sulfato (Weissbach e col., 1959).

As funções fisiológicas possivelmente existentes do IAA ou de seus metabólitos em um cérebro normal ou em tais estados patológicos são ainda desconhecidas.

I.2 A OXIDAÇÃO DO IAA CATALISADA POR PEROXIDASE

A oxidação do IAA catalisada por peroxidase de raiz forte (HRP) utiliza oxigênio molecular e tem como um de seus produtos majoritários o indol-3-carboxialdeído (ICA) e libera CO₂, através de uma reação fracamente quimiluminescente (Cilento, 1995). Diferentemente de outras oxidações catalisadas por HRP, a adição de H₂O₂ não é necessária neste caso:

Apesar da reação ser considerada uma importante via de degradação não há um consenso a respeito de seu mecanismo que será discutido mais adiante.

O ICA é considerado o principal produto de degradação do IAA e um metabólito do triptofano em plantas. Quantidades significativas de ICA foram detectadas em tecido adrenal tumoral humano e também em pâncreas e baço normais (Chen e col., 1974 e referência citada).

Foram demonstradas correlações diretas entre efeitos citotóxicos relativos ao IAA e a atividade de peroxidase em diversos tipos de células animais. No caso de linfócitos, que possuem atividade de peroxidase muito baixa, a adição de IAA não resultou em aumento de quimiluminescência e de consumo de oxigênio, e não foi citotóxica. Com relação aos parâmetros utilizados, os autores observaram o aumento dos efeitos na seguinte ordem: neutrófilos > macrófagos > linfócitos condizentes com a atividade de peroxidase de cada uma destas células (De Melo e col., 1997). Um estudo posterior do efeito da atividade de peroxidase das células demonstrou que a adição de IAA em neutrófilos *in vitro* promoveu mudanças pronunciadas em sua ultraestrutura e morte celular enquanto que em linfócitos não ocorreram estas alterações. A adição no meio de cultura das enzimas antioxidantes, superóxido dismutase e catalase, demonstrou um efeito protetor indicando a provável produção de superóxido e água oxigenada, mas o envolvimento de outra espécie reativa, provavelmente radical peroxila, é também sugerido (De Melo e col., 1998).

A oxidação do IAA e de alguns análogos catalisada por peroxidase mostrou a citotoxicidade do sistema IAA/HRP em células de fibroblastos de hamster (V79) em cultura e quebras em plasmídios induzidas pelo sistema IAA/HRP também foram relatadas (Folkes e col., 1999). O mesmo grupo demonstrou anteriormente (Candeias e col., 1995) a formação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), indicando lipoperoxidação desencadeada pelo sistema em lipossomas. As células V79 tratadas com 5-³H-IAA na presença de HRP demonstraram um aumento na medida de cintilação de 14 vezes, em relação ao controle sem HRP.

Utilizando-se o 2-¹³C-IAA marcado, foi demonstrada a incorporação desta espécie em tRNA, após a oxidação aeróbica catalisada por HRP (Bednar e col., 1976). Cepas de *Escherichia coli* (*E. coli*) contendo o plasmídio pAT153, sofreram quebras em fita de DNA quando exposta ao sistema IAA/HRP/O₂ (De Toledo e col., 1982) e cepas de *E. coli* deficientes em 4-tiouridina (S⁴U) exibiram uma sobrevivência maior do que a cepa selvagem, após tratamento com ICA triplete, sugerindo que S⁴U é um cromóforo importante no aparecimento dos efeitos letais dessa espécie (Duran e col., 1990).

Diversas reações de oxidação que ocorrem em sistemas biológicos emitem luz fraca. Produtos quimiluminescentes gerados em células vivas são verificados, por exemplo, na reoxigenação de coração de rato após isquemia (Barsacchi e col., 1989), em leucócitos (Cadenas e col., 1983) e macrófagos (Quickenden e Quee, 1974) em atividade de fagocitose e simplesmente em células isoladas de levedura.

A quimiluminescência ultrafraca espontânea pode ter diversas origens. A identificação da reação responsável pela emissão de luz requer, primeiramente, a identificação da molécula que no estado excitado, é responsável pela emissão e secundariamente, a identificação do mecanismo gerador desta espécie. Duas principais espécies tem sido relacionadas como responsáveis por esta quimiluminescência, o oxigênio singlete (¹O₂) e as carbonilas tripletes (R₂-C = O^{*}).

A geração de moléculas eletronicamente excitadas por uma reação química ou bioquímica é bem conhecida e atestada pela quimiluminescência e bioluminescência (Cilento, 1995).

Modelos enzimáticos geradores de espécies eletronicamente excitadas têm sido estudados, assim como a transferência de energia eletrônica para vários aceptores, inclusive macromoléculas e sistemas biológicos complexos. Acreditando que a formação destes produtos em estados eletronicamente excitados ocorra *in vivo* tendo outras finalidades que não somente a emissão de luz, mas que também possa ser utilizada em outros processos biológicos não quimiluminescentes, como a realização de trabalho tipicamente fotoquímico, Cilento e colaboradores iniciaram uma linha de pesquisa denominada "Fotobioquímica no escuro" (Cilento, 1995).

I.3 FORMAÇÃO DE ESPÉCIES ELETRONICAMENTE EXCITADAS

Em meados dos anos setenta, foram mostradas que várias reações aeróbicas catalisadas por HRP geram os produtos esperados da clivagem de um dioxetano intermediário, com alto rendimento de espécies tripletes. (Cilento, 1995; White e col. 1974).

A produção de espécies eletronicamente excitadas têm sido demonstrada principalmente pela oxidação enzimática aeróbica catalisada por peroxidases. Por exemplo, a degradação oxidativa da clorofila por HRP/H₂O₂ que resulta em espécies excitadas eletronicamente, como indicado pela emissão de luz. A oxidação do IAA catalisada pela HRP é da mesma forma acompanhada por quimiluminescência. A reação catalisada por HRP que gera compostos carbonílicos em seu estado eletronicamente excitado mais extensivamente estudada e caracterizada é a oxidação do isobutanal (IBAL) (Figura 1) (Cilento, 1995):

Figura 1 – Oxidação enzimática do isobutanal.

Espécies carbonílicas eletronicamente excitadas são de interesse biológico porque elas podem ser geradas em sistemas celulares e têm sido relacionadas a mutagênese e carcinogênese espontâneas (Cilento e Adam, 1995; Adam e col., 1999 e referencias citadas). Estes compostos, gerados tanto por excitação direta como por decomposição térmica de 1,2-dioxetanos, têm sido apontados como indutores de danos oxidativos no DNA (Cilento e Adam, 1995; Adam e col., 1999).

Entretanto, pouco se conhece sobre danos ao DNA causado por compostos carbonílicos excitados produzidos enzimaticamente em sistemas bioquímicos sob condições fisiológicas. Por exemplo, demonstrou-se que a oxidação aeróbica

catalisada por HRP do isobutanol induz alterações no DNA, como as envolvidas pelas mudanças no espectro de dicroísmo circular (Faljoni e col., 1978), formação de sítios sensíveis a álcalis (Menck e col., 1986), e detecção de quebras de fitas de DNA no plasmídeo pBR322 (Adam e col., 1999).

Um papel deletério de espécies eletronicamente excitadas em processos associados a adutos do tipo de base de Schiff foi sugerido neste caso. Tais adutos poderiam estar relacionados com danos hepáticos produzidos por ingestão crônica de álcool, uma vez que acetaldeído é intermediário na sua metabolização (Medeiros e Bechara, 1986).

O envolvimento de um intermediário dioxetânico na oxidação aeróbica do IAA catalisada por HRP (no caso, dioxetanona) é compatível com os produtos observados, portanto, espera-se que o ICA seja formado no estado excitado. É possível que a fraca quimiluminescência do sistema IAA/HRP/O₂ seja devida ao ¹O₂ que seria formado pela transferência de energia da carbonila triplete ao oxigênio no estado fundamental (Figura 2).

O oxigênio molecular excitado eletronicamente ao estado singlete tem grande importância em sistemas químicos e biológicos devido a sua alta reatividade e envolvimento em processos fisiológicos (Edwards e col., 1999) e patológicos.

Figura 2 – Oxidação do IAA catalisada por HRP/ O_2 formando o ICA no estado excitado (ICA^*) e transferência de energia ao oxigênio fundamental formando o $^1\text{O}_2$.

Existem duas formas excitadas possíveis do oxigênio molecular $^3\Sigma_g^-$, uma designada $^1\Delta_g$, onde os elétrons estão no mesmo orbital, e a forma $^1\Sigma_g^+$, onde os elétrons estão com “spins” opostos em orbitais diferentes. O oxigênio singlete sendo uma molécula excitada, pode perder sua energia por decaimento ao estado fundamental tripleto, emitindo luz. O primeiro estado excitado $^1\Delta_g$ tem energia de 22,5 Kcal/mol acima do estado fundamental. Este estado apresenta vida-média alta (10^{-6}s), uma vez que a transição para o estado envolve a inversão de “spin”. O estado $^1\Sigma_g^+$, por sua vez tem energia de 37,5 Kcal/mol acima do estado fundamental e vida-média muito menor (10^{-11}s), decaindo rapidamente para o estado $^1\Delta_g$.

Considerando estas características, a única forma de oxigênio singlete que apresenta interesse em sistemas biológicos é a forma $^1\Delta_g$. Neste texto, oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) se refere sempre à forma $^1\Delta_g$ (Figura 3) (Kasha, 1985).

Estado		Orbital π^*2p	Energia (Kcal/mol)	Tempo de vida (s)
Fundamental	$^3\Sigma_g^-$	$\uparrow \quad \uparrow$		
Singlete	$^1\Delta_g$	$\uparrow\downarrow \quad \text{—}$	22,5	10^{-6}
Singlete	$^1\Sigma_g^+$	$\uparrow \quad \downarrow$	37,5	10^{-11}

Figura 3 – Estados eletrônicos do oxigênio molecular.

Sendo o oxigênio singlete uma molécula no estado eletrônico excitado, ela pode, como já foi dito, decair emitindo luz. Existem dois tipos de emissões possíveis:

Emissão Monomolecular (infra-vermelho)

Emissão Bimolecular (vermelho)

Estudos com emissão de luz específica do 1O_2 ($\lambda = 1270 \text{ nm}$) (Kanofsky, 1988) e com supressores específicos de 1O_2 (De Mello e col., 1980) reforçam a hipótese de que a fraca quimiluminescência do sistema IAA/HRP/ O_2 seja devida ao 1O_2 .

O oxigênio não é muito reativo com moléculas orgânicas comuns com elétrons pareados (regra de restrição de spin), mas é altamente reativo com radicais livres e moléculas no estado triplete excitado com elétron desemparelhado, como o ICA*.

Algumas moléculas podem sequestrar quimicamente o $^1\text{O}_2$, e o produto específico pode então ser identificado. Estas moléculas são consideradas ferramentas importantes no estudo do envolvimento de $^1\text{O}_2$ nas reações de interesse (Martinez e col., 2000^a). Um exemplo é a reação com derivados de antraceno solúveis em água, como o 9,10-dietilantraceno disulfonato (EAS), que reagindo especificamente com o $^1\text{O}_2$ forma um endoperóxido do 9,10-dietilantraceno disulfonato (EASO₂) estável que pode ser detectado e quantificado por HPLC (McCall, 1984; Di Mascio e Sies, 1989).

Atualmente, com exceção de alguns organismos especialmente adaptados para viver sob condições anaeróbicas, todos os animais e vegetais necessitam de oxigênio para uma produção eficiente de energia (Halliwell e Gutteridge, 1989). Entretanto, uma consequência da vida aeróbica são os danos estruturais a uma grande variedade de compostos orgânicos (DNA, proteínas, carboidratos e lipídios) que podem ocorrer devido a reações oxidativas causadas por espécies reativas de oxigênio ou radicais livres (Sies, 1986).

A participação do $^1\text{O}_2$ tem sido evidenciada em vários sistemas biológicos, entre eles: i) mecanismos de defesa como a fagocitose; ii) atividade hormonal de prostaglandinas; iii) fototerapia com pigmentos através da chamada ação fotodinâmica; iv) fotossensibilidade a drogas como clorpromazina e v) erros metabólicos como a porfiria eritropoiética (Di Mascio e col., 1995). A alta reatividade de $^1\text{O}_2$ com compostos insaturados, sulfetos e aminas resulta de sua alta eletrofilicidade e vida média relativamente longa (2-4 μs em H_2O e próximo a 700 μs em CCl_4). Assim, ácidos graxos insaturados, proteínas e DNA representam alvos biológicos importantes. Biomoléculas extensamente conjugadas como carotenóides, além de furanóides e tocoferóis, atuam como supressores físicos e químicos do $^1\text{O}_2$ e portanto exercem mecanismos de proteção contra os efeitos deletérios desta forma excitada do oxigênio (Di Mascio e col., 1995).

Com relação aos possíveis mecanismos de geração de $^1\text{O}_2$ pelo sistema IAA/HRP/O₂ existem duas possibilidades que estão sendo mais discutidas na literatura: a reação de transferência de energia direta do ICA* gerado pela clivagem

da dioxetanona para o O_2 (Figura 2) e envolvimento do radical peroxila através da adição de O_2 ao radical escatol gerando 1O_2 pelo mecanismo de Russell (Figura 4).

Figura 4 – Mecanismo de Russell para o radical peroxila formado a partir do radical escatol.

Uma questão importante, é a formação de 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina (8-oxodGuo) pela oxidação da 2'-desoxiguanosina (dGuo) pelo 1O_2 , que é conhecido como indutor por ser altamente reativo com moléculas ricas em elétrons no estado singlete (eletrofílico) (Figura 5) (Adam e col., 1995; Cadet e col., 1997; Martinez e col., 2002).

Um outro aspecto interessante é que o 1O_2 e outras espécies reativas de oxigênio são considerados como indutores do mecanismo apoptótico observado em células. A indução de apoptose por fotoprodutos do IAA em células humanas HL-60 e tumorais "Murine" NOS/2 não irradiadas foi estudada por Edwards e colaboradores (1999). Danos como efeito dose-resposta, alterações morfológicas de células mortas observadas por microscopia eletrônica e fragmentação de DNA marcado com nucleotídeos modificados analisada por fluxo citométrico por fluorescência, indicaram que os fotoprodutos (não caracterizados) induziram a morte celular por um mecanismo apoptótico (Edwards e col., 1999).

Figura 5 – Oxidação de dGuo por $^1\text{O}_2$ formando 8-oxodGuo.

I.4 FORMAÇÃO DE RADICAIS LIVRES

Os radicais livres podem ser definidos como qualquer espécie com existência independente que contenha um ou mais elétrons desemparelhados. A presença de um elétron livre geralmente torna os radicais livres reativos, embora a reatividade irá variar conforme a espécie (Halliwell e Gutteridge, 1989).

Lesões em biomoléculas causadas por radicais livres vêm sendo estudadas desde o início da radiobiologia, quando se estabeleceu que a irradiação de células cria íons, radicais livres, e espécies excitadas que podem provocar mutações e morte celular. A caracterização da enzima superóxido desmutase por McCord e Fridovich (McCord e Fridovich, 1969) nos finais dos anos 60 forneceu grande evidência da produção de radicais derivados de oxigênio durante os metabolismos normais, criando um excepcional estímulo ao estudo de espécies reativas em sistemas biológicos.

A utilização oxigênio molecular para a obtenção de energia pelos organismos aeróbicos está associada à possibilidade de que biomoléculas e estruturas celulares sofram danos oxidativos, um fenômeno conhecido como estresse oxidativo. Dessas reações oxidativas, as que têm sido mais estudadas são as reações de radicais livres em cadeia que levam a degradação de biomoléculas. Portanto, o conceito de estresse oxidativo é associado a vários processos de doenças incluindo envelhecimento, câncer e inflamação (Augusto e col., 1995).

Vários pesquisadores (Nakajima e Yamazaki, 1979; Metodiewa e col., 1992) sugeriram a existência de um radical livre centrado no carbono, o escatol, derivado do IAA que seria um intermediário de sua degradação, mostrando mecanismos que seriam compatíveis com sua formação. Candeias e colaboradores (Candeias e col., 1995) usaram um modelo químico, no qual a peroxidação enzimática de lipossomos foi aumentada pelo IAA, para demonstrar o conceito da amplificação do estresse oxidativo. O efeito foi atribuído a reação de um radical peroxil derivado do IAA com um lipídio para iniciar a peroxidação lipídica. Por radiólise de pulso, mostraram a formação de cátions radicais formados na oxidação do IAA pela HRP em pH 3 a 4,

que são descarboxilados pela quebra da ligação C-C da cadeia lateral do ácido acético resultando no radical escatol. A dependência do pH apresentada em espectros de absorção é explicada pela desprotonação do cátion radical (IAA^{•+}) no N1 para produzir radicais indolil ($pK_a = 5,1$). A formação de radicais peroxila é dada pela adição de O₂ ao radical escatol, explicando o consumo de O₂. Os radicais peroxila propagariam a cadeia de formação de novos radicais pela abstração de hidrogênio (Figura 6).

Figura 6 – Formação do radical escatol e propagação da cadeia radicalar.

No trabalho apresentado por Candeias os radicais estariam reagindo com lipídios insaturados desencadeando a peroxidação lipídica demonstrada em seus resultados (Candeias e col., 1995). A abstração de hidrogênios do próprio IAA, formando novos radicais IAA[•] também é sugerida (De Mello e col., 1980).

O radical escatol como um intermediário foi detectado por ressonância paramagnética eletrônica (RPE) (Mottley e Mason, 1986) e por espectrometria de massa (MS) (Gazarian e col., 1998), contribuindo com a elucidação do mecanismo proposto.

Kobayashi e colaboradores (1980) demonstraram que a emissão de luz do IAA aumenta na presença de H_2O_2 e discutiram a produção do IAA^{*+} no sistema H_2O_2 /mieloperoxidase/IAA através de estudos comparativos de espectros de quimiluminescência e de fosforescência originado de um IAA eletronicamente excitado.

