BIBLIOTECA
INSTITUTO DE QUÍMICA
Universidade de São Paulo
20.10.01

Recebido em 28/03/02

gild

filas 01

25360

1254592

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA**

**METABÓLITOS RADICAIS DO ETANOL E
ALQUILAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEÍCOS.
ESTUDOS *IN VITRO* E *IN VIVO***

LIA SUMIE NAKAO

TESE DE DOUTORADO

Orientadora: Profa. Dra. OHARA AUGUSTO

SÃO PAULO

31/01/02

DEDALUS - Acervo - CQ

30100004747

Ficha Catalográfica

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

Nakao, Lia Sumie
N163m Metabólitos radicalares do etanol e alquilação de
ácidos nucléicos. Estudos *in vitro* e *in vivo* / Lia Sumie
Nakao. -- São Paulo, 2002.
110p.

Tese (doutorado) - Instituto de Química da Universidade
de São Paulo. Departamento de Bioquímica.
Orientador: Augusto, Ohara

1. Xenobiótico : Metabolismo 2. Macromolécula :
Bioquímica 3. Oxidação biológica 4. Espectroscopia :
Bioquímica analítica I. T. II. Augusto, Ohara, orientador.

574.192 CDD

**“Metabólitos Radicalares do Etanol e Alquilação
de Ácidos Nucléicos Estudos *IN VITRO* e *IN
VIVO*”**

LIA SUMIE NAKAO

*Tese de Doutorado submetida ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à
obtenção do grau de Doutor em Ciências – Área: Bioquímica.*

Aprovada por:

Profa. Dra. OHARA AUGUSTO
IQ – USP
(Orientadora e Presidente)

Prof. Dr. HUGO PEQUENO MONTEIRO
Hemocentro – SP

Profa. Dra. LUCIANA CEZAR DE CERQUEIRA LEITE
Instituto Butantan

Prof. Dr. CARLOS FREDERICO MARTINS MENCK
ICB – USP

Prof. Dr. ALVARO AUGUSTO DA COSTA LEITAO
UFRJ

SÃO PAULO
31 DE JANEIRO 2002.

PARA

MEU ESPOSO SÍLVIO

MEUS PAIS YSAO E EMIKA

Meus sinceros agradecimentos

À Ohara, pela orientação segura, ensinamentos e pelas inúmeras oportunidades concedidas.

Aos professores Marisa Medeiros, Paolo di Mascio e Ana Maria Ferreira pelas discussões e pelo acesso a equipamentos e reagentes.

Aos demais professores do grupo de Radicais Livres, Etelvino Bechara, Virgínia Junqueira, Rogério Meneghini e ao professor Hugo Armelin pelo acesso incondicional a equipamentos e reagentes.

Aos funcionários do IQUSP, que de uma forma ou de outra contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

A todos os amigos do laboratório: Edlaine, Célio, Marcelo, Denise, Angélica, Silvia, e aos que não estão mais por lá: Sônia, Maurício, Reynaldo, Jolie, Jeannete, Ligia e Soraia pelo aprendizado e pela convivência divertida.

Aos colegas da orgânica Fernando Perna e Patrícia Busko, pela ajuda e amizade.

À Kazinha e à Mercedes, pelas colaborações frutíferas.

À Elaine e ao Ednailson, pelo auxílio com os animais.

Aos colegas dos outros laboratórios Valdemir, Wagner, Ana Paula, Osmar, Janice, Sabrina, Clécio, Lydia, Léo, Kátia, Ivan, Miriam, Paula, Érico, Fernanda e Adriana pelas discussões e dicas.

À amiga Telma e sua família, pela amizade de longos anos.

Aos amigos Berê e Humberto, por terem partilhado comigo os mesmos valores de conduta.

Ao meu irmão Jun, por tudo e sempre.

Ao professor Bernd Epe, e a todo seu grupo por me receberem durante meu estágio na Alemanha.

Ao professor T. Lindahl, pelo incentivo no final do projeto.

A FAPESP pelo apoio financeiro.

Índice

Abreviaturas	1
Resumo	2
Summary	3
1. Introdução	
1.1. Etanol	4
1.1.1. Metabolismo e formação do radical 1-hidroxietila	4
1.1.2. Metabolismo de acetaldeído e produção de radicais livres	6
1.1.3. Etanol e estresse oxidativo	6
1.1.4. Efeitos do etanol e seus metabólitos sobre ácidos nucleicos	9
1.2. Adutos de DNA e RNA com radicais livres: formação e papel em carcinogênese	10
2. Objetivos	12
3. Materiais e Métodos	13
3.1. Reagentes	13
3.2. Síntese e purificação dos adutos 8-(1-HE)Gua e 8-(2-HE)Gua	14
3.3. Preparo de partículas submitocondriais	17
3.4. Tratamento dos animais	17
3.5. Experimentos de EPR associada ao método do captador de <i>spin</i>	18
3.6. Alquilação dos ácidos nucleicos	18
3.7. Isolamento de RNA e DNA hepático de ratos	19
3.8. Hidrólise ácida dos ácidos nucleicos	19
3.9. Análise por HPLC-ECD de 8-(1-HE)Gua, 8-(2-HE)Gua, 8-oxoGua e 8-oxoAde	20
3.10. Análise de 8-(1-HE)Gua em ácidos nucleicos de fígado de ratos por HPLC-ECD e HPLC-MS/MS	20
3.11. Estudos cinéticos	22
3.12. Análise de acetato, formiato, nitrito e nitrato por EFC	23
4. Resultados	24
4.1. Alquilação de ácidos nucleicos por radicais 1-hidroxietila e 2-hidroxietila produzidos durante a oxidação de etanol <i>in vitro</i>	24

4.2.	Oxidação de acetaldeído a radicais acetila e metila mediada por peroxinitrito e peróxido de hidrogênio/Fe (II)	39
4.3.	Oxidação de acetaldeído a radicais metila e acetila por sistemas enzimáticos e <i>in vivo</i>	52
4.4.	Deteção de 8-(1-HE)Gua em ácidos nucléicos isolados de ratos controle e tratados com etanol	65
5.	Discussão	78
5.1.	Alquilação de ácidos nucléicos por radicais 1-hidroxietila e 2-hidroxietila produzidos durante a oxidação de etanol <i>in vitro</i>	78
5.2.	Oxidação de acetaldeído a radicais acetila e metila mediada por peroxinitrito e peróxido de hidrogênio/Fe (II)	79
5.3.	Oxidação de acetaldeído a radicais metila e acetila por sistemas enzimáticos e <i>in vivo</i>	82
5.4.	Deteção de 8-(1-HE)Gua em ácidos nucléicos isolados de ratos controle e tratados com etanol	85
6.	Discussão geral	89
7.	Referências bibliográficas	93
	Currículo	110

Abreviaturas

Ade	adenina
ADH	álcool desidrogenase
ALDH	aldeído desidrogenase
CG	cromatografia gasosa
CYP2E1	citocromo P450 isoforma 2E1
DBNBS	3,5-dibromo-4-nitrosobenzeno sulfonato
DMPO	5,5-dimetil-1-pirrolina- <i>N</i> -óxido
DMSO	dimetil sulfóxido
DSS	2,2-dimetil-2-silapentano-5-sulfonato
DTPA	dietilenotriamina- <i>N,N,N',N'</i> -pentaacetato
ECD	detecção eletroquímica
EFC	eletroforese capilar
EPR	ressonância paramagnética eletrônica
GTP	guanosina trifosfato
Gua	guanina
8-(1-HE)Gua	8-(1-hidroxietil)guanina
8-(2-HE)Gua	8-(2-hidroxietil)guanina
HER	radical 1-hidroxietila
HPLC	cromatografia líquida de alta performance
i.g.	intragástrico
i.p.	intraperitoneal
8-MeGua	8-metilguanina
MEOS	sistema microssomal metabolizador de etanol
MRM	<i>multiple reaction monitoring</i>
MS	espectrometria de massa
N7-(2-HE)Gua	7-(2-hidroxietil)guanina
NADPH	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida
O6-(2-HE)Gua	6-(2-hidroxietil)guanina
8-oxoAde	8-oxo-7,8-diidroadenina
8-oxoGua	8-oxo-7,8-diidroguanina
PDA	arranjo de fotodiodos
POBN	α -(4-piridil-1-óxido)- <i>N-tert</i> -butilnitrona
RMN	ressonância magnética nuclear
TIC	contagem total de íons
XOD	xantina oxidase

Resumo

O consumo de álcool vem sendo associado a um aumento do risco de câncer e a uma situação de estresse oxidativo. Os metabólitos responsáveis por tais processos permanecem em discussão. Neste trabalho, caracterizamos novos metabólitos radiculares do etanol e examinamos suas interações com ácidos nucleicos. Primeiramente, demonstramos que os radicais 1-hidroxietila e 2-hidroxietila produzidos durante a oxidação do etanol por sistemas Fenton alquilam DNA e RNA *in vitro* produzindo os adutos 8-(1-HE)Gua e 8-(2-HE)Gua, respectivamente. Esses adutos foram sintetizados e caracterizados quimicamente. Também, demonstramos que acetaldeído, o principal metabólito do etanol, é oxidado por sistemas Fenton, peroxinitrito, xantina oxidase, partículas submitocondriais e ratos a radicais acetila e metila. Esses radicais foram caracterizados e seus mecanismos de formação elucidados, pelo menos *in vitro*. A possibilidade do radical 1-hidroxietila alquilar ácidos nucleicos *in vivo* foi também examinada. Inesperadamente, o aduto 8-(1-HE)Gua foi detectado em RNA e DNA do fígado de ratos controle e seus níveis não foram significativamente alterados após administração aguda de etanol. Esses resultados sugerem que os radicais 1-hidroxietila, acetila e metila são importantes metabólitos do etanol *in vivo* mas atacam preferencialmente outras biomoléculas que não ácidos nucleicos.

Summary

Alcohol consumption has been associated with increased cancer risk and an oxidative stress condition. Ethanol metabolites responsible for these processes remain debatable. Here, we characterized novel radical metabolites of ethanol and examined their interactions with nucleic acids. First, we demonstrated that the 1-hydroxyethyl and 2-hydroxyethyl radical produced from ethanol oxidation by Fenton systems alkylated DNA and RNA *in vitro* to produce 8-(1HE)Gua and 8-(2-HE)Gua, respectively. Both adducts were synthesized and structurally characterized. Next, we demonstrated that acetaldehyde, the main ethanol metabolite, is oxidized by Fenton systems, peroxyxynitrite, xanthine oxidase, submitochondrial particles and whole rats to acetyl and methyl radicals. These radicals were characterized and their production mechanisms *in vitro* elucidated. The possibility of the 1-hydroxyethyl radical alkylating nucleic acids *in vivo* was also examined. Unexpectedly, the adduct 8-(1-HE)Gua was detected in RNA and DNA from liver of control rats and their levels were not increased by acute ethanol treatment. Overall, the results suggest that the radicals 1-hydroxyethyl, acetyl and methyl are important ethanol metabolites *in vivo* but they preferentially attack biomolecules other than nucleic acids.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Etanol

1.1.1. Metabolismo e formação do radical 1-hidroxietila

O consumo de etanol por humanos remonta a um passado de mais de 10.000 anos. Ingerido no início ocasionalmente como produto da fermentação natural dos alimentos, seu sabor provocativo e suas propriedades anti-sépticas fizeram-no ser chamado de “água da vida” durante a Idade Média. Atualmente, devido ao seu consumo excessivo, o etanol representa um dos maiores problemas de saúde pública, contribuindo com mais de 100.000 mortes anualmente nos Estados Unidos (Vallee, 1998).

Por causa disso, os mecanismos envolvidos em seu metabolismo, toxicidade e dependência que causa são bastante estudados. De fato, as principais vias de metabolismo do etanol estão bem estabelecidas (Hodson e Levi, 1994; Lieber, 1997). Resumidamente, cerca de 90% do etanol absorvido é metabolizado no fígado a acetaldeído, pela álcool desidrogenase (ADH) citossólica, pelo sistema microssomal localizado no retículo endoplasmático e pela catalase localizada nos peroxissomos. Recentemente, um sistema nuclear hepático foi também descrito como metabolizador de etanol (Castro e col., 1998). O acetaldeído produzido é rapidamente oxidado a acetato principalmente pela aldeído desidrogenase localizada na mitocôndria (Lieber, 1997).

A principal via de conversão de etanol a acetaldeído é aquela catalisada pela ADH. Nesta reação, o etanol é oxidado às custas de NAD^+ (eq.1). Uma rota acessória é o sistema microssomal metabolizador de etanol (MEOS). A atividade do MEOS envolve uma isoforma induzível do citocromo P450 (Ohnishi e Lieber, 1977). A CYP2E1 é constitutivamente expressa no fígado (5% do total de citocromos P450) (Koop e col., 1985) e outros tecidos (Ingelman-Sundberg e col., 1994), mas após o consumo crônico de etanol, ocorre um aumento de 4-10 vezes na sua expressão (Lieber, 1997).

Assim como o citocromo P450, a isoforma CYP2E1 requer NADPH e O₂ (Lieber e DeCarli, 1970), sendo portanto, capaz de produzir radicais superóxido e peróxido de hidrogênio durante o ciclo catalítico (Kuthan e Ullrich, 1982; Ingelman-Sundberg e col., 1994). Além dessas espécies, experimentos de EPR associado à técnica de captação de *spin* demonstraram a produção inequívoca do radical 1-hidroxietila durante a oxidação microsomal do etanol (Albano e col., 1987; Reinke e col., 1987; Rashba-Step e col., 1993; Rao e col., 1996). O mecanismo de formação do radical 1-hidroxietila mediada pelo MEOS não está ainda esclarecido (Cederbaum, 1989; Reinke e col., 1997; Albano e col., 1999). Estão descritas basicamente duas vias de formação (Albano e col., 1987; 1988). Uma é independente do radical hidroxila apontando para uma oxidação direta por 1-elétron pela CYP2E1 (Albano e col., 1988; 1991). A outra requer a presença de traços de íons metálicos e é consistente com um mecanismo mediado por radicais hidroxila (Albano e col., 1988; Reinke e col., 1997) como proposto já em 1983 (Winston e Cederbaum, 1983). No caso da via mediada por radicais hidroxila, a produção do radical 1-hidroxietila poderia ser dependente da formação de espécies reativas de oxigênio produzidas não enzimática (Reinke e col., 1997), ou enzimaticamente pela citocromo P450 redutase (Rao e col., 1996) ou por citocromos P450, como o CYP2E1 (Ingelman-Sundberg e col., 1994).

A formação de radicais 1-hidroxietila foi também demonstrada em incubações contendo proteínas nucleares hepáticas, NADPH e etanol, apesar do mecanismo não estar elucidado (Castro e col., 1998).

O radical 1-hidroxietila recebeu maiores considerações devido à sua detecção durante o metabolismo do etanol *in vivo* em extratos de fígado e coração de ratos tratados com etanol (Reinke e col., 1987), na bile de ratos deficientes em ADH (Knecht e col., 1990), na bile de ratos submetidos a tratamento agudo (Moore e col., 1995) e na bile e secreção pancreática de ratos submetidos a tratamento crônico (Iimuro e col., 1996). Células de Kupffer devem também contribuir para a formação de radicais 1-hidroxietila *in vivo*, já que a destruição destas células diminui a intensidade do sinal de EPR do radical aduto POBN-1-hidroxietila na bile de ratos tratados cronicamente com etanol (Knecht e col., 1995). Consistente com esta hipótese, a ativação de células de Kupffer por administração de lipopolissacarídeo (LPS) aumentou a intensidade do sinal do radical aduto detectado na bile dos animais (Chamulitrat e col., 1998).

1.1.2. Metabolismo de acetaldeído e produção de radicais livres e espécies reativas

O acetaldeído, metabólito final de todas as vias de oxidação do etanol, é bastante reativo e tóxico, o que torna sua rápida eliminação necessária (Lieber, 1997). Ele é metabolizado a acetato primariamente na mitocôndria pela aldeído desidrogenase, que possui alta afinidade pelo acetaldeído (Marjanen, 1972; Hodgson e Levi, 1994) (eq.2).

Além desta, duas outras enzimas presentes na fração solúvel dos homogenatos hepáticos metabolizam acetaldeído a acetato: a aldeído oxidase (Rajagopalan e col., 1962) e a xantina oxidase, ambas flavoproteínas contendo molibdênio, grupos Fe-S e um grupo prostético pterina (Fridovich, 1989). Em contraste com a aldeído desidrogenase, estas enzimas produzem espécies reativas de oxigênio (Kellog e Fridovich, 1975; Mira e col., 1995), pois são capazes de reduzir o O_2 por passos de um e dois elétrons, produzindo superóxido e peróxido de hidrogênio, respectivamente (Fridovich, 1989). A xantina oxidase merece maiores considerações pois a conversão de sua forma desidrogenase para oxidase aumenta durante a intoxicação por etanol (Sultatos, 1988; Batteli e col., 1992), evidenciando sua importância no metabolismo do acetaldeído. A oxidação de acetaldeído pela xantina oxidase produz quimioluminescência, atribuída à formação de diversas espécies reativas (Arneson, 1970; Cadenas e Chance, 1981; Puntarulo e Cederbaum, 1989). Estudos de EPR-captção de *spin* mostraram que radicais hidroxila produzidos durante oxidação de acetaldeído pela xantina oxidase na presença de Fe(III) atacam o acetaldeído, produzindo radicais acetila (Albano e col., 1994).

1.1.3. Etanol e estresse oxidativo

O consumo de álcool tem sido frequentemente associado a diversas patologias como danos hepáticos (Hodgson e Levi, 1994), danos ao sistema nervoso central (Schuckit, 1998), síndrome fetal alcoólica (Chaudhuri, 2000) e câncer (Mufti, 1992).

Considera-se que uma etapa importante para o desenvolvimento dessas patologias seja uma condição de estresse oxidativo (Ishii e col., 1997). O estresse oxidativo causado pelo etanol é provavelmente, uma consequência da formação de metabólitos reativos e da interação entre eles e/ou deles com biomoléculas (Esquema 1).

Esquema 1. Metabolismo do etanol e estresse oxidativo

O acetaldeído por si é bastante tóxico por ser um potente eletrófilo capaz de se ligar covalentemente às bases do DNA, produzindo adutos (Hemminke e Suni, 1984; Fang e Vaca, 1997; Matsuda e col., 1999). Também, liga-se a proteínas produzindo adutos que podem ativar a produção de anticorpos, inativar enzimas e diminuir a eficiência de reparo do DNA (Ishii e col., 1997). Além disso, o acetaldeído promove ligações cruzadas inter-e intra-fitas no DNA (Matsuda e col., 1998; Blasiak e col., 2000).

A intoxicação por etanol causa diversos danos que podem ser atribuídos a espécies reativas ou ao acetaldeído produzidos durante sua metabolização a acetaldeído ou deste a acetato (Esquema 1), à medida que etanol em si não é muito reativo. Já foi demonstrado que o metabolismo do etanol pode, entre outros efeitos, alterar o balanço redox celular (Domschke e col., 1974), promover um aumento na concentração de ferro livre de baixo peso molecular no citossol (Rouach e col., 1990; Sergent e col., 1995), induzir peroxidação lipídica (Shaw, 1989; Sergent e col., 1995), depletar glutatona (Comporti e col., 1973; MacDonald e col., 1977), diminuir a

atividade da SOD e da catalase (Schisler e Singh, 1989), diminuir os níveis de vitamina C (Bekpinar e Tugrul, 1995) e vitamina E (Koch e col., 1994; Takeyama e col., 1996).

A mitocôndria, uma organela importante no metabolismo do etanol por reoxidar o NADH produzido pela ADH, é também um alvo bastante afetado por etanol (Ishii e col., 1997; Cederbaum, 1999). Em animais experimentais, o consumo prolongado de etanol causa mudanças morfológicas na mitocôndria, aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio, danifica o complexo ATP sintetase, diminui a síntese protéica mitocondrial (Cederbaum, 1999) e diminuiu os níveis de GSH (Fernández-Checa e col., 1991). O DNA mitocondrial também está sujeito a oxidações (Wieland e Lauterburg, 1995) e degradação (Mansouri e col., 1999). Em relação ao DNA nuclear, já foi demonstrada a formação de quebras (Singh e col., 1995; Blasiak e col., 2000; Navasumrit e col., 2000), fragmentação (Aroor e Baker, 1997), e um aumento nos níveis de adutos endógenos (Navasumrit e col., 2001).

A intoxicação aguda por etanol ativa células de Kupffer e endoteliais, produzindo quantidades significativas de superóxido (Bautista e Spitzer, 1996). A administração crônica de etanol em ratos estimula a produção de óxido nítrico no fígado (Wang e col., 1995), e a produção deste radical pelas células de Kupffer é aumentada em pacientes com hepatite alcoólica (Hunt e Goldin, 1992). Trabalhos com células de Kupffer isoladas de ratos tratados com etanol mostraram que estas apresentam uma produção de espécies reativas de oxigênio e uma peroxidação lipídica maior do que aquelas isoladas de ratos controle (Takeyama e col., 1996). Estas células também estão envolvidas na produção de radicais 1-hidroxietila (Knecht e col., 1995) que parecem ter uma contribuição importante para a toxicidade do etanol (Albano e col., 1999). Recentemente, um sistema nuclear metabolizador de etanol caracterizado em hepatócitos de rato foi capaz de produzir o radical 1-hidroxietila na presença de NADPH, O_2 e etanol (Castro e col., 1998). O papel do radical 1-hidroxietila na patogênese alcoólica tem despertado crescente interesse. Este radical interage com proteínas produzindo adutos estáveis (Albano e col., 1993; Moncada e col., 1994; Clot e col., 1996). A imunização de coelhos com proteínas microssomais de rato previamente expostas ao radical 1-hidroxietila levou a produção de anticorpos que reagiram com albumina hidroxietilada (Moncada e col., 1994). Foi também mostrado que pacientes sofrendo de cirrose alcoólica possuem anticorpos circulantes que

reconhecem CYP2E1 e outras proteínas microsossomais previamente hidroxietiladas (Clot e col., 1996). Posteriormente foi demonstrado que a presença de CYP2E1 hidroxietilada na membrana plasmática de hepatócitos pode disparar reações imunológicas (Clot e col., 1997). A interação do radical 1-hidroxietila com antioxidantes foi recentemente reportada e mostrou que ele interage com glutatona, ácido ascórbico e α -tocoferol (Stoyanovsky e col., 1998). Catalase, glutatona peroxidase, superóxido dismutase também mostraram-se sensíveis à exposição a radicais 1-hidroxietila (Puntarulo e col., 1999). A exposição de mitocôndrias ao radical 1-hidroxietila induz uma diminuição do potencial de membrana, sugerindo uma contribuição desta espécie ao dano das funções mitocondriais causado por etanol (Sakurai e col., 2000).

1.1.4. Efeitos do etanol e seus metabólitos sobre ácidos nucleicos

O consumo excessivo de etanol está associado a diversos tipos de câncer, principalmente àqueles do sistema gastrointestinal superior, mama e fígado (Mufti, 1992).

Embora seja bem difundida a idéia de que o etanol exerce um papel na promoção de tumores (Mufti, 1992), seu mecanismo genotóxico não está claro (Brooks, 1997). Por exemplo, etanol já foi descrito como supressor do sistema imunológico (Mufti, 1992; Ben-Eliyahu e col., 1996), provocador de metástases (Ben-Eliyahu e col., 1996; Maeda e col., 1998) e de metilação aberrante do DNA (Barrows e Shank, 1981) e inibidor de mecanismos de reparo de DNA (Garro e col., 1986). Além disso, vários efeitos do etanol e de seus metabólitos sobre ácidos nucleicos estão descritos, como a quebra de fitas de DNA *in vitro* (Rajasinghe e col., 1990), em culturas de células (Blasiak e col., 2000) e em ratos após tratamento agudo (Singh e col., 1995; Navasumrit e col., 2000) e crônico (Navasumrit e col., 2000). Também foi descrita a produção de ligações cruzadas inter e intra-fitas do DNA (Matsuda e col., 1998, Blasiak e col., 2000) e entre DNA e proteínas (Olin e col., 1996). Mais ainda, foi descrita a formação de adutos com nucleosídeos e desoxinucleosídeos (Fraenker-Conrat e Singer, 1988) como a N2-etilguanosina (Hemminki e Suni, 1984), e N2-etil-2'-desoxiguanosina. Esta última foi detectada em DNA de linfócitos e de granulócitos de pacientes alcoólicos (Fang e Vaca, 1997). Tal aduto pode atuar como substrato das DNA polimerases α e δ *in vitro* (Matsuda e col., 1999) e induzir transversões G→C

(Terashima e col., 2001). O etanol também levou a um aumento na formação de adutos endógenos como a 1,N⁶-eteno-2'-desoxiadenosina e 3,N⁴-2'-etenodesoxicidina após tratamento agudo e crônico em ratos (Navasumrit e col., 2001) e aumentou os níveis de N7-MeGua em fígado de ratos tratados agudamente (Barrows e Shank, 1981).

1.2. Adutos de DNA e RNA com radicais livres: formação e papel em carcinogênese

Carcinogênese consiste em um processo multifatorial ocasionado por eventos genotóxicos e epigenéticos que resultam na ativação ou alteração da expressão de protooncogenes e/ou perda ou inativação de genes supressores de tumores.

