UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

**Adutos de DNA Gerados por Produtos da
Lipoperoxidação: Caracterização, Detecção,
Incorporação em Oligonucleotídeos e
Implicações Biológicas**

VALDEMIR MELECHCO CARVALHO

Tese de Doutorado apresentada ao Departamento
de Bioquímica

Orientadora:
Prof^a Dr^a Marisa H. G. Medeiros

São Paulo

2001

**“Adutos de DNA Gerados Por Produtos da
Lipoperoxidação: Caracterização, Detecção,
Incorporação em Oligonucleotídeos e
Implicações Biológicas”**

VALDEMIR MELECHCO CARVALHO

*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*

Aprovado por:

Profa. Dra. MARISA HELENA GENNARIO DE MEDEIROS
IQ - USP
(Orientadora e Presidente)

Prof. Dr. ETELVINO JOSÉ HENRIQUES BECHARA
IQ - USP

Profa. Dra. HELENA MARIA CARVALHO FERRAZ
IQ - USP

Prof. Dr. CARLOS FREDERICO MARTINS MENCK
ICB - USP

Prof. Dr. FRANCISCO LAURINDO
Incor

SÃO PAULO
05 DE ABRIL 2001.

Ora, a fé é o firme fundamento das coisas que se esperam, e a prova das coisas que não se vêem. (Hebreus 11:1).

AGRADECIMENTOS

À Dra. Marisa H. G. Medeiros pela orientação, amizade, confiança e incentivo ao longo desses anos.

Ao Dr. Jean Cadet por ter acreditado no projeto mesmo quando tudo o que tínhamos eram alguns artefatos, pelo incentivo, otimismo e por ter me acolhido no seu grupo em Grenoble.

Ao Dr. Didier Gasparutto pela amizade e colaboração nos estudos de síntese dos oligonucleotídeos.

Ao Dr. Paolo Di Mascio pelo apoio e sugestões ao longo do projeto.

À Dra. Sylvie Sauvaigo pela colaboração, pelo exemplo e por todos os conselhos.

Ao Dr. Ivan Pérsio de Arruda Campos, meu guru de espectroscopia, quem muitas vezes me guiou nas viagens pelos espectros e terras desconhecidas da química orgânica.

Ao Dr. Thierry Douki pela colaboração no início do projeto.

Ao assessor da FAPESP que, através de seus pareceres atenciosos e com críticas e sugestões sempre muito apropriadas, contribuiu muito no desenvolvimento desse trabalho.

À Dra. Ohara Augusto, depois de suas aulas empolgantes de Bioquímica na graduação seria impossível seguir outro caminho.

Ao Humberto Reis Matos pela amizade e companhia nos muitos fins de semana e madrugadas no laboratório e pelo papo científico sempre de alto nível.

Ao Osmar Gomes pela amizade e estar sempre disposto a “quebrar todos os galhos” no laboratório.

Ao Flávio Asahara e ao Marcelo Azevedo, grandes amigos e também grandes colaboradores enquanto alunos de iniciação científica no laboratório.

À Sabrina Marques pela amizade e pela disposição constante em ajudar.

À Ana Paula de Melo Loureiro pela convivência agradável desde a iniciação científica.

À Tedra Mendonça pelos inúmeros conselhos e servir de muro das lamentações muitas vezes.

A todos os colegas e amigos do laboratório do Paolo: Christiane, Clécio, Eduardo, Gláucia, Janice, Lydia e Priscila pela acolhida e amizade.

Ao pessoal da Central Analítica do IQUSP, em especial a Miriam pela atenção e paciência na aquisição dos espectros. Ao Fernando e à Rute pelas dicas e pelo treinamento na operação do espectrômetro.

Aos professores do IQ, especialmente Pio Colepicolo, Luiz H. Catalani, Mari Sogayar, Etelvino H. Bechara, Marina Tavares, Vicente Santelli, Daisy Resende e Teresa M. Miranda por permitirem o acesso a equipamentos ou outros materiais de seus laboratórios e/ou pelas sugestões e/ou conselhos nos corredores do IQ que foram muito importantes no desenvolvimento do projeto.