As espécies reativas de oxigênio e os radicais livres são formados continuamente em células de organismos vivos como produtos do metabolismo. Quando produzidos nas células, alguns desses radicais livres são capazes de reagir virtualmente com todos os tipos de biomoléculas. É estimado que todos os dias mais de 10 mil reações de oxidação causem danos ao DNA, em cada célula humana (Moller e Wallin, 1998).

I.5 FORMAÇÃO DE ADUTOS DE DNA

As ligações de compostos reativos ao DNA, cujo produto é denominado aduto de DNA, têm adquirido grande importância na pesquisa da mutagênese (espontânea ou não) e citotoxicidade que é potencialmente útil em quimioterapia (Lawley, 1994).

Existe a possibilidade da dosagem destes biomarcadores moleculares serem uma ferramenta não só na pesquisa do câncer como também no estudo de outras doenças degenerativas (Flora e col., 1996).

Existem várias fontes endógenas possíveis de danos ao DNA: espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, produtos da peroxidação lipídica, agentes alquilantes, estrógenos, agentes clorinantes e certos intermediários de algumas vias metabólicas (Burcham, 1999; Loureiro e col, 2002^a).

A reação de espécies reativas de oxigênio com o DNA resulta em muitos tipos de danos oxidativos: pequenas lesões oxidativas de base; quebra de fitas; ligações cruzadas; adutos exocíclicos, intracíclicos e alquilados; Compostos I (Moller e Wallin, 1998).

O aduto de DNA é considerado um precursor de mutações, que ocorreriam supostamente nos locais do aduto de DNA ou próximos a eles, através de erros ou bloqueio da replicação durante a síntese de DNA. As origens destas mutações podem ser complexas, podendo ocorrer como resultado de reações químicas, mutações por mudança do quadro de leitura, deleção ou substituição das bases (Garner, 1998 e Grollman e Shibutani, 1994). Os dados obtidos até agora evidenciam inequivocamente que muitos, senão a maioria dos adutos, tem potencial para causar mutações (Hemminki, 1993). As mutações geralmente ocorrem em bases que são alvos específicos dos agentes, por exemplo: guanina e adenina são alvos para a cisplatina (Kat e Thilly, 1993).

Alterações na sequência de DNA pela exposição a genotóxicos podem originar infinitas alterações dentro da célula, incluindo a ativação ou desativação dos genes, expressões de proteínas com anomalias ou alterações no controle do ciclo celular. Por exemplo, se a mutação ocorrer em um gene que especifica uma

enzima de reparo de DNA, e faltar fidelidade no reparo, então ocorrerá uma cascata de novas mutações levando à perda de regulação e disfunção celulares adicionais. Assim, um evento genético isolado, pode resultar em um grupo muito grande de mutações (Garner, 1998).

Sua presença entretanto não implica no desenvolvimento da doença, desde que o aduto possa ser removido *via* mecanismos de reparo de DNA, e mais eventos prévios importantes são necessários para o aparecimento clínico da doença. Em todo caso, desde que a dose molecular leve em conta a variabilidade de fatores individuais na toxicinética e metabolismo, a presença do aduto pode refletir um elevado risco de desenvolvimento da doença, mais verdadeiro que a exposição a uma avaliação externa (Flora e col., 1996).

A lesão ao DNA mais extensivamente estudada é a 8-oxodGuo. Verificou-se que é uma lesão mutagênica em bactérias e células de mamífero, levando principalmente a transversões G→T (Moriya, 1993; Le Page e col., 1995). A 8-oxoadenina (8-oxoAdo), timina glicol, 5-hidroxiuracila, uracila glicol e 5-hidroxi-desoxicidina também são lesões mutagênicas (Wang e col., 1998; Kreutzer e Essigmann, 1998).

A integridade do DNA é mantida de várias maneiras, e vários níveis de defesa contra o efeito oxidativo podem ser supostos. Em um primeiro nível, o DNA é protegido pela ação de antioxidantes. As células são capazes tanto de eliminar nucleosídeos trifosfatados danificados do "pool" citossólico quanto de remover um nucleotídeo danificado da hélice de DNA (Moller e Wallin, 1998). A existência de um complexo sistema de reparo em *E. coli* para reduzir a mutagênese devida a 8-oxodGuo foi uma importante descoberta que sustenta a hipótese de que danos oxidativos no DNA levam a ocorrência de mutações espontâneas. Este sistema inclui uma glicosilase para remover 8-oxoguanina do DNA, uma glicosilase que remove adenina no pareamento errado 8-oxodGuo:dAdo e uma hidrolase para eliminar 8-oxodGTP da reserva de nucleotídeos (Tchou e col., 1991; Michaels e col., 1992; Mo e col., 1992). Existem também glicosilases para remoção de outras bases oxidadas do DNA (Singer e Hang, 1997), sendo que as endonucleases III e

VIII de *E.coli* participam da remoção de diversas pirimidinas oxidadas, tal como timina glicol, 6-hidroxi-5,6-dihidrocitosina e uracila glicol (Katcher e Wallace, 1983; Breimer e Lindahl, 1984; Singer e Hang, 1997; Purmal e col., 1998). Homólogos dessas enzimas de reparo estão presentes em organismos eucariontes (Demple e Harrison, 1994; Girard e Boiteux, 1997; Mitra e col., 1997).

O desenvolvimento de métodos analíticos ultra-sensíveis, tais como GC-MS, LC/ESI-MS, HPLC/radioimunoensaio, imunoafinidade/³²P-postlabeling, tornaram possível a detecção confiável de adutos em DNA, seguido pela detecção até mesmo de níveis basais. Com os avanços tecnológicos, a elucidação de estruturas de adutos específicos com limites de detecção de 1 aduto em 10⁸ nucleotídeos não modificados ou até menor foram possíveis (Kriek e col., 1998). Níveis de 8-oxoGuo e 8-oxodGuo relatados em tecidos humanos variam de 1 aduto em 10⁷ nucleotídeos a 1 aduto em 10³ nucleotídeos (Cadet e col., 1997) e os níveis basais nos mesmos tecidos relatados por diferentes laboratórios variam em ordens de magnitude (Beckman e Ames, 1999). Muitos esforços têm sido feitos no sentido de identificar e controlar as fontes de erros dessas medidas (Ravanat e col., 1995; Cadet e col., 1997; Jenner e col., 1998).

Dentre os adutos exocíclicos de DNA, os etenoadutos têm sido bastante estudados. Níveis basais de vários adutos exocíclicos, incluindo os etenoadutos 1,*N*⁶-eteno-2'-desoxiadenosina, 3,*N*⁴-eteno-2'-desoxicitidina e *N*²,3-eteno-2'-desoxiguanosina, passaram a ser observado em DNA de roedores e humanos não expostos a carcinógenos (Bartsch e col., 1994; Chung e col., 1996; Nair e col., 1999). Tais observações estimularam a busca por substâncias geradas endogenamente que poderiam levar à formação dessas lesões. Há, atualmente, muitas evidências de que níveis basais dos adutos exocíclicos são derivados da reação de produtos da lipoperoxidação com o DNA (Loureiro e col., 2002^a).

Dentre os aldeídos produzidos endogenamente, pelo processo de lipoperoxidação, os mais estudados são o malonaldeído (MDA) e o 4-hidroxinonenal (Vaca e col., 1988). Os aldeídos são conhecidos por sua reatividade com bases de DNA. Cada vez mais, um número maior de trabalhos tem mostrado que os aldeídos

interagem diretamente com o DNA, causando danos genéticos, ou originando compostos com alta atividade mutagênica.

A mutagenicidade das substâncias depende não apenas da natureza e da velocidade de reação das mesmas com o DNA, mas também da estabilidade ou persistência dos produtos da reação *in vivo*. Essa estabilidade reflete a capacidade de reparo dos adutos formados. Foi verificado que os adutos formados entre MDA e guanina em DNA são muito persistentes, apresentando meia-vida de 12,5 dias (Kautiainen e col., 1993).

Muitos esforços estão sendo direcionados para a elucidação das fontes, o significado toxicológico e as conseqüências genéticas dessas lesões basais de DNA; os tipos de fatores exógenos ou condições patofisiológicas que levam ao seu aumento; e se esses adutos, quando gerados através de reações mediadas por estresse oxidativo, desempenham um papel na carcinogênese humana ou em outras doenças neurodegenerativas (Bartsch, 1999).

Apesar de ter sido sugerida a possibilidade de 1,N²-eteno-2'-desoxiguanosina (1,N²-εdGuo) ser um bom marcador para danos em DNA induzidos por produtos da peroxidação lipídica (Sodum e Chung, 1988), a sua formação em sistemas biológicos ainda não foi demonstrada (Möller e Wallin, 1998; Burcham, 1999). Os primeiros dados referentes a mutações induzidas por esse aduto em *E. coli* foram publicados em 1998 (Langouët e col., 1998) e células de mamífero (Akasaka e Guengerich, 1999) com a utilização de vetores dupla-fita.

A verificação de que os etenoadutos são reconhecidos por enzimas de reparo mostra a existência de mecanismos de defesa celular contra essas lesões genotóxicas (Bartsch, 1999). Todos esses estudos nos levam a acreditar que ao utilizarem-se métodos específicos e sensíveis para analisar amostras biológicas facilmente disponíveis, como leucócitos e urina, vários fatores etiológicos que influenciam a peroxidação lipídica, tais como dietas ricas em lipídios, baixos níveis de antioxidantes e processos inflamatórios, podem ser avaliados com a utilização dos etenoadutos como biomarcadores (Nair, 1999).

II. OBJETIVOS

O objetivo do trabalho foi investigar possíveis lesões em biomoléculas, principalmente em DNA, causadas por metabólitos, espécies reativas, incluindo as eletronicamente excitadas, envolvidas no sistema IAA/HRP/O₂. Considerando-se estas lesões foram realizados os estudos descritos abaixo:

- (I) Estudo da reação do sistema IAA/HRP/O₂ e do ICA, um de seus principais metabólitos, com desoxirribonucleosídeos, *in vitro*, para verificação da formação de possíveis adutos em DNA;
 - (II) Estudo da formação de 8-oxodGuo, *in vitro*, provocada pela incubação com o sistema IAA/HRP/O₂;
 - (III) Estudo com EAS para evidenciar a possível participação do ¹O₂ em lesões induzidas no sistema IAA/HRP/O₂;
 - (IV) Estudo de quebras em plasmídios após exposição ao sistema IAA/HRP/O₂;
 - (V) Exposição de células de fibroblastos, linhagem CV1-P, ao tratamento com o sistema IAA/HRP/O₂, para verificação de citotoxicidade, formação de lesões em DNA (8-oxodGuo) e danos oxidativos a membrana celular (lipoperoxidação);
 - (VI) Exposição de neutrófilos, extraídos de ratas, linhagem Wistar, ao tratamento com IAA, para verificação de formação de 8-oxodGuo em DNA.
-

III. MATERIAIS E MÉTODOS

III.1 REAGENTES

A água utilizada foi tratada pelo *Water System Nonopure* da marca Barnstead. Todos os solventes e tampões utilizados em HPLC foram previamente degaseificados com hélio e filtrados em filtro de Nylon de poro 22 µm da marca Nalgene®.

Os reagentes e solventes foram adquiridos das seguintes marcas:

Em Science: acetonitrila (ACN) e metanol (MeOH).

Merck: azul de metileno (AM), 2'-desoxiadenosina (dAdo), etanol, benzeno, diclorometano, butanol, ácido clorídrico, ácido fórmico e o ácido acético glacial.

Sigma: IAA, dGuo, 2'-desoxicitosina (dCit), HRP tipo VIA, formiato de amônio, penicilina-estreptomicina, sulfato de estreptomicina, ampicilina, tripsina, ácido etilenediaminotetraacético (EDTA), bicarbonato de sódio, carbonato de sódio, hidróxido de sódio, hidrobórato de sódio, cloreto de sódio, acetato de sódio, acetato de potássio, fosfato mono e dibásico de sódio, sulfato de magnésio, fosfato de potássio, hidroxitolueno butilado (BHT), resina Chelex® 100, terra de diatomáceas, agarose, dodecil sulfato de sódio (SDS), proteinase K, fosfatase alcalina, nuclease P1, RNase T1, tampão Tris-borato EDTA (TBE), meio LB, meio Eagle modificado por Dulbecco (DME), meio RPMI-1640, glicogênio tipo II de ostra, tetrahydrofurano (THF), dimetilsulfóxido (DMSO), ácido tiobarbitúrico (TBA), ácido tricloroacético (TCA), reagente de Folin&Ciocalteu (fosfomolibdato/fosfotungstato) e isopropanol.

Aldrich: RNase A, Oxone®, 1,1,1-trifluoroacetona 97% e água deuterada.

Peróxidos do Brasil: H₂O₂ (35%).

Fluka: ICA.

USB®: brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil-2,5-difenil-2H)-tetrazolium (MTT)

Pharmacia Biotech: azul de bromofenol, brometo de etídio, Ficoll, tris (hidroximetil) aminometano.Cl (Tris.Cl).

Cultilab: soro fetal bovino (SFB).

O 9,10-dietilantraceno disulfonato (EAS) foi sintetizado no laboratório segundo Mcall (1984) e Di Mascio e Sies (1989).

III.2 EQUIPAMENTOS

Os seguintes equipamentos foram utilizados:

- espectrofotômetro U-3000 da Hitachi;
 - agitador Thermomixer Comfort da Eppendorf com controle de temperatura;
 - centrífuga modelo 5804 R da Eppendorf;
 - centrífuga modelo Himac CR 21E da Hitachi;
 - liofilizador E-C Micro Modulyo, Speed Vac® Plus com bomba Savant;
 - pHmetro modelo 320 da Corning.
 - sistema de Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC): por 2 bombas Shimadzu LC-10ADVP, um injetor Rheodyne, detector de absorbância UV-Vis SPD-10AVVP, detector de fotodiodos em série (PDA) SPD-M10AVVP com injetor automático SIL-10ADVP, detector eletroquímico (EC) digital Antec DECADE, todos estes componentes controlados por um Controlador de Sistema SCL-10AVP e software CLASS-VP versão 5.03 da Shimadzu (Shimadzu, Kyoto - Japan) interfaciados a um microcomputador;
 - espectrômetro de massas Quattro II (Micromass, Manchester, UK) com uma fonte de ionização química a pressão atmosférica e dois tipos de "probes": ionização por "spray" de elétrons (ESI) e ionização química a pressão atmosférica (APCI). O controle do equipamento e a aquisição dos dados foram realizados através do software Masslynx 3.2;
 - fonte para eletroforese: Power Supply EPS 200 da Pharmacia Biotech;
 - Image Master VDS da Pharmacia Biotech;
 - cuba de eletroforese horizontal GNA 100 da Pharmacia Biotech;
-

III.3 MÉTODOS

III.3.1 Cromatografia líquida de alta performance (HPLC)

Nas separações e identificações dos produtos feitas por HPLC, utilizou-se detectores de absorbância UV ou de fotodiodos em série ("diode-array"). As fases móveis foram testadas e um método de separação e detecção apropriados foram desenvolvidos em cada experimento. Utilizou-se na maioria dos experimentos uma coluna de fase reversa C18 (150 x 4,6 mm, tamanho de partícula 5 μm) da SUPELCO com pré-coluna do mesmo tipo e marca. O fluxo utilizado, quando não especificado, foi de 1 mL/min.

III.3.1.1 Medida de 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina (8-oxodGuo)

A análise dos desoxirribonucleosídeos não modificados foi feita a partir da absorbância dos mesmos detectados a $\lambda = 254 \text{ nm}$ e a detecção eletroquímica da base modificada 8-oxodGuo a um potencial de +600 mV. Utilizou-se uma coluna de fase reversa C18 (Spherex, 250 x 4,6 mm, tamanho da partícula: 5 μm) da Phenomenex. A fase móvel utilizada foi uma solução de 10% MeOH/ KH_2PO_4 50 mM pH 5,5.

Os cromatogramas resultantes foram analisados em computador com o auxílio do software onde são integradas as áreas dos picos referentes aos desoxirribonucleosídeos e à 8-oxodGuo. Para determinação das quantidades equivalentes em resíduos de 8-oxodGuo/ 10^6 dGuo, foram injetados padrões de dGuo nas concentrações de 0,005, 0,01, 0,02 e 0,03 μmol e de 8-oxodGuo ($\epsilon_{246} = 12.600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) de 1,25, 2,5, 5,0 e 10 pmol para a determinação de curvas de calibração feitas para cada experimento e no mesmo dia das medidas.

III.3.2 Espectrometria de massas (MS)

Em todas as análises, foram realizadas injeções diretas (sem prévia separação cromatográfica) através de um injetor Rheodyne com "loop" de 10 μL . A

fase móvel era constituída por uma mistura de água/ACN (1:1), que era bombeada através de uma bomba de HPLC Shimadzu LC-10AD a um fluxo de 2 mL/min. A bomba era acoplada a um “splitter” que destinava 1/100 (20 µL/min) ao injetor e espectômetro. As amostras analisadas no modo positivo (ESI⁺) foram previamente misturadas a 0,2% de ácido fórmico antes da injeção. Foram feitas varreduras contínuas (“full-scan”) de 100 a 500 m/z utilizando-se diferentes voltagens de cone para obtenção de maior ou menor fragmentação da molécula.

III.3.3 Formação de adutos

A dGuo, a dAdo, a dCit, o ácido indol-3-acético e o indol-3-aldeído foram dissolvidos em várias concentrações e solventes, dependendo da incubação realizada. As incubações foram realizadas em um agitador Thermomixer Comfort da Eppendorf com controle de temperatura ou em sistemas de refluxo.

A HRP ($\epsilon_{403} = 102 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) e a H_2O_2 ($\epsilon_{240} = 43,6 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) foram dissolvidas em água ou água deuterada e suas concentrações foram determinadas por medida de absorbância de luz UV.

A peroxidase foi retirada das incubações utilizando-se um filtro ULTRAFREE-MC/Millipore (NMWL:10.000) da Sigma por centrifugação a 5.000 RCF durante 1 h a 10°C.