A formação de adutos de DNA através de interações covalentes entre compostos carcinogênicos ou seus metabólitos e as bases do DNA compreende a primeira etapa do evento genotóxico. Caso a replicação deste DNA modificado ocorra antes do reparo das lesões, estas podem ser convertidas em mutações. Têm-se descrito diversos adutos de DNA, produzidos tanto a partir de compostos endógenos como exógenos, sendo a maioria considerada proveniente do ataque de espécies eletrofílicas às bases do DNA. Há, entretanto, um crescente interesse na elucidação do papel dos radicais livres em carcinogênese. A 8-oxo-7,8-diidro-desoxiguanosina, por exemplo, um produto do ataque do radical hidroxila (Marnett e Burcham, 1993) e também do peroxinitrito (Inoue e Kawanishi, 1995) ao DNA, é uma lesão produzida endogenamente que é reconhecidamente mutagênica (Friedberg e col., 1995). O peroxinitrito (Yermilov e col., 1995) e o sistema mieloperoxidase/peróxido de hidrogênio/nitrito (Byun e col., 1999) produzem a 8-nitroguanina via o radical dióxido de nitrogênio. Recentemente, o óxido nítrico mostrou-se também capaz de produzir a 8-nitroguanina em fibroblastos de pulmão, após tratamento das células com NO gasoso sob baixas tensões de O₂ (Hsieh e col., 2001). A 8-nitro-2'-deoxiguanosina é rapidamente hidrolisada (Sodum e Fiala, 2001) ou depurinada do DNA (Yermilov e col., 1995), o que causa a formação de sítios abásicos.

Radicais de carbono também podem desempenhar um papel em carcinogênese. Já foi descrita a transformação de fibroblastos super-expressando o

proto-oncogene c-myc induzida por radicais alquila (Gamberini e col., 1998). Esses radicais lesam o DNA, produzindo quebras e formando adutos (Augusto, 1993). A formação do aduto 8-MeGua, produzido pelo ataque de radicais metila a guanina foi demonstrada *in vitro* (Augusto e col., 1990) e *in vivo*, em animais tratados com drogas metabolizadas a radicais metila, como 1,2-dimetilidrazina (Netto e col., 1992) e hidroperóxido de tércio-butila (Hix e col., 2000). Íons arenodiazônio produzem radicais arila que se mostraram capaz de alquilar DNA *in vitro* e em células (Gannet e col., 1996; 1999). Em relação às propriedades mutagênicas dos adutos de radicais livres, a C8-metil desoxiguanosina (Kohda e col., 1996) e a C8-fenildesoxiguanosina (Kohda e col., 1997) incorporadas em oligodesoxinucleotídeos induziram transversões G→C e G→T e deleções *in vitro*.

A produção de adutos de RNA com radicais livres têm sido muito menos considerada. Radicais hidroxila e metila mostraram-se capazes de alquilar RNA produzindo 8-oxo-7,8-diidroguanosina (Fiala e col., 1989) e 8-metilguanina (Kang e col., 1993) *in vivo* e *in vitro*, respectivamente. Recentemente, foi também mostrada a produção de 8-nitroguanosina a partir da incubação de guanosina com peroxinitrito (Sodum e Fiala, 2001). Entre os efeitos descritos para adutos de RNA, a 8-oxo-7,8-diidroguanosina mostrou-se um potente indutor de proliferação de linfócitos B (Ahmad e Mond, 1985). Este composto e a 8-metilguanina também aumentaram a velocidade de proliferação de alguns tipos celulares, como células de melanoma, embora o mecanismo da indução não tenha sido estudado (Kwee e col., 1998). A incorporação de 8-oxo-7,8-diidroguanosina no mRNA durante a transcrição leva à produção de proteínas alteradas (Taddei e col., 1997). Portanto, adutos de RNA podem contribuir para o processo carcinogênico através de eventos epigenéticos. Além disso, a presença de diversos ribonucleosídeos modificados em praticamente todos os tipos de RNA, mas preferencialmente em tRNA e rRNA (Limbach e col., 1994), sugere um papel desses adutos na modulação dos processos onde estes tipos de RNA estão envolvidos, como transcrição e tradução.

2. OBJETIVOS

Visando contribuir para a elucidação dos mecanismos pelos quais o etanol exerce efeitos genotóxicos, nos propusemos a caracterizar novos metabólitos radicalares do etanol e a estudar suas interações com ácidos nucléicos *in vitro* e em animais experimentais (ratos).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Reagentes

A água utilizada em todos os experimentos foi tratada com o sistema Nanopure da Barnstead e eventualmente com CHELEX-100.

DNA de timo de bezerro (tipo I), RNA de fígado de bezerro, RNA de levedura, guanina, adenina, ATP, GTP, CTP, UTP, Chelex-100, POBN, DMPO, d_6 -DMSO, ^{13}C -etanol, DTPA, dióxido de manganês RNAses A e T1, fenol cristalizado, formiato de amônio, fosfatase alcalina, antimicina A, nuclease P1, proteinase K, xantina oxidase de leite (grau III), alopurinol e EDTA foram obtidos da Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA.

O peróxido de hidrogênio foi obtido da Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, EUA, e sua concentração periodicamente determinada por espectrofotometria ($\epsilon_{240} = 43,6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Kuthan e Ullrich, 1982).

Acetaldeído, 8-oxoGua, e 3,5-dibromo sulfonato foram obtidos da Aldrich Chemical Co., Milwaukee, WI, EUA.

As soluções usadas nos estudos com peroxinitrito foram tratadas com CHELEX-100 por pelo menos 12 h.

1,2- ^{13}C -acetaldeído e 7,9- ^{15}N , 8- ^{13}C -guanina foram obtidos da Cambridge Isotopes Laboratories, Andover, MA, EUA.

Etanol, DSS, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, solventes de grau cromatográfico e demais reagentes foram obtidos da Merck, Darmstadt, Alemanha.

Mesilato de desferrioxamina (desferal) foi obtida da Ciba-Geigy, Summit, NJ, EUA.

As soluções de $Fe(II)$ empregadas foram preparadas em solução de H_2SO_4 ($\sim 0,5 \text{ M}$) para se evitar a auto-oxidação do ferro (North e col., 1992).

A atividade enzimática da xantina oxidase foi determinada medindo-se a velocidade de formação de ácido úrico ($\epsilon_{290} = 12.200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) a partir de xantina (0,1mM) em tampão fosfato pH 7,6.

DMPO foi purificado por destilação e sua concentração determinada por UV ($\epsilon_{234} = 7.700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, em etanol).

DBNBS e peroxinitrito foram sintetizados segundo protocolos descritos (Kaur e col., 1981; Beckman e col., 1990, respectivamente).

8-MeGua foi sintetizada e purificada como descrito anteriormente (Maeda e col., 1974).

A 8-OxoAde foi doada pelo Dr. J. Cadet, Service de Chemie Inorganique et Biologique, CEA, Grenoble, França.

A hidrazona do acetaldeído foi cedida pelo Dr. Valdemir Carvalho, IQUSP.

A concentração das soluções estoque de acetaldeído foi determinada pelo método da dinitrofenil hidrazina (DNPH) (Henle e col., 1996). Resumidamente, 50 μ L de uma solução de DNPH (2,5mg/mL em HCl 2M) foram adicionados a 200 μ L da amostra a ser determinada (concentração do aldeído deve ser menor que 500 μ M). Esta solução foi incubada a 40°C por 1h, em frasco vedado. Após resfriamento, 450 μ L de acetonitrila e 300 μ L de tampão fosfato 0,67M pH 7,0 foram adicionados. A solução foi filtrada e analisada por HPLC com detecção UV (367nm). A hidrazona do acetaldeído (t_r =18,7min) foi separada da DNPH (t_r =7,2min) em uma coluna μ Bondapak C18 Waters (3,9 $\times$ 300 mm, 10 μ m) eluída com água/acetonitrila (6:5, v/v) a 1,1 mL/min. As áreas dos picos foram comparadas com as áreas das soluções padrão da hidrazona do acetaldeído.

3.2. Síntese e purificação dos adutos 8-(1-HE)Gua e 8-(2-HE)Gua

Sessenta miligramas de guanina foram dissolvidos à temperatura ambiente e sob fluxo de N₂ em 240 mL de uma solução ácida de H₂SO₄, pH 1 (solução saturada ~1,5 mM) contendo 440 mg FeSO₄.7H₂O (6 mM) (Maeda e col., 1974). Após dissolução e ainda sob borbulhamento de N₂, foram adicionados 12 mL de uma solução 1,65M etanol (75 mM) e lentamente, 13,2 mL de uma solução 88 mM H₂O₂ (4,5 mM). A mistura permaneceu sob agitação e anaerobiose por 30 minutos. O pH foi elevado a 10-11 pela adição de uma solução 5 M NaOH para precipitação de óxidos de ferro e a mistura foi filtrada em papel de filtro comum. O pH do filtrado foi diminuído para 5-6 com uma solução de H₂SO₄. Traços de íons ferro foram eliminados pela complexação com CHELEX-100 por 12-14 horas sob agitação. A mistura foi então filtrada em uma membrana filtrante de 0,22 μ m e submetida às etapas de purificação.

Os adutos produzidos foram purificados por HPLC em duas etapas, utilizando-se um sistema cromatográfico Waters consistindo de 2 bombas em série (Waters 501), injetor Rheodyne 7010-7012, detector de UV (Waters 486) monitorando em 254 nm, controlador de temperatura da coluna e módulo de aquisição de dados (Waters 746). Em ambas as etapas a coluna utilizada foi uma semi-preparativa μ Bondapak C18 Waters (19 $\times$ 150 mm, 10 μ m) e as soluções foram bombeadas diretamente do reservatório da fase móvel (~4-8 mL/ "injeção"). Primeiramente foi feita uma pre-purificação da síntese coletando-se uma fração correspondente aos 2 produtos formados. Para isso, a coluna foi eluída com água/metanol (99:1, v/v) a 40 °C e fluxo de 5 mL/min. As frações (volume final de ~1,3 L), coletadas no mesmo recipiente, foram rotoevaporadas a 38-40 °C até aproximadamente 100 mL. A segunda etapa consistiu na separação dos produtos coletados, empregando-se como fase móvel uma solução de ácido fórmico pH 3,2, à temperatura ambiente, e fluxo de 5 mL/min. As frações correspondentes a cada um dos dois produtos foram coletadas separadamente e então rotoevaporadas a 38-40 °C até aproximadamente 150 mL cada. As duas soluções foram congeladas e liofilizadas em uma câmara de liofilização (Savant SC 110). Os sólidos brancos obtidos foram transferidos para um dessecador e secados sob pressão reduzida na presença de sílica gel.

A análise de pureza dos adutos foi feita por HPLC analítico em um sistema cromatográfico constituído de uma bomba (Waters 625 LC), injetor Rheodyne 9125, detector de fotodiodos (Waters 991), detector de fluorescência (Waters 470) (λ_{exc} =285 nm; λ_{em} = 365 nm) e detector amperométrico (Waters 480) (0,90V) acoplados a um sistema de aquisição de espectros NEC Power Mate SX Plus. Foi utilizada uma coluna de troca catiônica Whatman Partisil SCX (4,6 $\times$ 250mm) eluída com fosfato de sódio (15 mM), pH 2,7, e fluxo de 0,7 mL/min.

3.2.1. Caracterização espectroscópica

a) Espectroscopia de ^1H -RMN

Soluções dos produtos obtidos e de guanina foram preparadas em ca.1mL d_6 -DMSO, filtradas e transferidas para tubos de quartzo Wilmad de 5mm diâmetro. Os espectros de FT- ^1H -RMN foram obtidos em um espectrômetro de 200 MHz (Bruker AC 200), à temperatura ambiente, utilizando-se como padrão interno o próprio DMSO. Em

alguns casos, o pico da H₂O contaminante ($\delta \sim 3,5$ ppm) foi suprimido. Experimentos de desacoplamento de *spin* nuclear foram feitos irradiando-se as amostras com as frequências pertinentes.

b) Espectrofotometria na região UV

Os espectros de absorbância óptica na região do UV dos adutos isolados e da guanina foram registrados em um espectrofotômetro (Hitachi U-2000) à temperatura ambiente, em pH 1,0 e 7,0. Os coeficientes de extinção molar (ϵ) nos comprimentos de onda máximos ($\lambda_{\max}$) de cada aduto e da guanina foram determinados em pH 1 (HCl 0,1M) e 7 (tampão fosfato 10 mM). Para isso, a concentração das soluções dos compostos foi determinada a partir da integração de espectros de ¹H-RMN em D₂O/F₃C-COOD, usando-se DSS como padrão quantitativo. Os espectros de RMN foram adquiridos em um espectrômetro de 300 MHz (Bruker DPX 300), à temperatura ambiente.

c) Espectrometria de massa com ionização por *electrospray*

Os espectros de massa foram obtidos em um espectrômetro de massas triplo quadrupolo Micromass Quattro II, com ionização por *electrospray* em modo positivo. Soluções dos adutos (ca. 10 ng/ μ L) em acetonitrila contendo 0,1% HCOOH foram infundidas a um fluxo de 5 μ L/min e os espectros de MS e MS/MS adquiridos. Para a 8-(2-HE)Gua foi usada voltagem do cone de 50 V, energia de colisão de 22 eV; pressão do gás de colisão de 3×10^{-3} mBar. O espectro-filho do fragmento $m/z=178$ foi adquirido com uma voltagem do cone de 65V, energia de colisão de 26eV e pressão do gás de colisão de $5,7 \times 10^{-3}$ mBar. Para a 8-(1-HE)Gua, foi empregada uma voltagem de cone de 30 V, energia de colisão de 20 eV, pressão do gás de colisão de 3×10^{-3} mBar. O espectro-filho de $m/z=178$ foi adquirido com uma voltagem de cone de 30V, energia de colisão de 30eV e pressão do gás de colisão $4,0 \times 10^{-3}$ mBar.

d) Voltamograma hidrodinâmico

Voltamogramas hidrodinâmicos foram obtidos injetando-se ca. 20-30 ng de adutos em diferentes potenciais de oxidação (detecção amperométrica; 0,6-1,0 V em eletrodo de carbono, contra referência de Ag/AgCl) no mesmo sistema cromatográfico analítico que o descrito em 3.2. Foram utilizadas cromatografias (i) de troca catiônica

(coluna Partisil SCX Phenomenex (4,6 x 250 mm), eluída com formiato de amônio 14 mM, pH 2,70, 0,9 mL/min) e (ii) fase reversa (coluna C18 Resolve Waters (3,9 x 150 mm), eluída com fosfato de potássio 50 mM contendo 1% metanol v/v, pH 5,0, 0,5 mL/min).

3.3. Preparo de partículas submitocondriais

Uma suspensão mitocondrial (20 mg proteína/mL) isolada de coração bovino (Vercesi e col., 1978) em meio contendo Hepes (10 mM), sacarose (250 mM), ATP (6 mM) e Mg^{2+} (6 mM), pH 6,8, foi sonicada durante 3 ciclos de 45 segundos a 100 W de potência, com intervalos de 1 minuto, em um sonicador Branson, a 4°C. Após uma centrifugação de 15 min a 12000 rpm, o sobrenadante foi submetido a ultracentrifugação (45 min, 40000 rpm). As partículas submitocondrias precipitadas foram cuidadosamente ressuspensas em uma solução contendo KCl (130 mM) e EGTA (10 μ M) pH 7,5 tratada com CHELEX. Esta suspensão teve seu conteúdo protéico determinado pelo método de Bradford, e foi imediatamente congelada -80°C até o dia do experimento.

3.4. Tratamento dos animais

3.4.1. Estudos de alquilação de ácidos nucleicos

Ratos machos Sprague-Dawley, 7-8 semanas, 200-250g (CEMIB-Unicamp, Campinas, SP) foram tratados intragastricamente com etanol (5g/kg) diluído a 70% v/v em água (Barrows e Shank, 1981) ou com 2 mL de água. Após 3 e 12 h de tratamento, os animais foram mortos em uma câmara saturada de CO₂ e seus fígados removidos. Os fígados foram lavados em solução fisiológica comercial gelada, e duas partes do lóbulo direito foram separadas para a extração de DNA e RNA. Todos os tecidos foram congelados em gelo seco e mantidos a -80 °C até o processamento.

3.4.2. Estudos de EPR associado ao método do captador de spin

Ratos machos Sprague-Dawley, 300-450g (Charles River Breeding Laboratories, Raleigh, NC, EUA) foram anestesiados com pentobarbital (50mg/kg, i.p.) e os dutos biliares foram canulados com um tubo PE 10 (Becton Dickinson, Sparks,

MD, EUA) de 20 cm. Os animais receberam uma dose de POBN (1g/kg, i.p.) dissolvido em água, e alguns receberam uma injeção intragástrica de acetaldeído (1g/kg) diluído em água (1:1, v/v). Amostras de bile (~400 µL) foram coletadas a cada 20 min em tubos (de 1,5 mL) contendo 50 µL de uma solução 2,2'-dipiridil (30 mM) e batocuproína, sal dissódico (30 mM), protegidos de luz. As amostras foram congeladas em gelo seco imediatamente após a coleta e mantidas a -80 °C até a análise.

3.5. Experimentos de EPR associada à técnica do captador de *spin*

Para a detecção dos radicais 1-hidroxietila e 2-hidroxietila, etanol 100% ^{12}C ou 100% ^{13}C (75 mM) foi incubado com Fe(II) (1 mM), H_2O_2 (4 mM), DNA (1,3 mg/mL) na presença de POBN (100 mM) ou DBNBS (20 mM), sob um fluxo de N_2 . O pH foi ajustado a 4 ou 7 pela adição de soluções de HCl ou NaOH. Para o estudo da oxidação de acetaldeído a radicais metila, as misturas reacionais contiveram acetaldeído, captador de *spin* POBN, DMPO ou DBNBS, e o sistema oxidante, peroxinitrito ou H_2O_2 /Fe(II)-EDTA/ascorbato, em tampão fosfato. Nesses casos, os espectros foram adquiridos 1 min após a adição do último reagente.

As misturas reacionais do sistema acetaldeído/xantina oxidase foram incubadas a 36 °C por 15 min, sob agitação constante. As partículas submitocondriais foram reativadas descongelando-as a 31 °C por 10 min. Algumas amostras de bile foram tratadas com ferricianeto de potássio (1mM) por 1h (Sentjurk e Mason, 1992).

As misturas reacionais ou amostras de bile foram imediatamente transferidas para uma cela de EPR de 200 µL ou 100 µL e analisadas à temperatura ambiente em um espectrômetro Bruker EMX equipado ou não com uma cavidade Super High Q. A concentração dos radicais adutos foi estimada a partir da dupla integração dos espectros de EPR usando-se o radical 4-hidroxi-2,2,6,6-tetrametil-1-piperidiniloxila (TEMPOL) como padrão quantitativo. Quando necessário, alguns espectros foram simulados com o programa escrito por Duling (Duling, 1994).

3.6. Alquilação de ácidos nucleicos *in vitro*

As misturas reacionais (3 mL volume final) contiveram DNA de timo de bezerro

(1,3 mg/mL) ou RNA de fígado de bezerro (1,3 mg/mL), etanol (50 ou 100 mM), Fe(II) (1mM) e H₂O₂ (4 mM), em água a pH 4 ou 7, e foram mantidas durante toda a incubação sob um fluxo de N₂ e à temperatura ambiente. O pH foi monitorado com um medidor de pH (Orion 520A) acoplado a um eletrodo de vidro combinado, e ajustado pela adição controlada de soluções de HCl ou NaOH. Após 15 minutos de incubação, as reações foram interrompidas pela adição de 1 mL de uma solução 5M de NaCl e 2-3 volumes de etanol gelado (-20°C). As misturas foram mantidas a -20°C por 3-5 horas para que os ácidos nucleicos precipitassem. Uma centrifugação (~2000 rpm, 25 min) (Sorvall RT6000B, rotor H1000B) foi necessária para isolar o DNA e o RNA, que foram então lavados 2 vezes com uma solução 70% v/v etanol, secados sob pressão reduzida e submetidos à hidrólise.

3.7. Isolamento de RNA e DNA hepático de ratos tratados com etanol ou água

O RNA foi isolado de 0,5 g de cada fígado, segundo protocolo já descrito (Chomczynski e Sacchi, 1987). Algumas alterações foram introduzidas para prevenir uma possível formação do radical 1-hidroxietila *ex vivo*: β-mercaptoetanol foi substituído por DTT, desferal (0,2 mM) foi adicionado à solução caotrópica de guanidina e etanol usado para precipitar o RNA foi substituído por 2-propanol. O DNA foi isolado de 1g de cada fígado pelo método do NaI, segundo protocolo descrito (Helbock e col., 1998). 2-Propanol foi utilizado para a precipitação, substituindo etanol. A quantidade de RNA contaminante foi determinada através da relação de área entre Ado e dAdo por HPLC-UV (254 nm) (Bianchini e col., 1993), variando de 1 a 3,5% nos DNA isolados.

3.8. Hidrólise ácida dos ácidos nucleicos

DNA e RNA foram ressuspensos em tampão fosfato 10 mM, pH 7,0, por pelo menos 12h. As concentrações destas soluções foram determinadas por UV (relação A_{260nm}=1 corresponde a 50 µg/mL ou 40 µg/mL, para DNA e RNA, respectivamente (Sambrook e col., 1989)). Após o ajuste de suas concentrações para 1,5 mg/mL, foram hidrolisados quimicamente. Para isso, as soluções de DNA foram aciduladas com uma solução 1M HCl (conc. final 0,1M) e aquecidas a 70 °C por 1h. As soluções de RNA

foram aciduladas com uma solução 10M HCl (conc. final 1M) e aquecidas a 95 °C por 1h (Kang e col., 1993).

3.9. Análise por HPLC-ECD de 8-(1-HE)Gua, 8-(2-HE)Gua, 8-oxoGua e 8-oxoAde em ácidos nucleicos produzidos durante incubação *in vitro*

Os hidrolisados ácidos de DNA e RNA foram analisados quanto à presença dos adutos 8-(1-HE)Gua e 8-(2-HE)Gua em um sistema cromatográfico consistindo de uma bomba (Waters 625LC), injetor Rheodyne 9125, acoplados a um detector de fotodiodos 991 (monitorando entre 230-300nm) (Waters 991), detector eletroquímico (Waters 460) e a um sistema de aquisição de espectros NEC Power Mate SX Plus. A separação cromatográfica foi obtida por duas colunas analíticas Resolve C18 Waters (3,9 × 150 mm, 5µm) em série, eluídas com um tampão fosfato KH₂PO₄ 50 mM pH 5 contendo 1% v/v metanol, a 0,5 mL/min. Foram feitos voltamogramas hidrodinâmicos como descrito em 3.2.1. (utilizando-se adutos sintetizados e 45 µg DNA ou RNA). A quantificação dos adutos foi feita através da integração dos picos correspondentes e comparação de suas áreas com as áreas dos picos dos padrões autênticos. A análise de 8-oxoGua foi realizada em sistema cromatográfico consistindo de uma bomba (Shimadzu LC 10AD) acoplada a um detector UV (Waters 484), monitorando em 285nm e a um detector eletroquímico amperométrico (Shimadzu L-ECD 6A), monitorando em 0,6V. A separação foi obtida por uma coluna µBondapak Waters (3,9 × 300 mm, 10 µm) eluída com uma solução KH₂PO₄ 50 mM pH 5 contendo 1% v/v metanol, a 0,6 mL/min. 8-OxoAde foi analisada durante a análise dos adutos alquilados. A quantificação dos adutos foi feita através da integração dos picos correspondentes e comparação de suas áreas com as áreas dos picos dos padrões autênticos.

3.10. Análise de 8-(1-HE)Gua em ácidos nucleicos de fígado de ratos por HPLC-ECD e HPLC-MS/MS

3.10.1. Pré-purificação dos adutos

Para a análise inicial por HPLC-ECD, os hidrolisados foram pre-purificados por

HPLC composto de duas bombas (Waters 501), injetor Rheodyne 7125, acoplados a um detector UV (Waters 486). A separação foi obtida por uma coluna analítica catiônica Phenosphere (21,2 × 250 mm, 5 µm) eluída com uma solução de formiato de amônio (100 mM), pH 2,6 contendo 7% metanol v/v, a 10 mL/min. As frações de 8-(1-HE)Gua coletadas foram rotoevaporadas. Para a análise por HPLC-MS/MS, os hidrolisados foram injetados em um sistema de HPLC consistindo de uma bomba Shimadzu LC-10AD, detector PDA Shimadzu M10AV e injetor Rheodyne 7725i. A separação cromatográfica foi obtida por uma coluna semipreparativa C18 µBondapak Waters (7,8 × 300 mm; 10µm), eluída com formiato de amônio 10 mM pH 5,2 contendo 1% MeOH, 1mL/min, a 43 °C. Duas injeções contendo o equivalente a 120 µg de RNA cada ou 210 µg DNA cada na presença de 1,1 pmol de [M+3] 8-(1-HE)Gua foram feitas para cada rato. As frações correspondentes aos tempos de retenção de [M+3] 8-(1-HE)Gua ($\pm$ 2min) foram coletadas, congeladas e liofilizadas. Os solventes das hidrólises (soluções de HCl), assim como as soluções usadas no isolamento de DNA e RNA também foram injetados e coletados na presença do padrão interno entre as injeções de RNA e DNA para a verificação de contaminações cruzadas nas soluções e/ou vidrarias empregadas no isolamento dos ácidos nucleicos e de *carry-over* do aduto. Os resíduos, em tubos de 15 mL, foram ressuspensos em solução de ácido fórmico pH 1-2, aquecidos a 70 °C por 30 min e transferidos para tubos de 1,5 mL. As soluções foram secas e os resíduos mantidos a -20°C até a análise.

3.10.2. Análise por HPLC-ECD

Os resíduos das frações coletadas foram ressuspensos em uma solução de ácido fórmico pH 3 e a análise das frações coletadas foi feita em um sistema de HPLC consistindo de uma bomba (Waters 625), injetor Rheodyne 9125-080 associados a um detector PDA (Waters 996) controlado pelo programa Millennium Waters, e a um detector coulométrico ESA (0,5V). A separação foi obtida por uma coluna C18 Novapak Waters (250 × 4,6 mm; 5µm) eluída com fosfato de potássio 50 mM, pH 5,3 contendo 4% metanol, fluxo de 0,5 mL/min.