Ao Dr. Denílson Nogueira de Moraes pelas inúmeras dicas de síntese.

À Patrícia Lopes, amiga desde o meu primeiro dia na USP, pela companhia e apoio durante toda a graduação e pós.

Ao pessoal do laboratório do Pio: o próprio, Ernani, Heloísa, Cristina, Daniela, Keith, Ednaílson, Alcely, Maísa, Antonieta, Adriana, Karina e Marcelo por terem sido meu refúgio muitas vezes e propiciado momentos divertidíssimos.

A todos os demais amigos do IQUSP por terem tornado esse instituto um lugar tão agradável de se trabalhar.

À Sandrine Frelon pela valiosa amizade e por muitos momentos alegres na França.

Ao Dr. Victor Duarte pela amizade, conselhos e muitas vezes por ser o único que falava a minha língua (literalmente) em Grenoble.

Ao Dr. Jean-Luc Ravanat pela amizade e disposição constante em ajudar.

A todos os companheiros do LAN por terem me adotado durante sete meses e tornado minha estadia na França inesquecível: Anne-Gaëlle, Sophie, Evelyne, François, Johann, Jean-Pierre, Christine, Maurice, Francette, Zorah, Natallie (e todos os demais que passaram por lá tão rapidamente que nem deu para memorizar os nomes).

À Colette Lebrun pela simpatia e pelas análises por *ion trap* impecáveis.

Ao Dr. Michel Jaquinot pelas análises por MALDI-TOF.

Ao professores da UFMS, especialmente a Edna Scremin-Dias, a Ângela Zanon e o Valdir Souza pela amizade e por me estimularem a vir para São Paulo buscar uma formação melhor.

Aos meus amigos Robson e Luciano pela convivência agradável, compreensão e apoio nos momentos difíceis.

A toda a minha família, pela preocupação, carinho e apoio em todos os momentos. Aos tios e primos de São Paulo por terem me acolhido como filho ou irmão durante esses oito anos; não teria sido possível chegar até aqui sem vocês.

E finalmente, e em especial, à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa concedida.

Muito obrigado a todos (principalmente aos esquecidos)!

“Até aqui nos ajudou o Senhor” (I Samuel 7:12)