III.3.3.1 Incubações com indol-3-carboxialdeído (ICA)

Foram preparadas e analisadas incubações com as seguintes composições e condições de HPLC:

- 1) 1,7 mM de dGuo e 1,7 mM de ICA em 50% etanol/ tampão fosfato de sódio 100 mM pH 7,4 por 2 h a 37°C. HPLC: 20% ACN/ formiato de amônio 25 mM; volume injetado: 20 µL.
- 2) 1 mM de dGuo e 3 mM de ICA em 35% etanol/ tampão acetato de sódio 100 mM pH 5 por 24 h a 37°C. HPLC: 25% ACN/ formiato de amônio 25 mM; volume injetado: 20 µL.

- 3) 2,5 mM de dGuo e 46 mM de ICA em 50% ACN/ tampão carbonato de sódio 100 mM pH 9,4 por 24 h a 50°C. HPLC: 25% ACN/ formiato de amônio 25 mM; volume injetado: 20 µL.
- 4) 2,5 mM de dGuo e 35 mM de ICA em 50% ACN/ água por 24 h a 37°C. HPLC: 35% ACN/ formiato de amônio 25 mM; fluxo: 0,8 mL/min; volume injetado: 10 µL.
- 5) 30 mM de dGuo e 50 mM de ICA em DMSO por 1 h a 60°C. Alíquotas de 20 µL foram dissolvidas em 1 mL de água para análise em HPLC. HPLC: 35% ACN/ formiato de amônio 25 mM; volume injetado: 20 µL.
- 6) 1 mM de dGuo e 5,5 mM de ICA em 50% etanol/ tampão acetato de sódio 100 mM pH 5 por 9 dias a 60°C. HPLC: 30% ACN/ água; fluxo: 0,8 mL/min volume injetado: 20 µL.
- 7) 1 mM de dCit e 3 mM de ICA em 35% etanol/ tampão acetato de sódio 100 mM pH 5 por 24 h a 37°C. HPLC: 25% ACN/ formiato de amônio 25 mM; volume injetado: 20 µL.

Em todas as incubações descritas acima foram feitos controles contendo apenas o desoxinucleosídeo ou o ICA nas mesmas soluções utilizadas e submetidos as mesmas condições da incubação e análise por HPLC.

III.3.3.2 Incubações com IAA/HRP

Foram preparadas e analisadas incubações com as seguintes composições e condições de HPLC:

- 1) 1 mM de dGuo, 1mM de IAA e 3 µM de HRP em 10% etanol/ tampão acetato de sódio 100 mM pH 5 por 2 h a 37°C. A reação foi iniciada pela adição de IAA. HPLC: 35% MeOH/ água; volume injetado: 20 µL.
- 2) 1 mM de dGuo, 1mM de IAA, 3 µM de HRP e 15 mM de H₂O₂ em 10% etanol/ tampão acetato de sódio 100 mM pH 5 por 2 h a 37°C. A reação foi iniciada pela adição de IAA. HPLC: 35% MeOH/ água; volume injetado: 20 µL. Em todas as incubações descritas acima foram feitos controles nos mesmos solventes utilizados e submetidos as mesmas condições da incubação e análise por HPLC.

III.3.3.3 Incubações com ICA/H₂O₂

Foram incubados 2 mM de ICA , 50 mM de H₂O₂ e 1 mM de dGuo em 10% MeOH/ tampão acetato de sódio 100 mM pH 5 por 10 dias a 50°C. Outra duas incubações foram realizadas, substituindo-se o tampão utilizado pelo tampão fosfato de sódio 100 mM pH 7,4 e pelo tampão carbonato de sódio 100 mM pH 9,4.

O mesmo procedimento foi realizado com as bases dAdo (1 mM) e dCit (1 mM).

III.3.3.4 Incubações com IAA/H₂O₂

Foram incubados 2 mM de IAA , 50 mM de H₂O₂ e 1 mM de dGuo em 10% MeOH/ tampão acetato de sódio 100 mM pH 5 por 10 dias a 50°C. Outra duas incubações foram realizadas, substituindo-se o tampão utilizado pelo tampão fosfato de sódio 100 mM pH 7,4 e pelo tampão carbonato de sódio 100 mM pH 9,4. O mesmo procedimento foi realizado com as bases dAdo (1 mM) e dCit (1 mM).

III.3.3.5 Redução com NaBH₄

Foram incubados 7,5 µmol de dGuo em 0,8 mL de tampão fosfato de sódio 0,5 M pH 7,0 com 21 µmol de ICA em 0,2 mL de etanol por 18 h a 37°C com agitação. Foram adicionadas então, 3 mg de NaBH₄ por 3 vezes em intervalos de 30 min durante os quais o pH 7,0 era controlado com papel indicador com acréscimos de 3-5 µL de HCl 1M quando necessário. Após uma última adição de 6 mg e intervalo de 30 min a amostra foi centrifugada e o precipitado ressuspense em ACN (Fang e Vaca, 1995). Ambas as fases foram analisadas em HPLC com fase móvel de (ACN/água) de 0-25 min com 10-40% de ACN; 25-35 min de 40 a 10% ACN; 35-40 min isocrático de 10% ACN.

III.3.3.6 Sistema em benzeno anidro

Foram adicionados 0,5 mmol de dGuo e 0,5 mmol de ICA em 100 mL de benzeno anidro a um balão acoplado a um Dean-Starck (Moriarty e col., 1987) e

mantido em refluxo sob atmosfera de N₂ com agitação magnética, em banho de etilenoglicol, por 20 h. Alíquotas foram dissolvidas em ACN e analisadas por HPLC com fase móvel isocrática de 15% MeOH/água. O produto obtido foi purificado por HPLC e analisado por espectrometria de massa em modo ESI⁺ e voltagem do cone de 10 V.

III.3.3.7 Sistema em acetonitrila (ACN) anidra e peneira molecular 4Å

Foram refluxados em um balão, com peneira molecular 4Å (Moriarty e col., 1987), 0,625 mmol de dGuo e 0,025 mol de ICA em 20 mL de ACN anidra em banho de óleo por 23 h. O precipitado foi ressuspenso em MeOH e o sobrenadante foi concentrado por roto-evaporação. Ambas as fases foram analisadas por HPLC em fase móvel isocrática de 30% ACN/água.

III.3.3.8 Epoxidação do ICA por dioxirano gerado *in situ*

Na epoxidação por dioxirano gerado *in situ* (Yang e col., 1995), 0,2 mmol de ICA foi dissolvido em 1,5 mL de ACN e a esta mistura foram adicionados 1 mL de EDTA dissódico 0,4 mM. A mistura foi resfriada em banho de gelo e com uma seringa resfriada adicionou-se 0,2 mL de 1,1,1-trifluoroacetona.

Na solução homogênea foi adicionada durante 60 min, uma mistura de bicarbonato de sódio (1,55 mmol - 0,130 g) e Oxone[®] (1 mmol - 0,615 g) com controle de pH 7,0. Após 90 min, adicionou-se 20 mL de água à solução resultante e efetuou-se a extração com diclorometano (3 x 20 mL). Os extratos orgânicos combinados foram secos com MgSO₄, concentrados em roto-evaporador e ressuspenso em ACN.

A solução foi analisada por HPLC com fase móvel de 50% ACN/formiato de amônio 25 mM e por espectrometria de massa em modo ESI⁺ com voltagem do cone de 20 V sem prévia purificação.

Alíquotas de 400 µL da solução foram adicionadas a 500 µL de tampão fosfato de sódio 100 mM pH 7,4 com 4 µmol dGuo dissolvida e incubadas por 15

dias a 60°C. Controles de dGuo apenas com os solventes adicionados foram realizados.

O mesmo experimento foi realizado substituindo-se o tampão fosfato de sódio pelo tampão carbonato de sódio 200 mM pH 9,4 e pelo tampão acetato de sódio 100 mM pH 5,0. As mesmas incubações foram realizadas com as bases dAdo e dCit nos 3 tampões (pH's) decritos acima.

As incubações foram analisadas por HPLC em fase móvel em gradiente de 0-5 min com 5% de ACN/água; 5-30 min de 5 a 40% ACN; 30-35 min de 40-5% e 35-40 min isocrático de 5% ACN.

III.3.3.9 Sistema em tetrahidrofurano (THF)

Foram incubados 7 μ mol de ICA dissolvidos em 0,5 mL de THF (previamente exposto a luz por vários dias para formação de peróxidos) com 4 μ mol de dGuo dissolvida em 0,5 mL de tampão fosfato de sódio 100 mM pH 7,4 por 10 dias a 50°C. Controles de dGuo e ICA apenas com os solventes adicionados foram realizados. O mesmo experimento foi realizado substituindo-se o tampão fosfato de sódio pelo tampão carbonato de sódio 200 mM pH 9,4 e pelo tampão acetato de sódio 100 mM pH 5,0.

As mesmas incubações foram realizadas com as bases dAdo e dCit nos 3 tampões (pH's) decritos acima.

III.3.3.10 Ativação do ICA com H_2O_2/OH^-

Para a peroxidação do ICA com H_2O_2/OH^- foram adicionados 100 mg de ICA (0,7 mmol), 1,5 mL de H_2O_2 35% e 5 mL de ACN em um frasco com circulação externa de água e com agitação magnética. A mistura foi resfriada a 10°C e 100 μ L de NaOH 6 M foram adicionados, após cada 15 min mais 50 μ L eram adicionados durante 1 h. A seguir, a solução foi incubada sob agitação por 2 h. Ao final adicionou-se 5 mL de água e os produtos foram extraídos com diclorometano (3 x 5

mL). Os extratos combinados foram lavados com 1 volume de água, secos com MgSO_4 e concentrados no rota-evaporador.

O experimento foi repetido em condições mais brandas de oxidação. Foram adicionados 50 mg de ICA (0,35 mmol), 1,5 mL de H_2O_2 35% e 5 mL de ACN em um frasco com circulação externa de água resfriada a 10°C e com agitação magnética.

Foram adicionados 10 μL de NaOH 6 M. Após 10 min mais 20 μL foram adicionados. A seguir, a solução foi incubada sob agitação por 2,5 h. Ao final adicionou-se 5 mL de água e os produtos foram extraídos com diclorometano (3 x 5 mL). Os extratos combinados foram lavados com 1 volume de água, secos com MgSO_4 e concentrados no rota-evaporador.

Resultaram de cada um destes procedimentos uma fase orgânica concentrada, uma fase aquosa e houve a formação de um precipitado azul não identificado entre as fases que após sua separação apenas foi solúvel em DMSO. Foram realizadas 1 incubação com a fase aquosa do segundo procedimento e 2 incubações com as respectivas fases orgânicas extraídas:

- 1) Foram incubados 2,46 μmol de dGuo em 300 μL de tampão acetato de sódio 100 mM pH 5 com 600 μL da fase aquosa por 7 dias a 50°C. Outra duas incubações foram realizadas, substituindo-se o tampão utilizado pelo tampão fosfato de sódio 100 mM pH 7,4 e pelo tampão carbonato de sódio 100 mM pH 9,4.
- 2) Foram incubados 0,8 μmol de dGuo em 100 μL de tampão acetato de sódio 100 mM pH 5 com 200 μL da respectiva fase orgânica por 7 dias a 50°C. Outras duas incubações foram realizadas, substituindo-se o tampão utilizado pelo tampão fosfato de sódio 100 mM pH 7,4 e pelo tampão carbonato de sódio 100 mM pH 9,4.

As análises em HPLC foram realizadas em gradiente de água/ACN → de 1 a 10 min: 1% ACN; 10 a 30 min: 1-60%ACN; 30 a 35 min: 60-1%; 35 a 40 min: 1%.

III.3.3.11 Ativação do IAA com $^1\text{O}_2$

Aproximadamente 50 mg de IAA foram dissolvidos em 10 mL de etanol, acrescentou-se 200 μL de uma solução 10 mg/mL de AM em água, utilizado como

sensibilizador. A mistura de reação foi exposta diretamente por 4 h a uma lâmpada de 500 W a 10 cm enquanto O₂ era borbulhado na solução. O AM foi retirado com a utilização de resina Chelex® 100.

Foram incubados 2 mM de dGuo em tampão acetato de sódio 100 mM pH 5 e 250 µL da mistura de reação (v/v 1:1) por 5 dias a 50°C. Outra duas incubações foram realizadas, substituindo-se o tampão utilizado pelo tampão fosfato de sódio 100 mM pH 7,4 e pelo tampão carbonato de sódio 100 mM pH 9,4.

As análises em HPLC foram realizadas em gradiente de água/ACN de 1 a 10 min: 1% ACN; 10 a 30 min: 1-60% ACN; 30 a 40 min: 60% ACN ; 40 a 50 min: 60-1%; 50 a 60 min: 1%.

III.3.4 Estudo da captação de ¹O₂ gerado no sistema IAA/HRP/O₂ pela reação com EAS

III.3.4.1 Preparação do padrão de EASO₂

Foram dissolvidos 10 mg de EAS em 6 mL de D₂O em banho de 5°C, na presença de 15 µL de solução de AM em água (10 mg/mL) utilizado como sensibilizador, foram expostos diretamente por 2 h a uma lâmpada de 500 W a aproximadamente 10 cm e O₂ foi borbulhado na solução.

O AM foi retirado com a utilização de resina Chelex® 100. A análise e purificação do EASO₂ obtido foi feita por HPLC com fase móvel de 35% MeOH/formiato de amônio 100 mM pH 7,3. O produto foi seco em Speed Vac, ressuspenso em água e purificada novamente com fase móvel de 20% MeOH/água.

Após liofilização o produto foi caracterizado por espectrometria de massas no modo Apcl⁻, onde os seguintes picos foram encontrados: m/z = 228 correspondente a molécula de EASO₂ sem os dois átomos de sódio e portanto com duas cargas negativas ($m/z = (502 - 46)/2 = 228$); o pico m/z = 479 correspondente a molécula com apenas um átomo de sódio e uma carga negativa ($m/z = (502 - 23)/1 = 479$) e o pico m/z = 212 correspondente a molécula de EAS, pela perda do O₂, sem os dois átomos de sódio ($m/z = (470 - 46)/2 = 212$).

III.3.4.2 Incubação de IAA/HRP/O₂ com EAS

A partir de soluções estoque de 10 mM IAA em etanol, 44 μ M HRP em D₂O e 25 mM EAS em água, preparou-se uma reação com concentrações finais de 1 mM, 10 μ M e 2,5 mM respectivamente, a um volume final de 200 μ L em tampão acetato 100 mM pH 5,0 preparado com D₂O e saturado com O₂. O controle de endoperóxido do 9,10-dietilantraceno disulfonato foi comparado em relação ao tempo de retenção e por espectro de absorbância UV com padrão obtido por fossensibilização.

Para detecção do EAS e de seu endoperóxido EASO₂ em HPLC, foi utilizada a fase móvel de 30% MeOH/formiato de amônio 100 mM pH 7,3 em λ = 229 nm.

III.3.5 Incubações com DNA plasmidial

III.3.5.1 Extração de DNA plasmidial pBR322

As bactérias *E. coli* cepa HB101 transformadas com plasmídios pBR322 foram incubadas a 37°C em 3 mL de meio LB com 60 μ g/mL de ampicilina “overnight” (D.O. cerca de 1 em λ = 600 nm) sob agitação constante de 200 rpm. Então foram centrifugadas por 2 min a 13000 rpm e o sobrenadante descartado.

As bactérias foram ressuspensas em 500 μ L de Tris-Cl 50 mM, pH 8,0, contendo 10 mM de EDTA e 100 μ g/mL RNase A (livre de DNase) a temperatura ambiente. Foram adicionados 500 μ L de solução de lise (1% de SDS em 0,2 M de NaOH) à suspensão a temperatura ambiente e agitou-se gentilmente. Após 5 min foram adicionados 500 μ L de solução de neutralização (tampão acetato de potássio 4 M pH 4,8). A solução foi agitada e centrifugada por aproximadamente 7 min. Foi adicionado ao sobrenadante da centrifugação anterior aproximadamente o mesmo volume de tampão de ligação (guanidina 6 M).

Essa mistura foi aplicada na coluna de terra de diatomáceas livre de impurezas e succionada com bomba a vácuo sem deixar a coluna secar, para que o DNA se ligasse a coluna. Foi adicionada a solução de lavagem (80% isopropanol em água) e centrifugada por 4 min a 13000 rpm duas vezes.

A coluna foi transferida para um novo “eppendorf” e 50 μ L de tampão TE (10 mM Tris-HCl pH 8,5/1 mM EDTA) foram adicionados. A solução resultante foi deixada a temperatura ambiente por 10 min. A coluna foi centrifugada por 3 min a 13000 rpm. Esta etapa foi repetida e então a concentração de plasmídios foi medida por espectrofotometria a $\lambda = 260$ nm (1 D.O. = 50 μ g/mL).

III.3.5.2 Extração de DNA plasmidial pUC19

As bactérias *E. coli* cepa HB101 transformadas com plasmídios pUC19 de 2,8 Kb foram incubadas a 37°C em 1 L de meio LB com 60 μ g/mL de ampicilina “overnight” (D.O. cerca de 1 em $\lambda = 600$ nm) e centrifugadas por 20 min a 1500 g e o sobrenadante foi descartado. A extração do plasmídio pUC19 foi realizada conforme a utilização do kit de purificação de DNA, Wizard® Plus Megapreps da Promega. A concentração de plasmídios foi medida espectrofotometricamente a $\lambda = 260$ nm (1 D.O. = 50 μ g/mL).

III.3.5.3 Incubações

Foram realizadas incubações dos plasmídios a 37°C em um volume final de 100 μ L com os seguintes tratamentos:

- 1) plasmídios pBR322 incubados com 1mM IAA/10 μ M HRP por 2 h em tampão acetato de sódio 50 mM pH 3,8 com 2% etanol.
 - 2) plasmídios pUC19 incubados com 1 e 2 mM IAA/10 μ M HRP por 3 h em tampão 50 mM acetato de sódio pH 3,8 com 2% etanol e 30 μ M de EDTA.
 - 3) plasmídios pUC19 incubados com 1 μ M HRP e 10 mM BHT por 90 min em tampão fosfato de sódio 10 mM pH 7,2 com 2% etanol.
 - 4) plasmídios pUC19 incubados com 0,2, 0,5, 1 e 5 mM de IAA e 1 μ M HRP por 90 min em tampão fosfato de sódio 10 mM pH 7,2 com 6% etanol. As amostras foram secas no “Speed Vac” e ressuspensas em 80 μ L de água.
 - 5) plasmídios pBR322 incubados com 0,5; 1; 2; 4; 6 e 10 mM de ICA em por 2 h em tampão fosfato de sódio 100 mM pH 7.
-

III.3.5.4 Eletroforese

A eletroforese foi realizada em gel de 0,8 % agarose/1,8 μ M de brometo de etídio em tampão TBE (Tris – borato 90 mM/ EDTA 250 mM) pH 8,0. À 20 μ L da incubação foram misturados 15% de Ficoll tipo 400 e 0,25% de azul de bromofenol, aplicados no gel e submetidos a 35 mA e 35 mV durante o período de 2 a 3,5 h. Após a eletroforese as bandas de DNA foram visualizadas através da fluorescência do brometo de etídio intercalado ao DNA e fotografados.