3.10.3. Análise por HPLC-MS/MS

Os resíduos das frações coletadas (~240 µg RNA ou 420 µg DNA) foram

ressuspensos em 100 μL de água e submetidos a análise por HPLC-MS/MS. O sistema cromatográfico era composto por bombas Shimadzu SPD-10AV VP-Class e injetor Rheodyne 7725i. A separação foi obtida por uma coluna *narrowbore* C18 Supelco (2,1 $\times$ 250 mm, 5 μm), eluída com 15% v/v acetonitrila, a 0,12 mL/min. A detecção por espectrometria de massa e ionização por *electrospray* no modo positivo foi feita em um espectrômetro triplo quadrupolo Quattro II Micromass (Altrincham, Inglaterra), acoplado ao programa de aquisição Masslinx 3.2. O equipamento foi operado com uma voltagem de capilar 2,5kV, temperatura da fonte 85 °C, voltagem do cone 15V e energia de colisão 16eV. Nitrogênio (10L/min) foi empregado como gás nebulizador, enquanto que argônio (3,1 $\times 10^{-3}$ mBar) como gás de colisão. A detecção em *tandem* consistia no modo MRM (*multiple reaction monitoring*), usando-se um tempo de exposição (*dwel time*) de 1s. A janela de aquisição foi mantida em $\pm 0,1$ u.m.a.. A quantificação foi feita através de uma curva de calibração obtida medindo-se as relações de áreas entre 1,16 pmol [M+3] 8-(1-HE)Gua e quantidades variáveis de 8-(1-HE)Gua (0,06-2 pmol).

3.10.4. Quantificação de guanina

Para a análise por HPLC-MS/MS, guanina foi quantificada durante a etapa de pre-purificação para a normalização dos valores de aduto por base parental. Foi feita uma curva de calibração (detecção por UV a 254 nm) injetando-se diferentes quantidades de guanina (padrão externo).

3.11. Estudos cinéticos

A cinética de decomposição do peroxinitrito na ausência e presença de acetaldeído foi monitorada a 325 nm em um espectrofotômetro de cinética rápida (Applied Photophysics SX-18MV) com um tempo de mistura menor que 2 ms. As constantes de velocidade aparentes foram determinadas através de uma equação padrão do programa ajustada a uma função exponencial simples. Os valores determinados representam a média das médias de 5-7 determinações independentes. A temperatura foi mantida a 37,0 $\pm$ 0,2 °C e o pH das soluções finais foi medido ao fim dos experimentos com um medidor de pH. A reação entre o acetaldeído e o peróxido

de hidrogênio foi monitorada medindo-se o consumo do peróxido. Alíquotas das misturas de incubação em diferentes tempos foram retiradas e a concentração de peróxido de hidrogênio foi determinada pela oxidação de 2,2'-azobis(sulfonato de 3-etilbenzotiazolina) (ABTS) catalizada por peroxidase de raiz forte (Radi e col., 1991). As soluções empregadas nesses ensaios foram preparadas sempre um dia antes e tratadas com CHELEX-100 por uma noite.

3.12. Análise de acetato, formiato, nitrito e nitrato por eletroforese capilar

As misturas reacionais consistiram em incubações de acetaldeído (11 ou 100 mM) com peroxinitrito (10 mM) ou com Fe(II) (0,5mM) e H₂O₂ (10 mM) em água. O pH foi ajustado pela adição controlada de soluções de HCl ou NaOH nas paredes do tubo, simultaneamente à adição do peroxinitrito ou do Fe(II). As misturas foram incubadas por 40 min a temperatura ambiente, o pH foi determinado em um medidor de pH e as soluções foram congeladas a -80°C até a análise. A análise dos ânions cloreto, nitrito, nitrato, acetato e formiato foi realizada em um equipamento de eletroforese capilar 270-HT (Applied Biosystems/Perkin-Elmer) acoplado a um detector de UV monitorando em 254 nm, com detecção indireta. O eletrólito consistia numa solução de K₂Cr₂O₇ (10 mM) contendo CTBA (0,1 mM), pH 8,75. Os ânions foram separados empregando-se uma voltagem constante de -10kV. Soluções padrão de formiato foram preparadas a partir da titulação de soluções de ácido fórmico com uma solução padronizada de NaOH, enquanto que as soluções padrão de acetato foram preparadas pesando-se acuradamente acetato de sódio sólido e dissolvendo-o em balão volumétrico.

4. RESULTADOS

4.1. Alquilação de ácidos nucleicos por radicais 1-hidroxietila e 2-hidroxietila produzidos durante a oxidação de etanol *in vitro*

4.1.1. Síntese, purificação e caracterização dos adutos 8-(1-HE)Gua e 8-(2-HE)Gua

As reações inicialmente vislumbradas (eq. 3-5) para a mistura reacional contendo guanina (1,5 mM), etanol (75 mM), peróxido de hidrogênio (4,5 mM) e Fe(II) (6 mM) em pH 1 e sob um fluxo de N₂ previam a formação de um produto principal, o aduto 8-(1-HE)Gua. Esta suposição baseava-se (i) na conhecida formação de radicais 1-hidroxietila a partir da oxidação do etanol por radicais hidroxila (Moncada e col., 1994) e em sua detecção por experimentos de EPR durante o metabolismo do etanol *in vitro* (Albano e col., 1987; Rao e col., 1996) e *in vivo* (Reinke e col., 1987; Knecht e col., 1990; Moore e col., 1995) e (ii) em dados da literatura (Maeda e col., 1974; Steinmaus e col., 1971) e do nosso laboratório (Augusto e col., 1990) que demonstraram que radicais de carbono alquilam preferencialmente a posição 8 da guanina.

Contudo, a análise da mistura reacional por HPLC-UV (250 nm) mostrou que dois produtos principais foram formados, em rendimentos comparáveis (Fig.1). Ambos os produtos foram purificados por HPLC em duas etapas e apresentaram um único pico quando foram re-analisados por HPLC com detecções por UV, fluorescência e eletroquímica (Fig. 2). As análises espectroscópicas de cada um dos produtos identificou os picos com tempos de retenção 20,3 e 25,6 min (Fig.1) como 8-(2-HE)Gua e 8-(1-HE)Gua, respectivamente (Esquema 2).

Figura 1. Cromatograma representativo da incubação de guanina (1,5 mM) com Fe(II) (6 mM), H_2O_2 (4,5 mM) e etanol (75 mM) em água pH 1 por 15 min, sob fluxo de N_2 . A separação cromatográfica foi realizada com uma coluna de fase reversa semi-preparativa C18 μ Bondapak Waters eluída com H_2O /metanol, 99:1, v/v a 40 °C. O fluxo foi de 5 mL/min de 0 a 15,5 min e de 2,5 mL/min de 15,6 até o final da corrida.

Figura 2. Cromatogramas representativos dos adutos (A) 8-(2-HE)Gua e (B) 8-(1-HE)Gua purificados da incubação de guanina com Fe(II), H_2O_2 e etanol. A separação cromatográfica foi obtida com uma coluna de troca catiônica Whatman Partisil SCX ($4,6 \times 250\text{mm}$) eluída com fosfato de sódio (15 mM), pH 2,7 e fluxo de 0,7 mL/min. Detecções de UV (250 e 280 nm), fluorescência ($\lambda_{\text{exc}}=285\text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}}=365\text{ nm}$) e amperométrica (0,90V).

Esquema 2: Produtos da reação entre guanina e radicais 1-hidroxietila e 2-hidroxietila produzidos durante oxidação do etanol por sistema Fenton

Os espectros de ^1H -RMN obtidos em d_6 -DMSO para 8-(2-HE)Gua e 8-(1-HE)Gua estão mostrados na Figura 3, e as atribuições dos prótons, assim como as respectivas constantes de acoplamento (J) estão apresentadas na Tabela 1. A primeira constatação clara foi a substituição na posição 8. O próton H-8 da guanina absorve em ca. 7,6 ppm em d_6 -DMSO (dado não mostrado). Guaninas substituídas, como a N7-MeGua, N7-(2-HE)Gua, O6-(2-HE)Gua, também apresentam seus H-8 entre 7,8 e 7,9 ppm (Ashby e col., 1982), demonstrando que a substituição não causa mudanças significativas no deslocamento químico do H-8 da guanina. Nos espectros dos adutos (Figs. 3A,B) não foi observada nenhuma evidência da presença do H-8. Os prótons 2- NH_2 dos adutos apresentaram-se também na mesma região (Tabela 1) que os prótons da guanina (em 6,3 ppm) (dado não mostrado), daqueles determinados para 8-MedGuo, em 6,4 ppm (Morais, 1995) e de outros nucleosídeos substituídos na posição 8 (Cho e col., 1990). Além disso, no espectro da 8-(2-HE)Gua observam-se dois tripletos (Fig. 3A). Os tripletos em 2,74 e 3,70 ppm foram atribuídos aos H do grupo substituinte. O triplete em 3,70 corresponde aos dois H do C1 devido a influência do grupo OH, que desprotege os prótons do carbono a que está ligado, fazendo com que seus prótons absorvam em campo mais baixo que os H do carbono vizinho. Em um experimento paralelo, a irradiação de um dos tripletos induziu o

Figura 3. Espectros de ¹H-RMN da (A) 8-(2-HE)Gua e (B) 8-(1-HE)Gua, em d₆-DMSO, obtidos à temperatura ambiente, com supressão do pico de H₂O (ca. 3,5 ppm). As atribuições estão mostradas na Tabela 1.

desacoplamento dos *spins* entre eles, confirmando que os prótons destes picos estão próximos entre si e acoplados. No caso da 8-(1-HE)Gua, o dubleto em 1,34 ppm refere-se ao grupo metila do grupo substituinte acoplado com o H do C1, detectado como um quarteto em 4,62 ppm. O acoplamento destes prótons foi também confirmado através de experimentos de irradiação (resultados não mostrados). Os valores das constantes de acoplamento determinados para ambos os adutos (Tabela 1) são consistentes com os valores esperados (Silverstein e col., 1991; Vaca e col., 1995).

Tabela 1. Atribuições dos prótons dos adutos 8-(2-HE)Gua e 8-(1-HE)Gua determinados por ^1H -RMN

Composto	Atribuição	δ *(ppm)	multiplicidade	J (Hz)
8-(2-HE)Gua	-CH ₂ -	2,74	triplete	7,0
	-CH ₂ OH	3,70	triplete	
	2-NH ₂	6,33	singleto	
8-(1-HE)Gua	-CH ₃	1,34	dubleto	6,6
	-CH(OH)-	4,62	quarteto	
	2-NH ₂	6,48	singleto	

* os deslocamentos químicos (δ) são relativos ao d₆-DMSO (δ = 2,49 ppm) em temperatura ambiente

Estudos espectrofotométricos na região ultravioleta mostraram que ambos os adutos apresentam espectros similares ao da guanina não substituída em pHs 1 e 7 (Fig. 4). Os λ de máxima absorção de radiação UV estão mostrados e comparados com os da guanina na Tabela 2. Nos dois pHs estudados, observou-se um pequeno deslocamento batocrômico nos espectros de absorção dos adutos em comparação à guanina na região de 250 nm. Este efeito é esperado pela substituição por grupos alquila e foi também observado na 8-MeGua, 8-MeGuo e 8-hidroximetilGuo em comparação aos compostos parentais (Maeda e col., 1974). Além disso, a 8-(2-HE)Gua apresentou um pequeno deslocamento batocrômico na região de 276 nm (Fig.4B), em relação a guanina, devido a hiperconjugação do grupo substituinte com o anel purínico, efeito também observado na 8-MeGua (Augusto e col., 1990). O fato do C1, proveniente do etanol na 8-(1-HE)Gua estar mais substituído do que na 8-MeGua

Figura 4. Espectros de absorção de UV de 8-(2-HE)Gua, 8-(1-HE)Gua e guanina em (A) pH 1 e (B) pH 7.

e 8-(2-HE)Gua atenua o efeito, por diminuir o número de formas canônicas possíveis. Os valores dos coeficientes de extinção molar dos adutos determinados nos λ máximos a pHs 1 e 7 (Tabela 2) estão na mesma ordem daqueles descritos para a 8-MeGua (Maeda e col., 1974), N7-(2-HE)Gua e O6-(2-HE)Gua (Ashby e col, 1982).

Tabela 2. Dados espectrais na região de UV da guanina (Dawson e col., 1986) e dos adutos 8-(2-HE)Gua e 8-(1-HE)Gua

Composto	pH	λ_{max} (nm)	ϵ ($\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)
guanina	1	248	11400
	7	246	10700
8-(2-HE)Gua	1	250	10630
	7	247	8945
8-(1-HE)Gua	1	250	10320
	7	249	9734

A caracterização estrutural dos adutos foi também confirmada por espectrometria de massa com ionização por *electrospray* em modo positivo (Fig. 5). Como os compostos são isômeros de posição, eles possuem a mesma massa molecular (195 u.m.a.) e apresentaram um padrão de fragmentação muito similar nos espectros filhos dos íons $m/z=196$. Estes incluíram a perda de grupos hidroxila na forma de H_2O , uma fragmentação típica de álcoois e a perda sequencial de H_2O e NH_2 (Fig. 5A, B). Esta eliminação sequencial foi demonstrada para ambos os adutos em outro experimento de MS/MS, onde foi registrado o espectro filho do fragmento m/z 178, mostrando que o fragmento m/z 161 é realmente derivado do fragmento m/z 178 (Fig. 5, insertos). A ausência de um fragmento correspondendo à perda total do grupo substituinte ($-\text{CHOHCH}_3$ ou $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$) evidenciou também a substituição em um átomo de carbono, ao invés de substituição em átomos de N ou O (Frilhart e Leonard, 1973). Embora os espectros sejam muito parecidos (Fig. 5A, B), no caso da 8-(2-HE)Gua foi observado um fragmento de m/z 165 que corresponde à quebra da ligação $\text{CH}_2-\text{CH}_2\text{OH}$, esperada no caso de álcoois primários.

Voltamogramas hidrodinâmicos, realizados em duas condições cromatográficas, permitiram a determinação dos potenciais de meia-onda para os

Figura 5. Espectros de massa com ionização por *electrospray* no modo positivo de (A) 8-(2-HE)Gua e (B) 8-(1-HE)Gua. Os inserts mostram os espectros-filhos dos fragmentos de m/z 178. Condições instrumentais para 8-(2-HE)Gua: voltagem do cone, 50 V; energia de colisão, 22 eV; pressão do gás de colisão, 3×10^{-3} mBar; para o inserto: voltagem do cone, 65V; energia de colisão, 26eV; pressão do gás de colisão, $5,7 \times 10^{-3}$ mBar. 8-(1-HE)Gua: voltagem do cone, 30 V; energia de colisão, 20 eV; pressão do gás de colisão, 3×10^{-3} mBar; para o inserto: voltagem do cone, 30V; energia de colisão, 30eV; pressão do gás de colisão, $4,0 \times 10^{-3}$ mBar.

adutos sintetizados (Fig. 6). Os valores obtidos estiveram na faixa de 0,70-0,85V, dependendo da fase móvel empregada. Comparativamente a 8-MeGua, que foi recentemente detectada *in vivo* por HPLC- ECD (Hix e col., 2000) aplicando-se um potencial de oxidação de 0,93V (Gomes e col., 1995), os valores obtidos para 8-(1-HE)Gua e 8-(2-HE)Gua indicam que os últimos são mais facilmente oxidados. Este fato deve estar relacionado com a presença do grupo hidroxila nos substituintes. Por exemplo, a 8-oxoGua, que tem uma forma tautomérica hidroxilada, é facilmente detectada em potenciais tão baixos como 0,6 V (Kaur e Halliwell, 1996). A possibilidade de utilização de baixos potenciais na detecção eletroquímica propicia uma vantagem metodológica por aumentar a seletividade.

4.1.2. Caracterização dos radicais 1-hidroxietila e 2-hidroxietila durante a oxidação de etanol por sistemas de Fenton

A formação de quantidades comparáveis dos adutos 8-(1-HE)Gua e 8-(2-HE)Gua (Fig. 1, Esquema 2) em incubações de guanina com sistemas de Fenton foi um resultado inesperado, pois existiam poucos relatos sobre a formação do radical 2-hidroxietila a partir de sistemas Fenton (Ozawa e Hanaki, 1987; Smith e Robertson, 1988; Gatti e col., 1998) e nenhum sobre sua formação durante o metabolismo do etanol *in vitro* (Reinke e col., 1987; Albano e col., 1988; Rao e col., 1996) e *in vivo* (Knecht e col., 1990; Moore e col., 1995). Provavelmente, a utilização de captadores de *spin* como POBN, DMPO e PBN contribuiu para que o radical 1-hidroxietila fosse considerado praticamente o único formado a partir da oxidação do etanol por tais sistemas. De fato, esses captadores de *spin* produzem radicais adutos com constantes de desdobramento hiperfino muito semelhantes tornando difícil a caracterização dos radicais captados somente por espectroscopia de EPR. Utilizando dois tipos diferentes de captadores de *spin*, um da classe nitroso (DBNBS) e outro da classe nitrona (POBN), a formação de ambos radicais 1-hidroxietila e 2-hidroxietila foi confirmada durante a oxidação de etanol por $H_2O_2/Fe(II)$ (Fig.7). Na presença de DBNBS, o principal radical detectado foi o radical aduto DBNBS-2-hidroxietila (Fig. 7A) cujas constantes de desdobramento hiperfino ($a_N = 1,42mT$; $a_H = 1,13 mT$; $a_{H(m)} = 0,075 mT$)

Figura 6. Voltamogramas hidrodinâmicos de 8-(2-HE)Gua e 8-(1-HE)Gua obtidos em duas condições cromatográficas. Condição 1: troca iônica, (coluna Phenomenex Partisil 10SCX, eluída com tampão formiato de amônio 14 mM, pH 2,6, a 0,9 mL/min). Condição 2: fase reversa (coluna C18 Resolve Waters, eluída com tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 5 contendo 1% metanol v/v, a 0,5 mL/min). Para melhor visualização, as curvas foram construídas na mesma escala Y.

Figura 7. Espectros de EPR dos radicais adutos obtidos durante a incubação de etanol com Fe(II) e H₂O₂. Os espectros foram adquiridos após 1 min de incubação de etanol (100 mM), Fe(II) (1mM), H₂O₂ (4 mM) e DNA (1,3mg/mL) em pH 4 na presença de (A) DBNBS (20 mM); (B) POBN (100 mM); (C) POBN (100 mM), e substituição do etanol por ¹³1-C-etanol. Condições instrumentais: potência de microondas, 20 mW; constante de tempo, 327,7 ms; velocidade de varredura, 0,0298 mT/s; amplitude de modulação, 0,05 mT; ganho, 2,52 x 10⁶ (A) e 2,00 x 10⁶ (B,C).

são consistentes com as descritas para este aduto (Ozawa e Hanaki, 1987; Gatti e col., 1998). Na presença de POBN, o principal radical detectado foi o aduto POBN-1-hidroxietila ($a_N=1,58\text{mT}$; $a_H=0,26\text{mT}$) (Fig. 7B), como confirmado por experimentos com ^{13}C -etanol (Fig. 7C). Neste caso, o espectro de seis linhas (Fig. 7B) foi substituído por um espectro de 12 linhas ($a_N=1,55\text{mT}$; $a_H=0,26\text{mT}$; $a_{^{13}\text{C}}=0,42\text{mT}$) devido à contribuição do átomo de ^{13}C ($I=1/2$). Embora o radical 1-hidroxietila fosse o maior componente desse espectro, as diferentes alturas dos picos, assim como a presença de uma 13ª linha (Fig. 7C), indicaram que baixas quantidades de outro radical aduto, provavelmente o POBN-2-hidroxietila, estavam contribuindo para o espectro final. Os rendimentos radicalares foram estimados nesses experimentos. O rendimento total de radicais captados por DNBBS e POBN não variou mais do que duas vezes com o pH. O rendimento do radical aduto DNBBS-2-hidroxietila foi estimado em 15 e 9 μM a pH 4 (Fig. 7A) e pH 7, respectivamente. No caso do aduto POBN-1-hidroxietila, os rendimentos estimados foram de 135 e 180 μM a pH 4 (Fig. 7B) e pH 7, respectivamente. Embora a concentração de radicais captados seja no geral menor do que a concentração total de radicais formados, um rendimento do radical 2-hidroxietila bem menor que o do radical 1-hidroxietila é consistente com estudos de radiólise de pulso (Asmus e col., 1973). Tais estudos demonstraram que a oxidação de etanol por radicais hidroxila produz radicais 1-hidroxietila, 2-hidroxietila e etoxila em rendimentos de 84,3, 13,2 e 2,5%, respectivamente.

4.1.3. Alquilação de DNA e RNA pelos radicais 1-hidroxietila e 2-hidroxietila produzidos por sistemas de Fenton na presença de etanol

A distribuição de produtos observada durante a alquilação da guanina isolada poderia não refletir o padrão de alquilação de resíduos de guanina em ácidos nucleicos, porque a estrutura terciária afeta este padrão, principalmente quando íons metálicos participam do processo (Hix e col., 1995). Então, a possibilidade de se detectar os adutos 8-(1-HE)Gua e 8-(2-HE)Gua em DNA e RNA incubados com etanol e sistemas de Fenton foi testada experimentalmente, por HPLC-ECD.

A análise cromatográfica com detecção amperométrica dos hidrolisados ácidos de incubações de RNA ou DNA (1,3 mg/mL) com etanol (100 mM), peróxido de

hidrogênio (4 mM) e Fe(II) (1 mM) em pH 4 revelou a formação de 8-(1-HE)Gua e 8-(2-HE)Gua nos ácidos nucleicos (Fig. 8). A identificação dos adutos nos hidrolisados foi feita pela comparação dos tempos de retenção, espectros de UV e voltamogramas hidrodinâmicos com aqueles dos padrões autênticos (dados não mostrados). Em pH 7, ambos os adutos foram encontrados nos hidrolisados de RNA tratado com o sistema completo, enquanto que nos hidrolisados de DNA tratado somente a 8-(1-HE)Gua foi inequivocamente identificada e quantificada (Tabela 3). Mesmo assim, estes hidrolisados apresentaram um pequeno pico com o mesmo tempo de retenção que a 8-(2-HE)Gua e que co-eluíu com o padrão autêntico (dado não mostrado). Os rendimentos obtidos para a produção dos adutos variaram com o ácido nucleico e o pH (Tabela 3). Em todas as condições empregadas, a alquilação foi mais eficiente no RNA do que no DNA.

Tabela 3. Rendimento de produtos hidroxietilados em ácidos nucleicos incubados com etanol na presença de peróxido de hidrogênio e Fe(II)

Sistema	8-(1-HE)Gua (pmol/mg)*	8-(2-HE)Gua (pmol/mg)*
DNA/Fe(II), pH 4	nd**	nd
DNA/Fe(II)/H ₂ O ₂ , pH 4	nd	nd
DNA/Fe(II)/H ₂ O ₂ /EtOH, pH 4	1350	190
DNA/Fe(II), pH 7	nd	nd
DNA/Fe(II)/H ₂ O ₂ , pH 7	nd	nd
DNA/Fe(II)/H ₂ O ₂ /EtOH, pH 7	21	<5***
RNA/Fe(II), pH 4	nd	nd
RNA/Fe(II)/H ₂ O ₂ /EtOH, pH 4	3020	287
RNA/Fe(II), pH 7	nd	nd
RNA/Fe(II)/H ₂ O ₂ /EtOH, pH 7	226	31

* resultados expressos em pmol de aduto por mg de ácido nucleico, média de 2 determinações independentes

** nd = não detectado

*** a identificação e quantificação inequívoca não foram possíveis com uma única separação cromatográfica

Figura 8. Cromatogramas representativos obtidos por detecção amperométrica de (A) mistura de padrões contendo guanina (56 ng), 8-(1-HE)Gua (51 ng) e 8-(2-HE)Gua (50 ng); (B) hidrolisado ácido de uma incubação de DNA (1,3 mg/mL) com Fe(II) (1 mM) em pH 4; (C) hidrolisado ácido de uma incubação de DNA (1,3 mg/mL) com Fe(II) (1mM), H_2O_2 (4mM) e etanol (100 mM) em pH 4. As injeções de (B) e (C) correspondem a 90 μ g de DNA não hidrolisado.

Apesar da análise de danos oxidativos não estar dentro dos objetivos principais deste trabalho, os níveis de 8-oxoGua e 8-oxoAde foram determinados nas incubações de DNA, Fe(II) (1 mM), peróxido de hidrogênio (4 mM) na presença e ausência de etanol (100 mM). A 8-oxoAde foi analisada nas mesmas condições cromatográficas que os adutos alquilados (Fig. 8), enquanto que a 8-oxoGua foi analisada em corridas paralelas. As bases oxidadas foram identificadas pela comparação de tempo de retenção e espectros de UV com os dos padrões autênticos (resultado não mostrado). Como esperado de sistemas Fenton, a guanina e a adenina foram oxidadas. A quantificação nos hidrolisados (Tabela 4) mostrou uma tendência de rendimentos mais altos dos dois produtos nas incubações contendo etanol.