III.3.6 Cultura celular

Foram utilizadas células de fibroblastos renais de macaco verde africano, linhagem CV1-P, cultivadas em meio Eagle modificado por DUBELCO (DME) com adição de 1,2 g/L de NaHCO_3 , 0,2 g/L de penicilina, 0,094 g/L de sulfato de estreptomicina e 10 % de soro fetal bovino (SFB). O meio foi filtrado em membrana de 0,22 μ m.

As culturas foram incubadas em atmosfera com 5% de CO_2 , a 37°C, no escuro. As células cresceram aderidas à superfície de garrafas plásticas de cultura e foram repicadas quando confluentes.

III.3.6.1 Repique das células

Após a retirada do meio, a cultura foi lavada duas vezes com PBS-A (solução salina tamponada com fosfato: 137 mM NaCl, 1,68 mM KCl, 47 mM Na_2HPO_4 , pH 7,0). A seguir, uma solução de 0,05% de tripsina em PBS-A com 1 mM de EDTA foi adicionada à cultura. Quando as células se desprenderam da garrafa, a solução foi retirada e as células foram ressuspensas em meio DME com 10% de SFB, homogenizadas e distribuídas para as novas garrafas com a diluição desejada. A contagem foi realizada em uma câmara de Neubauer. Todas as soluções foram mantidas em recipientes estéreis, armazenadas na geladeira, utilizadas a aproximadamente 37°C e a manipulação foi realizada próxima a chama em capela de cultura celular.

III.3.6.2 Citotoxicidade do ICA e do sistema IAA/HRP

As células foram plaqueadas com aproximadamente 5×10^5 células em 1 mL de meio. Uma curva de calibração para a posterior determinação da concentração foi construída. As células foram incubadas "overnight" para aderência e confluência em meio DME com 10% de SFB.

O meio foi então substituído por 1 mL de meio sem soro após lavagem das células com 500 μ L de PBS-A. O ICA ou o IAA dissolvidos em etanol foi adicionado na concentração final desejada. A HRP foi dissolvida em água e também adicionada para a concentração desejada. Células sem nenhum tratamento e tratadas apenas com etanol, ICA, IAA, ou HRP, nas mesmas concentrações foram utilizadas como controles. As células foram incubadas novamente pelo tempo desejado.

O meio com a droga foi retirado e as células foram lavadas com PBS-A novamente. Foi adicionado 1 mL de meio sem soro e em seguida 0,333 mL de solução de MTT (5mg/mL em PBS-A) (método modificado de Hansen e col., 1989). Após 3 h de incubação, 500 μ L de meio foi aspirado e 1 mL de solução de 10% de SDS (50%DMF/50% água, pH 4,8) foi adicionado. As células foram ressuspensas e a absorbância foi medida em $\lambda = 595$ nm a cerca de 50°C.

III.3.6.3 Tratamento para verificação da formação de 8-oxodGuo

As células foram plaqueadas com meio DME com 10% de SFB e incubadas para aderência e confluência. O tratamento e seus respectivos controles foram realizados com 1 mM de IAA e 1,5 μ g/ mL de HRP em meio sem soro. As células foram incubadas por 14 h e seu DNA foi extraído.

III.3.6.4 Extração de DNA

O método utilizado na extração de DNA foi modificado de Wang e colaboradores (1994). Cada placa contendo entre 10^6 - 10^7 células foi ressuspensa em 2 mL de PBS-A, homogenizadas e centrifugadas a 1500g x 10 min.

O "pellet" foi ressuspenso em 2 mL de tampão A (320 mM sacarose, 5 mM $MgCl_2$, 10 mM Tris.Cl, 0,1 mM desferroxamina e 1% TRITON X-100, pH 7,5),

homogenizado e centrifugado a 1500g x 10 min. Ao “pellet” coletado foi adicionado 600 µL de tampão B (10 mM Tris.Cl, 5 mM EDTA.Na₂, 0,15 mM desferroxamina, pH 8,0).

Após a homogenização foram adicionados 35 µL de uma solução de 10% SDS, 30 µL de RNase A (1 mg/mL em tampão C - 10 mM Tris.Cl, 1 mM EDTA, 2,5 mM desferroxamina, pH 7,4), 80 µL de RNase T1 (1 U/mL em tampão C) e incubado por 1 h a 37°C. Então, foram adicionados 40 µL de proteinase K (20 mg/mL em água) e incubado novamente por 1 h a 37°C. A mistura foi centrifugada a 5000 g x 15 min e o sobrenadante (DNA) foi coletado. Adicionou-se 1,2 mL de solução de NaI (7,6 mM NaI, 40 mM Tris.Cl, 20 mM EDTA.Na₂, 0,3 mM desferroxamina, pH 8,0), 2 mL de isopropanol e foi levado ao freezer “overnight” para precipitação do DNA.

Após centrifugação a 5000g x 15 min, o sobrenadante foi descartado e adicionou-se 1 mL de isopropanol gelado 60%. Centrifugou-se novamente e foi adicionado 1 mL de etanol 70% para lavagem. Adicionou-se 100 µL de desferroxamina 0,1 mM ao “pellet” após centrifugação a 5000g x 15 min para dissolver o DNA.

A pureza do DNA obtido foi verificada pelo cálculo da razão de absorbância nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm ($A_{260}/A_{280} \geq 1,8$). A concentração determinada pela relação 1 OD em 260 nm equivalem a 50 µg/mL.

III.3.6.5 Hidrólise do DNA

Adicionou-se ao DNA tampão acetato de sódio 1 M pH 4,8 para concentração final de 20 mM e Nuclease P1 (10 U/ 100 µg de DNA). O DNA foi incubado por 4 h a 37°C. Adicionou-se 100 µL de Tris.HCl para cada 1 mL de amostra e 1 U de fosfatase alcalina para cada 200 µg de DNA e incubou-se novamente por 2 h a 37°C. Foi adicionado 1 V de clorofórmio, centrifugado a 10.000 rpm por 10 min e o sobrenadante foi coletado cuidadosamente (Fiala e col., 1989).

Amostras de aproximadamente 100 µg de DNA hidrolisado foram injetadas no HPLC para análise de 8-oxodGuo segundo descrito anteriormente.

III.3.6.6 Tratamento para verificação de lipoperoxidação

As células foram plaqueadas com meio DME com 10% de SFB e incubadas para aderência e confluência. O tratamento e seus respectivos controles foram realizados com 1 mM de IAA e 1,5 µg/ mL de HRP em meio sem soro. As células foram incubadas por 24 h antes da análise e os tratamentos e controles foram realizados em triplicatas.

III.3.7 Medidas de Lipoperoxidação

TBARS foram medidas de acordo com Esterbauer e Cheeseman (1990). As células foram lavadas 2 vezes com PBS-A após aspiração do meio com o tratamento e cada placa foi lisada com 1,5 mL de solução de SDS 5%. Uma alíquota de 500 µL foi retirada após homogenização para análise posterior do conteúdo de proteínas para a normalização das medidas. Foram adicionados 50 µL de solução de EDTA 40 mM, 1 mL de solução de TBA: 10% TBA, 0,67% TCA e 0,01% BHT (aqueceu-se a 50°C para dissolver quando necessário). A mistura foi então aquecida a 90°C por 30 min e resfriada no gelo.

A extração de TBARS foi realizada com 1 mL de butanol. A fase orgânica foi coletada após centrifugação a 30.000 rpm x 10 min para análise da absorbância em $\lambda = 535 \text{ nm}$ e $\varepsilon = 153.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Após a determinação do conteúdo de proteína em cada amostra, os dados foram normalizados para nmol MDA/µg proteína.

III.3.7.1 Dosagem de proteínas

Uma alíquota de 10 µL do homogenizado de células em solução de SDS 5% foi adicionada a 390 µL de água. Adicionou-se 400 µL do reagente de Lowry e agitou-se imediatamente. Após 10 min, foram adicionados 200 µL de solução aquosa de Folin (0,4 N) e agitou-se a mistura imediatamente. A absorbância em $\lambda = 750 \text{ nm}$ foi medida após 30 min.

Uma curva de calibração com padrão de albumina bovina a partir uma solução aquosa estoque de albumina de 1 mg/mL foi construída com as concentrações finais de 10, 20, 40, 60, 80 e 100 µg/mL.

III.3.7.2 Preparação da solução de cobre-tartarato-carbonato (CTC) e do reagente de Lowry

Para a solução de CTC foram preparados separadamente 100 mL de solução aquosa de Na₂CO₃ 20%, 40 mL de solução aquosa contendo 0,2 g de sulfato de cobre e 40 mL de solução aquosa contendo 0,4 g de tartarato duplo de sódio e potássio. As duas últimas soluções foram misturadas e o volume completado para 100 mL. Adicionou-se lentamente a solução de Na₂CO₃ sob agitação magnética para evitar turbidez.

Concentrações finais de sulfato de cobre 1%; tartarato de potássio 0,2% e carbonato de sódio 10% em volume final de 200 mL de solução. Esta solução pode ser guardada por 2 meses a temperatura ambiente em frasco escuro.

O reagente de Lowry foi preparado adicionando-se 10 mL da solução de CTC, 10 mL de solução aquosa de SDS 10%, 8 mL de solução aquosa de NaOH 1 N e 12 mL de água. Esta solução pode ser guardada por 2 semanas a temperatura ambiente.

III.3.8 Neutrófilos

III.3.8.1 Tratamento dos ratos para extração dos neutrófilos

Foram utilizadas ratas da linhagem Wistar albinus pesando entre 200 e 300g. Extrudados intra-peritoniais foram obtidos após injeção de 20 mL glicogênio de ostra 1% em PBS estéril. Após 4 h os animais foram anestesiados com éter e sacrificados por rompimento da medula. As células foram coletadas após lavagem da cavidade peritonal com 40 mL de PBS. As células foram lavadas 3 vezes com PBS após centrifugação a 850g por 8 min. A contaminação por eritrócitos, quando

presente, foi removida por choque hipotônico, com água deionizada gelada, por alguns segundos.

As células foram ressuspensas após as lavagens em meio RPMI-1640 contendo 10% de SFB e cultivadas a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂. Este procedimento fornece populações de células com 95-98% de viabilidade, consistuídas de 90 a 96% de granulócitos (principalmente neutrófilos). A caracterização morfológica foi feita em esfregaço, usando-se a coloração de Leishman.

A suspensão de células pode ser mantida em um banho de gelo para manter a integridade celular por um período de até 5 a 6 h. A contagem das células foi feita em câmara de Neubauer com microscópio ótico e uma solução de Turck (30 mL de ácido acético glacial, 2 gotas de azul de metileno 1% em 1L de H₂O desmineralizada e filtrada em filtro de 0,22 mm) foi usada para coloração.

III.3.8.2 Tratamento dos neutrófilos para a extração de DNA

As células (cerca de 1×10^8 por placa) foram incubadas com 1 mM de IAA e cultivadas a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂ 37°C por 20 h. As células controles e tratadas com IAA foram centrifugadas (700g x 10 min) e lavadas com PBS para a retirada do meio. O procedimento de extração e hidrólise de DNA foi utilizado como já descrito anteriormente.

III.3.8.3 Análise da formação de 8-oxodGuo

Amostras de aproximadamente 100 µg de DNA hidrolisado foram injetadas no HPLC com detector UV e eletroquímico para análise de 8-oxodGuo conforme descrito anteriormente.

III.3.8.4 Detecção do aduto 1,N²- etenodesoxiguanosina (1,N²-εdGuo)

Um padrão concentrado de 1,N²-εdGuo (65 pmol/µL) foi analisado por HPLC, e seu tempo de retenção foi determinado. Em seguida, alíquotas de 100 µg de DNA

com 2 pmol de padrão marcado com ^{15}N foram coletados no tempo de retenção do padrão (Loureiro e col., 2000).

Utilizou-se um gradiente linear de acetonitrila, 0-5 minutos: 5% acetonitrila; 5-30 minutos 5% a 50% acetonitrila. A absorbância foi monitorada a 225 nm. Em seguida, as amostras coletadas foram liofilizadas e ressuspensas em 1mL de água e transferidas para “eppendorfs”. Este volume foi seco em um Speed Vac (Savant) e o resíduo diluído em 16 μL de água.

Foram injetadas 10 μL desta solução no LC/MS para a dosagem de $1,N^2$ - ϵ dGuo (correspondendo a 200 μg de DNA). A cromatografia líquida com detecção por espectrometria de massas operando com ionização por “spray” de elétrons no modo positivo (ESI^+) foi feita utilizando-se uma bomba LC-10AD da Shimadzu conectada a um divisor de fluxo (“splitter”) para bombear o eluente, uma mistura de água e acetonitrila (70:30 ou 50:50), através de uma coluna capilar Luna C18(2) (150 mm x 1 mm i.d., 3 μm , Phenomenex) a um fluxo de 7 $\mu\text{L}/\text{min}$ para o interior do espectrômetro Quattro II da Micromass.

No interior do espectrômetro, a amostra passa por um primeiro analisador onde é feita uma primeira seleção das moléculas a serem detectadas, daí para uma câmara de colisão onde ocorre a fragmentação das moléculas previamente selecionadas e esses fragmentos passam através de um segundo analisador onde ocorre uma segunda seleção das moléculas a serem detectadas no detector final. Os adutos dissolvidos em soluções aquosas contendo 0,2% de ácido fórmico (v/v) foram injetados na fase móvel através de um injetor Rheodyne conectado a um loop de 10 ou 20 μL .

Para a detecção foi utilizada a função de monitoramento de reação múltipla (MRM) do espectrômetro de massas, a qual permite monitorar a fragmentação de íons pais (no caso, m/z 292 e 297) para os correspondentes íons filhos (m/z 176 e 181 respectivamente) com grande sensibilidade (ao nível de poucos fmoles), sendo, finalmente, detectadas apenas as moléculas que apresentarem o padrão específico de fragmentação selecionado. A voltagem do cone foi mantida em 15 V, a pressão do gás de colisão (argônio) na célula de colisão em $6,7 \cdot 10^{-7}$ mbar e a energia de

colisão em 10 eV.

A temperatura da fonte foi ajustada para 100°C e os fluxos dos gases de secagem e nebulização (nitrogênio) para 350 e 10 L/h, respectivamente. O potencial do capilar foi ajustado para 3,10 kV e do eletrodo HV para 0,3 kV. Os dados foram processados com o software MassLynx 3.2 da Micromass.

IV. RESULTADOS E DISCUSSÕES

IV.1 FORMAÇÃO DE ADUTOS DE DNA *IN VITRO*

A formação de intermediários reativos do IAA ou de seus metabólitos pode levar a lesões em biomoléculas. Os aldeídos representam um grupo de compostos orgânicos relativamente reativos e o seu potencial carcinogênico tem sido demonstrado principalmente para o formaldeído e acetaldeído (Becker e col., 1996). Considerando esta possível toxicidade, a reação de um dos principais produtos de metabolização do IAA, o ICA, com desoxirribonucleosídeos do DNA foi investigada (Figura 7). A dGuo, a dAdo e a dCit possuem uma amina exocíclica (nucleofílica) capaz de reagir com o ICA, um aldeído, formando um aduto de DNA.

Figura 7 – Formação de aduto entre o IAA e a dGuo.

O mecanismo proposto seria o de formação de iminas (bases de Schiff) que são formadas a partir de um aldeído e uma amina primária, eliminando uma molécula de água (Figura 8).

Figura 8 – Equação geral para a formação de uma imina (base de Schiff).

A adição processa-se por ataque nucleofílico da amina ao átomo de carbono carbonílico. Muitas vezes, é necessário ajustar o pH do meio ao valor exato mais adequado para a reação. A protonação do átomo de oxigênio carbonílico torna-o mais suscetível ao ataque nucleofílico, sendo favorecido em valores baixos de pH. Entretanto, a base $\text{H}_2\text{N}-\text{R}_2$, pode também ser protonada, formando o íon $^+\text{H}_3\text{N}-\text{R}_2$ que deixa de ser nucleofílico pois não possui mais o par de elétrons não compartilhados. A adição, em relação ao composto de nitrogênio, é favorecida por valores de pH maiores. A solução em que a adição ocorrerá deverá ser ácida o suficiente para a protonação da carbonila, mas não tão ácida que a concentração de nitrogênio livre seja muito baixa. Portanto, as condições ideais a serem utilizadas dependerão da basicidade do reagente e da reatividade do composto carbonílico. Foram realizadas várias tentativas em busca das condições ideais para a formação do aduto.

Utilizou-se o método analítico de HPLC para as separações dos componentes das reações. O método de HPLC foi sendo desenvolvido paralelamente às incubações. No início, muitas dificuldades foram encontradas devido as diferenças de solubilidade. Realizou-se um estudo das solubilidades das bases e do ICA em vários solventes para serem utilizados nas incubações.

Para todos os experimentos analisou-se controles de ICA e desoxinucleosídeos nas mesmas condições. Um exemplo de uma análise das incubações realizadas está no cromatograma abaixo (Figura 9). Não foram encontrados novos picos referentes a novos produtos.

Estudamos também a formação do ICA, ou de outros produtos secundários, a partir da oxidação do IAA por HRP na presença de O_2 diretamente na incubação com a dGuo (Figura 10) e com a dGuo e H_2O_2 (Figura 11).