Tabela 4. Rendimentos de adutos oxidados em DNA incubado com etanol na presença de peróxido de hidrogênio e Fe(II)

Sistema	8-oxoGua (pmol/mg)*	8-oxoAde (pmol/mg)*
DNA/Fe(II), pH 4	2410	nd**
DNA/Fe(II)/H ₂ O ₂ , pH 4	2180	600
DNA/Fe(II)/H ₂ O ₂ /EtOH, pH 4	7290	1560
DNA/Fe(II), pH 7	1130	nd
DNA/Fe(II)/H ₂ O ₂ , pH 7	3670	520
DNA/Fe(II)/H ₂ O ₂ /EtOH, pH 7	3040	649

* resultados expressos em pmol de aduto por mg de ácido nucléico; média de 2 determinações independentes

** nd= não detectado

4.2. Oxidação de acetaldeído a radicais metila e acetila por peroxinitrito e peróxido de hidrogênio/Fe(II)-EDTA

Durante os estudos de EPR da oxidação de etanol por sistemas de Fenton (Fig. 7), foi possível notar que os espectros das incubações contendo DBNBS apresentavam uma espécie componente de menor intensidade (Fig. 7A), principalmente em pHs ≥ 7 . Experimentos controle indicaram que aquele sinal não era artefactual e era derivado da oxidação do etanol. Por tratar-se de uma espécie

radicalar, sua origem e formação foram estudadas. Nestes estudos, dois importantes oxidantes biológicos foram utilizados, peroxinitrito e peróxido de hidrogênio na presença de Fe(II). A incubação de etanol (15 mM) com peroxinitrito (1mM) na presença de DNBBS (10 mM) produziu, além do radical aduto DNBBS-2-hidroxietila, outro radical aduto que pôde ser inequivocamente identificado como DNBBS-metila ($a_N = 1,41$ mT; $a_H = 1,13$ mT; $a_{H(m)} = 0,070$ mT) (Gatti e col., 1998). Os rendimentos relativos desse radical variaram com o pH (Fig. 9). Além de aumentar com o pH, o rendimento do radical aduto DNBBS-metila foi maior em incubações contendo peroxinitrito do que naquelas contendo H_2O_2 /Fe(II)-EDTA (resultado não mostrado). Este comportamento foi também observado para a produção de radicais livres durante a oxidação de piruvato pelos mesmos oxidantes (Vasquez-Vivar e col., 1997). A fonte dos radicais metila foi demonstrada substituindo-se o etanol por acetaldeído, que é um produto estável da oxidação de etanol. Incubações de acetaldeído com peroxinitrito ou H_2O_2 /Fe(II)-EDTA/ascorbato, na presença de DNBBS, produziram intensos espectros de EPR do radical DNBBS-metila (Fig. 10C, E). Na ausência de peroxinitrito (Fig. 10A) ou Fe(II)-EDTA (Fig. 10D) nenhum sinal foi detectado. A adição de peroxinitrito decomposto a incubações contendo acetaldeído e DNBBS não produziu nenhum radical aduto (dados não mostrados). Já a adição do oxidante a soluções contendo somente o captador de *spin* produziu um sinal de EPR atribuído anteriormente ao aduto DNBBS-OH (Fig. 10 B) (Kohn e col., 1991). Os rendimentos do radical aduto DNBBS-metila produzidos durante a oxidação de acetaldeído por peroxinitrito (1mM) e H_2O_2 (5mM)/Fe(II)-EDTA (0,5mM)/ascorbato (1mM) em pH 7,4 foram de 100 e 10 μ M, respectivamente. Estes rendimentos mostraram-se dependentes do pH (Fig. 11), e as curvas sigmoidais obtidas apresentaram pontos de inflexão em pHs 6,4 e 7,8 para o peroxinitrito e para o sistema H_2O_2 /Fe(II)-EDTA/ascorbato, respectivamente. O primeiro valor está de acordo com o pKa determinado para o ácido peroxinitroso (pKa= 6,6) (Merényi e Lind, 1998). Considerando-se que o pKa do acetaldeído (pKa>13) (Serjeant e Dempsey, 1979) não está dentro da faixa de pH analisada, a curva obtida reflete a desprotonação do ácido peroxinitroso (eq. 6), indicando que a produção de radicais metila a partir da oxidação do acetaldeído por peroxinitrito depende do ânion peroxinitrito. Analogamente, o perfil obtido para a oxidação por H_2O_2 /Fe(II)-EDTA/ascorbato (Fig. 11) também demonstrou a importância da forma desprotonada do peróxido na formação de radicais metila, pois reflete a dissociação do peróxido de

Figura 9. Espectros de EPR dos radicais adutos de DBNBS obtidos durante a incubação de etanol (15 mM) , DBNBS (10mM) e peroxinitrito (1mM) por 1 min em tampão fosfato (100 mM) contendo DTPA (0,1mM) em pH: (A) 5,1; (B) 7,2. Os espectros componentes estão marcados (•) DBNBS-metila e (o) DBNBS-2-hidroxietila. Condições instrumentais: potência de microondas, 20 mW, constante de tempo, 327,7 ms; velocidade de varredura, 0,0149 mT/s; amplitude de modulação, 0,05 mT; ganho, $5,64 \times 10^6$.

Figura 10. Espectros de EPR dos radicais adutos de DNBBS obtidos durante a incubação de DNBBS (20mM) em tampão fosfato (0,2 M) contendo DTPA (0,1mM) pH 7,4 com: (A) acetaldeído (11 mM); (B) peroxinítrito (1mM); (C) acetaldeído (11 mM) e peroxinítrito (1mM); (D) acetaldeído (11 mM) e peróxido de hidrogênio (5 mM); e (E) acetaldeído (11 mM) e peróxido de hidrogênio na presença de Fe(II)-EDTA (0,5 mM). Condições instrumentais: potência de microondas, 20 mW, constante de tempo, 327,7 ms; velocidade de varredura, 0,0149 mT/s; amplitude de modulação, 0,05 mT; e ganho, $2,25 \times 10^5$ (A-C) e $1,26 \times 10^6$ (D,E),

Figura 11. Efeito do pH nos rendimentos do radical aduto DNBBS-metila produzido durante a oxidação de acetaldeído. Os espectros foram obtidos durante a incubação de acetaldeído (11 mM) e DNBBS (20 mM) por 1 min à temperatura ambiente em tampão fosfato (200 mM), contendo DTPA (0,1 mM) com (○) peroxinitrito (1mM) ou (●) peróxido de hidrogênio (5 mM)/Fe(II)-EDTA (0,5 mM)/ascorbato (1mM). Condições instrumentais como descrito na Figura 10, exceto pelo ganho, que mudou de acordo com o tamanho do sinal. Os rendimentos radicalares obtidos na presença de peróxido de hidrogênio foram multiplicados por 2.

hidrogênio (eq. 7), apesar do ponto de inflexão (pH=7,8) estar bem abaixo do valor do pKa do peróxido de hidrogênio (pKa=11,7) (Lide, 1993). Neste caso, contudo, o sistema é bem mais complexo, pois a formação de radicais metila é completamente dependente da presença de íons Fe(II) (Fig. 10D,E) e a concentração de Fe(II) diminui a medida que o pH da mistura reacional aumenta, já que pHs alcalinos estabilizam melhor complexos do metal no estado de Fe(III) (Koppenol, 1994).

A reação entre peróxido de hidrogênio e íons de metais de transição na forma reduzida gera radicais hidroxila (eq. 3). A formação de radicais metila a partir da oxidação do acetaldeído por radical hidroxila já havia sido descrita (Puntarulo e Cederbaum, 1989). Nesse caso, radicais hidroxila oxidam o acetaldeído a radicais acetila que são decompostos a monóxido de carbono e radicais metila (eqs. 8, 9). Entretanto, os dados obtidos (Fig. 11) indicaram que outro mecanismo, dependente do ânion peróxido, poderia estar ocorrendo nas condições aqui utilizadas. O mecanismo de formação de radicais metila a partir da oxidação de acetaldeído por H_2O_2 (5 mM)/Fe(II)-EDTA (0,5mM)/ascorbato (1mM) foi examinado mais detalhadamente por experimentos de EPR em presença de DMPO (20 mM) (Fig. 12). Os espectros obtidos mostraram que três radicais adutos são produzidos, o DMPO-acetila ($a_N=1,52\text{mT}$; $a_H=1,88\text{ mT}$) (Rota e col., 1997), o DMPO-metila ($a_N=1,61\text{ mT}$; $a_H=2,32\text{ mT}$) (Li e col., 1988) e o DMPO-hidroxila ($a_N=1,50\text{ mT}$; $a_H=1,50\text{ mT}$) (Li e col., 1988). Seus rendimentos relativos variaram com o pH e com a concentração de acetaldeído. O rendimento de todos os adutos aumentou com o aumento do pH da incubação de 5,1 para 8,4 (Fig. 12A, B). Um aumento de 10 vezes na concentração do aldeído (de 11 para 100 mM) provocou uma diminuição na concentração do radical aduto DMPO-hidroxila e um aumento na concentração dos radicais adutos derivados do acetaldeído (Fig. 12 B-D), como esperado pela competição do acetaldeído e DMPO pelo radical hidroxila. Contudo, o rendimento do aduto DMPO-acetila aumentou ca. 2 vezes (de 16,7 para 36,3 μM), enquanto que o rendimento do radical aduto DMPO-metila aumentou ca.10 vezes (de 5,4 para 61,7 μM). Esta diferença indicou que a produção de radicais metila e acetila nestas condições experimentais devia ocorrer por vias

Figura 12. Espectros de EPR de radicais adutos de DMPO obtidos durante incubações de acetaldeído com peróxido de hidrogênio/Fe(II)-EDTA. Os espectros foram obtidos durante a incubação de DMPO (20 mM), peróxido de hidrogênio (5 mM), Fe(II)-EDTA (0,5 mM) e ascorbato (1mM) em tampão fosfato com: (A) acetaldeído (11 mM), pH 5,1; (B) acetaldeído (11 mM), pH 8,4; e (C) acetaldeído (100 mM) pH 8,4. (D) simulação computacional de (C) considerando três radicais adutos (•) DMPO-metila, (o) DMPO-hidroxila, (x) DMPO-acetila. O dubleto central em (A) é o radical ascorbila, enquanto que o radical presente em baixas concentrações em (C) é DMPO-H. Condições instrumentais: potência de microondas, 20 mW; constante de tempo, 163,84 ms; velocidade de varredura, 0,0596 mT/s; amplitude de modulação, 0,1 mT; e ganho, $5,02 \times 10^4$.

distintas.

Estudos cinéticos foram conduzidos para melhor compreensão da etapa inicial da interação entre o acetaldeído e a espécie oxidante. A oxidação mediada por peroxinitrito foi estudada por experimentos de cinética rápida. A constante bimolecular aparente para a reação entre peroxinitrito e acetaldeído foi calculada como $680 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ em pH 7,4 e 37°C , medindo-se as constantes de pseudo-primeira ordem para o decaimento do peroxinitrito na ausência e presença de diferentes concentrações de acetaldeído (Fig. 13). O valor obtido está na mesma ordem de grandeza que o valor determinado para a mesma reação por outros investigadores ($830 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ em pH 7,0 e 25°C) (Uppu e col, 1997). As constantes de pseudo-primeira ordem variaram com o pH (Fig. 13, inserto). O perfil de pH obtido no gráfico de k_{obs} , corrigido para a variação da constante de decomposição espontânea do peroxinitrito com o pH ($k_{\text{obs}} - k_{\text{N}}$), exibiu um ponto de inflexão de 6,2, um valor próximo do pKa do ácido peroxinitroso (eq.6) (Merényi e Lind, 1998). A cinética entre o acetaldeído e peróxido de hidrogênio não pôde ser estudada sob as condições experimentais empregadas porque o consumo de H_2O_2 foi muito baixo na ausência de Fe(II)-EDTA (dado não mostrado).

Os efeitos do pH sobre a velocidade de oxidação do acetaldeído (Fig. 13) e a formação de radicais metila (Figs. 11,12) sugeriram um mecanismo de adição nucleofílica (Vasquez-Vivar e col., 1997; Knudsen e col., 2000). Neste, a forma desprotonada do oxidante ataca o grupo carbonila do acetaldeído, produzindo um intermediário hipotético que se cliva produzindo radicais metila, íons formiato e acetato homoliticamente, no caso do peroxinitrito (Fig.14) ou redutivamente pela presença de íons Fe(II) no caso do sistema $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe(II)-EDTA/ascorbato}$ (Fig.15). Para confirmar este mecanismo, os produtos de oxidação estáveis foram analisados.

Os produtos aniônicos produzidos durante a oxidação do acetaldeído por peroxinitrito ou peróxido de hidrogênio na presença de íons ferro foram analisados por eletroforese capilar. As incubações foram feitas em água, pois íons fosfato interferiram nos eletroferogramas. Os pHs foram controlados pela adição simultânea de soluções de HCl ou NaOH. Este procedimento causou pequenas variações nos pHs finais das

Figura 13. Constantes de pseudo-primeira ordem para a reação entre peroxinitrito e acetaldeído em função da concentração do acetaldeído. A concentração inicial do peroxinitrito foi de 0,6 mM, e as reações foram feitas em tampão fosfato 100 mM, pH 7,4, contendo DTPA (0,1 mM) a 37 °C. O inserto mostra a dependência de $k_{obs} - k_N$ pelo pH, a 37 °C. k_{obs} e k_N correspondem a constante de decomposição do peroxinitrito, na ausência e presença de acetaldeído, respectivamente.

Figura 14. Mecanismo de adição nucleofílica proposto para a formação de radicais metila e íons formiato, acetato, nitrato e nitrito a partir da reação de acetaldeído com peroxinitrito. Rota A: isomerização do peroxinitrito a nitrato com regeneração do aldeído (Uppu e col., 1997); Rota B: transferência de elétrons *in-cage* (Hodges e Ingold, 1999); Rota C: escape de elétrons com formação de radicais livres (Vasquez-Vivar e col., 1997; Gatti e col., 1998; Goldstein e Czapski, 1998; Lyman e Hurst, 1998; Merényi e Lind, 1998; Merényi e col., 1998; Bonini e col., 1999; Hodges e Ingold, 1999).

Figura 15. Mecanismos propostos para a formação de radicais metila e acetila, íons formiato e acetato, a partir da reação de acetaldeído com peróxido de hidrogênio e Fe(II)-EDTA. Rota A: produção de radicais hidroxila por reação de Fenton (Puntarulo e Cederbaum, 1989; Albano e col., 1994); Rota B: adição nucleofílica (Vasquez-Vivar e col., 1997).

misturas (Tabelas 5 e 6). Os eletroferogramas das misturas reacionais contendo peroxinitrito exibiram picos correspondentes a cloreto (provenientes da síntese do peroxinitrito e do ajuste de pH), nitrito, nitrato, formiato e acetato (Fig.16). Os íons foram identificados pelos tempos de retenção e co-eluição com padrões autênticos. Injeções de soluções de acetaldeído mostraram que traços de íons acetato estavam presentes nas soluções de acetaldeído (<1%, mol/mol). Uma parte dos íons nitrito (18%, mol/mol) e nitrato (18%, mol/mol) são contaminantes provenientes da síntese do peroxinitrito. As concentrações destes contaminantes foram determinadas em incubações onde o peroxinitrito foi decomposto em meio ácido. Nesta condição, assumiu-se que todo peroxinitrito isomeriza-se a nitrato (Kissner e col., 1997; Pfeiffer e col., 1997; Merényi e col., 1998). A produção de formiato, acetato, nitrito e nitrato na presença e ausência de acetaldeído em dois pHs diferentes foi quantificada (Tabela 5). Os rendimentos de formiato foram de 8 e 13% da concentração inicial de peroxinitrito em pH 6,7 e 9,1, respectivamente. O rendimento total de íons orgânicos (formiato e acetato) também aumentou com o pH, de 25 para 33%, respectivamente. Os rendimentos de nitrito e nitrato foram de ca. 35 e 75% da concentração inicial do peroxinitrito e não se mostraram sensíveis a variações de pH. A análise dos produtos gerados durante a oxidação de acetaldeído por peróxido de hidrogênio/Fe(II) (Tabela 6) foi menos informativa, porque o EDTA não pôde ser utilizado. Quando presente nas misturas reacionais, o EDTA foi oxidado a muitos produtos que se distribuíram pelos eletroferogramas, impedindo a detecção de acetato e formiato. Portanto, Fe(II) foi adicionado sem o quelante, o que causou sua rápida oxidação e precipitação de hidróxidos nos pHs mais alcalinos. Este fato dificultou a interpretação dos resultados. Contudo, foi possível a obtenção de alguns dados relevantes. A produção de formiato foi maior em pH mais alcalino e mostrou-se completamente dependente da presença de íons Fe(II), como no caso da formação de radicais metila (Fig. 10), indicando que a formação de radicais metila e íons formiato ocorrem pela mesma rota.

Figura 16. Eletroferogramas representativos da incubação de peroxinitrito (10 mM) em pH 6,8 na ausência (A); e na presença (B) de acetaldeído (100 mM).

Tabela 5. Produção de nitrato, nitrito, formiato e acetato durante a oxidação de acetaldeído (100 mM) por peroxinitrito (10 mM)

Sistema	[NO ₃ ⁻] (mM)*	[NO ₂ ⁻] (mM)*	[HCOO ⁻] (mM)	[H ₃ C-COO ⁻] (mM)*
Aa/ ONOO ⁻ , pH 6,7	7,60 ± 0,83	2,48 ± 0,33	0,79 ± 0,03	1,69 ± 0,31
Aa/ ONOO ⁻ , pH 9,1	7,95 ± 0,82	2,75 ± 0,37	1,30 ± 0,09	1,97 ± 0,21
ONOO ⁻ , pH 6,8	8,62 ± 0,21	1,90 ± 0,15		
ONOO ⁻ , pH 9,0	5,01 ± 0,20	5,50 ± 0,27		

* os valores (média±desvio padrão) foram corrigidos para as contaminações presentes em soluções de acetaldeído (100 mM) (0,23 ± 0,06 mM acetato) e peroxinitrito (10 mM) (1,92 ± 0,10 mM nitrato e 1,76 ± 0,06 mM nitrito)

Tabela 6. Produção de formiato e acetato durante a oxidação de acetaldeído (11 mM) por peróxido de hidrogênio (5 mM) e Fe(II) (0,5 mM)

Sistema	[HCOO ⁻] (mM)	[H ₃ C-COO ⁻] (mM)*
Aa/ H ₂ O ₂ / Fe(II), pH 8,1	0,29 ± 0,01	0,77 ± 0,03
Aa/ H ₂ O ₂ , pH 7,3	nd**	0,19
Aa/ H ₂ O ₂ / Fe(II), pH 10,2	0,33 ± 0,01	1,84 ± 0,11
Aa/ H ₂ O ₂ , pH 10,3	nd	2,13 ± 0,17

* os valores (média±desvio padrão) foram corrigidos para as contaminações presentes em soluções de acetaldeído (100 mM) (0,23 ± 0,06 mM acetato)

** nd= não detectado

4.3. Oxidação de acetaldeído a radicais metila e acetila por sistemas enzimáticos e *in vivo*

Apesar de alguns trabalhos da literatura já terem mostrado a formação de radicais livres durante o metabolismo do acetaldeído *in vitro* (Fridovich, 1989; Puntarulo e Cederbaum, 1989; Rajasinghe e col., 1990; Gonthier e col., 1991; Albano e col., 1994), nenhum deles caracterizou os radicais produzidos. Portanto, sistemas

potencialmente relevantes para o metabolismo do acetaldeído foram examinados quanto à produção de radicais livres.

4.3.1. *Xantina oxidase e partículas submitocondriais*

Uma das enzimas que podem metabolizar acetaldeído é a xantina oxidase, uma flavoenzima cuja conversão da forma desidrogenase para oxidase aumenta durante a intoxicação por etanol (Sultatos, 1988; Batteli e col., 1992). A possibilidade do acetaldeído ser oxidado a radicais metila pela xantina oxidase foi avaliada. Incubações contendo acetaldeído (80 mM), xantina oxidase (6 mU/mL) e Fe(III)-EDTA (5 μ M) na presença do captador de *spin* DMPO (80mM) apresentaram um espectro de EPR composto de três radicais adutos de DMPO (Fig. 17A). Esses radicais adutos foram identificados por simulação computacional dos espectros experimentais como os radicais aduto DMPO-acetila ($a_N=1,52$ mT; $a_H=1,87$ mT) (Rota e col., 1997), DMPO-metila ($a_N=1,62$ mT; $a_H= 2,32$ mT) e DMPO-hidroxila ($a_N=1,49$ mT; $a_H= 1,49$ mT) (Li e col., 1988). Já era conhecida a produção de radicais superóxido, peróxido de hidrogênio e radicais acetila durante a oxidação de acetaldeído por xantina oxidase (Fridovich, 1989; Puntarulo, e col., 1989; Albano e col., 1994). Radicais acetila haviam sido identificados por experimentos de EPR utilizando-se POBN como captador de *spin* (Albano e col., 1994). Como já discutido anteriormente, os radicais adutos de POBN possuem constantes de desdobramento hiperfino muito semelhantes, o que torna difícil a identificação de radicais apenas por esses parâmetros. Além disso, a baixa concentração de acetaldeído empregada por Albano e col. (2 mM) produziu baixos rendimentos de radicais, comprometendo suas identificações. Em nossos estudos, experimentos controle mostraram que a produção de radicais foi dependente da presença de acetaldeído (Fig. 17 B). A dependência da enzima foi também demonstrada (Fig. 17 C) porque alopurinol, um inibidor competitivo da xantina oxidase, inibe o rendimento de radicais adutos (Fig. 17D). Sem a adição de Fe(III)-EDTA, a intensidade do sinal foi reduzido para ca. 60% da intensidade original (dado não mostrado). Mesmo na ausência de Fe(III)-EDTA exógeno e na presença de desferal (1 mM), o sinal de EPR não foi completamente inibido (Fig. 17E). Este resultado indicou que íons de metais de transição são necessários para a formação de radicais livres e

Figura 17. Espectros de EPR dos radicais adutos de DMPO produzidos durante a incubação de acetaldeído com xantina oxidase. Os espectros foram obtidos após incubação de acetaldeído (80 mM) com xantina oxidase (6mU/mL), Fe(III)-EDTA (5 μ M) e DMPO (80 mM) por 15 min, a 36 °C em tampão fosfato pH 7,8. (A) sistema completo; (B) como A, mas sem acetaldeído; (C) como em A, mas sem xantina oxidase; (D) como A, com adição de alopurinol (1,5 mM); (E) como A, na ausência de Fe(III)-EDTA e presença de desferal (1mM). Os espectros componentes estão marcados (•) DMPO-metila; (o) DMPO-acetila; e (□) DMPO-hidroxila. Condições instrumentais: potência de microondas, 20 mW; constante de tempo, 327,7 ms; velocidade de varredura, 0,0298 mT/s; amplitude de modulação, 0,1 mT; e ganho, 1×10^6 .

e a enzima devia estar contaminada por traços metálicos que não conseguiram ser removidos pelo tratamento com CHELEX ou pela incubação com desferal (Lloyd e Mason, 1990).

Nossos resultados (Fig. 17) são consistentes com a proposta original de que o acetaldeído atua tanto como substrato da xantina oxidase, produzindo radicais superóxido e peróxido de hidrogênio, como um alvo para estas espécies (Fridovich, 1989; Puntarulo e Cederbaum, 1989; Albano e col., 1994). Duas rotas são possíveis para a oxidação mediada por peróxido de hidrogênio, ambas dependentes de metais de transição (Fig. 15). Para examinar a ocorrência da rota tipo Fenton (Fig.15, rota A), ensaios de competição foram realizados. Como esperado da competição entre o aldeído (eq. 8) e o DMPO (eq. 10) pelos radicais hidroxila, os rendimentos dos radicais adutos DMPO-hidroxila diminuíram com o aumento da concentração de acetaldeído. Já os rendimentos dos radicais adutos DMPO-metila e DMPO-acetila aumentaram até atingir saturação (Fig. 18A).

Contudo, com altas concentrações do aldeído, os rendimentos dos radicais adutos não responderam à concentração de DMPO (Fig. 18B). Por exemplo, com acetaldeído (80 mM) o rendimento de DMPO-hidroxila esperado do gráfico obtido (Fig. 18A) seria máximo. Neste caso, como as constantes de velocidade das reações do radical hidroxila com DMPO ($4,3 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$) (Buxton e col., 1988) e com acetaldeído ($3,6 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$) (Schuchman e von Sonntag, 1988) são praticamente idênticas, metade do radical hidroxila produzido deveria reagir com o acetaldeído e metade com o DMPO (80 mM). Em concentrações mais altas que 80 mM, o DMPO deveria captar mais radicais hidroxila que o acetaldeído, e concentrações ainda maiores deveriam inibir a produção de radicais livres derivados do acetaldeído (Puntarulo e Cederbaum, 1989). Esta tendência, entretanto, não foi observada nas condições experimentais empregadas (Fig. 18B). Os rendimentos dos radicais adutos DMPO-metila e DMPO-acetila aumentaram com o aumento da concentração de DMPO, sugerindo que o mecanismo de Fenton (eqs. 8,9; Fig.15 rota A) não deve representar a única via de formação de radicais derivados do acetaldeído durante a oxidação por xantina oxidase.

Figura 18. Efeito das concentrações de (A) acetaldeído e (B) DMPO nos rendimentos dos radicais adutos de DMPO produzidos durante a oxidação do acetaldeído pela xantina oxidase. Condições experimentais e instrumentais como descrito na Figura 17. (•) DMPO-metila; (◦) DMPO-acetila, e (◻) DMPO-hidroxila.

Espectros muito semelhantes aos obtidos com o sistema da xantina oxidase foram obtidos em incubações de acetaldeído (100 mM), DMPO (50 mM) e partículas submitocondriais (12 mg/mL) na presença de succinato (10 mM) e antimicina A (0,3 mM) (Fig. 19A). Os componentes do espectro foram confirmados por simulação computacional como o DMPO-metila, o DMPO-acetila e o DMPO-hidroxila (Fig. 19B). A diminuição da concentração de acetaldeído para 50 mM inibiu em ca. 30% a intensidade do sinal (dado não mostrado). Na ausência de antimicina A, nenhum sinal foi detectado (Fig. 19C), enquanto que a ausência de acetaldeído levou à detecção apenas do radical aduto DMPO-hidroxila, que decai rapidamente durante a aquisição do espectro (Fig. 19D). Isso deve ser resultado de sua redução para a hidroxilamina correspondente, que não é radicalar e portanto não é detectável por EPR. Esses resultados indicaram que partículas submitocondriais de coração bovino são capazes de metabolizar acetaldeído a radicais metila e acetila, em um processo dependente do vazamento de elétrons da cadeia de transporte de elétrons, uma vez que a presença de antimicina A foi essencial para a detecção destes radicais (Fig. 19C). Este composto é um inibidor do complexo III da cadeia respiratória e portanto, impede o fluxo normal de elétrons até a citocromo oxidase. Conseqüentemente aumenta a produção de superóxido e peróxido de hidrogênio pela mitocôndria (Boveris e Chance, 1973) e por partículas submitocondriais (Giulivi e col., 1995).

4.3.2. Administração de acetaldeído a ratos

A observação de que radicais metila e acetila são produzidos durante o metabolismo do acetaldeído por oxidantes biológicos (Figs. 10, 12) e por sistemas enzimáticos potencialmente relevantes no metabolismo do etanol (Figs. 17-19), tornou importante examinar a produção desses radicais *in vivo*. Os estudos de detecção de metabólitos radicalares *in vivo* empregam geralmente o captador de *spin* POBN (Kadiiska e col., 1994; Moore e col., 1995; Kadiiska e Mason, 2000), pois ele pode ser administrado em altas doses. Também, produz adutos relativamente estáveis, em comparação com o captador DMPO (Knecht e Mason, 1993) que utilizamos nos estudos *in vitro*. Contudo, os radicais adutos de POBN são muito parecidos entre si, tornando difícil a identificação inequívoca do radical captado quando não se emprega o substrato marcado isotopicamente. Como o metabolismo do acetaldeído *in vitro*

Figura 19. Espectros de EPR dos radicais adutos de DMPO produzidos durante a incubação de acetaldeído com partículas submitocondriais. Os espectros foram obtidos após 1 min de incubação de acetaldeído (100 mM) com SMP (12 mg/mL), succinato (10 mM), antimicina A (0,3 mM) e DMPO (50 mM), em PBS, pH 7,4. (A) sistema completo; (B) simulação computacional de (A); (C) como em (A), mas na ausência de antimicina A; e (D) como (A), mas na ausência de acetaldeído. Os espectros componentes estão marcados como: (•) DMPO-metila; (○) DMPO-acetila; (□) DMPO-hidroxila. Condições instrumentais: potência de microondas, 31 mW; constante de tempo, 655 ms; velocidade de varredura, 0,015 mT/s; amplitude de modulação, 0,15 mT; e ganho, $1,42 \times 10^6$.

resultou na detecção de três radicais adutos, o DMPO-metila, DMPO-acetila e DMPO-hidroxila, os estudos *in vivo* foram precedidos da caracterização dos correspondentes radicais adutos de POBN. A incubação de acetaldeído (80 mM) com peróxido de hidrogênio (5 mM) e Fe(II)-EDTA (0,1 mM) em pH 5,0 e presença de POBN (100 mM) produziu um espectro de EPR composto de pelo menos dois radicais adutos (Fig. 20A). A simulação computacional deste espectro foi consistente com a presença de três radicais adutos, o POBN-acetila ($a_N=1,50$ mT; $a_H= 0,30$ mT), o POBN-metila ($a_N= 1,60$ mT; $a_H= 0,27$ mT) e o POBN-hidroxila ($a_N= 1,49$ mT; $a_H= 0,19$ mT) (Li e col., 1988) em rendimentos relativos de 57, 37 e 6%, respectivamente (Fig. 20B). A proporção relativa de radicais mudou com o tempo. Após 30 minutos de incubação, o espectro era dominado pelo radical aduto POBN-metila (74%) (Fig. 20C). Experimentos idênticos foram conduzidos na presença de acetaldeído marcado com ^{13}C em ambos os carbonos (Fig. 21). Como esperado, o espectro apresentou linhas adicionais resultantes da contribuição dos núcleos de ^{13}C ($I=1/2$) (Fig. 21A). A simulação computacional mostrou-se consistente com a presença de três radicais adutos, o POBN- $^{13}\text{CO}^{13}\text{CH}_3$ ($a_N=1,49$ mT; $a_H= 0,29$ mT; $a_{13\text{C}}=0,58$ mT), o POBN- $^{13}\text{CH}_3$ ($a_N= 1,60$ mT; $a_H= 0,28$ mT; $a_{13\text{C}}= 0,50$ mT) e o POBN- $^{\bullet}\text{OH}$ ($a_N= 1,50$ mT; $a_H= 0,18$ mT) em rendimentos relativos de 38, 35 e 27%, respectivamente (Fig. 21B). Esta simulação caracterizou os parâmetros de EPR do radical aduto POBN-acetila. Novamente, este aduto não se mostrou estável e após 20 minutos de incubação o espectro foi dominado pelo espectro do radical aduto POBN-metila (63%) (Fig. 21C). Estes resultados mostraram que o POBN poderia ser útil no estudo do metabolismo do acetaldeído *in vivo*.

Frações de bile coletadas de ratos tratados com POBN (1g/kg, i.p.) e acetaldeído (1g/kg; i.g.) produziram espectros de EPR típicos de radicais adutos de POBN (Fig. 22 B) que foram de 3 a 5 vezes mais intensos que os espectros das frações de bile de ratos tratados apenas com POBN (Fig. 22A). Os espectros mostrados na Fig. 22 correspondem às frações de bile coletadas entre 60-80 min após o tratamento e são essencialmente iguais às anteriores, exceto pela intensidade do sinal, que aumentou com o tempo (dados não mostrados). As amostras, cujos espectros estão mostrados na Figura 22 A,B foram tratadas com ferricianeto (1mM) por 1 hora, pois este tratamento aumentou a intensidade dos sinais, indicando que os adutos ou foram excretados na forma de hidroxilaminas, ou foram reduzidos a essa

Figura 20. Espectros de EPR dos radicais adutos de POBN obtidos durante incubações de acetaldeído com peróxido de hidrogênio/Fe(II)-EDTA. Os espectros foram obtidos após os tempos especificados de incubação de acetaldeído (100 mM), peróxido de hidrogênio (5 mM), Fe(II)-EDTA (0,5 mM) e POBN (100 mM), em tampão acetato pH 5,0. (A) 3 min; (B) simulação computacional de (A); e (C) 20 min. Os espectros componentes estão marcados como (●) POBN-metila e (○) POBN-acetila. Condições instrumentais: potência de microondas, 20mW; constante de tempo, 164 ms; velocidade de varredura, 0,095 mT/s; amplitude de modulação, 0,05 mT e ganho, $3,99 \times 10^4$.

Figura 21. Espectros de EPR de radicais adutos de POBN obtidos durante incubações de acetaldeído (marcado com ^{13}C nos dois carbonos) com peróxido de hidrogênio/Fe(II)-EDTA. Os espectros foram obtidos após os tempos especificados de incubação de acetaldeído (100 mM), peróxido de hidrogênio (5 mM), Fe(II)-EDTA (0,5 mM) e POBN (100 mM), em tampão acetato pH 5,0. (A) 7min; (B) simulação computacional de (A); e (C) 20 min. Duas linhas do radical $\text{POBN-}^{13}\text{CO-}^{13}\text{CH}_3$ que não se sobrepõem ao $\text{POBN-}^{13}\text{CH}_3$ estão marcadas (o) nas figuras (A) e (C) para mostrar o decaimento do sinal com o tempo. Condições instrumentais: potência de microondas, 20mW; constante de tempo, 164 ms; velocidade de varredura, 0,095 mT/s; amplitude de modulação, 0,05 m e ganho, $3,99 \times 10^4$.

Figura 22. Espectros de EPR dos radicais adutos de POBN presentes na bile de ratos tratados com acetaldeído (1g/kg) e POBN (1g/kg). Frações de biles foram coletadas de 60-80 min. (A) ratos tratados com POBN; (B) ratos tratados com acetaldeído e POBN; (C) ratos tratados com POBN mais a adição de acetaldeído (30 mM) à bile com 1h incubação; (D) como (C), após adição de ferricianeto de potássio (1 mM) e mais 1h de incubação. Condições instrumentais: potência de microondas, 20 mW; constante de tempo, 1310 ms; velocidade de varredura, 0,012 mT/s; amplitude de modulação, 0,1 mT e ganho, 2×10^5 .

forma pelos redutores presentes na bile (Sentjurc e Mason, 1992; Stoyanovsky e Cederbaum, 1999). A intensidade do espectro da bile de ratos controle (Fig. 22A) não aumentou após a adição de acetaldeído (30 mM) e 1 hora de incubação (Fig. 22C), nem após adição de ferricianeto (1mM) e mais 1 hora de incubação, descartando a possibilidade de formação *ex vivo* dos radicais detectados (Fig. 22D). Portanto, esses resultados indicaram que a maior parte dos radicais adutos de POBN detectados na bile dos ratos tratados foram derivados do metabolismo do acetaldeído no animal. Como já comentado, estes experimentos apenas não poderiam identificar os radicais captados. Esses radicais poderiam ser derivados do acetaldeído ou de biomoléculas eventualmente oxidadas durante o metabolismo do aldeído (Wright e col., 1999). Para abordar este problema, acetaldeído marcado isotopicamente em ambos os carbonos foi administrado aos ratos. Os espectros de EPR da bile dos animais tratados com o acetaldeído marcado (1g/kg, i.g.) e POBN (1g/kg, i.p.) apresentaram as linhas adicionais esperadas do ^{13}C (Fig. 23A). A simulação computacional deste espectro forneceu o melhor ajuste assumindo-se dois radicais adutos, o $\text{POBN-}^{*13}\text{CH}_3$ ($a_{\text{N}} = 1,58$ mT; $a_{\text{H}} = 0,28$ mT; $a_{13\text{C}} = 0,46$ mT) e outro radical aduto de carbono não marcado isotopicamente ($a_{\text{N}} = 1,56$ mT; $a_{\text{H}} = 0,27$ mT) em rendimentos relativos de 15 e 85%, respectivamente (Fig. 23B). O radical aduto POBN-acetila não foi detectado neste experimento. Provavelmente, a baixa estabilidade deste radical impediu sua detecção *in vivo*. Entretanto, como a descarboxilação do radical acetila é uma das vias possíveis para a formação de radicais metila a partir de acetaldeído (eqs. 8,9), a detecção do radical metila *in vivo* fornece evidências da produção de ambos os radicais durante o metabolismo *in vivo* do acetaldeído. Os resultados obtidos também mostraram que o metabolismo do acetaldeído produz adutos de radicais livres derivados de moléculas endógenas (Fig. 23). A presença de adutos derivados de biomoléculas em biles de animais tratados com drogas ou metais de transição já havia sido reportada (Kadiiska e col., 1994, 1998; Kadiiska e Mason, 2000). A natureza destes adutos ainda não é conhecida, embora radicais derivados de lipídeos como os radicais etila ou pentila têm sido tentativamente identificados em alguns casos (Kadiiska e Mason, 2000).

Figura 23. Espectros de EPR dos radicais adutos de POBN presentes na bile de ratos tratados com acetaldeído marcado com $^{13}1,2\text{-C}(1\text{g/kg})$ e POBN (1g/kg). Frações de biles foram coletadas de 60-80 min. (A) espectro experimental; e (B) simulação computacional. Condições instrumentais: potência de microondas, 20 mW; constante de tempo, 1310 ms; velocidade de varredura, 0,012 mT/s; amplitude de modulação, 0,1 mT e ganho, 2×10^5 .

4.4. Detecção de 8-(1-HE)Gua em ácidos nucleicos isolados de ratos controle e tratados com etanol

Os resultados obtidos para a alquilação de DNA e RNA *in vitro* (Fig. 8, Tabela 3) mostraram que os radicais 1-hidroxietila e 2-hidroxietila são capazes de alquilar a guanina, mesmo quando esta faça parte de uma estrutura maior e mais complexa. Também, dados da literatura mostravam que o radical 1-hidroxietila é produzido durante o metabolismo do etanol *in vivo* (Knecht e col., 1990; Moore e col., 1995). Conseqüentemente, a possibilidade desses radicais alquilarem ácidos nucleicos *in vivo* foi examinada. Como somente o radical 1-hidroxietila havia sido inequivocamente detectado *in vivo*, os esforços foram dirigidos para a detecção do aduto 8-(1-HE)Gua.

Nos experimentos iniciais foram analisados hidrolisados de RNA de fígado de ratos por HPLC com detecções UV-PDA e eletroquímica. Os hidrolisados foram pré-purificados por cromatografia de troca iônica e as frações correspondentes ao tempo de retenção da 8-(1-HE)Gua foram coletadas, concentradas e então analisadas por detecção coulométrica (0,5V) após separação cromatográfica por fase reversa. A análise das frações provenientes de RNA de fígado de ratos tratados com etanol por 12 horas (5g/kg, i.g.; n=3) revelou a presença de um pico com tempo de retenção igual ao do padrão autêntico (Fig. 24B). A adição de padrão autêntico a estas amostras revelou que o pico co-eluíu com a 8-(1-HE)Gua sintetizada (Fig. 24C). Contudo, a análise das frações provenientes de RNA de ratos não tratados (n=3) mostrou também a presença de um pico com o mesmo tempo de retenção que o do padrão e de mesma intensidade que os picos das frações dos animais tratados (Fig. 24 A, B). Assumindo-se que o pico detectado fosse realmente o aduto 8-(1-HE)Gua, a administração de etanol não apresentou efeitos após 12 horas de tratamento e níveis basais de ca. 20 fmol aduto/ μ g RNA foram encontrados no RNA de fígado de ratos. Infelizmente, a baixa quantidade do composto detectado não permitiu a obtenção de seu espectro de UV, impedindo sua identificação inequívoca. Tais resultados mostraram que a detecção e análise da 8-(1-HE)Gua *in vivo* requeria uma metodologia mais seletiva.

4.4.1. Desenvolvimento da metodologia de HPLC-MS/MS

Para este propósito, a detecção por espectrometria de massa em *tandem* com ionização por *electrospray* pareceu bem adequada, pois além de muito sensível, tem a

Figura 24. Cromatogramas representativos das frações correspondentes ao aduto 8-(1-HE)Gua obtidas de 100 μ g de RNA de fígado de ratos tratados com (A) água (2 mL); (B) etanol (5g/kg, i.g., 12 h); (C) como em B., mas com adição de 0,35 ng de padrão autêntico. O pico analisado está indicado. Coluna C18, eluída com fosfato de potássio 50 mM, pH 5,3 contendo 4% metanol, 0,5 mL/min.

vantagem de ser muito seletiva (Ravanat e col., 1998; Andrews e col., 1999; Doerge e col., 1999; Weimann e col., 2001). Portanto, foi desenvolvida para a análise da 8-(1-HE)Gua *in vivo* uma metodologia de HPLC-MS/MS, no modo MRM. Resumidamente, neste modo é possível determinar no primeiro quadrupolo do espectrômetro os compostos que deverão passar para o segundo quadrupolo, selecionando-se o valor m/z dos compostos a serem ionizados. No segundo quadrupolo (câmara de colisão), os íons selecionados pela relação massa/carga são fragmentados. No terceiro quadrupolo, selecionam-se os íons-filhos derivados das fragmentações típicas do analito. Assim, monitorando-se as transições adequadas, a detecção em *tandem* garante alta seletividade metodológica. De fato, após seleção e refinamento dos parâmetros, as transições 199→181, 196→178 e 152→135 foram escolhidas para a detecção de [M+3] 8-(1-HE)Gua, 8-(1-HE)Gua e guanina, respectivamente. As transições 199→181 e 196→178 representam as fragmentações correspondentes à perda do grupo -OH sob a forma de H₂O (Fig. 5) do aduto marcado isotopicamente em ¹⁵7,9-N e ¹³8-C e não marcado, respectivamente. A transição 152→135 representa a fragmentação correspondente à perda do grupo -NH₂ exocíclico da guanina. Cromatogramas representativos da análise de uma mistura de [M+3] 8-(1-HE)Gua (100 fmol), 8-(1-HE)Gua (100 fmol) e guanina (55 pmol) apresentaram um pico bem definido para cada transição (Fig. 25) demonstrando a alta seletividade do método desenvolvido. A sensibilidade mostrou-se muito boa, sendo possível a detecção de até 70 fmol de [M+3] 8-(1-HE)Gua com a relação altura sinal/altura ruído maior que 3 (dado não mostrado). Para a quantificação, a detecção por espectrometria de massa requer uma curva de calibração onde a resposta do analito é normalizada por uma quantidade conhecida de um outro composto, preferencialmente o próprio analito isotopicamente marcado (Yen e col., 1996; Weimann e col., 2001). Portanto, uma curva de calibração para a 8-(1-HE)Gua foi feita (Fig. 26). A resposta mostrou-se linear na faixa de 0,06-2,0 pmol, com $R^2=0,99$. Assim, o estabelecimento de um método seletivo para a detecção desse aduto permitiu sua análise *in vivo*.

4.4.2. Detecção de 8-(1-HE)Gua em RNA

Os hidrolisados de RNA de fígado de ratos contendo o padrão isotopicamente marcado foram submetidos à pré-purificação por separação cromatográfica, desta vez por fase reversa, e as frações correspondentes ao tempo de retenção da [M+3] 8-(1-

Figura 25. Cromatogramas representativos monitorados por detecção de MS/MS no modo MRM de uma mistura de padrões contendo **A.** 8-(1-HE)Gua (100 fmol); **B.** [M+3] 8-(1-HE)Gua (100 fmol); e **C.** guanina (55 pmol). As transições monitoradas estão indicadas. A separação cromatográfica foi obtida por uma coluna de fase reversa C18 Supelco (2,1 x 250 mm; 5 μ m), eluída com acetonitrila 15% v/v, a 0,12 mL/min. Condições instrumentais: voltagem do capilar, 2,5kV, temperatura da fonte, 85 °C, voltagem do cone, 15V, e energia de colisão, 16 eV.

Figura 26. Curva de calibração para [M+3] 8-(1-HE)Gua. O aduto isotopicamente marcado (1,16 pmol) e diferentes quantidades de aduto não marcado isotopicamente (0,06-2 pmol) foram injetados no sistema HPLC-MS/MS. Condições instrumentais: como descrito na Figura 25. Os valores representam a média de 3 determinações independentes.

HE)Gua foram coletadas, concentradas e então analisadas por HPLC-MS/MS. As frações provenientes de RNA de fígado de ratos tratados com etanol (5g/kg, i.g.) por 3 e 12 horas, assim como os de ratos controle, tratados apenas com água (2mL/rato, i.g.), apresentaram um pico que co-eluiu com o pico do padrão interno marcado. Cromatogramas representativos estão mostrados na Figura 27. Duas transições foram monitoradas para assegurar uma maior seletividade: a perda de H₂O, representada pelas transições 199→181 e 196→178 (para o aduto [M+3]8-(1-HE)Gua e 8-(1-HE)Gua, respectivamente), e a perda sequencial de H₂O e -NH₂, representada pelas transições 199→164 e 196→161 (para o aduto [M+3]8-(1-HE)Gua e 8-(1-HE)Gua, respectivamente) (Fig. 5). Em ambas as transições um pico com o mesmo tempo de retenção do padrão autêntico isotopicamente marcado foi detectado (9,5 min) nos canais 196→178 (Fig. 27 B,D). A quantificação destes picos mostrou que o RNA hepático de ratos controle apresentou 3,5±0,5 adutos/10⁶ Gua. O tratamento com etanol por 3h elevou este nível para 4,9±0,5 e o tratamento por 12h diminuiu o nível para 2,4±0,5 adutos/10⁶ Gua (Fig. 29). Esses valores não foram estatisticamente diferentes, mas mostraram que RNA hepático de ratos não tratados com etanol já apresenta um nível basal de 8-(1-HE)Gua, o qual aumenta após 3h de tratamento e decai após 12h para níveis ainda menores que nos animais não tratados. Os cromatogramas das frações coletadas dos solventes de hidrólise e das soluções de isolamento dos ácidos nucleicos não apresentaram nenhum pico co-eluinto com o padrão interno (dados não mostrados). Estes resultados demonstram que o pico detectado não era uma contaminação proveniente dos solventes da hidrólise, das soluções de isolamento dos ácidos nucleicos, e nem de *carry over* dos sistemas cromatográficos. Isômeros de posição da 8-(1-HE)Gua foram co-injetados com as amostras de ratos nas mesmas condições para a verificação de seus tempos de retenção, devido à possibilidade de também serem detectados nas transições monitoradas. A adição de N7-(2-HE)Gua, uma lesão encontrada endogenamente em DNA de humanos e animais (Wu e col., 1999) a uma amostra de rato controle produziu cromatogramas compostos de 2 picos no canal da transição 196→178 e um pico no canal da transição 199→181 (Fig. 28A,B), mostrando que o pico analisado (9,5 min) não é N7-(2-HE)Gua (11 min). A adição de [M+3] 8-(2-HE)Gua, aduto produzido pelo ataque do radical 2-hidroxietila a guanina (Figs. 1-6), a uma amostra de rato controle

Figura 27. Cromatogramas representativos obtidos por detecção de MS/MS modo MRM de frações de RNA de fígado de ratos tratados com etanol (5g/kg) por 12h. **A** e **B** são transições correspondentes a perda de H_2O ; **C** e **D** correspondem a perda de $H_2O + NH_2$. **A**, **C** e **B**, **D** são canais para transições de padrão interno e padrão normal, respectivamente. Condições cromatográficas e instrumentais: como descrito na Figura 25. Injeção correspondente a 50 μg de RNA não-hidrolisados.

Figura 28. Cromatogramas representativos obtidos por detecção MS/MS modo MRM de frações de RNA de fígado de ratos controle, adicionados de: **A** e **B** $N7-(2-HE)Gua$ padrão, e **C** e **D** $[M+3]8-(2-HE)Gua$ padrão. Todos os canais representam transições referentes a perda de H_2O . **A**, **C** e **B**, **D** são canais para transições de padrão interno e padrão normal, respectivamente. Condições cromatográficas e instrumentais: como descrito na Figura 25.

Figura 29. Níveis de 8-(1-HE)Gua determinados em RNA de diferentes fontes por HPLC-MS/MS. Os valores correspondem aos níveis determinados em RNA de fígado de ratos tratados com etanol (5g/kg) por 3 e 12h ou água (2 mL), RNA comercial de fígado de bezerro submetido às etapas de isolamento e hidrólise do RNA (clRNA tratado), ou submetido diretamente à hidrólise (clRNA), RNA comercial de levedura e GTP de músculo de cavalo em uma mistura contendo 25%GTP, 25%ATP, 25% CTP e 25% UTP. Os valores representam a média de n ratos ou experimentos independentes $\pm$ erro padrão.

produziu cromatogramas compostos de 1 pico no canal da transição 196→178, correspondente ao aduto 8-(1-HE)Gua, e dois picos no canal da transição 199→181, correspondentes ao [M+3] 8-(1-HE)Gua (9,5 min) e [M+3] 8-(2-HE)Gua (14,5min). Esses resultados demonstraram que nem N7-(2-HE)Gua nem 8-(2-HE)Gua co-eluíram com 8-(1-HE)Gua, indicando que o pico detectado nos hidrolisados de RNA de ratos era, de fato, 8-(1-HE)Gua.

Apesar do cromatograma das soluções de isolamento do RNA não ter fornecido nenhuma evidência de contaminação cruzada, uma possível explicação para a detecção do aduto tanto em ratos controles como tratados em níveis comparáveis seria o aprisionamento do aduto pela macromolécula RNA através de interações não-covalentes durante seu isolamento do fígado. Esta hipótese foi avaliada preparando-se uma solução de RNA comercial de fígado de bezerro e dividindo-a em duas partes: uma foi submetida a todas as etapas de isolamento e hidrólise e a outra foi diretamente hidrolisada. Ambas foram pré-purificadas na presença do padrão interno e analisadas. Surpreendentemente, o aduto 8-(1-HE)Gua foi detectado em ambas as amostras, em níveis similares aos encontrados em amostras dos ratos: 4,3 e 4,0 adutos/10⁶ Gua, nos RNAs de fígado de bezerro submetido às etapas de isolamento e diretamente hidrolisado, respectivamente (Fig. 29). Esses resultados mostraram que as etapas de isolamento de RNA não elevaram o nível de aduto encontrado, e sugeriram que o RNA de fígado de rato e bezerro contém um nível basal de 8-(1-HE)Gua. Para se verificar se a presença deste aduto era exclusiva de fígado, RNA de levedura e uma mistura de nucleotídeos trifosfato contendo GTP isolado de músculo de cavalo foram também hidrolisados, pré-purificados na presença de padrões internos e analisados por HPLC-MS/MS. Novamente, foi verificada a presença do aduto nestas amostras, em níveis variados, mas da mesma ordem de grandeza (Fig. 29). Esses resultados sugeriram fortemente que 8-(1-HE)Gua está presente em todas as amostras de RNA analisadas em níveis comparáveis, e o tratamento com etanol tende a elevar os níveis basais após 3h. Depois de 12h, este nível diminui para valores menores que os do controle.