Figura 9 – Cromatograma da incubação de 30 mM de dGuo e 50 mM ICA em DMSO por 1h a 60°C. Análise por HPLC de fase reversa em $\lambda = 254$ nm conforme descrito em Materiais e Métodos.

Figura 10 – Cromatograma da incubação de dGuo 1 mM, IAA 1 mM e 3 μ M HRP em 10% etanol/tampão acetato 100 mM pH 5,0, por 2 h a 37°C. Análise por HPLC de fase reversa em $\lambda = 254$ nm conforme descrito em Materiais e Métodos.

Figura 11 – Cromatograma da incubação de 1 mM de dGuo, 1 mM de IAA, 3 μ M de HRP e 15 mM de H_2O_2 em 10% etanol/ tampão acetato 100 mM pH 5,0 por 120 min a 37°C. Análise por HPLC de fase reversa em $\lambda = 254$ nm conforme descrito em Materiais e Métodos.

Todos os picos das incubações com a dGuo foram observados nos controles, portanto não houve a formação de novos produtos aos menos com estabilidade e rendimento consideráveis.

Com o intuito de formar outros produtos de oxidação derivados do ICA ou do IAA, que pudessem reagir com as bases, realizamos incubações com alta concentração de H_2O_2 e com as bases dGuo, dAdo e dCit separadamente. Cada incubação foi realizada em 3 pH (5; 7,4 e 9,4) e cada uma com todos os controles conforme descrito em Materiais e Métodos, num total de 9 incubações com ICA e 9 com o IAA.

Um exemplo de análise realizada está no cromatograma da Figura 12. Os picos foram analisados por comparação no tempo de retenção e de seus respectivos espectros de UV. Não foram encontrados novos produtos em nenhuma dessas incubações.

Figura 12 – Cromatogramas da incubação de 2 mM de ICA com 1 mM de dGuo e 50 mM de H_2O_2 em 10% MeOH/ tampão fosfato 100 mM pH 7,4 por 10 dias a 50°C e de seus respectivos controles analisados por HPLC de fase reversa em $\lambda = 254$ nm conforme descrito em Materiais e Métodos.

Devido à instabilidade de iminas em meio aquoso ácido pois uma molécula de água pode adicionar-se a ligação $\text{C}=\text{N}$ formada revertendo a reação, Fang e Vaca (Fang e Vaca, 1995) sintetizaram um aduto entre a dGuo e o acetaldeído reduzindo o produto formado com NaBH_4 tornando-o estável para caracterização. Considerando esta hipótese tentamos reduzir o suposto produto formado entre a dGuo e o ICA com NaBH_4 (Figura 13).

Figura 13 – Redução de um possível aduto entre dGuo e ICA formando um produto estável.

Entretanto, nenhum novo produto foi identificado nas análises realizadas por HPLC nas condições utilizadas de incubação descrita em Materiais e Métodos.

A hipótese de que o produto formado poderia estar em baixa concentração levou-nos a duas tentativas em escala maior de síntese em meio anidro.

A primeira em benzeno anidro, com a utilização de um Dean-Stark para a retirada da água que estivesse presente no meio ou fosse formada (Moriarty e col., 1987). A solubilidade da dGuo em benzeno foi um variável limitante. Analisamos o sobrenadante por HPLC (Figura 14) e obtivemos um novo produto X com espectro de UV desconhecido (Figura 15). Este produto foi purificado por HPLC e analisado por espectrometria de massa (Figura 16).

Figura 14 – Cromatograma dos produtos de incubação da dGuo com o ICA em benzeno adquirido HPLC de fase reversa em $\lambda = 254$ nm conforme Materiais e Métodos. O produto X de interesse está indicado com a seta.

Figura 15 – Espectro de absorbância UV do produto X e da dGuo indicados no cromatograma acima (Figura 14).

Figura 16 – Espectro de massas obtido em modo ESI⁺ do produto (X) purificado conforme Materiais e Métodos.

O pico do íon molecular $[M+H]^+$ em m/z próximo a 242, não poderia ser do aduto esperado ($MW = 395$) pois sua massa é menor que a massa da dGuo ($m = 267$), mesmo considerando a perda da desoxirribose ($m = 116$). Este produto pode ser de degradação dos reagentes ou uma outra *vía* de reação pode estar ocorrendo, seria necessária a produção de quantidades maiores para a elucidação de sua estrutura.

Na segunda tentativa, a incubação da dGuo com o ICA foi realizada em ACN com peneira molecular para a retenção da água (Moriarty e col., 1987). Apesar da extração e separação dos produtos da peneira ter sido bastante trabalhosa, nenhum novo produto foi encontrado por análise em HPLC.

Outro mecanismo de reação proposto seria através da ativação do ICA pela sua epoxidação, tornando-o mais reativo. Um método de epoxidação bastante eficiente é através de dioxiranos, que são peróxidos cíclicos de 3 membros capazes de transferirem diretamente um átomo de oxigênio a uma dupla ligação.

Figura 17 – Epoxidação por dioxirano esperado para o ICA.

O uso do composto metil(trifluorometil)acetona permite a geração do metil(trifluorometil)dioxirano *in situ* (Yang e col., 1995) e foi utilizado na epoxidação do ICA (Figura 17). São apresentados, nas Figuras 18 e 19, o cromatograma da análise por HPLC dos produtos obtidos e seus espectros de absorbância UV, respectivamente.

Os espectros de absorvância de UV dos 2 primeiros picos com tempo de retenção = 1,42 e 2,34 min são desconhecidos podendo se tratar do epóxido ou de outras espécies derivadas. Realizamos uma análise direta por espectrometria de massa (Figura 20), que mostra o pico do íon molecular $[M+H]^+$ em $m/z = 146$ da molécula de ICA e um outro pico correspondente a adição de um átomo de oxigênio à molécula em $m/z = 162$, que seria o epóxido do ICA.

Figura 18 – Cromatograma dos produtos da epoxidação do ICA pela metil(trifluorometil)dioxirano gerada *in situ* analisados por HPLC de fase reversa em $\lambda = 221$ nm conforme descrito em Materiais e Métodos.

Figura 19 – Espectros de absorbância UV dos produtos de epoxidação do ICA referentes ao cromatograma da Figura 18.

Figura 20 – Espectro de massa dos produtos de epoxidação do ICA adquiridos em modo ESI⁺ conforme descrito em Materiais e Métodos.

Foram realizadas incubações de dCit, dAdo e dGuo com a mistura de reação da epoxidação do ICA em três pH's diferentes (5,0; 7,4 e 9,4), todos com seus respectivos controles. O desenvolvimento de um método de gradiente para análise em HPLC foi extremamente trabalhoso, assim como a análise destes cromatogramas. Os produtos foram comparados um a um por tempo de retenção e espectros de absorbância. Na Figura 21 podemos ver um exemplo da complexidade da análise.

Utilizamos também o THF, que quando exposto a luz por um longo tempo forma peróxidos bastante reativos e foi utilizado para a peroxidação do ICA. As incubações com dCit, dAdo e dGuo foram realizadas com o THF também em 3 pH's diferentes (5,0, 7,4 e 9,4), portanto 9 incubações. Os mesmos problemas e nível de dificuldades encontrados para a análise dos resultados por HPLC na incubação com o epóxido, descritos acima, se aplicaram também nestes estudos. Na Figura 22 podemos ver um exemplo de uma das incubações realizadas.

Figura 21 – Cromatogramas da incubação da mistura de reação da epoxidação do ICA por dioxirano com dGuo em tampão fosfato 100 mM pH 7,4 e seus respectivos controles analisados por HPLC de fase reversa em $\lambda = 220$ nm conforme descrito em Materiais e Métodos.

Figura 22 – Cromatograma da incubação ICA em THF contendo peróxidos com a dGuo em tampão fosfato 100 mM pH 7,4 analisado por HPLC de fase reversa em $\lambda = 254$ nm descrito em conforme descrito em Materiais e Métodos.

Em nenhum desses dois métodos identificamos um novo produto de reação. Como a mistura de análise é muito complexa, o produto caso exista, pode estar mascarado por co-eluição com alguns desses compostos ou não ser formado nestas condições.

Os experimentos tiveram prosseguimento tentando-se o uso de H_2O_2 em meio alcalino para a etapa de formação do possível intermediário reativo como um epóxido formado pelo mecanismo de Michael (Chen e col., 1995) (Figura 23). Foram realizadas 2 estratégias de adição de NaOH a mistura de ICA e H_2O_2 em ACN conforme descrito em Materiais e Métodos. Foram realizadas 3 incubações, 2 com as respectivas fases orgânicas extraídas e 1 com uma das fases aquosas. Cada um destes extratos foi incubado com a dGuo em 3 pH's diferentes, 5, 7,4 e 9,4. Não foram observados novos picos nos cromatogramas. Na Figura 24 pode-se observar um exemplo da análise.

Figura 23 – Mecanismo de Michael proposto para a formação de um epóxido no ICA.

Figura 24 – Cromatograma da incubação da fase orgânica de ICA/H₂O₂ em meio alcalino com a dGuo em tampão acetato de sódio 100 mM pH 5 analisado por HPLC de fase reversa em $\lambda = 254$ nm conforme descrito em Materiais e Métodos.

Foi realizada uma tentativa de abertura do anel indólico (Chen e col., 1995) do IAA com a utilização do AM como sensibilizador na presença de O₂, formando o ¹O₂ segundo a reação abaixo (Figura 25).

Figura 25 – Abertura do anel indólico do IAA.

Foram realizadas incubações de dCit, dAdo e dGuo com a mistura de reação do IAA em três pH's diferentes, 5,0, 7,4 e 9,4, e todos com seus respectivos controles. Os produtos foram comparados um a um por tempo de retenção e espectros de absorbância. Na Figura 26 podemos ver um exemplo da análise. A não detecção de um produto majoritário de reação pode também estar relacionada com o baixo rendimento da reação.

Figura 26 – Cromatograma da incubação de IAA/ O_2 com dGuo em tampão fosfato de sódio 100 mM pH 7,4 analisado por HPLC de fase reversa em $\lambda = 254$ nm conforme descrito em Materiais e Métodos.

IV.2 FORMAÇÃO DE 8-OXODGUO *IN VITRO*

O oxigênio não é muito reativo com moléculas orgânicas comuns com elétrons pareados, mas é altamente reativo com radicais livres e moléculas no estado triplete excitado com elétron desemparelhado. Devido a essa alta reatividade pode haver a transferência da energia do ICA*, que é formado no estado excitado pela oxidação do IAA catalisada pela HRP, para o oxigênio no estado fundamental gerando $^1\text{O}_2$ (Figura 2).

Demonstrou-se que o $^1\text{O}_2$ é altamente reativo com a dGuo intracelularmente formando a 8-oxodGuo (Figura 5) (Ravanat e col., 2000).

Considerando esta hipótese, estudamos a formação de 8-oxodGuo a partir da reação do sistema IAA/HRP/ O_2 com a dGuo *"in vitro"*. Testamos o efeito de peróxido de hidrogênio (Figura 27). Com a adição de H_2O_2 esperava-se um possível aumento na formação de 8-oxodGuo devido a reação de Fenton que poderia ocorrer com íons metálicos contaminantes gerando o radical hidroxila ($\text{HO}^\bullet$) que além do $^1\text{O}_2$, também oxida a dGuo na posição 8 do anel purínico. Observou-se um aumento de aproximadamente 3 a 5 vezes na formação de 8-oxodGuo em relação aos controles de dGuo. Entretanto, observamos que a adição de H_2O_2 ao sistema não aumentou a formação de 8-oxodGuo após as incubações de 2 e 24 horas, mas apresentou uma diminuição da quantidade de resíduos detectados. Sabe-se que a 8-oxodGuo também é substrato a oxidações subsequentes promovidas por espécies reativas envolvidas no sistema, o que explicaria a diminuição da quantidade de 8-oxodGuo observada.

Realizou-se o mesmo experimento com aumento da concentração de HRP (Figura 28). Em todos os experimentos observa-se a formação de 8-oxodGuo a temperatura ambiente. Não houve aumento proporcional de formação de 8-oxodGuo com a concentração de HRP nestas concentrações de substratos. Observa-se um aumento de resíduos de 8-oxodGuo após 3 h de incubação em relação a amostra não incubada mas não há diferença quantitativa significativa entre as incubações de 3 e 24 h. Possivelmente a concentração de substrato já seja saturante nestas condições e ocorram oxidações subsequentes da 8-oxodGuo.

Figura 27 – Formação de 8-oxodGuo pelo sistema IAA/HRP/O₂ com dGuo na ausência e presença de peróxido de hidrogênio (1mM). Incubação de IAA (1mM)/HRP (3 µM)/O₂ com dGuo (1mM) em tampão acetato de sódio 100 mM pH 5,0 (Volume final = 1500 µL) por 2 h e 24 h a 37°C.

Figura 28 – Formação de 8-oxodGuo pelo sistema IAA/HRP/O₂ com dGuo com variação de concentração de HRP e tempo de incubação. Incubação de IAA (1mM)/HRP (3, 6 e 10μM)/O₂ em tampão acetato de sódio 100 mM pH 5,0 com a dGuo (1mM) (Volume final =1500μL) por 24 h a 37°C.

Sabe-se que a água deuterada (D₂O) aumenta o tempo de vida do ¹O₂ (Merkel e Kearna, 1972). Se o sistema produz ¹O₂ e seu tempo de vida é aumentado na reação, quando realizada em meio de D₂O esperava-se um aumento da formação da 8-oxodGuo (Figura 29).

Observou-se aproximadamente o dobro de resíduos de 8-oxodGuo/10⁶dGuo na reação realizada em água deuterada em relação o realizada em água. Os experimentos com as incubações com água e água deuterada e as curvas de calibração da dGuo e 8-oxodGuo foram preparadas no mesmo dia e condições. Tais resultados indicam fortemente a participação de ¹O₂ no mecanismo de oxidação da dGuo *in vitro*, que poderia ser formado a partir dos mecanismos de transferência de energia direta do ICA* para o ³O₂ ou *via* mecanismo de Russell (Figuras 2 e 4).

Figura 29 – Formação de 8-oxo-dGuo pelo sistema IAA/HRP/O₂ em D₂O. Incubação de IAA(1mM)/HRP(6 μ M)/O₂ em tampão acetato de sódio 100 mM pH 5,0 com a dGuo (1mM) realizadas em água e água deuterada (Volume final = 150 μ L) por 3 h a 37°C.

IV.3 ESTUDO DA CAPTAÇÃO DO $^1\text{O}_2$ GERADO PELO SISTEMA IAA/HRP/ O_2 PELA REAÇÃO COM EAS

Algumas moléculas podem sequestrar o $^1\text{O}_2$, e o produto formado pode então ser identificado evidenciando a participação desta espécie reativa. Alguns exemplos desse tipo de reação são: a reação de Diels-Alder – ciclo adição (2+4) de dienos conjugados com $^1\text{O}_2$, formando endoperóxidos; a reação de alcenos com $^1\text{O}_2$ formando hidroperóxidos alílicos; a reação de sulfetos com $^1\text{O}_2$ formando sulfóxidos e a reação com derivados de antraceno solúveis em água que formam o respectivo endoperóxido estável.

Derivados de antraceno podem ser considerados modelos adequados para uso como captador de $^1\text{O}_2$, pois de acordo com o tipo e a posição dos substituintes no anel, a reatividade, estabilidade e solubilidade podem ser modificadas.

O derivado de antraceno o 9,10-dietilantraceno disulfonato (EAS) reage com $^1\text{O}_2$ para formar o endoperóxido correspondente (EASO₂) (Figura 30).

Figura 30 – Reação do EAS com $^1\text{O}_2$ gerando o EASO₂ (Martinez e col., 2000^b).

As vantagens deste captador são que outros oxidantes não são capazes de gerar este mesmo endoperóxido, sua solubilidade independe do pH, possui grande estabilidade (até 120°C) e pode ser detectado por HPLC (McCall, 1984 e Di Mascio e Sies, 1989).

Os resultados descritos anteriormente referentes à formação de 8-oxodGuo a partir da reação do sistema IAA/HRP/ O_2 com a dGuo in vitro em água deuterada

indicaram fortemente a participação de $^1\text{O}_2$ no mecanismo de oxidação da dGuo. Considerando estes resultados, realizamos a adição de EAS ao sistema para o trapeamento do $^1\text{O}_2$ formando o EASO_2 .

Nos experimentos iniciais, o pico do padrão de EASO_2 eluiu com tempo de retenção semelhante aos de outros produtos de oxidação da reação do sistema IAA/HRP/ O_2 dificultando sua identificação. Um padrão de EASO_2 foi sintetizado a partir do EAS com azul de metileno como sensibilizador e analisado por espectrometria de massa para auxiliar em sua detecção e identificação posterior em HPLC. O uso de um PDA para auxiliar nas identificações foi utilizado nos experimentos. Desta forma, conseguimos desenvolver um método cromatográfico para a detecção do EASO_2 no sistema em estudo.

A oxidação do IAA (1 mM) catalizada por HRP (10 μM) com a adição de EAS (1,2; 2,4 e 4,8 mM) para a quantificação do EASO_2 formado foi realizada em meio de D_2O . A Figura 31 mostra os cromatogramas dos controles de EAS/HRP e IAA/HRP e dos padrões de EAS, EASO_2 . Na reação de controle de IAA/HRP observamos a formação de ICA, que é produto majoritário e também de outros produtos minoritários.

Figura 31 – Cromatogramas dos controles (a) EAS/HRP; (b) EAS; (c) EASO_2 e (d) IAA/HRP incubados por 3,5 h a 37°C em D_2O e analisados por HPLC em $\lambda = 230 \text{ nm}$ conforme descrito em Materiais e Métodos.

No cromatograma da incubação do sistema IAA/HRP/O₂ na presença do EAS (Figura 32) observamos o EASO₂ e outros produtos formados que foram denominados A, B e C. Os produtos B e C formados na oxidação do IAA pela peroxidase na presença de EAS, não aparece nos controles incubados nas mesmas condições (Figura 31), podendo ser resultante de outros mecanismos de reação desconhecidos. O produto A é observado tanto no controle de EAS, quanto no de EAS/HRP, mas sua proporção aumenta na incubação com IAA.