4.4.3. Detecção de 8-(1-HE)Gua em DNA

As frações de DNA de ratos controle e tratado também apresentaram picos que co-eluíram com o padrão interno (Fig. 30). Embora os picos neste caso fossem bem

Figura 30. Cromatogramas representativos monitorados por detecção MS/MS modo MRM de frações de DNA de fígado de ratos **A,B** controle (água) e **C, D** tratados com etanol (5g/kg, 12h). **A, C** e **B, D** são canais para transições de padrão interno e padrão normal, respectivamente. Condições cromatográficas e instrumentais: como descrito na Figura 25. Injeção correspondente a 100 µg DNA não hidrolisado.

menores que nas amostras de RNA, foi possível a determinação de níveis de $1,9 \pm 0,9$ adutos/ 10^7 Gua e $2,9 \pm 0,3$ adutos/ 10^7 Gua para DNA de fígado de ratos controle (água) e tratados (etanol 5g/kg) por 12h, respectivamente. Esses valores não foram significativamente diferentes, provavelmente devido a alta variabilidade entre as amostras, mas evidenciaram a presença de níveis basais de 8-(1-HE)Gua em DNA hepático de ratos e indicaram que nas condições experimentais empregadas, a exposição ao etanol tende a elevar os níveis do aduto. Os controles consistindo de soluções de isolamento do DNA e de solvente da hidrólise submetidos às etapas de pré-purificação mostraram que, assim como no RNA, não houve contaminações cruzadas. DNA comercial de timo de bezerro foi também submetido às etapas de isolamento de DNA e pré-purificado na presença de padrões internos e analisado por HPLC-MS/MS. Os resultados obtidos (Fig. 31) mostraram que DNA de timo de bezerro também apresenta um nível basal de 8-(1-HE)Gua, comparável ao nível encontrado em DNA de fígado de ratos (Fig. 31), e cerca de 10 vezes menor que os níveis basais encontrados no RNA (Fig. 29).

Figura 31. Níveis de 8-(1-HE)Gua determinados em DNA de fígado de ratos, tratados com etanol (5g/kg, 12h) ou água (2 mL), e DNA de timo bovino comercial submetido às etapas de isolamento e hidrólise de DNA. Os valores representam a média de n ratos ou experimentos independentes $\pm$ erro padrão.

5. DISCUSSÃO

5.1. Alquilação de ácidos nucleicos por radicais 1-hidroxietila e 2-hidroxietila produzidos durante a oxidação de etanol *in vitro*

Os resultados apresentados mostraram que a oxidação de etanol por $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe(II)}$ produz além do radical 1-hidroxietila, o radical 2-hidroxietila (Fig. 7), os quais são capazes de alquilar a guanina (Figs. 1-6, Tabelas 1 e 2) e resíduos de guanina em DNA e RNA (Fig. 8, Tabela 3) produzindo os adutos 8-(1-HE)Gua e 8-(2-HE)Gua, respectivamente. Em todas as condições testadas, a alquilação foi maior no RNA que no DNA (Tabela 3), sugerindo que o acesso aos resíduos de guanina seja um fator importante no processo de alquilação. Tal sugestão está também de acordo com o maior rendimento obtido em pH 4, tanto para o DNA como para o RNA, uma vez que pHs ácidos favorecem a exposição das bases ao solvente, devido à desestruturação terciária dos ácidos nucleicos (Voet e Voet, 1990). O maior rendimento de alquilação obtido em pH ácido está de acordo com resultados obtidos em outros sistemas alquilantes radicalares (Kang e col., 1993; Hix e col., 1995). Contudo, o rendimento de alquilação de 10 a 60 vezes maiores observado em pH 4 (Tabela 3) não pode ser relacionado aos rendimentos de radicais captados, que foi praticamente o mesmo a pH 4 (150 μM) e pH 7 (200 μM).

Nas incubações contendo ácidos nucleicos, os rendimentos da 8-(2-HE)Gua foram aproximadamente 10% daqueles da 8-(1-HE)Gua (Tabela 3). Embora os rendimentos do radical aduto DBNBS-2-hidroxietila tenham sido aproximadamente 10% dos rendimentos de POBN-1-hidroxietila (ver 4.1.2), não é possível correlacioná-los com os rendimentos dos adutos de guanina, pois tratam-se de adutos diferentes, cujas velocidades relativas de formação não são conhecidas. De qualquer forma, estes valores estão de acordo com os rendimentos obtidos para a oxidação de etanol por radicais hidroxila gerados por radiólise de pulso. Nestes estudos, os radicais 1-hidroxietila, 2-hidroxietila e etoxila foram produzidos em rendimentos relativos de 84,3, 13,2 e 2,5%, respectivamente (Asmus e col., 1973).

A alquilação da guanina livre produziu quantidades próximas dos dois adutos, ca. 2:1, 8-(1-HE)Gua: 8-(2-HE)Gua (Fig.1, Esquema 2). Uma possível explicação para

esta diferença é o excesso de Fe(II) em relação ao peróxido de hidrogênio utilizado na síntese. Esse excesso aumenta a probabilidade do radical 1-hidroxietila reagir com os íons Fe(III) (eq. 11) produzidos pela reação de Fenton (eq.1) ao invés de reagir com a guanina. A reação de Fe(III) com o radical 2-hidroxietila (eq. 12) é mais lenta (Smith e Robertson, 1988), o que explica os altos rendimentos de 8-(2-HE)Gua observados durante a síntese.

Quanto à oxidação de DNA, os resultados mostraram que etanol, neste sistema, protegeu as bases oxidadas de outras oxidações, especialmente em pH 4 (Tabela 4). Já é conhecido que 8-oxopurinas têm potenciais redox mais baixos que as purinas parentais (Park e col., 1989). De fato, o peroxinitrito reage preferencialmente com a 8-oxodGuo do que com a dGuo (Uppu e col., 1996). Assim, esses resultados representam um exemplo de como a interpretação de experimentos que empregam *scavengers* não é tão simples como usualmente considerada. Em uma publicação recente foi também encontrada uma relação inversa entre consumo de etanol e níveis de 8-oxodGuo em linfócitos de mulheres com diferentes hábitos de consumo de álcool (Bianchini e col., 2001).

5.2. Oxidação de acetaldeído a radicais acetila e metila mediada por peroxinitrito e peróxido de hidrogênio/Fe(II)

Com os dados obtidos foi possível propor os mecanismos de oxidação do acetaldeído por peroxinitrito (Fig. 14) e $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe(II)}$ -EDTA/ascorbato (Fig. 15) a radicais acetila e metila. A oxidação do acetaldeído tanto por peroxinitrito (Uppu e col., 1997) como por $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe(II)}$ -EDTA (Gonthier e col., 1991) já fora estudada, mas nossos estudos caracterizam inequivocamente os radicais produzidos.

A formação de radicais metila a partir da oxidação do acetaldeído por $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe(II)}$ -EDTA/ascorbato ocorre por duas vias distintas, cujas importâncias

relativas dependem do pH e da concentração dos reagentes (Figs. 10, 12). Em pHs alcalinos e com grande excesso molar do aldeído sobre o peróxido de hidrogênio, a adição nucleofílica com formação de um aduto hipotético e sua clivagem (Fig. 15, rota B) deve predominar. De fato, formiato (Tabela 6) e radicais metila (Fig. 12C) foram produtos importantes nessas condições. Já, quando as concentrações do aldeído e do peróxido de hidrogênio são próximas, a via mediada pelo radical hidroxila (Fig. 15, rota A) deve se tornar mais relevante (Fig. 12). No caso do peroxinitrito, o ataque do ânion peroxinitrito ao acetaldeído parece ser a principal rota de formação de radicais metila (Fig. 14). De fato, a reação direta tem uma constante de velocidade relativamente alta ($k = 680 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ pH 7,4) (Fig. 13). Hoje, está bem estabelecido que o ácido peroxinitroso se decompõe espontaneamente produzindo nitrato (~70%) e radicais hidroxila e dióxido de nitrogênio (~30%) (eq. 13) (Gatti e col., 1998; Merényi e Lind, 1998; Hodges e Ingold, 1999). Todavia, a decomposição espontânea é lenta (Kissner e col., 1997) para competir com a reação direta entre o peroxinitrito e o acetaldeído, principalmente com um excesso de 10 vezes de acetaldeído (Figs. 11, 13 e Tabela 5) (Uppu e col., 1997; Hodges e Ingold, 1999).

A oxidação do acetaldeído por peroxinitrito produziu um rendimento médio de ácidos orgânicos (detectados como acetato e formiato) de ca. 30% da concentração inicial do peroxinitrito entre os pHs 6,7 e 9,1 (Tabela 5). Os rendimentos de radicais metila (Fig. 11) acompanharam a produção de formiato (Tabela 5), sendo igual a ca. 10% da concentração inicial do peroxinitrito nessa faixa de pH. Os rendimentos de nitrito e nitrato foram de 25 e 75%, respectivamente (Tabela 5). Esses dados confirmam resultados anteriores (Uppu e col., 1997) indicando que os adutos produzidos pela interação de aldeídos com peroxinitrito decompõem-se majoritariamente para nitrato e regeneram o aldeído. Os nossos resultados mostraram que ca. 30% do aduto do acetaldeído com o peroxinitrito decai a produtos oxidados como formiato, acetato (Tabela 5) e radicais metila (Figs. 10, 11). Como ca. 30% foi o rendimento determinado para produção de radicais livres a partir do peroxinitrito (eq. 13) e do aduto hipotético nitrosoperoxicarboxilato (Vasquez-Vivar e col., 1997; Gatti e col., 1998; Goldstein e Czapski, 1998; Lyman e Hurst, 1998; Merényi e Lind, 1998;

Merényi e col., 1998; Bonini e col., 1999; Hodges e Ingold, 1999) o rendimento de 30% determinado para a produção de formiato e acetato parece refletir a produção de dióxido de nitrogênio e radicais 1-hidroxietoxietila, ou seja, o decaimento radicalar do aduto hipotético (Fig. 14 rota C). Esta proposta está de acordo com a química descrita para radicais análogos ao radical 1-hidroxietoxietila, que sofre β -eliminação (produzindo quantidades equimolares de radicais metila e íons formiato) ou transposição 1,2 seguido de oxidação (Harris e Waters, 1952; Bothe e col., 1978; Schuchmann e von Sonntag, 1988) (produzindo quantidades equimolares de radicais superóxido e íons acetato). Os rendimentos determinados para a produção de formiato (Tabela 5) e radicais aduto DBNBS-metila (Fig.11) indicaram que 10% do aduto hipotético (Fig. 14) é decomposto em radicais metila e formiato (Fig. 14, rota C). A determinação de um rendimento de 9% de superóxido a partir da reação de acetaldeído com peroxinitrito (Hodges e Ingold, 1999) sugeriu que ca. 10% do aduto hipotético é decomposto em radicais superóxido e íons acetato (Fig.14, rota C). Estes dados indicam que ca. de 20% do aduto decai para radicais livres, produzindo o radical dióxido de nitrogênio e um radical cuja natureza depende do substrato. A determinação de 10% para a via de formação de acetato acompanhada de superóxido explica somente metade da produção total de acetato obtida (Tabela 5) e reportada para a reação entre acetaldeído e peroxinitrito (Uppu e col., 1997). Portanto, os 10% remanescentes de acetato foram atribuídos à transferência de elétrons *in-cage* (Fig. 14, rota B) (Hodges e Ingold, 1999), semelhante àquela proposta para explicar a descarboxilação do piruvato mediada por peroxinitrito (Vasquez-Vivar e col., 1997). Os rendimentos de nitrito (25%) (Tabela 5) são consistentes com a inclusão desta rota. Assim, nitrito pode resultar da rota B (Fig. 14) (ca. 10%) e da rápida reação ($k = 4,5 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) (Logagen e Sehested, 1993) entre o dióxido de nitrogênio (20%) e o ânion superóxido (9%) formando peroxinitrato (10%), que se decompõe em nitrito (10%) e oxigênio (10%) (eq. 14) (Goldstein e Czapski, 1998). Além disso, nitrito (5%) pode ser produzido do decaimento relativamente lento do dióxido de nitrogênio ($k = 4,7 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) (Treinin e Hayon, 1970) (eq. 15), que resta (10%) depois do consumo de superóxido (eq. 14). Embora outras reações que possam produzir nitrito não estejam excluídas, a três rotas aqui discutidas provavelmente predominam pois explicam os valores experimentais obtidos.

Esses dados, assim como de outros laboratórios (Uppu e col., 1997; Hodges e Ingold, 1999) demonstraram que a reação entre acetaldeído e peroxinitrito resulta em isomerização (Fig. 14, rota A), transferência de elétrons *in-cage* (Fig.14, rota B) e formação de radicais livres (Fig.14, rota C) em rendimentos relativos de 70, 10 e 20%, respectivamente. Esse mecanismo representa outro exemplo de produção de radicais livres mediada por peroxinitrito independente de metais de transição (Vasquez-Vivar e col., 1997; Gatti e col., 1998; Merènyi e Lind, 1998; Merènyi e col., 1998; Hodges e Ingold, 1999; Knudsen e col., 2000), em contraste com o mecanismo mediado por peróxido de hidrogênio, que requer Fe(II) tanto na via de Fenton (Fig.15, rota A), como na adição nucleofílica (Fig.15, rota B).

5.3. Oxidação de acetaldeído a radicais metila e acetila por sistemas enzimáticos e *in vivo*

Os resultados obtidos indicam que o acetaldeído é metabolizado a radicais acetila e metila por sistemas enzimáticos (Figs. 17-19) e por ratos (Figs. 22, 23), embora neste último caso somente o radical metila tenha sido inequivocamente identificado. Provavelmente, a instabilidade do radical aduto POBN-acetila (Figs. 20, 21) não permitiu sua detecção *in vivo*. A identificação de ambos os radicais foi possível explorando-se as propriedades dos captadores de *spin* DMPO e POBN. O DMPO é muito útil na discriminação dos diferentes radicais adutos (Figs. 17-19), enquanto que o POBN é muito adequado para experimentos *in vivo* (Figs. 22, 23). A utilização de acetaldeído marcado isotopicamente foi importante para distinguir entre os radicais livres derivados do acetaldeído e da oxidação de biomoléculas durante o desbalanço metabólico causado pelo aldeído *in vivo* (Figs. 22, 23) (Wright e col., 1999). Embora os radicais derivados de biomoléculas produzidos durante o metabolismo do acetaldeído (Fig. 22) e outros tratamentos *in vivo* (Kadiiska e col., 1994, 1998; Kadiiska e Mason, 2000) permaneçam não identificados, suas detecções indicam a ocorrência de reações radicalares em cadeia iniciadas pelos radicais livres derivados do xenobiótico

administrados. Considerando-se todas as possíveis reações desses radicais livres primários, é de fato surpreendente que eles e seus produtos possam ser captados *in vivo*.

Os resultados aqui descritos não permitem concluir sobre as possíveis enzimas que metabolizam o acetaldeído a radicais livres *in vivo* nem sobre os possíveis mecanismos envolvidos. Mas os estudos *in vitro* demonstraram que tanto a xantina oxidase (Figs. 17, 18) quanto partículas submitocondriais (Fig. 19) são capazes de oxidar acetaldeído produzindo radicais metila e acetila. Ambos os sistemas parecem ser relevantes para a intoxicação por etanol (Sultatos, 1988; Batteli e col., 1992; Cederbaum, 1999).

A oxidação do acetaldeído a acetato pela xantina oxidase é acompanhada da produção de ânion superóxido e peróxido de hidrogênio (Fridovich, 1989). Mas o mecanismo de Fenton (Fig. 32, rota B) não foi a única rota responsável pela formação de radicais acetila e metila, pois os rendimentos dos radicais adutos DMPO-metila e DMPO-acetila não foram inibidos pelo aumento da concentração de DMPO, principalmente o rendimento do radical DMPO-metila (Fig. 18). De fato, é possível que durante a oxidação enzimática do acetaldeído para acetato, uma pequena fração do produto escape como radical acetila (Fig. 32, rota A), que pode se decompor a radicais metila e monóxido de carbono. Além disso, um mecanismo semelhante ao descrito para o sistema químico (Figs. 14, 15), mas mediado enzimaticamente pela xantina oxidase pode também ser proposto (Fig. 32, rota C). Nesse caso, a desprotonação do peróxido produzido durante a oxidação pode ser facilitada, pois enzimas como a xantina oxidase, que reduzem O_2 para H_2O_2 podem produzir peróxidos desprotonados *in situ*, já que a transferência de elétrons é mais rápida que a transferência de prótons (Hodges e col., 2000). Conseqüentemente, pode-se especular que o metabolismo do acetaldeído a radicais livres pode ocorrer através da formação de radicais hidroxila e adição nucleofílica de peróxidos (Fig. 32), entre outras possíveis rotas. Além disso, a produção de radicais acetila e metila a partir da oxidação do acetaldeído por partículas submitocondriais (Fig. 19) e a proposta da produção de 1-hidroxietilperóxido durante a oxidação de acetaldeído na mitocôndria (Boh e col., 1982) sugerem a participação mitocondrial na produção *in vivo* de radicais derivados do acetaldeído.

Figura 32. Representação esquemática das rotas possíveis para a formação de radicais metila e acetila a partir do acetaldeído. (A) escape hipotético de radicais acetila durante a oxidação enzimática do acetaldeído; (B) mecanismo de Fenton (Puntarulo e Cederbaum, 1989; Albano e col., 1994); e (C) adição nucleofílica.

5.4. Detecção de 8-(1-HE)Gua em ácidos nucleicos isolados de ratos controle e tratados com etanol

O desenvolvimento de uma metodologia de detecção por HPLC-MS/MS para a análise do aduto 8-(1-HE)Gua permitiu sua detecção seletiva e confiável (Figs. 25, 26) em amostras biológicas.

As Figuras 29 e 31 resumizam os dados obtidos para a determinação de 8-(1-HE)Gua em RNA e DNA, de diferentes tecidos ou fontes. Esses resultados foram surpreendentes, pois a formação do aduto seria uma consequência esperada da interação entre a guanina e o radical 1-hidroxietila, cuja produção estaria relacionada ao metabolismo do etanol. Entretanto, a detecção de níveis basais de 8-(1-HE)Gua em animais não expostos a etanol evidencia a existência de outra(s) fonte(s) endógenas do grupo 1-hidroxietila.

A detecção de 8-(1-HE)Gua por HPLC-MS/MS em RNA (Figs. 27-29) e DNA (Figs. 30, 31) não foi artefactual, pelo menos até onde foi possível explorar com os recursos presentemente disponíveis. De fato, todos os possíveis controles foram realizados. Contaminações cruzadas a partir da etapa de isolamento dos ácidos nucleicos foram excluídas, e a possibilidade de co-eluição dos isômeros N7-(2-HE)Gua e 8-(2-HE)Gua foi eliminada (Fig. 28). Outros isômeros de 8-(1-HE)Gua também poderiam ser considerados, como a O6-(2-HE)Gua ou a N7-(1-HE)Gua. Contudo, a posição O6 parece ser bem menos susceptível do que a posição N7 a 2-hidroxietilação provocada pela incubação de DNA com óxido de etileno ou N-(2-hidroxietil)-N-nitrosouréia (Segerbäck, 1990). Quanto a N7-(1HE)Gua não há nenhum relato sobre sua detecção *in vitro* ou *in vivo*. De qualquer forma, co-eluições seriam muita coincidência porque ocorreriam somente se o isômero fosse pré-purificado na mesma fração que o analito e apresentasse o mesmo tempo de retenção que o padrão interno [M+3]8-(1-HE)Gua durante a análise por HPLC-MS/MS. Os níveis diferenciados de 8-(1-HE)Gua detectados em DNA (ca. 10 vezes menores que no RNA) (Figs. 29, 31) também indicam a não ocorrência de contaminação por aprisionamento do aduto, pois isso implicaria em níveis de contaminação similares para DNA e RNA.

Assim, os valores aqui reportados representam níveis basais de 8-(1-HE)Gua

em RNA e DNA de fígado de ratos. Embora não possamos especificar o doador endógeno do grupo 1-hidroxietila, deve-se notar sua semelhança estrutural com o grupo 2-hidroxietila, cujo precursor endógeno parece ser o óxido de etileno, que é um produto do metabolismo do etileno. A modificação de DNA e de proteínas por óxido de etileno (por exemplo, Segerbäck, 1990) têm sido bastante considerada. Mas nesses casos, assume-se a ocorrência somente de 2-hidroxietilação. No DNA, o produto mais estudado dessa alquilação é a N7-(2-HE)Gua. Estudos recentes têm demonstrado por ^{32}P -*postlabeling* (Eide e col., 1999) e CG-MS de alta resolução (Wu e col., 1999) que os níveis basais da N7-(2-HE)Gua em fígado de ratos estão em torno de $3\text{--}4/10^7\text{Gua}$. Esses valores estão na mesma ordem que o valor basal determinado para 8-(1-HE)Gua no DNA de fígado de ratos, de $1,9\pm 0,9/10^7\text{Gua}$ (Figs. 30, 31). Ainda de acordo com nossos dados está o valor determinado para níveis basais de N2-etil-2'-desoxiguanosina, um produto da interação do acetaldeído com DNA. Em DNA de linfócitos de humanos, o valor basal de $0,3\text{ aduto}/10^7\text{ nucleotídeos}$ foi encontrado (Fang e Vaca, 1997). Interessantemente, este aduto foi também detectado na urina de humanos em abstinência alcoólica de uma semana (Matsuda e col., 1999). Esses dados mostram que adutos estruturalmente diversos, mas que cujas origens estão possivelmente relacionadas à alquilação por compostos pertencentes ao *pool* de dois carbonos, estão presentes endogenamente em níveis basais similares.

Embora a posição 8 da guanina seja a mais suscetível a ataque radicalar (Augusto, 1993; Justo e col., 1995), e pareça não exibir tendência a substituição eletrofílica, há um relato descrito sobre a formação de 8-alkilguaninas a partir de um rearranjo alílico da posição O6 para C8 (Frilhart e Leonard, 1973), e também uma discussão na literatura sobre o mecanismo de formação dos adutos 8-(N-aryl)guanina e 8-aminoguanina. Considera-se a formação de um intermediário resultante da interação entre íons nitrênio (ArNH^+ ou H_2N^+) e a posição 7 da guanina, com posterior migração para a posição 8 (Humphreys e col., 1992; Guengerich e col., 1999). Mas, recentemente a interação direta entre íons nitrênio e a posição 8 foi demonstrada (McClelland e col., 1999). De qualquer forma, em todos esses casos, tratam-se de íons de nitrogênio e/ou os adutos produzidos são estruturalmente muito diferentes da 8-(1-HE)Gua. Para carbocátions, não há na literatura evidência para sua interação direta com a posição 8, exceto para radicais catiônicos (Cavalieri e Rogan, 1995).

Para explicar a detecção de 8-(1-HE)Gua em ácidos nucleicos de animais não-

tratados, vias enzimáticas para a 1-hidroxietilação da guanina não podem ser descartadas. Por exemplo, a adição do piruvato a tiamina pirofosfato (TPP), seguido da sua descarboxilação e formação do carbânion 1-hidroxietil-TPP é a primeira etapa da conversão de piruvato a acetil-CoA, pelo complexo multienzimático piruvato desidrogenase, presente na mitocôndria (Voet e Voet, 1990). Devido à semelhança estrutural entre o cofator tiamina e parte imidazólica da guanina, assim como à adição enzimática do grupo 1-hidroxietila à posição 2 da tiamina, análoga à posição 8 da guanina nesta comparação estrutural, um mecanismo iônico catalisado enzimaticamente talvez deva ser considerado. Considerando especificamente este complexo multienzimático, pode-se justificar a presença do aduto em todas as amostras aqui analisadas, incluindo o RNA de levedura, que apresenta uma reação idêntica catalisada pela piruvato descarboxilase, ambas sendo, portanto, pertencentes ao metabolismo basal.

Contudo, independentemente do mecanismo de formação do aduto, sua detecção no DNA e principalmente no RNA de animais normais levanta a questão sobre um possível significado biológico ou se é um mero subproduto do metabolismo basal. No primeiro caso, mais de uma centena de nucleosídeos modificados já foram descritos (Limbach e col., 1994), principalmente em tRNA, onde são considerados importantes na eficiência e fidelidade no reconhecimento dos códons (Ashraf e col., 2000; Bjork e col., 2001) e rRNA, onde sua função não é ainda conhecida (Martinez e col., 1998). Quanto às modificações encontradas, são as mais variadas (Limbach e col., 1994), sendo poucas modificadas na posição 8 das purinas, como a N2-metil-8-oxoguanosina, um derivado de tRNA encontrado em urina de rato e humanos (Helbock e col., 1996), 8-hydroxyguanosina e 8-hydroxyadenosina, isoladas de RNA de levedura (Yanagawa e col., 1992).

Com relação aos animais expostos ao etanol (5g/kg, i.g.), verificamos que 3h de tratamento tende a elevar discretamente os níveis basais no RNA hepático (Fig. 29), mostrando que a alquilação observada foi pelo menos em parte devido à metabolização do etanol a radicais 1-hidroxietila, como esperado da produção *in vivo* deste radical durante as primeiras horas após intoxicação por etanol (Moore e col., 1995). Após 12h, esses níveis apresentaram-se consistentemente menores que os valores basais, sugerindo uma resposta à elevação observada em 3h. Esses resultados confirmam os dados preliminares obtidos por HPLC-ECD (Fig. 24), de que

não há um aumento visível após 12h. Resultados análogos foram obtidos para os níveis de quebra de fita simples em DNA de fígado de ratos tratados com etanol (5g/kg), que atingem níveis máximos após 6 horas de intoxicação aguda e retornam aos níveis basais após 12 horas (Navasumrit e col., 2000).

Os resultados obtidos para o DNA hepático sugerem uma tendência a elevação dos níveis após 12 h de tratamento. Entretanto, para melhor compreensão da produção e reparo, ou não, da lesão, a análise com DNA após 3h de tratamento e re-análise de amostras controle para melhorar o desvio padrão deverão ser incluídos nos próximos experimentos.

6. DISCUSSÃO GERAL

O consumo de álcool vem sendo associado a um aumento do risco de câncer e a uma situação de estresse oxidativo. Os metabólitos responsáveis por tais processos permanecem em discussão. É conhecido que o acetaldeído formado e o desbalanço redox provocado pelo seu metabolismo têm uma contribuição considerável na toxicidade do etanol. A produção de espécies reativas de oxigênio (Takeyama e col., 1996) e óxido nítrico (Wang e col., 1995) também parece exercer um papel importante na patogênese alcoólica. Neste trabalho, caracterizamos novos metabólitos radiculares do etanol e examinamos suas interações com ácidos nucleicos.