Figura 32 – Cromatogramas da reação de IAA (1 mM)/HRP (10 μM)/O₂ na presença de EAS (2,4 mM) por 3,5 h a 37°C em D₂O e analisados por HPLC $\lambda=230$ nm conforme descrito em Materiais e Métodos.

Na Figura 33 temos os espectros de absorvância destes produtos. Podemos observar que o produto B possui um espectro bastante semelhante ao do EASO₂. A identificação do EASO₂ foi feita pela adição do padrão ("spike"), similaridade de espectro de UV e tempo de retenção (TR = 21,9 min).

A concentrações do EAS e EASO₂ foram determinadas por medidas de absorvância e a concentração foi determinada a partir de curvas de calibração construídas com os padrões (Figura 34).

Figura 33 – Espectros de absorvância dos produtos A, B, C e EASO₂ com seus respectivos tempos de retenção (TR).

Curvas de Calibração

Figura 34 – Curvas de calibração construídas com padrões e utilizadas na quantificação de EAS e EASO₂.

Nas 3 incubações realizadas com IAA/HRP observamos o consumo do EAS em aproximadamente 50%. Entretanto, o EASO₂ também foi consumido ao invés de

aumentar como era suposto pela captação do $^1\text{O}_2$ que seria gerado pelo sistema IAA/HRP/ O_2 (Figura 35 e 36).

Figura 35 – Quantificação do EAS nas incubações de IAA/HRP com (1) 1,2; (2) 2,4 e (3) 4,8 mM de EAS e nos controles de EAS e EAS/HRP nas mesmas condições.

Figura 36 – Quantificação do EASO₂ nas incubações de IAA/HRP com (1) 1,2; (2) 2,4 e (3) 4,8 mM de EAS e nos controles de EAS e EAS/HRP nas mesmas condições.

O comportamento dos outros produtos foi avaliado através da quantificação de suas respectivas áreas integradas a partir dos cromatogramas obtidos (Figura 37). Os produtos B e C não foram detectados nos controles de EAS e EAS/HRP, portanto a formação destes produtos ocorreu apenas na presença de IAA na incubação. O produto A estava presente nestes controles, e nota-se um acentuado aumento destas áreas nas incubações com IAA. Este aumento é difícil de ser

avaliado uma vez que o produto tem sua estrutura química desconhecida e portanto não pode ser devidamente quantificado.

Áreas dos Produtos Desconhecidos

Figura 37 – Áreas dos produtos desconhecidos A, B e C nas incubações de IAA/HRP com (1) 1,2; (2) 2,4 e (3) 4,8 mM de EAS e nos controles de EAS e EAS/HRP nas mesmas condições.

Conseguimos o espectro de massas do pico A (Figura 38) com análise por HPLC/MS, mas para uma melhor elucidação de sua estrutura seria necessária a purificação de maiores quantidades para análise de RMN.

Figura 38 – Espectro de massas do pico A adquirido em modo ES^- conforme descrito em Materiais e Metodos.

Comparando-se os cromatogramas de IAA/HRP/EAS e o controle de IAA/HRP observa-se que a formação de ICA é menor em relação à reação sem EAS, e a formação de um outro produto, provavelmente o oxindol-3-carbinol (OIC), é proporcionalmente maior. Isto pode indicar que o mecanismo da reação supostamente ocorre por uma via diferente na presença de EAS, levando a formação de outros produtos (Figura 39 e 40). A identificação deste produto foi realizada apenas por comparação do espectro de UV, portanto não podemos afirmar que se trata realmente do OIC. Para isso, este produto teria que ser isolado e purificado por HPLC e analisado por MS e RMN.

Figura 39 – Cromatogramas das incubações de IAA/HRP e IAA/HRP/EAS realizadas nas mesmas condições e concentrações.

Figura 40 – Espectro de um produto da reação entre IAA/HRP, provavelmente o OIC e sua estrutura química.

Segundo Gazarian e colaboradores (1998), que identificaram o hidroperóxido escatol derivado do radical escatol (Figura 6) por espectometria de massas, o OIC é o principal produto de degradação por via não enzimática deste hidroperóxido, enquanto que o ICA seria produzido por rota enzimática da HRP. Portanto, nossos resultados estariam coerentes com estes estudos realizados.

Acredita-se que outras espécies reativas de oxigênio, como $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 e consequentemente $^{\bullet}OH$ estejam envolvidos na reação IAA/HRP/ O_2 além do 1O_2 (Smith e col., 1982; Melo e col., 1998). Estes produtos A, B e C podem ser resultantes de outras reações envolvendo estas espécies e o EAS ou com o $EASO_2$, como por exemplo sua hidroxilação, perda do grupo SO_4^- ou reoxidação a novos produtos finais.

Os resultados não demonstraram o envolvimento direto do 1O_2 , mas podem existir diversas reações ocorrendo paralelamente neste experimento onde o modelo com o EAS não é adequado para a completa elucidação deste mecanismo.

IV.4 VERIFICAÇÃO DE LESÕES EM DNA PLASMIDIAL

De Toledo e colaboradores (1982) demonstraram quebras no DNA de *E. coli* contendo o plasmídio pAT153 quando expostas ao sistema IAA/HRP que seriam causadas pelo $^1\text{O}_2$ produzido na oxidação. Folkes e colaboradores (1999) também observaram quebras em plasmídios pBR322 incubados diretamente com 2 mM de IAA e análogos com 6,7 μM de HRP.

Com o intuito de verificar as lesões em plasmídios causados por IAA/HRP e ICA incubamos os plasmídios com os tratamentos já descritos em Materiais e Métodos.

Realizamos o Tratamento 1 utilizando diretamente os plasmídios pBR322 (Figura 41).

Figura 41 – Eletroforese em gel de agarose: *Linha 1*: plasmídio para controle; *Linha 2*: plasmídio com 1 mM IAA; *Linha 3*: plasmídio com 10 μM HRP; *Linha 4*: plasmídio, 1 mM IAA/10 μM HRP e *Linha 5*: os plasmídios acrescentados após a incubação de IAA/HRP por 2 h a 37°C conforme descrito em Materiais e Métodos. SC: “supercoiled” (forma enovelada); OC: “open circle” (forma circular aberta).

Os plasmídios com apenas 1 mM de IAA (*Linha 2*) não apresentaram quebras significativas em relação ao controle. Os plasmídios incubados apenas com 10 μM de HRP não foram visíveis na forma enovelada e praticamente também não nas formas

circular aberta e linear. Este resultado foi surpreendente e indica a possível existência de reações paralelas que possam estar interferindo. Com o sistema completo observou-se a fragmentação total dos plasmídios na Linha 4. Para verificarmos a participação de $^1\text{O}_2$, o plasmídio foi exposto ao sistema após a incubação, quando o $^1\text{O}_2$ já deveria estar desativado (Linha 5). Entretanto, observou-se o aparecimento da forma circular aberta mesmo a incubação. Os diferentes resultados observados para as Linas 3, 4 e 5 indicam a existência de processos distintos para as quebras da fita do DNA apresentadas.

Na Figura 42 podemos observar o resultado do Tratamento 2 em plasmídios pUC19. A linha 2 mostra que não houve aumento de quebras quando os plasmídios pUC19 foram tratados apenas com 1 mM de IAA em relação ao controle de plasmídios (linha 1).

Figura 42 – Eletroforese em gel de agarose - *Linha 1*: plasmídios para controle; *Linha 2*: plasmídios com 1mM IAA; *Linha 3*: plasmídios com 10μM HRP; *Linha 4*: 1 mM IAA/10 μM HRP na ausência de plasmídios; *Linha 5*: plasmídios com 1 mM IAA/10 μM HRP e *Linha 6*: plasmídios com 2 mM IAA/10 μM HRP. SC: “supercoiled” (forma enovelada); OC: “open circle” (forma circular aberta).

No controle de HRP com os plasmídios, na linha 3, não foram observadas as bandas referentes ao DNA plasmidial, mas observa-se uma banda no poço de aplicação do gel, que pode ser uma possível agregação da proteína HRP com o DNA muito fragmentado. A fragmentação total do plasmídio pode ser devida ao longo tempo de incubação (3 h) ou a elevada concentração de HRP (10 μM).

Esta banda é verificada também na presença de IAA/HRP (10 μ M) nas concentrações de 1 e 2 mM de IAA, linhas 5 e 6. A linha 4, controle de IAA (2 mM)/HRP (10 μ M) sem plasmídios foi realizada apenas para a verificação de que o brometo de etídio apenas se intercala nas fitas de DNA, como esperado.

Para verificarmos o efeito da HRP sobre o plasmídio pUC19 realizamos o Tratamento 3, onde o tempo de incubação foi reduzido a 90 min e a concentração de HRP a 1 μ M mostrado na Figura 43.

Figura 43 – Eletroforese em gel de agarose - Linha 1: plasmídios para controle; Linha 2: plasmídios com etanol para controle; Linha 3: plasmídios com 1 μ M HRP; Linha 4: plasmídios com 1 μ M HRP e 10 mM BHT e Linha 5: 1 μ M HRP para controle. SC: “supercoiled” (forma enovelada); OC: “open circle” (forma circular aberta).

Na linha 2, o controle de plasmídios com etanol, que é utilizado nos experimentos para solubilizar o IAA ou o ICA, não mostrou aumento significativos nas quebras.

Observamos na linha 3 que os plasmídios tratados com 1 μ M de HRP apresentaram aumento da banda da forma circular aberta. A peroxidase nestas condições leva a quebra das fitas por um mecanismo não conhecido e não observado nos trabalhos citados anteriormente (De Toledo e col.,1982; Folkes e col.1999).

O BHT é considerado um antioxidante que age bloqueando a propagação de cadeias de radicais livres (“chain-breaking”). Neste experimento ele foi utilizado na

concentração de 10 mM (linha 4), para investigar se as quebras causados pela HRP no DNA eram devidas a contaminação da HRP por peróxidos e metais que originariam radicais hidroxila pela reação de Fenton, mas não foi observada proteção. Outros sequestradores de espécies reativas de oxigênio e de espécies eletronicamente excitadas devem ser testados para melhor compreensão dos mecanismos responsáveis por essas lesões.

Destacamos que nos estudos anteriores na literatura, este aspecto da quebra pela HRP nunca foi abordado com profundidade, existindo diversas questões em relação ao mecanismo e às condições de observação do mesmo. Os resultados obtidos nestes estudos devem ser ampliados.

Sabendo-se que 1 μ M de HRP sem IAA gera quebras, tentou-se verificar o efeito da variação da concentração de IAA nos plasmídios pUC19 no Tratamento 4, mantendo-se a concentração de HRP constante (Figura 44).

Neste experimento devido às concentrações de etanol necessárias utilizadas na solubilização do IAA, as incubações foram liofilizadas e ressuspensas em água, pois não foi possível a aplicação direta no gel. As quebras observadas no controle (Linha 1 – Figura 44) provavelmente se devem a esta manipulação adicional das amostras.

A observação das linhas 2 e 3, referentes aos controles de HRP e IAA (na maior concentração utilizada) respectivamente, mostram o aumento na banda de DNA na forma circular aberta aumentada e redução da banda da forma enovelada, ambas em relação ao controle na linha 1.

Figura 44 – Eletroforese em gel de agarose - *Linha 1*: controle de plasmídios; *Linha 2*: controle de plasmídios com 1 μM de HRP; *Linha 3*: controle de plasmídios com 5 mM de IAA; *Linhas 4 a 7*: plasmídios com 1 μM de HRP e 0,2, 0,5, 1 e 5 mM de IAA respectivamente. SC: “supercoiled” (forma enovelada); OC: “open circle” (forma circular aberta).

Observou-se que o aumento na concentração de IAA levou a um respectivo aumento na fragmentação do DNA devido ao desaparecimento progressivo da banda na forma circular aberta. Com 0,2 mM de IAA a banda no poço quase não aparece, mas com as concentrações maiores estas bandas passaram a ser muito pouco visíveis. Comparando-se os plasmídios incubados com 5 mM de IAA na Linha 3 com os plasmídios tratados com 5 mM de IAA e 1 μM de HRP na Linha 7, podemos observar que com a adição de HRP o DNA plasmidial foi totalmente fragmentado. O DNA parece ficar mais agregado a proteína HRP que fica retida no poço quanto mais fragmentado ele estiver.

A oxidação de aldeídos é fortemente acelerada por alguns íons de metais de transição segundo a reação abaixo:

O metal Cu (II) inicia a oxidação via transferência de um elétron formando o radical acila e a forma reduzida do metal Cu (I). Como o Cu (I) reduz o oxigênio molecular a íon superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) que é dismutado a H_2O_2 e O_2 :

O cobre é considerado essencial à cromatina e é proximamente relacionado com cromossomos e DNA. Becker e colaboradores (1996) investigaram, baseados nestes conceitos, quebras simples e duplas na fita de DNA com a combinação de aldeídos aromáticos e alifáticos com Cu (II). Eles demonstraram que as espécies produzidas pelas reações redox de aldeídos em presença de Cu (II) causam danos ao DNA de maneiras diferenciadas.

Considerando este estudo, incubamos os plasmídios pBR322 com o ICA em concentrações crescentes (Tratamento 5) para observação se o aldeído poderia gerar uma lesão macroscópica no DNA plasmidial. Entretanto, nenhuma quebra foi detectada nestas condições (Figura 45).

Figura 45 – Eletroforese em gel de agarose - Plasmídio pBR322 após incubação com ICA em várias concentrações.

IV.5 VERIFICAÇÃO DE LESÕES EM CULTURA CELULAR

IV.5.1 Citotoxicidade

O estudo da viabilidade das células de fibroblastos renais de macaco verde africano CV1-P na presença do sistema IAA/HRP/O₂ e de um de seus principais produtos de oxidação, o ICA foram realizadas pelo método do sal de tetrazolium (MTT).

O método do MTT envolvendo sua conversão pelas células em um composto colorido, formazona, que pode ser medido espectrometricamente, tem sido utilizado na detecção indireta da relação de crescimento celular/morte celular por vários grupos. A formação de formazonas ocorre principalmente pela sua metabolização em mitocôndrias intactas, embora outras localizações extracelulares com atividade de desidrogenases possam contribuir com sua produção total (Hansen e col., 1989).

A determinação das concentrações a partir das quais o IAA/HRP e o ICA seriam tóxicos às células é importante para os experimentos de verificação de formação de lesões em DNA, danos oxidativos como a 8-oxodGuo, lipoperoxidação e formação de adutos.

Na Figura 46, observamos uma pequena variação na viabilidade celular das células tratadas com ICA, mas não parece relacionada à toxicidade e sim a fatores experimentais. Repetimos o experimento com concentrações maiores de ICA (Figura 47).

Figura 46 – Citotoxicidade do ICA em células CV1- P, após 5 h (análises em triplicata).

Figura 47 – Citotoxicidade do ICA em células CV1-P, após 5 h (análises em triplicata).

Em nenhum dos 2 experimentos realizados observou-se uma redução de viabilidade com o aumento da concentração dos tratamentos como era esperado.

Na Figura 48, observamos apenas uma tendência de redução na viabilidade celular a partir de 100 μM de IAA/HRP, embora os controles de IAA e etanol também apresentem redução de viabilidade.

Figura 48 – Citotoxicidade do sistema IAA em células CV1-P, na presença de 1,7 $\mu\text{g/mL}$ de HRP, após 2 h (análises em triplicata).

A análise da viabilidade nestes 3 experimentos foi realizada logo após o tratamento. Novos experimentos foram feitos aumentando-se o tempo de tratamento das células ou as doses de IAA e HRP aplicadas e deixando as células incubadas novamente em meio suplementado com soro por algumas horas antes da análise.

Na Figura 49 podemos observar que não houve uma diminuição na viabilidade celular significativa neste experimento onde as células foram tratadas por 2 h em PBS-A e depois incubadas por 24 h antes da análise.

Com o aumento do tempo de tratamento das células para 12 h, observamos uma diminuição significativa nas concentrações de 1 e 2 mM de IAA (Figura 50).

Figura 49 – Citotoxicidade do sistema IAA em células CV1-P nas concentrações de 0,05, 0,20, 0,50 e 1,00 mM com 1,5 µg/mL HRP e 0,5 e 1,0 com 3,0 µg/mL HRP (análises em triplicata).

Figura 50 – Citotoxicidade do sistema IAA em células CV1-P com 1,5 µg/mL de HRP (análises em triplicata).

Estes resultados nos permitiram estabelecer as doses que foram utilizadas nos experimentos para estudos de lipoperoxidação e de lesões oxidativas em DNA.

IV.5.2 Lipoperoxidação

Candeias e colaboradores (1995) demonstraram um aumento na lipoperoxidação de lipossomas dependente do tempo quando tratados com IAA/HRP que seria explicada pela química de radicais centrados no carbono do IAA (Figura 6). Folkes e colaboradores (1999) usaram vários métodos para detecção de lipoperoxidação em células de fibroblastos V79 *in vitro*. Entretanto, não detectaram a formação de hidroperóxidos lipídicos ou MDA, nem perda de ácidos graxos insaturados celulares com o IAA ou nenhum de seus análogos estudados, na presença de HRP, sob as condições utilizadas para a demonstração da citotoxicidade observada em seus experimentos.

Utilizamos o método de medida de TBARS para verificação da lipoperoxidação em células CV1-P conforme descrito em Materiais e Métodos. Observamos um aumento de aproximadamente 2,5 vezes na formação de TBARS quando as células foram tratadas com IAA e de aproximadamente 5 vezes quando tratadas com IAA/HRP, ambos em relação aos controles (Figura 51).

Figura 51 – Produtos de lipoperoxidação detectados em células CV1-P após tratamento com IAA (1 mM)/HRP (1,5 µg/µL) por 24 h (análises em triplicata).

Este resultado é inédito na literatura e nos fornece perspectivas para estudos de formação de adutos de DNA tipicamente produzidos por produtos finais de lipoperoxidação, como por exemplo o 1,*N*²-etenodesoxiguanosina (1,*N*²-εdGuo) que é discutido adiante.

IV.5.3 Formação de 8-oxodGuo

Considerando os estudos de citotoxicidade realizados com as células de fibroblastos para a determinação das concentrações indicadas, realizamos o tratamento das células com IAA (1mM)/HRP (1,5 $\mu\text{g/mL}$) e de seus respectivos controles para a verificação da quantidade de resíduos de 8-oxodGuo formados nas células. O DNA das células foi extraído e hidrolizado conforme descrito em Materiais e Métodos, analisado por HPLC-EC e quantificado utilizando-se curva de calibração determinada para 8-oxodGuo e dGuo (Figura 52).

Figura 52 – Formação de 8-oxodGuo em células de fibroblastos CV1-P tratadas com IAA (1 mM) e HRP (1,5 $\mu\text{g/mL}$) por 14 h de tratamento em condições de cultura celular.

Os valores experimentais encontrados preliminarmente acima não apresentaram aumento de resíduos de 8-oxodGuo nas células tratadas com IAA/HRP em relação aos controles conforme esperado. A oxidação do IAA catalizada pela HRP é uma reação rápida e no modelo proposto acima os produtos e espécies reativas devem estar sendo gerados extracelularmente. A concentração

de espécies reativas geradas pode não ser suficiente ou elas podem ser desativadas por outras biomoléculas antes de atingir o DNA. Para que o $^1\text{O}_2$ pudesse chegar ao núcleo celular e oxidar a dGuo ele teria que ser ao menos gerado em meio intracelular com maior proximidade ao núcleo.

O tratamento com IAA de células que contém maior quantidade de peroxidases intracelulares como os neutrófilos, seria um modelo melhor para este estudo pois o IAA seria oxidado dentro das células e portanto mais próximos ao DNA, podendo então aumentar as lesões oxidativas esperadas. Os experimentos utilizando-se neutrófilos são discutidos adiante.

IV.6 VERIFICAÇÃO DE LESÕES EM NEUTRÓFILOS

IV.6.1 Formação de 8-oxodGuo

Foi demonstrado que o IAA estimula a produção de espécies reativas de oxigênio ($O_2^{\cdot-}$ e H_2O_2) em células com atividade de peroxidase como os neutrófilos causando morte celular (Melo e col., 1998). Neste trabalho estes efeitos não parecem estar relacionados à perda de atividade de enzimas antioxidantes e sim ao aumento da produção destas espécies como sugerido pelo efeito protetor exibido pela catalase e pela superóxido dismutase em neutrófilos cultivados. Também foi sugerido o possível envolvimento de outras espécies reativas como o radical peróxido do IAA. O tratamento com IAA de células que contém maior quantidade de peroxidases intracelulares como os neutrófilos, foi considerado um modelo melhor para o estudo de formação de 8-oxodGuo do que em células de fibroblasto estudadas anteriormente. Em neutrófilos, o IAA pode ser oxidado intracelularmente e, portanto mais próximos ao DNA, podendo então aumentar a probabilidade de lesões oxidativas no DNA como a 8-oxodGuo.

O procedimento desse modelo experimental envolveu o aprendizado na manipulação dos ratos para tratamento com glicogênio, a extração dos neutrófilos da cavidade intraperitoneal sem a perfuração da alça intestinal, e ajustes das quantidades de células de neutrófilos necessárias para a extração de DNA suficiente (100 μ g) para a detecção de 8-oxodGuo. Portanto, os experimentos foram realizados diversas vezes até a padronização da metodologia conforme descrita em Materiais e Métodos.

A contagem das células, determinação da quantidade de células viáveis e caracterização morfológica para quantificação da porcentagem de neutrófilos também foram realizadas levando-se em conta que estas células após extraídas permanecem viáveis em PBS apenas por 4 h, quando mantidas em gelo, e devem ser colocadas em meio RPMI-1640 para garantir maior tempo de vida e portanto, o posterior tratamento com IAA.

Após o tratamento com IAA, o DNA foi extraído e congelado. A hidrólise foi realizada no dia da análise para evitar a formação de 8-oxodGuo posterior ao

tratamento. Curvas de calibração para a quantificação da dGuo e 8-oxodGuo foram também realizadas no dia do experimento por HPLC-EC conforme descrito em Materiais e Métodos (Figura 53).

Figura 53 – Curvas de calibração construídas com padrões e utilizadas na quantificação de dGuo e 8-oxodGuo.

Considerando os estudos de citotoxicidade realizados com as células de fibroblastos para a determinação das concentrações indicadas, realizamos o tratamento dos neutrófilos com IAA para a verificação da quantidade de resíduos de 8-oxodGuo formados nos neutrófilos (Figuras 54 e 55).

Os valores experimentais encontrados apresentaram aumento de resíduos de 8-oxodGuo nas células tratadas com IAA em relação aos controles conforme esperado. A quantidade de resíduos de 8-oxodGuo dos neutrófilos controle (sem tratamento) no primeiro experimento foi menor que no segundo. Entretanto, o aumento de resíduos nas células tratadas em ambos os experimentos foi sempre significativo e indicou ser mais suscetível ao aumento de IAA do que do tempo de incubação.

O que pôde ser observado claramente durante a extração de DNA nestes experimentos é que a fragmentação do DNA tratado em relação ao controle é visível durante a etapa de precipitação do DNA. O controle mostra-se mais íntegro e sua recuperação é mais fácil. Estas observações são válidas também com o aumento da concentração de IAA de 1 para 5 mM.

Figura 54 – Formação de 8-oxodGuo em neutrófilos tratados em cultura com IAA conforme descrito em Materiais e Métodos.

Figura 55 – Formação de 8-oxodGuo em neutrófilos em cultura tratados com IAA (1 mM) por 12 e 36 h conforme descritos em Materiais e Métodos.

IV.6.2 Formação de Etenoadutos

A verificação em nossos experimentos anteriores, de lipoperoxidação em as células de fibroblastos CV1-P tratadas com IAA, com um aumento de aproximadamente 2,5 vezes no nível de TBARS e de aproximadamente 5 vezes quando tratadas com IAA/HRP, ambos em relação aos controles nos forneceu perspectivas para estudos de formação de adutos de DNA tipicamente produzidos por produtos finais de lipoperoxidação.

Sabe-se que produtos de lipoperoxidação tais como acroleína, crotonaldeído, trans-2-hexenal, 2,4-decadienal e trans-4-hidroxi-nonenal podem alquilar o DNA. Estes aldeídos podem ser convertidos a epoxialdeídos correspondentes tanto enzimaticamente quanto por reações com hidroperóxidos de ácidos graxos endógenos ou H_2O_2 (Loureiro e col., 2000 e 2002^a). Reações subsequentes destes epoxialdeídos com as bases de DNA levam a formação de eteno adutos de DNA.

A investigação do papel de eteno adutos de DNA no processo de mutagênese e carcinogênese tem demonstrado que algumas dessas lesões, quando acumuladas no DNA após exposição crônica a genotóxicos, levam a erros na replicação ou transcrição (Swenberg e col., 1992).

O mesmo DNA utilizado para a determinação de 8-oxodGuo após exposição dos neutrófilos ao IAA foi utilizado em um experimento preliminar para a detecção de um tautômero da 1,*N*²-εdGuo (Figura 56).

Figura 56 – Estruturas tautoméricas entre os adutos 1,N²-εdGuo e A1 (Loureiro e col., 2000).

A Figura 57 mostra dados da análise do aduto A1. Como podemos observar maior quantidade do aduto foi encontrada no controle comparando-se com o tratamento de 12 h. Uma explicação para este fato seria a fragmentação observada durante a extração do DNA das amostras tratadas em relação ao controle, onde as bases modificadas poderiam não estar sendo recuperadas devido à fragmentação no passo de precipitação do DNA extraído do neutrófilo.

Estes dados são bastante promissores, uma vez que é o primeiro relato de detecção deste tipo de aduto em neutrófilos. Recentemente, foi desenvolvida uma metodologia mais avançada pela Dra. Ana Paula e a doutoranda Sabrina Marques do laboratório da Profa. Dra. Marisa Medeiros. Essa metodologia permite a detecção de níveis basais deste aduto em células, ampliando as possibilidades de detecção destas lesões em estudo (Loureiro e col., 2002^b).

Figura 57 – Cromatogramas das análises de A1 em DNA de neutrófilos controle (A) e tratados com 1mM de IAA (B) por LC/MS (módulo MRM), com seus respectivos padrões de adutos que foram incorporados ao DNA previamente.

V. CONCLUSÕES

O presente trabalho buscou investigar possíveis lesões em biomoléculas e estruturas celulares promovidas pelo sistema IAA/HRP. A oxidação do IAA tem sido associada a doenças neurodegenerativas. Níveis aumentados deste ácido têm sido relatados em condições clínicas como a fenilcetonúria e doenças renais. Apesar de sua ocorrência em células, suas possíveis funções fisiológicas são desconhecidas.

Desta forma, vários modelos experimentais (nucleosídeos, DNA plasmidial, fibroblastos e neutrófilos) foram estudados utilizando-se indicadores apropriados (de oxidação de DNA, de detecção de adutos com produtos de oxidação do IAA, de lipoperoxidação e formação de etenoadutos) para evidenciar o possível efeito deletério do sistema IAA/HRP em sistemas biológicos. Baseando-se nos resultados obtidos, temos as seguintes conclusões:

- ♦ Várias reações foram realizadas na tentativa de síntese de um aduto de bases de DNA com ICA e com o sistema IAA/HRP, no entanto em nenhuma das condições propostas conseguimos identificar um novo produto, por HPLC ou HPLC/MS.
 - ♦ Demonstrou-se o aumento de resíduos de 8-oxodGuo/ 10^6 dGuo quando a dGuo é incubada com o sistema IAA/HRP/ O_2 *in vitro*. Demonstrou-se que em água deuterada, que aumenta o tempo de vida do 1O_2 , aumentou-se também a formação de 8-oxodGuo, indicando uma possível participação desta espécie no mecanismo de lesão deste nucleosídeo.
 - ♦ Foram observadas quebras em plasmídios tratados com o sistema IAA/HRP/ O_2 , entretanto quebras de plasmídeos tratados apenas com IAA ou apenas com HRP também foram verificadas. Ressaltamos que dados anteriores encontrados na literatura não apontam esses efeitos. Os resultados aqui obtidos indicam uma maior complexidade do sistema. Portanto este estudo deve ser revisto e abordados com mais profundidade.
-

- ♦ Determinamos condições de citotoxicidade do sistema IAA/HRP em células de fibroblastos de macaco verde africano (CV1-P), para a verificação e quantificação da formação de 8-oxodGuo e lipoperoxidação. O ICA não se demonstrou citotóxico nas condições utilizadas.

 - ♦ Encontramos um aumento de lipoperoxidação (TBARS) nas células CV1-P tratadas com IAA/HRP em relação ao controle. Este resultado é bem interessante pois trabalhos anteriores da literatura apenas demonstraram aumento de lipoperoxidação em sistemas modelos de lipossomas. O aumento da lipoperoxidação pode estar associado com eventos tóxicos relatados nos estados patológicos e deve ser testado em outros modelos.

 - ♦ A formação de resíduos de 8-oxodGuo pelo sistema IAA/HRP não evidenciou aumento em relação aos controles com as concentrações utilizadas em células (CV1-P). Estes dados podem estar relacionados com a baixa concentração de espécies reativas em “steady-state” gerados pelo sistema IAA/HRP extracelularmente.

 - ♦ O sistema IAA/HRP/O₂ foi incubado com o EAS para sequestrar ¹O₂. Não foi verificado o aumento de EASO₂, entretanto, observou-se a formação de pelo menos 2 novos produtos derivados do antraceno utilizado que podem demonstrar o envolvimento de outras espécies reativas na reação, como por exemplo o radical hidroxila. Estes dados abrem novas perspectivas para o estudo desta reação.

 - ♦ Um modelo experimental com neutrófilos foi utilizado por serem células com maior quantidades de peroxidases intracelulares que poderiam gerar as espécies reativas mais próximas ao DNA. Os resultados obtidos indicaram o aumento da formação de 8-oxodGuo em neutrófilos tratados com IAA. Detectamos também o aduto 1,N²-etenodesoxiguanosina em neutrófilos controle e tratados.
-

O aumento na formação de 8-oxodGuo em DNA de neutrófilos tratados com IAA forneceu, portanto, um modelo bastante promissor para o estudo de possíveis lesões em biomoléculas promovidas pela oxidação intracelular do IAA.

Ressaltamos que no momento, o grupo encontra-se em melhores condições técnicas para o estudo dos mecanismos envolvidos nestas lesões e da possível participação do $^1\text{O}_2$, mecanismos estes que vêm sendo debatidos na literatura desde aproximadamente 1970, sem que ferramentas apropriadas permitissem experimentos conclusivos.

Portanto, o trabalho apresentado produziu dados importantes sobre os sistemas e modelos estudados, contribuindo para a elucidação do envolvimento de espécies reativas em mecanismos relacionados à lesões biológicas promovidas pelo sistema IAA/HRP/ O_2 e indicando novos caminhos a serem investigados.

VI. REFÊRENCIAS

Adam, W., Saha-Moller, C.R., Schonberger, A., Berger, M., Cadet, J. (1995) Formation of 7,8-dihydro-8-oxoguanine in the 1,2-dioxetane-induced oxidation of calf thymus DNA: Evidence for photosensitized DNA damage by thermally generated triplet ketones in the dark. *Photochem. Photobiol.*, **62** (2), 231-238.

Adam, W., Kurz, A., Saha-Möller, C.R. (1999) DNA e 2'-deoxyguanosine damage in the horseradish-peroxidase-catalyzed autoxidation of aldehydes: The search for the oxidizing species. *Free Radic.Biol. Med.*, **26** (5/6), 566-579.

Akasaka, S. e Guengerich, F.P. (1999) Mutagenicity of site-specifically located 1,N2-ethenoguanine in Chinese hamster ovary cell chromosomal DNA. *Chem. Res. Toxicol.*, **12**, 501-507.

Augusto, O., Hix, S., Morais, M.S., Vasquez-Vivar, J. (1995) Free radical reactions: Formation of adducts with biomolecules and their biological significance. *Ciência e Cultura*, **47**(5/6), 280-287.

Bartsch, H., Barbin, A., Marion, M.-J., Nair, J. e Guichard, Y. (1994) Formation, detection, and role in carcinogenesis of ethenobases in DNA. *Drug Metab. Rev.*, **26**, 349-371.

Bartsch, H. (1999) Keynote address: Exocyclic adducts as new risk markers for DNA damage in man. In: Exocyclic DNA adducts in mutagenesis and carcinogenesis (Singer, B. e Bartsch, H., eds), *IARC Sci. Publ.*, **150**, Lyon, IARC, 1-16.

Barsacchi, R., Coassin, M., Maiorino, M., Pelosi, G., Simonelli, C, Ursini, F. (1989) Increased ultra weak chemiluminescence emission from rat heart at postischemic reoxygenation: protective role of vitamin E. *Free Radic. Biol. Med.*, **6**(6), 573-9.

Bednar, T.W., Linsmaier-Bednar, E.M., King, C.M., (1976) Peroxidase-H₂O₂ catalyzed incorporation of auxin derivatives into sRNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2**(2), 761-767.

Becker, T.W., Krieger, G., Witte, I. (1996) DNA single and double strand breaks induced by aliphatic and aromatic aldehydes in combination with copper (II). *Free Radic. Res.*, **24**(5), 325-332.

Beckman, K.B. e Ames, B.N. (1999) Endogenous oxidative damage of tDNA. *Mutat. Res.*, **424**, 51-58.

Breimer, L.H. e Lindahl, T. (1984) DNA glycosylase activities for thymine residues damaged by ring saturation, fragmentation, or ring contraction are functions of endonuclease III in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem*, **259**, 5543-5548.

Burcham, P.C. (1999) Internal hazards: baseline DNA damage by endogenous products of normal metabolism. *Mutat. Res.* 443, 11-36.

Cadenas, E., Brigelius, R., Sies, H. (1983) Paraquat-induced chemiluminescence of microsomal fractions. *Biochem. Pharmacol.*, **32**, 147-50.

Cadet, J., Berger, M., Douki, T., Ravanat, J.-L. (1997) Oxidative damage to DNA: Formation, measurement, and biological significance. *Reviews of Physiology. Biochem. Pharmacol.*, **131**, 1-87.

Candeias, L.P., Folkes, L.K., Porssa, M., Parrick, J., Wardman, P. (1995) Enhancement of lipid peroxidation by indole-3-acetic acid and derivatives: Substituent effects. *Free Radic. Res.*, **23**(5), 403-418.

Chen, N.C., Gholson, R.K., Raica, N., (1974) Isolation and identification of indole-3-carboxaldehyde: A major new urinary metabolite of d-triptophan. *Biochim. Biophys. Acta*, **343**, 167-172.

Chen, G.-N., Xu, X.-Q., Dun, J.-P., HE, M.-M., Zhang, F. (1995) Chemiluminescent characteristics of some indole derivatives. *Analyst*, **120**, 1699-1704.

Chung, F.-L., Chen, H.-J. C. e Nath, R. G. (1996) Lipid peroxidation as a potential endogenous source for the formation of exocyclic DNA adducts. *Carcinogenesis*, **17**, 2105-2111.

Cilento, G. (1995) Enzymatic generation of electronically excited triplet species: Photobiochemistry without light. *Ciência e Cultura*, **47**(5/6), 312-319.

Cilento, G., Adam, W. (1995) From free radicals to electronically excited species. *Free Radic. Biol. Med.*, **19**, 103-114.

De Melo, M.P., Curi, T.C.P., Curi, R., Di Mascio, P. Cilento, G. (1997) Peroxidase activity may play a role in the cytotoxic effect of indole acetic acid. *Photochem. Photobiol*, **65**(2), 338-341.

De Melo, M.P., Curi, T.C.P., Miyasaka, C.K., Palanch, A.C., Curi, R. (1998) Effect of indole acetic acid on oxygen metabolism in cultured rat neutrophil. *Gen. Pharmacol.*, **31**(4), 573-578.

De Mello, M.P., De Toledo, S.M., Haun, M., Cilento, G. e Duran N. (1980) Excited indole-3-acetic acid. Reaction with and energy transfer to transfer ribonucleic acid. *Biochemistry*, **19**, 5270-5275.