Primeiramente, demonstramos que os radicais 1-hidroxietila e 2-hidroxietila são produzidos durante a oxidação do etanol por $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe(II)}$ (Fig. 7). A produção do radical 1-hidroxietila *in vitro* (Albano e col., 1988; Rao e col., 1996) e *in vivo* (Reinke e col., 1987; Knecht e col., 1990; Moore e col., 1995) é bem estabelecida, enquanto que a formação do radical 2-hidroxietila não tem sido muito considerada (Ozawa e Hanaki, 1987; Smith e Roberston, 1988), principalmente em sistemas bioquímicos (Gatti e col., 1998) ou biológicos. De fato, a reação entre etanol e radicais hidroxila gera ca. 90% de radicais 1-hidroxietila e ca. 10% de radicais 2-hidroxietila (Asmus e col., 1973). Além disso, a utilização de captadores de *spin* pouco informativos quanto à identidade do radical captado, deve ter impedido a consideração do radical 2-hidroxietila como um metabólito do etanol. Portanto, a escolha do DNBBS como captador de *spin* foi adequada e essencial para demonstrar inequivocamente a produção do radical 2-hidroxietila durante a oxidação de etanol por sistemas Fenton.

O radical 1-hidroxietila interage com diversas biomoléculas, como proteínas (Albano e col., 1999), antioxidantes (Stoyanovski e col., 1998), enzimas (Puntarullo e col., 1999) e DNA, produzindo quebras (Navasumrit e col., 2000). Nossos estudos mostraram que ambos os radicais derivados do etanol interagem com ácidos nucleicos formando adutos. Sintetizamos quimicamente os adutos 8-(1-HE)Gua e 8-(2-HE)Gua (Figs.1-6) e demonstramos que eles são produzidos pela interação dos radicais 1-hidroxietila e 2-hidroxietila com DNA e RNA *in vitro*, entre outros possíveis produtos (Fig.8).

Também, caracterizamos os radicais metila e acetila como metabólitos

radicais do etanol. Nestes casos, contudo, o precursor é o acetaldeído, o produto de oxidação do etanol. O acetaldeído foi oxidado a radicais metila e acetila por sistemas de Fenton, peroxinitrito, xantina oxidase, partículas submitocondriais e ratos. Os mecanismos de formação desses radicais por sistemas Fenton e peroxinitrito foram elucidados. A produção radicalar depende da desprotonação dos peróxidos para que a adição nucleofílica se efetue (Figs. 14, 15). No caso do peróxido de hidrogênio, o pH necessário para sua desprotonação é bastante alto ($pK_a = 11,7$) e só deve ocorrer em ambientes especiais. Interessantemente, o consumo crônico de etanol está relacionado a um aumento na produção de óxido nítrico no fígado de ratos (Wang e col., 1995), e a um aumento na produção de radicais superóxido (Ishii e col., 1997), o que eleva a possibilidade de formação de peroxinitrito (eq. 17). A constante bimolecular aparente da reação entre peroxinitrito e acetaldeído (Fig. 13) é menor que aquelas determinadas para outros alvos intracelulares do peroxinitrito, como GSH ($1350 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) (Koppenol e col., 1992) e CO_2 ($3 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) (Lymar e Hurst, 1995). Contudo, em alcoólicos pesados, a concentração de acetaldeído pode alcançar níveis consideráveis no sangue e tecidos (Pikkarainen e col., 1981; Lieber e col., 1989), enquanto que a concentração de GSH pode diminuir (Comporti e col., 1973; MacDonald e col., 1977; Sergeant e col., 1995). Além disso, o aumento na produção de peróxido de hidrogênio (Ishii e col., 1997) e a conseqüente mobilização de ferro de ferritina nessas situação de alcoolismo crônico fornece condições teóricas para que os mecanismos propostos (Figs. 14, 15) atuem *in vivo*.

Como o acetaldeído é um importante metabólito do etanol, tornou-se relevante examinar a possibilidade de sua oxidação a radicais livres por sistemas enzimáticos e *in vivo*. Inicialmente, testamos a xantina oxidase, uma enzima que metaboliza acetaldeído a acetato (Fridovich, 1989). Foi verificado que além da rota já conhecida para a formação de radicais acetila e metila (Puntarulo e Cederbaum, 1989; Albano e col., 1994), outras estavam contribuindo para a produção total de radicais metila (Fig. 32). Propusemos o mecanismo de adição nucleofílica seguida de clivagem radicalar catalisada por metais de transição, e outro onde radicais acetila seriam um subproduto da reação de oxidação do acetaldeído a acetato. Além da xantina oxidase (Figs. 17,

18), partículas submitocondriais (Fig. 19) também oxidaram acetaldeído a radicais livres. Finalmente, os experimentos *in vivo* confirmaram a produção de radicais metila a partir do metabolismo do acetaldeído (Figs. 20-23). Embora não possamos discriminar ou mesmo identificar os mecanismos pelos quais radicais metila foram gerados *in vivo* a partir do metabolismo do acetaldeído, pudemos demonstrar inequivocamente sua produção e indicar a produção de radicais acetila como seus precursores.

A possibilidade dos radicais 1-hidroxietila alquilarem ácidos nucleicos *in vivo* também investigada (Figs. 25-31). Surpreendentemente, detectamos o aduto 8-(1-HE)Gua no DNA e no RNA hepáticos de animais não tratados com etanol. Os níveis basais foram ca. 10 vezes mais altos no RNA (Fig. 29) do que no DNA (Fig. 31), sugerindo a maior susceptibilidade do RNA à alquilação. No DNA, os níveis determinados são comparáveis aos níveis de adutos endógenos reportados para DNA hepático, como a N7-(2-HE)Gua (Eide e col., 1999) e a N2-etilguanina (Fang e Vaca, 1997), cujos grupos substituintes se assemelham com o da 8-(1-HE)Gua, indicando uma consistência nas determinações realizadas pelos diferentes laboratórios. A administração de etanol, contudo não elevou significativamente os níveis basais tanto no DNA como no RNA. No DNA, observou-se uma tendência de elevação após 12 h de tratamento, enquanto que no RNA os níveis aumentaram após 3h, mas diminuíram após 12h, em relação aos níveis basais. Embora seja bem conhecida a produção *in vivo* de radicais 1-hidroxietila após a intoxicação por etanol, sua interação com antioxidantes como GSH, ácido ascórbico e α -tocoferol foi recentemente reportada (Stoyanovski e col., 1998), e pode ter competido com a interação com os ácidos nucleicos. De fato, diversos estudos mostram uma diminuição nos conteúdos de antioxidantes após a intoxicação por etanol (Comporti e col., 1973; Schisler e Singh; 1989; Koch e col., 1994; Bekpinar e Tugrul, 1995; Takeyama e col., 1996).

A detecção desse aduto em RNA e DNA de diferentes organismos sugere sua ubiquidade, mas não define sua origem. Portanto, seria interessante determinar se o aduto possui um significado biológico ou se é um mero subproduto do metabolismo basal. No primeiro caso, mais de uma centena de nucleosídeos modificados já foram descritos (Limbach e col., 1994), principalmente em tRNA, onde são considerados importantes na eficiência e fidelidade no reconhecimento dos códons (Ashraf e col., 2000; Bjork e col., 2001) e rRNA, onde sua função não é ainda conhecida (Martinez e

col., 1998). Quanto às modificações encontradas, são as mais variadas (Limbach e col., 1994), sendo poucas modificadas na posição 8 das purinas, como a N2-metil-8-oxoguanosina, um derivado de tRNA encontrado em urina de rato e humanos (Helbock e col., 1996), 8-hydroxyguanosina e 8-hydroxyadenosina, isoladas de RNA de levedura (Yanagawa e col., 1992).

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ahmad, A. e Mond, J.J. (1985) 8-Hydroxyguanosine and 8-methoxyguanosine possess immunostimulating activity for lymphocytes. *Cell. Immunol.* **94**, 276-280.

Albano, E., Clot, P., Comoglio, A., Dianzani, M. U. e Tomasi, A. (1994) Free radical activation of acetaldehyde and its role in protein alkylation. *FEBS Lett.* **348**, 65-69.

Albano, E., French, S. W. e Ingelman-Sundberg (1999) Hydroxyethyl radicals in ethanol hepatotoxicity. *Front. Biosci.* **4**, d533-d540.

Albano, E., Parola, M., Comoglio, A. e Dianzani, M.U. (1993) Evidence for the covalent binding of hydroxyethyl-radicals to rat liver microsomal proteins. *Alcohol Alcohol.* **28**, 453-459.

Albano, E., Tomasi, A., Gorla-Gatti, L., Dianzani, M.U. (1988) Spin-trapping of free radical species produced during microsomal metabolism of ethanol. *Chem.-Biol. Interact.* **65**, 223-234.

Albano, E., Tomasi, A., Gorla-Gatti, L., Poli, G., Vanini, V. e Dianzani, M.U. (1987) Free radical metabolism of alcohols in rat liver microsomes. *Free Rad. Res. Commun.* **3**, 243-249.

Albano, E., Tomasi, A., Persson, J. -O., Terelius, Y., Gorla-Gatti, L., Ingelman-Sundberg, M. e Dianzani, M.U. (1991) Role of ethanol-inducible cytochrome P450 (P450IIE1) in catalyzing the free radical activation of aliphatic alcohols. *Biochem. Pharmacol.* **41**, 1895-1902.

Andrews, C.L., Vouros, P. e Harsch, A. (1999) Analysis of DNA adducts using high-performance separation techniques coupled to electrospray ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr.A.* **856**, 515-526.

Arneson, R.M. (1970) Substrate induced chemiluminescence of xanthine oxidase and aldehyde oxidase. *Arch. Biochem. Biophys.* **136**, 352-360.

Aroor, A.R. e Baker, R.C. (1997) ethanol-induced apoptosis in human HL-60 cells. *Life Sci.* **61**, 2345-2350.

Ashby, J., Paton, D., Styles, J.A., Greatbanks, D. e Wright, B. (1982) Synthesis of N7-hydroxyethylguanine and O6-hydroxyethylguanine. Markers for the reaction of ethylene oxide (EO) with DNA. *Mut. Res.* **103**, 257-261.

Ashraf, S. S., Guenther, R. H., Ansari, M. G., Malkiewics, A., Sochacka, E. e Agris, P. F. (2000) Role of modified nucleoside of yeast tRNA(Phe) in the ribosomal binding. *Cell Biochem. Biophys.* **33**, 241-252.

Asmus, K. -D., Mockel, H. e Henglein, A. (1973) Pulse radiolytic study of the site of OH[•] radical attack on aliphatic alcohols in aqueous solution. *J. Phys. Chem.* **77**, 1218-1221.

Augusto, O (1993) Alkylation and cleavage of DNA by carbon-centered free radical metabolites. *Free Radic. Biol. Med.* **15**, 329-336.

Augusto, O., Cavalieri, E. L., Rogan, E. G., Ramakrishna, N.V.S. e Kolar, C. (1990) Formation of 8-methylguanine as a result of DNA alkylation by methyl radicals generated during horseradish peroxidase-catalyzed oxidation of methyl-hydrazine. *J. Biol. Chem.* **265**, 22093- 22096.

Barrows, L. R. e Shank, R. C. (1981) Aberrant methylation of liver DNA during hepatotoxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **60**, 334-345.

Batteli, M. G., Abbondanza, A. e Stirpe, F. (1992) Effects of hypoxia and ethanol on xanthine oxidase of isolated rat hepatocytes: conversion from D to O form and leakage from cells. *Chem.-Biol. Interacts.* **83**, 73-84.

Bautista, A.P. e Spitzer, J.J. (1996) Postbinge effects of acute alcohol intoxication on hepatic free radical formation. *Alcohol Clin. Exp. Res.* **20**, 502-509.

Beckman, J.S., Beckman, T.W., Chen, J., Marshall, P.A. e Freeman, B.A. (1990) Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **87**, 1620-1625.

Bekpinar, S. e Tugrul, Y. (1995) Influence of selenium supplementation in non-toxic doses of vitamin E on testis lipid peroxide and antioxidant levels in chronic alcohol-fed rats. *Alcohol Alcohol.* **30**, 645-650.

Ben-Eliyahu, S., Page, G. G., Yirmiya, R. e Taylor, A.N. (1996) Acute alcohol intoxication suppresses natural killer cell activity and promotes tumor metastasis. *Nat. Medic.* **2**, 457-460.

Bianchini, F., Jaeckel, A., Vineis, P., Martinez-Garcia, C., Elmstahl, S., van Kappel, A.L., Boeing, H., Ohshima, H., Riboli, E. e Kaaks, R. (2001) Inverse correlation between alcohol consumption and lymphocyte levels of 8-hydroxydeoxyguanosine in humans. *Carcinogenesis* **22**, 885-890.

Bianchini, F., Montesano, R., Shuker, D.E.G., Cuzik, J. e Wild, C.P. (1993)

Quantification of 7-methyldeoxyguanosine using immunoaffinity purification and HPLC with electrochemical detection. *Carcinogenesis* **14**, 1677-1682.

Bjork, G.R., Jacobsson, K., Nilsson, K. M., Johansson, M.J., Bystrom, A.S. e Persson, O.P. (2001) A primordial tRNA modification required for the evolution of life? *EMBO J.* **20**, 231-239.

Blasiak, J., Trzeciak, A., Malecka-Panas, E., Drzewoski, J. e Wojewódzka, M. (2000) In vitro genotoxicity of ethanol and acetaldehyde in human lymphocytes and the gastrointestinal tract mucosa cells. *Toxicol In Vitro* **14**, 287-295.

Boh, E. E., Baricos, W. H., Bernofsky, C. e Steele, R. H. (1982) Mitochondrial chemiluminescence elicited by acetaldehyde. *J. Bioenerg. Biomembr* **14**, 115-133.

Bonini, M. G.; Radi, R., Ferrer-Sueta, G.; da- Costa Ferreira, A M. e Augusto, O. (1999) Direct detection of the carbonate radical anion produced from peroxyntirite and carbon dioxide. *J. Biol. Chem.* **274**, 10802-10806.

Bothe, E., Schuchmann, M.N., Schulte-Frohlinde, D. e von Sonntag, C. (1987) HO[•]₂ elimination from α -hydroxyalkylperoxyl radicals in aqueous solution. *Photochem. Photobiol.* **28**, 639-644.

Boveris, A. e Chance, B. (1973) The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem. J.* **134**, 707-716.

Brooks, P. J. (1997) DNA damage, DNA repair and alcohol toxicity- a review. *Alcohol Clin. Exp. Res.* **21**, 1073-1082.

Buxton, G.V., Greenstock, C.L., Helman, W.P. e Ross, A. B. (1988) *J. Phys. Chem. Ref. Data* **17**, 513-886.

Byun, J., Henderson, J.P., Mueller, D.M. e Heinecke, J.W. (1999) 8-Nitro-2'-deoxyguanosine, a specific marker of oxidation by reactive nitrogen species, is generated by the myeloperoxidase-hydrogen peroxide-nitrite system of activated human phagocytes. *Biochemistry* **38**, 2590-2600.

Cadenas, E. e Chance, B. (1981) Acetaldehyde-induced chemiluminescence of xanthine oxidase. *Biophys. J.* **33**, 184a .

Castro, G.D., Delgado, A.M.A. e Castro, J. A. (1998) Liver nuclear ethanol metabolizing systems (NEMS) producing acetaldehyde and 1-hydroxyethyl free radicals. *Toxicology* **129**, 137-144.

Cavalieri, E.L. e Rogan, E. G. (1995) Central role of radical cations in metabolic

activation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Xenobiotica* **25**, 677-688.

Cederbaum, A.I. (1989) Oxygen radical generation by microsomes: role of iron and implications for alcohol metabolism and toxicity. *Free Radic. Biol. Med.* **7**, 559-567.

Cederbaum, A.I. (1999) Effects of ethanol on hepatic mitochondrial function and DNA. *Gastroenterology* **117**, 265-269.

Chamulitrat, W., Carnal, J., Reed, N.M. e Spitzer, J.J. (1998) In vivo endotoxin enhances biliary ethanol-dependent free radical generation. *Am. J. Physiol.* **274**, 6653-6661.

Chaudhuri, J.D. (2000) Alcohol and the developing fetus-a review. *Med. Sci. Monit.* **6**, 1031-1041.

Cho, B.P., Kadlubar, F.F., Culp, S.J. e Evans, F.E. (1990) ¹⁵N Nuclear magnetic resonance studies on the tautomerism of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, 8-hydroxyguanosine, and other C8-substituted guanine nucleosides. *Chem. Res. Toxicol.* **3**, 445-452.

Chomczynski, P. e Sacchi, N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extration. *Anal. Biochem.* **162**, 156-159.

Clot, P., Albano, E., Eliasson, E., Tabone, M., Aricó, S., Israel, Y., Moncada, C. e Ingelman-Sundberg, M. (1996) Cytochrome P450E1 hydroxyethyl radical adducts as the major antigen in autoantibody formation among alcoholics. *Gastroenterology* **111**, 206-216.

Clot, P., Parola, M., Bellomo, G., Dianzani, U., Carini, R., Tabone, M., Aricó, S., Ingelman-Sundberg, M. e Albano, E. (1997) Plasma membrane hydroxyethyl radical adducts cause antibody-dependent cytotoxicity in rat hepatocytes exposed to alcohol. *Gastroenterology* **113**, 265-276.

Comporti, M., Benedetti, A. e Chiele, E. (1973) Studies on in vitro peroxidation of liver lipids in ethanol treated rats. *Lipids*. **8**, 498-502.

Dawson, R.M.C., Elliot, D.C., Elliot, W.H. e Jones, K.M. (1986) *Data for biochemical research*, 3ª edição, Clarendon Press, Oxford.

Doerge, D. R., Churchwell, M.I., Marques, M.M. e Beland, F.A. (1999) Quantitative analysis of 4-aminobiphenyl-C8-deoxyguanosyl DNA adducts produced *in vitro* and *in vivo* using HPLC-ES-MS. *Carcinogenesis* **20**, 1055-1061.

Domschke, S., Domschke, W., Lieber, C.S. (1974) Hepatic redox state:

Attenuation of the acute effects of ethanol induced by chronic ethanol consumption. *Life Sci.* **15**, 1327-1334.

Duling, D. R. (1994) Simulation of multiple isotropic spin-trap EPR spectra. *J. Magn. Reson.* **104**, 105-110.

Eide, I., Zhao, C., Kumar, R., Hemminki, K., Wu, K.Y. e Swenberg, J.A. (1999) Comparison of ³²P-postlabeling and high-resolution CG/MS in quantifying N7-(2-hydroxyethyl)guanine adducts. *Chem. Res. Toxicol.* **10**, 979-984.

Fang, J.-L. e Vaca, C. E. (1997) Detection of DNA adducts of acetaldehyde in peripheral white blood cells of alcohol abusers. *Carcinogenesis* **18**, 627-632.

Fernández-Checa, J.C., García-Ruiz, C., Ookhtens, M. e Kaplowitz, N. (1991) Impaired uptake of GSH by hepatic mitochondria from chronic ethanol-fed rats. Tracer kinetic studies in vitro and in vivo and susceptibility to oxidant stress. *J. Clin. Invest.* **87**, 397-405.

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

Fraenkel-Conrat, H. e Singer, B. (1988) Nucleoside adducts are formed by cooperative reaction of acetaldehyde and alcohols: Possible mechanism for the role of ethanol in carcinogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 3758-3761.

Fridovich, I. (1989) Oxygen radicals from acetaldehyde. *Free Radic. Biol. Med.* **7**, 557-558.

Friedberg, E.C., Walker, G.C. e Siede, W. (1995) *DNA repair and mutagenesis*, ASM Press, Washington DC.

Frilhart, C.R. e Leonard, N.J. (1973) Allylic rearrangement from O6 to C8 in the guanine series. *J. Am. Chem. Soc.* **95**, 7174-7175.

Gamberini, M., Cidade, R.M., Valotta, L.A., Armelin, M.C.S. e Leite, L.C.C. (1998) Contribution of hydrazines-derived alkyl radicals to cytotoxicity and transformation induced in normal c-myc-overexpressing mouse fibroblasts. *Carcinogenesis* **19**, 147-155.

Gannet, P. M., Lawson, T., Miller, D. D., Thakkar, J. W., Lord, W.-M. Yau e Toth, B. (1996) 8-arylguanine adducts from arenediazonium ions and DNA. *Chem.-Biol. Interact.* **101**, 149-164.

Gannet, P.M., Powell, J.H., Rao, R., Shi, X., Lawson, T., Kolar, C. e Toth, B.

(1999) C8-arylguanine and C8-aryl原因ine formation in calf thymus DNA from arenediazonium ions. *Chem. Res. Toxicol.* **12**, 297-304.

Garro, A.J. , Espina, N., Farinati, F. e Salvagnini, M. (1986) The effects of chronic ethanol consumption on carcinogen metabolism and on O⁶-methylguanine transferase-mediated repair of alkylated DNA. *Alcohol Clin. Exp. Res.* **10**, 73S-77S.

Gatti, R. M., Alvarez, B., Vasquez-Vivar, J., Radi R. e Augusto, O (1998) Formation of spin trap adducts during the decomposition of peroxynitrite. *Arch. Biochem. Biophys.* **349**, 36-46.

Giuvili, C., Boveris, A. e Cadenas, E. (1995) Hydroxyl radical generation during mitochondrial electron transfer and the formation of 8-hydroxydesoxyguanosine in mitochondrial DNA. *Arch. Biochem. Biophys.* **316**, 909-916.

Goldstein, S. e Czapski, G. (1998) Formation of peroxynitrate from the reaction of peroxynitrite with CO₂: evidence for carbonate radical production. *J. Am. Chem. Soc.* **120**, 3458-3463.

Gomes, L. F., Netto, L. E. S. e Augusto, O. (1995) Electrochemical detection of C8-methylguanine: a potential marker for monitoring DNA alkylation by methyl radicals. Em: *The Oxygen Paradox* (Editores: Davies, K. J. A e Ursini, F.), 149-156, CLEUP Press, Padova.

Gonthier, B., Jeunet, A. e Barret, L. (1991) Electron spin resonance study of free radicals produced from ethanol and acetaldehyde after exposure to a Fenton system or to brain and liver microsomes. *Alcohol* **8**, 369-375.

Guengerich, F.P., Mundkowski, R.G., Voehler, M. e Kadlubar, F.F. (1999) Formation and reaction of N7-aminoguanosine and derivatives. *Chem. Res. Toxicol.* **12**, 906-916.

Harris, E. F. P. e Waters, W. A. (1952) Thiol catalysis of the homolytic decomposition of aldehydes. *Nature (Lond)* **170**, 212-213.

Helbock, H.J., Beckman, K.B., Shigenaga, M.K., Walter, P.B., Woodall, A.A., Yeo, H.C. e Ames, B.N. (1998) DNA oxidation matters: the HPLC-electrochemical detection assay of 8-oxo-deoxyguanosine and 8-oxo-guanine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95**, 288-293.

Helbock, H.J., Thompson, J., Yeo, H. e Ames, B.N. (1996) N2-Methyl-8-oxoguanine: a tRNA urinary metabolite-role of xanthine oxidase. *Free Radic. Biol. Med.* **20**, 475-481.

Hemminki, K. e Suni, R. (1984) Sites of reaction of glutaraldehyde and acetaldehyde with nucleosides. *Arch. Toxicol.* **55**, 186-190.

Henle, E. S., Luo, Y. e Linn, S. (1996) Fe^{2+} , Fe^{3+} , and oxygen react with DNA-derived radicals formed during iron-mediated Fenton reactions. *Biochemistry* **35**, 12212-12219.

Hix, S., Kadiiska, M. B., Mason, R. P. e Augusto, O. (2000) *In vivo* DNA methylation by t-butylhydroperoxide. In vivo metabolism of tert-butyl hydroperoxide to methyl radicals. EPR spin-trapping and DNA methylation studies. *Chem. Res. Toxicol.* **13**, 1056-1064.

Hix, S., Morais, M. S. e Augusto, O. (1995) DNA methylation by tert-butylhydroperoxide-iron (II). *Free Radic. Biol. Med.* **19**, 293-301.

Hodges, G.R. e Ingold, K.U. (1999) Cage-escape of geminate radical pairs can produce peroxynitrate from peroxynitrite under a wide variety of experimental conditions. *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 10695-10701.

Hodges, G.R., Young, M.J., Paul, T. e Ingold, K.U. (2000) How should xanthine oxidase-generated superoxide yields be measured ? *Free Radic. Biol. Med.* **29**, 434-441.

Hodson, E. e Levi, P.E. (1994) *Introduction to biochemical toxicology*, 2^a Ed., Appleton & Lange, Norwalk, Connecticut, EUA.

Hsieh, Y.S., Wang, H.C., Tseng, T.H., Chang, W.C. e Wang, C.J. (2001) Gaseous nitric oxide-induced 8-nitroguanine formation in human lung fibroblast cells and cell-free DNA. *Toxicol Appl Pharmacol.* **172**, 210-216.

Humphreys, W.G., Kadlubar, F.F. e Guengerich, F.P (1992) Mechanism of C8 alkylation of guanine residues by activated arylamines: Evidence for the initial adduct formation at the N7 position. *Proc.Natl.Acad. Sci. USA* **89**, 8278-8282.

Hunt, N.C. e Goldin, R.D. (1992) Nitric oxide production by monocytes in alcoholic liver disease *J. Hepatol.* **14**, 146-150.

Iimuro, Y., Bradford, B.U., Gao, W., Kadiiska, M., Mason, R.P., Stefanovic, B., Brenner, D.A. e Thurman, R.G. (1996) Detection of α -hydroxyethyl free radical adducts in the pancreas after chronic exposure to alcohol in the rat. *Mol. Pharmacol.* **50**, 656-661.