De Toledo, S.M., Zaha, A., e Duran, N. (1982) DNA strand scission in *E. coli* by electronically excited state molecules generated by enzymatic systems. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **104**, 990-995.

Demple, B. e Harrison, L. (1994) Repair of oxidative damage to DNA. *Annu. Rev. Biochem.*, **63**, 915-948.

Di Mascio, P., Sies, H. (1989) Quantification of singlet oxygen generated by thermolysis of 3,3'-(1,4-Naphthylidene)dipropionate. Monomol and dimol photoemission and the effects of 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane. *J. Am. Chem. Soc.*, **111**, 2909-2914.

Di Mascio, P., Medeiros, M.H.G., Bechara, E.J.H., Catalani, L.H. (1995) Singlet molecular oxygen: Generation, reactivity, identification and biological effects. *Ciência e Cultura*, **47**(5/6), 297-311.

Duran, N., Marcucci, M.C., Gatti, M.S.V., Leite, L.C.C. (1990) Different lethal effects by enzyme-generated triplet indole-3-aldehyde in different *Escherichia coli* strains. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, **4**, 371-378.

Edwards, A.M., Barredo, F., Silva, E., De Ioannes, A.E., Becker, M.I. (1999) Apoptosis induction in nonirradiated human HL-60 and murine NOS/2 tumor cells by photoproducts of indole-3-acetic acid and riboflavin. *Photochem. Photobiol.*, **70**(4), 645-649.

Esterbauer, H., Cheeseman, K.H. (1990) Determination of aldehydic lipidic peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *In: Methods Enzimol.*, **186**, 407-431.

Faljoni, A., Haun, M., Hoffmann, M. E., Meneghini, R., Durán, N., Cilento, G. (1978) Photochemical-like effects in DNA caused by enzymically energized triplet carbonyl compounds. *Biochem. Biophys. Res. Com.*, **80**, 490-495.

Fang, J-L., Vaca, C.E. (1995) Development of a ³²P-postlabelling method for analysis of adducts arising through the reaction of acetaldehyde with 2'-desoxyguanosine-3'-monophosphate and DNA. *Carcinogenesis*, **16**(9), 2177-2185.

Fiala, E.S., Conaway, C., Mathis, J.E. (1989) Oxidative DNA e RNA damage in the livers of Sprague-Dawley rats treated with the hepatocarcinogen 2-nitropropano. *Cancer Res.*, **49**, 5518-5522.

Flora, D.F., Izzotti, A., Randerath, K., Randerath, E., Bartsch, H., Nair, J., Balansky, R., van Schooten, F., Degan, P., Fronza, G., Walsh, D., Lewtas, J. (1996) DNA adducts and chronic degenerative diseases. Phathogenetic relevance and implications in preventive medicine. *Mutat. Res.*, **366**, 197-238.

Folkes, L.K., Dennis, M.F., Stratford, M.R.L., Candeias, L.P., Wardman, P. (1999) Peroxidase-catalyzed effects of indole-3-acetic acid and analogues on lipid membranes, DNA, and mammalian cells *In Vitro. Biochem. Pharmacol.*, **57**, 375-382.

Garner, R.C. (1998) The role of DNA adducts in chemical carcinogenesis. *Mutation Res.*, **402**, 67-75.

Gazarian, I.G., Lagrimini, L.M., Mellons, F.A., Naldrett, M.J., Ashby, G.A., Thorneley, R.N.F. (1998) Identification of skatolyl hydroperoxide and its role in the peroxidase-catalysed oxidation of indol-3-yl acetic acid. *Biochem. J.*, **333**, 223-232.

Girard, P.M. e Boiteux, S. (1997) Repair of oxidized DNA bases in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimie*, **79**, 559-566.

Gordon, S.A., Fry, R.J.M., Barr, S. (1972) Origin of urinary auxin in the germfree and conventional mouse. *Am. J. Physiol.*, **222**, 399-403.

Grollman, A.P., Shibutani, S. (1994) Mutagenic specificity of chemical carcinogens as determined by studies of single DNA adducts. *In DNA Adducts: Idenntificação e Biological Significance*; IARC Scientific Plubcations, Lyon., **125**, 385-397.

Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (1989) *In Free Radicals in Biology and Medicine*, Second Edition, Oxford.

Hansen, M.B., Nielsen, S.E., Berg, K. (1989) Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *J. Immun. Met.*, **119**, 203-210.

Hemminki, K. (1993) DNA adducts, mutations and cancer. *Carcinogenesis*, **14**, 2007-2012.

Hu, T., Dryhurst, G. (1997) Electrochemical and peroxidase O₂-mediated oxidation of indole-3-acetic acid at physiological pH. *J. Electroanal. Chem.*, **432**, 7-18.

Jenner, A., England, T.G., Aruoma, O.I. e Halliwell, B. (1998) Measurement of oxidative DNA damage by gas chromatography-mass spectrometry: ethanethiol prevents artefactual generation of oxidized DNA bases. *Biochem. J.*, **331**, 365-369.

Kanofsky, JR., (1998) Singlet oxygen production from the peroxidase-catalyzed oxidation of indole-3-acetic acid. *J. Biol. Chem.*, **263**(28), 14171-14175.

Kasha, M. (1985) Singlet oxygen electronic structure and energy transfer, 1-14. *In Singlet O₂*. Vol I, AA Frimer ed, CRC Press, Boca Raton.

Kat, A.G. and Thilly, W.G. (1993) Mutational spectra in mammalian cells. In Hemminki, K., Dipple, A., Shuker, D.E.G., Kadlubar, F.F., Segerbäck, D. and Bartsch, H. eds, *In DNA adducts: Identification and Biological Significance*. IARC, Lyon, in press.

Katcher, H.L. e Wallace, S.S. (1983) Characterization of the *Escherichia coli* X-ray endonuclease, endonuclease III. *Biochemistry*, **22**, 4071-4081.

Kautiainen, A., Vaca, C.E., Granath, F. (1993) Studies on the relationship between hemoglobin and DNA adducts. *Carcinogenesis*, **14**, 705-708.

Kobayashi, S., Sugioka, K., Nakano, M. (1980) Excitation of indole acetate in myeloperoxidase-H₂O₂ system; possible formation of indole acetate cation radical. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **93**, 967-973.

Kreutzer, D.A. e Essigmann, J.M. (1998) Oxidized, deaminated cytosines are sources of C→T transitions in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 3578-3582.

Kriek, E., Rojas, M., Alexandrov, K., Bartsch, H. (1998) Polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in humans: relevance as biomarkers for exposure and cancer risk. *Mutation Res.*, **400**, 215-231.

Langouët, S., Mican, A. N., Müller, M., Fink, S. P., Marnett, L. J., Muhle, S. A. e Guengerich, F. P. (1998) Misincorporation of nucleotides opposite five-membered exocyclic ring guanine derivatives by *Escherichia coli* polymerases in vitro and in vivo: 1,N²-ethenoguanine, 5,6,7,9-tetrahydro-9-oxoimidazo[1,2-a]purine, and 5,6,7,9-tetrahydro-7-hydroxy-9-oxoimidazo[1,2-a]purine. *Biochemistry*, **37**, 5184-5193.

Lawley, P.D. (1994) From fluorescence spectra to mutational spectra, a historical overview of DNA-reactive compounds. In *DNA Adducts: Identificação e Biological Significance*; IARC Scientific Publications, Lyon., **125**, 3-22.

Lehninger, A.L., Nelson, D.L., Cox, M.M. (1993) *Principles of Biochemistry*, Worth Publishers, New York.

Le Page, F., Margot, A., Grollman, A.P., Sarasin, A. e Gentil, A. (1995) Mutagenicity of a unique 8-oxoguanine in a human Ha-ras sequence in mammalian cells. *Carcinogenesis* **16**, 2779-2784

Loureiro, A.P.M., Di Mascio, P., Gomes, O.F. and Medeiros, M.H.G. (2000) *trans, trans*-2,4-decadienal-induced 1,N²-etheno-2'-deoxyguanosine adduct formation. *Chem. Res. Toxicol.*, **13** (7), 601-609.

Loureiro, A.P.M., Di Mascio e Medeiros, M.H.G. (2002^a) Formação de adutos exocíclicos com bases de DNA: Implicações em mutagênese e carcinogênese *Química Nova*, **25** (0), no prelo .

Loureiro, A.P.M., Marques, S.A., Garcia, C.C.M., Di Mascio, P. e Medeiros, M.H.G. (2002^b) Development of an on-line chromatography-electrospray tandem mass spectrometry assay to quantitatively determine 1,*N*²-etheno-2'-deoxyguanosine in DNA. *Chem. Res. Toxicol.*, no prelo.

Mabuchi, H. e Nakahashi, H. (1988) Displacement by anionic drugs of endogenous ligands bound to albumin in uremic serum. *Ther. Drug. Monit.*, **10**, 261-264.

Martinez, G.R., Ravanat, J.L., Medeiros, M.H.G., Cadet, J., Di Mascio, P. (2000^a) Synthesis of a naphthalene endoperoxide as a source of ¹⁸O-labeled singlet oxygen for mechanistic studies. *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 10212-10213.

Martinez, G.R., Di Mascio, P., Bonini, M.G., Augusto, O., Briviba, K., Sies, H., Maurer, P., Rothlisberger, U., Herold, S., Koppenol, W.H. (2000^b) Peroxynitrite does not decompose to singlet oxygen (¹Δ_gO₂) and nitroxyl (NO⁻). *PNAS*, **97**(19), 10307-10312.

Martinez, G.R., Medeiros, M.H.G., Ravanat, J.L., Cadet, J., Di Mascio, P. (2002) [¹⁸O]-Labeled singlet oxygen as a tool for mechanistic studies of 8-oxo-7,8-dihydroguanine oxidative damage: detection of spiroiminidihydrantion, imidazole and oxazolone derivatives. *Biol. Chem.*, **383**, no prelo.

Martínez, E., Artigas, F., Suñol, C., Tussel, J.M., e Gelpi, E. (1983) Liquid-chromatographic determination of indole-3-acetic acid and 5-hydroxyindole-3-acetic acid in tissues. *Clin. Chem.*, **29**, 1354-1357.

McCall, D.B. (1984) Sodium 9,10-Bis(2-Ethylene)Anthracene Disulfate: a new water-soluble singlet oxygen trap for biological systems and polymer-immobilized naphthalene endoperoxides: a new convenient singlet oxygen generator, *Tese da Wayne State University*.

McCord, J.M., Fridovich, I. (1969) Superoxide dismutase - an enzymatic function for erythocuprein (hemocuprein). *J. Biol. Chem.*, **244**, 6049-6055.

Medeiros, M.H.G., Bechara, E. (1986) Chemiluminescent aerobic oxidation of protein adducts with glycoladehyde catalyzed by horseradish peroxidase. *Arch. Biochem. Biophys.*, **248**, 435-439.

Menck, C.F.M., Cabral-Neto, J.B., Faljoni-Alário, A., Alcantara-Gomes, R. (1986) Damages induced in λ phage DNA by enzyme-generated triplet acetone. *Mutation Res.*, **165**, 9-14.

Merkel, P.B. e Kearns, D.R. (1972) Radiationless decay of singlet molecular oxygen in solution. An experimental and theoretical study of electronic-to-vibronic energy transfer. *J. Am. Chem. Soc.*, **94**, 7244-7253.

Metodiewa, D., De Melo, M.P., Escobar, J.A., Cilento, G., Dunford, H.B. (1992) Horseradish peroxidase-catalyzed aerobic oxidation and peroxidation of indole-3-acetic acid. *Arch. Biochem. Biophys.*, **296**(1), 27-33.

Michaels, M.L., Tchou, J., Grollman, A.P. e Miller, J.H. (1992) A repair system for 8-oxo-7,8-dihydrodeoxyguanine. *Biochemistry*, **31**, 10964-10968.

Mills, M.H., Finlay, D.C., Haddad, P.R. (1991) Determination of melatonin and monoamines in rat pineal using reverse-phase ion interaction chromatography with fluorescence detection. *J. Chromatog.*, **564**, 93-102.

Mitra, S., Hazra, T.K., Roy, R., Ikeda, S., Biswas, T., Lock, J., Boldogh, I. e Izumi, T. (1997) Complexities of DNA base excision repair in mammalian cells. *Mol. Cell*, **7**, 305-312.

Mo, J.Y., Maki, H. e Sekiguchi, M. (1992) Hydrolytic elimination of a mutagenic nucleotide, 8-oxodGTP, by human 18-kilodalton protein: sanitization of nucleotide pool. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 11021-11025.

Moller, P., Wallin, H. (1998) Adduct formation, mutagenesis and nucleotide excision repair of DNA damage produced by reactive oxygen species and lipid peroxidation product. Reviews In *Mutation Res.*, **410**, 271-290.

Moriarty, R.M., Roll, D.M., Ku, Y-Y., Nelson, C., Ireland, C. (1987) A revised structure for the marine bromoindole derivative citorellamine. *Tetrahedron letters*, **28**(7), 749-752.

Moriya, M. (1993) Single-stranded shuttle phagemid for mutagenesis studies in mammalian cells: 8-oxoguanine in DNA induces targeted G:C→T:A transversions in simian kidney cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 1122-1126.

Mottley, C., Mason, R.P. (1986) An eletron spin ressonance study of free radical intermediates in the oxidation of indole acetic acid by horseradish peroxidase. *J. Biol. Chem.*, **261**, 16860-16864.

Nair, J., Barbin, A., Velic, I. e Bartsch, H. (1999) Etheno DNA-base adducts from endogenous reactive species. *Mutat. Res.*, **424**, 59-69.

Nair, J. (1999) Lipid peroxidation-induced etheno-DNA adducts in humans. In: Exocyclic DNA adducts in mutagenesis and carcinogenesis (Singer, B. e Bartsch, H., eds), *IARC Sci. Publ.*, **150**, Lyon, IARC, 55-61.

Nakajima, R., Yamazaki, I. (1979) The mecanism of indole-3-acetic acid oxidation by horseradish peroxidases. *J. Biol. Chem.*, **254**(3), 872-878.

Normanly, J. e Bartel, B. (1999) Redundancy as a way of life – IAA metabolism. *Plant Biol.*, **2**, 207-213.

Purmal, A.A., Lampman, G.W., Bond, J.P., Hatahet, Z. e Wallace, S.S. (1998) Enzymatic processing of uracil glycol, a major oxidative product of DNA cytosine. *J. Biol. Chem.*, **273**, 10026-10035.

Qureshi, G. A. e Baig, S.M. (1993) The role of tryptophan, 5-hydroxy indole-3-acetic acid and their protein binding in uremic patients. *Biochem. Mol. Biol. Int.*, **29**, 411-419.

Quickenden, T.I., Quee Hee, S.S. (1974) Weak chemiluminescence from the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and the existence of mitogenic radiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **60**, 764-70.

Ravanat, J.L.; Di Mascio, P.; Martinez, G.R.; Medeiros, M.H.G. e Cadet, J. (2000) Singlet oxygen induces oxidation of cellular DNA. *J. Biol. Chem.*, **275** (51), 40601-40604.

Reiss, U., Tappel, A.L., Chio, K.S. (1972) DNA-malonaldehyde reaction: Formation of fluorescent products. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **48**, 921-926.

Seto, H., Takesue, T., Ikemura, T. (1985) Reaction of malonaldehyde with nucleic acid. II. Formation of fluorescent pyrimido [1,2- α]purin-10(3H)-one mononucleotide. *Bull. Chem. Soc. Japn*, **58**, 3431-3435.

Selinger, H.H., (1975) The origin of bioluminescence. *Photochem. Photobiol.*, **21**, 355-361.

Shigenaga, M.K., Park, J.-W., Cundy, K.C., Gimeno, C.J., Ames, B.N. (1990) 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*, **186**, 521-531.

Sies, H., (1986) Biochemistry of Oxidative Stress. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **25**, 1058-1071.

Singer, B. e Hang, B. (1997) What structural features determine repair enzyme specificity and mechanism in chemically modified DNA? *Chem. Res. Toxicol.* **10**, 713-732.

Sodum, R.S. e Chung, F.-L. (1988) 1,N2-ethenodeoxyguanosine as a potential marker for DNA adduct formation by trans-4-hydroxy-2-nonenal. *Cancer Research*, **48**, 320-323.

Stryer, L. (1996) *Bioquímica*. Editora Guanabara Koogan S.A., Rio De Janeiro.

Swenberg, J.A., Fedtke, N., Ciroussel, F., Barbin, A. e Bartsch, H. (1992) Etheno adducts formed in DNA of vinyl chloride-exposed rats are highly persistent in liver. *Carcinogenesis*, **14**, 113-116.

Tchou, J., Kasai, H., Shibutani, S., Chung, M.-H., Laval, J., Grollman, A.P. e Nishimura, S. (1991) 8-Oxoguanine (8-hydroxyguanine) DNA glycosylase and its substrate specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 4690-4694.

Vaca, C.E., Wilhelm, J., Harms-Ringdahl, M. (1988) Interaction of lipid peroxidation products with DNA. A review, *Mutation Res.*, **195**, 137-149.

Wang, L., Hirayasu, K., Ishizawa, M., Kobayashi, Y. (1994) Purification of genomic DNA from human whole blood by isopropanol-fractionation with concentrated NaI e SDS. *Nucleic Acids Research*, **22**(9), 1774-1775.

Wang, D., Kreutzer, D.A. e Essigmann, J.M. (1998) Mutagenicity and repair of oxidative DNA damage: insights from studies using defined lesions. *Mutat. Res. Fundam. Mol. Mech. Mutagen.*, **400**, 99-115.

Weissbach, H., King, W., Sjoerdsma, A., e Udenfriend, S. (1959) Formation of indole-3-acetic acid and tryptamine in animals. A method for estimation of indole-3-acetic acid in tissues. *J. Biol. Chem.*, **234**, 81-86.

White E.H., Miano, J.D., Watkins, C.J., Breaux, E.J. (1974) Excited states chemically produced. *Angew Chem. Int. Ed.*, **13**, 229-243.

Yang, D., Wong, M-K., Yip, Y-C. (1995) Epoxidation of olefins using methyl(trifluoromethyl)dioxirane generated In Situ. *J. Org. Chem.*, **60**, 3887-3889.