Ingelman-Sundberg, M., Ronis, M.J., Lindros, K.O., Eliasson, E. e Zhukov, A. (1994) Ethanol-inducible cytochrome P4502E1: regulation, enzymology and molecular

biology. *Alcohol Alcohol. Suppl.* **2**, 131-139.

Inoue, I. e Kawanishi, S. (1995) Oxidative DNA damage induced by simultaneous generation of nitric oxide and superoxide. *FEBS Lett.* **364**, 431-437.

Ishii, H., Kurose, I. e Kato, S. (1997) Pathogenesis of alcoholic liver disease with particular emphasis on oxidative stress. *Journal of Gastroenterol. and Hepatol.* **12**, S272-S282.

Justo, G.Z., Livotto, P.R. e Duran, N. (1995) Chemical and photochemical generated carbon-centered radical intermediate and its reaction with desoxyribonucleic acid. *Free Radic. Biol. Med.* **20**, 431-440.

Kadiiska, M. B. e Mason, R. P. (2000) Acute intoxication by methanol causes free radical generation in rats: an ESR spin-trapping investigation. *Free Radic. Biol. Med* **28**, 1106-1114.

Kadiiska, M. B., Morrow, J. D., Awad, J. A., Roberts, L. J. e Mason, R. P. (1998) Identification of free radical formation and F₂- isoprostanes *in vivo* Cr (IV) poisoning. *Chem. Res. Toxicol.* **11**, 1516-1520.

Kadiiska, M. B., Qun-Hui, X. H. e Mason, R. P. (1994) *In vivo* free radical generation by chromium (IV): An electron-spin-resonance spin-trapping investigation. *Chem. Res. Toxicol.* **7**, 800-805.

Kang, J. O., Gallagher, K. S. e Cohen, G. (1993) Methylation of RNA purine bases by methyl radicals. *Arch. Biochem. Biophys.* **306**, 178-182.

Kaur, H. e Halliwell, B. (1996) Measurement of oxidized and methylated DNA bases by HPLC with electrochemical detection. *Biochem. J.* **318**, 21-23.

Kaur, H., Leung, K. H. W. e Perkins, M. J. (1981) A water-soluble, nitroso-aromatic spin-trap. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 142-143.

Kellog, E.W. e Fridovich, I. (1975) Superoxide, hydrogen peroxide and singlet oxygen in lipid peroxidation by a xanthine oxidase system. *J. Biol. Chem.* **250**, 8812-8817.

Kissner, R., Nauser, T., Bugnon, P., Lye, P. G. e Koppenol. W. H. (1997) Formation and properties of peroxynitrite as studied by laser flash photolysis, high-pressure stopped-flow technique, and pulse radiolysis. *Chem. Res. Toxicol.* **10**, 1285-1292.

Knecht, K T. e Mason, R. P. (1993) *In vivo* spin trapping of xenobiotic free-radical metabolites. *Arch. Biochem. Biophys.* **303**, 185-194.

Knecht, K. T., Bradford, B. U. e Mason, R. P. (1990) *In vivo* formation of a free radical metabolite of ethanol. *Mol. Pharmacol.* **38**, 26-30.

Knecht, K.T., Adachi, Y., Bradford, B.U., Iimuro, Y., Kadiiska, M., Xuang, Q.H. e Thurman, R.G. (1995) Free radical adducts in the bile of rats treated chronically with intragastric alcohol: inhibition by destruction of Kupffer cells. *Mol. Pharmacol.* **47**, 1028-1034.

Knudsen, F.S., Penatti, C.A., Royer, L.O., Bidart, K.A., Christoff, M., Ouchi, D. e Bechara, E.J. (2000) Chemiluminescent aldehyde and beta-diketone reactions promoted by peroxynitrite. *Chem. Res. Toxicol.* **13**, 317-326.

Koch, O.R., DeLeo, M.E., Borrello, S., Palombini, G. e Galeotti, T. (1994) Ethanol-treatment up-regulates the expression of mitochondrial manganese superoxide dismutase in rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **201**, 1356-1365.

Kohda, K., Tsunomoto, H., Kasamatsu, T., Sawamura, F., Terashima, I., Shibutani, S. (1997) Synthesis and miscoding specificity of oligodeoxynucleotide containing 8-phenyl -2'-deoxyguanosine. *Chem. Res. Toxicol.* **10**, 1351-1358.

Kohda, K., Tsunomoto, H., Minoura, Y., Tanabe, K. e Shibutani, S. (1996) Synthesis, miscoding specificity, and thermodynamic stability of oligodeoxynucleotide containing 8-methyl-2'-deoxyguanosine. *Chem. Res. Toxicol.* **9**, 1278-1284.

Kohn, M., Yamada, M., Mitsuta, K., Mizuta, Y. and Yoshikawa, T. (1991) Spin-trapping studies on the reaction of iron complexes with peroxides and the effects of water-soluble antioxidants. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **64**, 1447-1453.

Koop, D.R., Crump, B.L., Nordblom, G.D. e Coon, M.J. (1985) Immunochemical evidence for induction of the alcohol-oxidizing cytochrome P-450 of rabbit liver microsomes by diverse agents: ethanol, imidazole, trichloroethylene, acetone, pyrazole and isoniazid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 4065-4069.

Koppenol, W. H. (1994) Chemistry of iron and copper in radical reactions. Em *Free Radical Damage and its Control* (Rice-Evans, C. A. e Burdon, R. H., Eds), 3-24, Elsevier Science B. V.

Koppenol, W. H., Moreno, J. J., Pryor, W. A., Ischiropoulos, H. e Beckman, J. S. (1992) Peroxynitrite, a cloaked oxidant formed by nitric oxide and superoxide. *Chem. Res. Toxicol.* **5**, 834-842

Kuthan, H. e Ullrich, V. (1982) Oxidase and oxygenase function of the microsomal cytochrome P450 monooxygenase system. *Eur. J. Biochem.* **126**, 583-388.

Kwee, J., Armelin, M. C., Stefani, H. e Augusto, O. (1998) Cell proliferation induced by 8-oxoguanosine and 8-methylguanosine, two adducts produced by free radical attack on ribonucleosides and RNA. *Chem.-Biol. Interact.* **116**, 61-77.

Li, A. S. W., Cummings, K. B., Roethling, H. P., Buettner, G. R. e Chignell, C. F. (1988) A spin trapping data base implemented on the IBM PC/AT. *J. Magn. Res.* **79**, 140-142.

Lide, D.R. (1993) *CRC Handbook of Chemistry and Physics*, CRC Press, Boca Raton, Flórida.

Lieber, C.S. (1997) Ethanol metabolism, cirrhosis and alcoholism. *Clin. Chim. Acta* **257**, 59-84.

Lieber, C.S. e DeCarli, L.M. (1970) Hepatic microsomal ethanol oxidizing system: In vitro characteristics and adaptative properties in vivo. *J. Biol. Chem.* **245**, 2505-2512.

Limbach, P.A., Crain, P.F. e McCloskey, J.A. (1994) Summary: the modified nucleosides of RNA. *Nucleic Acid Res* **22**, 2183-2196.

Lloyd, R. V.e Mason, R. P. (1990) Evidence against transition metal-independent hydroxyl radical generation by xantine oxidase. *J. Biol. Chem.* **265**, 16733-16736.

Logagen, T. e Sehested, K. (1993) Formation and decay of peroxynitric acid: A pulse radiolysis study. *J. Phys. Chem.* **97**, 10047-10052.

Lymar, S. V. e Hurst, J. K. (1998) CO₂-catalized one-electron oxidations by peroxynitrite: properties of the reactive intermediate. *Inorg. Chem.* **37**, 294-301.

MacDonald, C.W., Dow, J. e Moore, M.R.A. (1977) A possible protective role for sulphhydryl compounds in acute alcoholic liver injury. *Biochem. Pharm.* **26**, 1524-1531.

Maeda, M., Nagawa, H., Maeda, T., Koike, H. e Kasai, H. (1998) Alcohol consumption enhances liver metastasis in colorectal carcinoma patients. *Cancer* **83**, 1483-1488.

Maeda, M., Nushi, K. e Kawazoe, Y. (1974) Studies on chemical alterations of nucleic acid and their components-VII C-alkylation of purine bases through free radical process catalyzed by ferrous ion. *Tetrahedron* **30**, 2677-2682.

Mansouri, A., Gaou, I., Kerguenec, C., Amsellem, S., Haouzi, D., Berson, A., Moreau, A., Feldmann, G., Lettéron, P., Pessayre, D. e Fromenty, B. (1999) An alcoholic binge causes massive degradation of hepatic mitochondrial DNA in mice.

Gastroenterology **117**, 181-190.

Marjanen, L. (1972) Intracellular localization of aldehyde dehydrogenase in rat liver. *Biochem. J.* **127**, 633-639.

Marnett, L.J. e Burcham, P.C. (1993) Endogenous DNA adducts: potential and paradox. *Chem. Res. Toxicol.* **6**, 771-785.

Martinez, J.A., Sáez, G.T. e Seisdedos, R.T. (1998) On the function of modified nucleosides in the RNA world. *J. Theor. Biol.* **194**, 485-490.

Matsuda, T., Kawanishi, M., Yagi, T., Matsui, S. e Takebe, H. (1998) Specific tandem GG to TT base substitutions induced by acetaldehyde are due too intra-strand crosslinks between adjacent guanine bases. *Nucleic Acid Res.* **26**, 1769-1774.

Matsuda, T., Terashima, I., Matsumoto, Y., Yabushita, H., Matsui, S. e Shibutani, S. (1999) Effective utilization of N2-ethyl-2'-deoxyguanosine triphosphate during DNA synthesis catalyzed by mammalian replicative DNA polymerases. *Biochemistry* **38**, 929-935.

McClelland, R.A., Ahmad, A., Dicks, A.P. e Licence, V.E. (1999) Spectroscopic characterization of the initial C8 intermediate in the reaction of the 2-fluorenylnitrenium ion with 2'-deoxyguanosine. *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 3303-3310.

Merényi, G. e Lind, J. (1998) Free radical formation in the peroxyntrous acid (ONOOH)/ peroxyntrite (ONOO⁻) system. *Chem. Res. Toxicol.* **11**, 243-246.

Merényi, G., Lind, J., Goldestein, S. e Czapski, G. (1998) Peroxyntrous acid homolyzes into [•]OH and [•]NO₂ radicals. *Chem. Res. Toxicol.* **11**, 712-713.

Mira, L., Maia, L., Barreira, L. e Manso, C.F. (1995) Evidence for ROS generation due to NADH oxidation by aldehyde oxidation by aldehyde oxidase during ethanol metabolism. *Arch. Biochem. Biophys.* **318**, 53-58

Moncada, C., Torres, V., Varghese, G. Albano, E. e Israel, Y. (1994) Ethanol-derived immunoreactive species formed by free radical mechanisms. *Mol. Pharmacol.* **46**, 786-791.

Moore, D.R., Reinke, L.A. e McCay, P.B. (1995) Metabolism of ethanol to 1-hydroxyethyl radical in vivo: detection with intravenous administration of α -(4-pyridyl-1-oxide)-N-t-butyl nitron. *Mol. Pharmacol.* **47**, 1224-1230.

Morais, M.S. (1995) Propriedades químicas e bioquímicas de 8-metil-2'-desoxiguanosina. Um produto do ataque de radicais metila ao DNA. Dissertação de Mestrado, Instituto de Química-USP, São Paulo.

Mufti, S.I. (1992) Alcohol acts to promote incidence of tumors. *Cancer Detect Prev.* **16**, 157-162.

Navasumrit P., Ward, T.H., Dodd, N.J. e O'Connor, P.J. (2000) Ethanol-induced free radicals and hepatic DNA strand breaks are prevented in vivo by antioxidants: effects of acute and chronic ethanol exposure. *Carcinogenesis* **21**, 93-99.

Navasumrit, P., Ward, T.H., O'Connor, P.J., Nair, J., Frank, N e Bartsch, H. (2001) Ethanol enhances the formation of endogenously and exogenously derived adducts in rat hepatic DNA. *Mut. Res.* **479**, 81-94.

Netto, L.E.S., Ramakrishna, N.V.S., Kolar, C., Cavalieri, E.L., Rogan, E.G., Lawson, T.A. e Augusto, O. (1992) Identification of C8-methylguanine in the hydrolysates of DNA from rats administered 1,2-dimethylhydrazine: evidence for *in vivo* DNA alkylation by methyl radicals. *J. Biol. Chem.* **267**, 21524-21527.

North, J. A., Spector, A. A. e Buettner, G. (1992) Detection of lipid radicals by electron paramagnetic resonance spin trapping using intact cells enriched with polyunsaturated acids. *J. Biol. Chem.* **267**, 5743-5746.

Ohnishi, K., Lieber, C.S. (1977) Reconstitution of the microsomal ethanol metabolizing system: qualitative and quantitative changes of cytochrome P-450 after chronic ethanol consumption. *J. Biol. Chem.* **252**, 7124-7131.

Olin, K. L., Cherr, G.N., Rifkin, E. e Keen, C.L. (1996) The effects of some redox-active metals and reactive aldehydes on DNA-protein cross-links *in vitro*. *Toxicology* **110**, 1-8.

Ozawa, T. e Hanaki, A. (1987) Spin-trapping of alkyl radicals by a water-soluble nitroso aromatic spin-trap, 3,5-dibromo-4-nitrosobenzenesulfonate. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **60**, 2304-2306.

Park, J.-W., Cundy, K. C. e Ames, B. N. (1989) Detection of DNA adducts by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Carcinogenesis* **10**, 827-832.

Pfeiffer, S., Gorren, A. C. F., Schmidt, K., Werner, E. R., Hansert, B., Scott Bohle, D. e Mayer, B. (1997) Metabolic fate of peroxynitrite in aqueous solution. Reaction with nitric oxide and pH-dependent decomposition to nitrite and oxygen in a 2:1 stoichiometry. *J. Biol. Chem.* **272**, 3465-3470.

Pikkarainen, P.H., Gordon, E.R., Lebsack, M.E. e Lieber, C.S. (1981) Determinants of plasma free acetaldehyde levels during the oxidation of ethanol.

Effects of chronic ethanol feeding. *Biochem. Pharmacol.* **30**, 799-802.

Puntarulo, S. e Cederbaum, A.I. (1989) Chemiluminescence from acetaldehyde oxidation by xanthine oxidase involves generation of and interactions with hydroxyl radicals. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* **13**, 84-90.

Puntarulo, S., Stoyanovsky, D.A. e Cederbaum, A.I. (1999) Interaction of 1-hydroxyethyl radical with antioxidant enzymes. *Arch. Biochem. Biophys.* **372**, 355-359.

Radi, R., Turrens, J. F., Chang, L. Y., Bush, K. M., Crapo, J. D. e Freeman, B. A. (1991) Detection of catalase in rat heart mitochondria. *J. Biol. Chem.* **266**, 22028-22034.

Rajagopalan, K.V., Fridovich, I. e Handler, P. (1962) Hepatic aldehyde oxidase. Purification and properties. *J. Biol. Chem.* **237**, 922-928.

Rajasinghe, H., Jayatilleke, E. e Shaw, S. (1990) DNA cleavage during ethanol metabolism: role of superoxide radicals and catalytic iron. *Life Sci.* **47**, 807-814.

Rao, D. N. R., Yang, M.-X., Lasker, J. M. e Cederbaum, A. I. (1996) 1-Hydroxyethyl radical formation during NADPH- and NADH-dependent oxidation of ethanol by human liver microsomes. *Mol. Pharmacol.* **49**, 814-821.

Rashba-Step, J., Turro, N.J. e Cederbaum, A.I. (1993) Increased NADPH- and NADH-dependent production of superoxide and hydroxyl radical by microsomes after chronic ethanol treatment. *Arch. Bioch. Biophys.* **300**, 401-408.

Ravanat, J.-L., Duretz, B., Guiller, A., Douki, T. e Cadet, J. (1998) Isotope dilution high performance liquid chromatography- electrospray tandem mass spectrometry assay for the measurement of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine in biological samples. *J. Chromatogr. B* **715**, 349-356.

Reinke, L. A., Lai, K., DuBose, C. M. e McCay, P. B. (1987) Reactive free radical generation *in vivo* in heart and liver of ethanol-fed rats: correlation with free radical formation *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 9223-9227.

Reinke, L. A., Moore, D. R. e McCay, P. B. (1997) Mechanisms for metabolism of ethanol to 1-hydroxyethyl radicals in rat liver microsomes. *Arch. Biochem. Biophys.* **348**, 9-14.

Rota, C., Barr, D. P., Martin, M. V., Guengerich, F. P., Tomasi, A. e Mason, R. P. (1997) Detection of free radicals produced from the reaction of cytochrome P-450 with linoleic acid hydroperoxide. *Biochem. J.* **328**, 565-571.

Rouach, H., Houze, P., Orfanelli, M.T., Gentil, M., Bourdon, R. e Nordmann, R.

(1990) Effect of acute ethanol administration on the subcellular distribution of iron in rat liver and cerebellum. *Biochem. Pharmacol.* **39**, 1095-1100.

Sakurai, K., Stoyanovsky, D.A., Fujimoto, Y. e Cederbaum, A.I. (2000) Mitochondrial permeability transition induced by 1-hydroxyethyl radical. *Free Radic. Biol. Med.* **28**, 273-280.

Sambrook, J., Fritsch, E. F. e Maniatis, T. (Eds.) (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nova Iorque.

Schisler, N.J. e Singh, S.M. (1989) Effect of ethanol in vivo on enzymes which detoxify oxygen free radicals. *Free Radic. Biol. Med.* **7**, 117-123.

Schuchmann, M. N. e von Sonntag, C. (1988) The rapid hydration of the acetyl radical. A pulse radiolysis study of acetaldehyde in aqueous solution. *J. Am. Chem. Soc.* **110**, 5698-5701.

Schuckit, M. A. (1998) Alcoholism and drug dependency. Em: *Harrison's Principles of internal medicine*, 14ª edição (Ed. Fauci, A.S. e outros), McGraw-Hill, Nova Iorque.

Segerbäck, D. (1990) Reaction products in hemoglobin and DNA after in vitro treatment with ethylene oxide and N-(2-hydroxyethyl)-N-nitrosourea. *Carcinogenesis* **11**, 307-312.

Sentjurs, M. e Mason, R. P. (1992) Inhibition of radical adduct reduction and reoxidation of the corresponding hydroxylamines in in vivo spin trapping of carbon-tetrachloride-derived radicals. *Free Radic. Biol. Med.* **13**, 151-160.

Sergent, O. Morel, I., Chevanne, M, Cillard, P e Cillard, J. (1995) Oxidative stress induced by ethanol in rat hepatocyte cultures. *Biochem. Mol. Biol. Int.* **35**, 575-583.

Serjeant, E. P. e Dempsey, B. (1979) *Ionisation Constants of Organic Acids in Aqueous Solution*, Pergamon Press, Oxford.

Shaw, S. (1989) Lipid peroxidation, iron mobilization and radical generation induced by alcohol. *Free Radic. Biol. Med.* **7**, 541-547.

Silverstein, R.M., Bassler, G.C. e Morrill, T.C. (1991) *Spectrometric identification of organic compounds*, 5ª edição, John Wiley & Sons, Nova Iorque.

Singh, N.P., Lai, H. e Khan, A. (1995) Ethanol-induced single-strand DNA breaks in rat brain cells. *Mut. Res.* **345**, 191-196.

Smith, P e Robertson, J. S. (1988) Electron paramagnetic resonance study of

the reactions of the spin trap 3,5-dibromo-4-nitrosobenzenesulfonate. *Can. J. Chem.* **66**, 1153-1158.

Sodum, R.S. e Fiala, E.S. (2001) Analysis of peroxynitrite reactions with guanine, xanthine, and adenine nucleosides by high-pressure liquid chromatography with electrochemical detection: C8-nitration and -oxidation. *Chem. Res. Toxicol.* **14**, 438-450.

Steinmaus, H., Rosenthal, I. e Elad, D (1971) Light- and γ -ray-induced reactions of purines and purine nucleosides with alcohols. *J. Org. Chem.* **36**, 3594-3598.

Stoyanovsky D.A. e Cederbaum A. I. (1999) Metabolism of carbon tetrachloride to trichloromethyl radical: An ESR and HPLC-EC study. *Chem. Res. Toxicol.* **12**, 730-736.

Stoyanovsky, D.A., Wu, D. e Cederbaum, A.I. (1998) Interaction of 1-hydroxyethyl radical with glutathione, ascorbic acid and alpha-tocopherol. *Free Radic. Biol. Med.* **24**, 132-138.

Sultatos, L.G. (1988) Effects of acute ethanol administration in hepatic xanthine dehydrogenase/oxidase system in the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **246**, 946-949.

Taddei, F., Hayakawa, H., Bouton, M.-F., Cirinesi, A.-M., Matic., I., Sekiguchi, M. e Radman, M. (1997) *Science* **278**, 128-130.

Takeyama, Y., Kamimura, S., Kuroiva, A., Sohda, T., Irie, M., Shijo, H. e Okumura, M. (1996) Role of Kupffer cell-derived reactive oxygen intermediates in alcoholic liver disease in rats in vivo. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* **20** (sup), 335A-339A.

Terashima, I., Matsuda, T., Fang, T.W., Suzuki, N., Kobayashi, J., Kohda, K. e Shibutani, S. (2001) Miscoding potential of the N2-ethyl-2'-deoxyguanosine DNA adduct by the exonuclease-free Klenow fragment of Escherichia coli DNA polymerase I: *Biochemistry* **40**, 4106-4114.

Treinin, A. e Hayon, E. (1970) Absorption spectra and reaction kinetics of NO_2 , N_2O_3 and N_2O_4 in aqueous solution. *J. Am. Chem. Soc.* **92**, 5821-5828.

Uppu, R. M., Cueto, R., Squadrito, G. L., Salgo, M. G. e Pryor, W. A. (1996) Competitive reactions of peroxynitrite with 2'-deoxyguanosine and 7,8-dihydro-8-oxo-2'-deoxyguanosine (8-oxodG): relevance to the formation of 8-oxodG in DNA exposed to peroxynitrite. *Free Rad. Biol. Med.* **21**, 407-411.

Uppu, R. M., Winston, G. W. e Pryor, W. A. (1997) Reactions of peroxynitrite with aldehydes as probes for the reactive intermediates responsible for biological

nitration. *Chem. Res. Toxicol.* **10**, 1331-1337.

Vaca, C.E., Fang, J.-L. e Schweda, E.K.H. (1995) Studies of the reaction of acetaldehyde with deoxynucleosides. *Chem.-Biol. Interact.* **98**, 51-67.

Vallee, B.L. (1998) Alcohol in the western world. *Sci. American*, junho, 62-67.

Vasquez-Vivar, J., Denicola, A., Radi, R. e Augusto, O. (1997) Peroxynitrite-mediated decarboxylation of pyruvate to both carbon dioxide and carbon dioxide anion radical. *Chem. Res. Toxicol.* **10**, 786-794.

Vercesi, A. E., Reynafarje, B. e Lehninger, A. L. (1978) Stoichiometry of H⁺ ejection and Ca²⁺ uptake coupled to electron-transport in rat heart mitochondria. *J. Biol. Chem.* **253**, 6379-6385.

Voet, D. e Voet, J. G. (1990) *Biochemistry*, John Wiley & Sons, Nova Iorque.

Wang, J.F., Greenberg, S.S. e Spitzer, J.J. (1995) Chronic alcohol administration stimulates nitric oxide formation in the rat liver with or without pretreatment by lipopolysaccharide. *Alcohol Clin. Exp. Res.* **19**, 387-392.

Weimann, A., Belling, D. e Poulsen, H.E. (2001) Measurement of 8-oxo-2'-deoxyguanosine and 8-oxo-2'-deoxyadenosine in DNA and human urine by high performance liquid chromatography. *Free Radic. Biol. Med.* **30**, 757-764.

Wieland, P. e Lauterburg, B. H. (1995) Oxidation of mitochondrial proteins and DNA following administration of ethanol. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **213**, 815-819.

Winston, G.W. e Cederbaum, A.I. (1983) NADPH-dependent production of oxy radicals by purified components of rat liver mixed function oxidase system II. Role in microsomal oxidation of ethanol. *J. Biol. Chem.* **258**, 1515-1519.

Wright, R. M., McManaman, J.L. e Repine, J.E. (1999) Alcohol-induced breast cancer: a proposed mechanism. *Free Radic. Biol. Med.* **26**, 348-354.

Wu, K.-Y., Scheller, N., Ranasinghe, A., Yen, T.-Y., Sangaiah, R., Giese, R. e Swenberg, J.A. (1999) A gas chromatography/electron capture/negative chemical ionization high-resolution mass spectrometry method for analysis of endogenous and exogenous N7-(2-hydroxyethyl)guanine in rodents and its potential for human biological monitoring. *Chem. Res. Toxicol.* **12**, 722-729.

Yanagawa, H., Ogawa, Y. e Ueno, M. (1992) Redox ribonucleosides. Isolation and characterization of 5-hydroxyuridine, 8-hydroxyguanosine and 8-hydroxyadenosine from *Torula* yeast RNA. *J. Biol. Chem.* **267**, 13320-13326.

Yen, T.-Y., Christova-Gueoguieva, N. I., Scheller, N., Holt, S., Swenberg, J. A. e Charles, M. J. (1996) Quantitative analysis of the DNA adduct N^2 , 3-ethenoguanine using liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **31**, 1271-1276.

Yermilov, V., Rubio, J. e Ohshima, H. (1995) Formation of 8-nitroguanine in DNA treated with peroxynitrite in vitro and its rapid removal from DNA by depurination. *FEBS Lett.* **376**, 207-210.