APOIO FINANCEIRO

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

CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

PRONEX/FINEP – Programa de Apoio aos Núcleos de Excelência

PADCT – Programa de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico

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

CEA – Commissariat à l'Energie Atomique/França

Índice

Índice	i
Abreviações	v
Resumo	viii
Abstract	ix
Capítulo 1: Introdução Geral.....	1-1
1.1 O DNA.....	1-2
1.2 Danos no DNA.....	1-3
1.2.1 Lesões promovidas por espécies reativas do oxigênio e do nitrogênio.....	1-4
1.2.1.1 Radical hidroxila	1-4
1.2.1.2 Oxigênio singlete.....	1-6
1.2.1.3 Peroxinitrito.....	1-7
1.3 A lipoperoxidação	1-8
1.3.1 Genotoxicidade de compostos carbonílicos α,β -insaturados	1-10
1.3.2 Lesões promovidas por produtos da lipoperoxidação: Adutos exocíclicos .	1-10
1.4 O <i>trans,trans</i> -2,4-Decadienal (DDE), bases de Schiff e o DNA fluorescente:	
Justificativa Geral	1-12
1.5 Referências Bibliográficas	1-14
Capítulo 2: Caracterização estrutural de adutos 1, <i>N</i> ⁶ -eteno-2'-desoxiadenosina	
promovidos por produtos da lipoperoxidação	2-1
2.1 Introdução.....	2-2
2.1.1 Etenoadutos – Descoberta e Mecanismos de Formação.....	2-2
2.1.2 Formação por aldeídos α,β -insaturados	2-3
2.1.3 O <i>trans,trans</i> -2,4-decadienal (DDE)	2-5
2.2 Objetivos e Justificativas	2-7
2.3 Materiais e Métodos	2-8
2.3.1 Materiais	2-8
2.3.1.1 Reagentes e solventes.....	2-8
2.3.1.2 Diversos	2-8
2.3.2 Métodos	2-9
2.3.2.1 Instrumentais.....	2-9
2.3.2.1.1 Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).....	2-9
2.3.2.1.2 Caracterização espectrofotométrica.....	2-9
2.3.2.1.3 Caracterização fluorimétrica.....	2-9
2.3.2.1.4 Análise por ressonância magnética nuclear (RMN).....	2-10
2.3.2.1.5 Determinação do coeficiente de absorvidade molar.....	2-11
2.3.2.1.6 Análise por espectrometria de massas	2-11
2.3.2.2 Sínteses	2-11
2.3.2.2.1 Purificação do 2,4-decadienal (DDE).....	2-11
2.3.2.2.2 Epoxidação do DDE e 2-octenal.....	2-12
2.3.2.2.3 Síntese e purificação de adutos em larga escala	2-12
2.4 Resultados.....	2-14
2.4.1 Busca de adutos fluorescentes entre os 2'-desoxinucleosídeos e o 2,4-	
decadienal (DDE).....	2-14
2.4.2 Síntese e purificação de adutos formados entre a dA e os produtos do DDE	
oxidado	2-16
2.4.2.1 Otimização da epoxidação do DDE e síntese dos adutos.....	2-16
2.4.2.2 Purificação de adutos formados entre epóxidos do DDE e a 2'-	
desoxiadenosina (dA).....	2-17
2.4.2.2.1 Purificação diastereoisomérica dos adutos I, II e IV	2-18

2.4.3 Caracterização estrutural dos adutos.....	2-19
2.4.3.1 Análise espectrofotométrica	2-19
2.4.3.2 Análise espectrofluorimétrica.....	2-21
2.4.3.3 Análise por espectrometria de massa	2-22
2.4.3.4 Análise por ressonância magnética nuclear (RMN).....	2-26
2.4.3.4.1 Aduto I	2-26
2.4.3.4.2 Aduto II.....	2-29
2.4.3.4.3 Aduto III.....	2-32
2.4.3.4.4 Aduto IV	2-39
2.5 Discussão	2-44
2.6 Conclusão	2-51
2.7 Referências Bibliográfica.....	2-53
Capítulo 3: Detecção de adutos 1, <i>N</i> ⁶ -eteno-2'-desoxiadenosina em DNA.....	3-1
3.1 Introdução.....	3-2
3.1.1 Algumas implicações da detecção de adutos de DNA.....	3-2
3.1.2 Detecção de adutos de DNA.....	3-3
3.1.2.1 ³² P- <i>postlabelling</i>	3-3
3.1.2.1.1 O ³² P- <i>postlabelling</i> e os compostos indógenas	3-3
3.1.2.1.2 Detecção de adutos endógenos através de ³² P- <i>postlabelling</i>	3-5
3.1.2.2 Espectrometria de massa.....	3-6
3.1.2.2.1 Detecção de adutos endógenos por espectrometria de massa com ionização química por captura de elétrons	3-8
3.1.2.2.2 Espectrometria de massa em <i>tandem</i> com ionização por <i>electrospray</i>	3-9
3.1.2.2.3 Detecção de adutos endógenos por espectrometria de massa com ionização por <i>electrospray</i>	3-14
3.2 Objetivos e Justificativas	3-16
3.3 Materiais e Métodos	3-17
3.3.1 Materiais	3-17
3.3.1.1 Reagentes e solventes	3-17
3.3.1.2 Diversos	3-17
3.3.2 Métodos	3-18
3.3.2.1 Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).....	3-18
3.3.2.2 Síntese dos aldeídos e dos epóxidos.....	3-18
3.3.2.2.1 Epoxidação do DDE e 2-octenal	3-18
3.3.2.2.2 Síntese e epoxidação do HNE	3-19
3.3.2.2.3 Quantificação de 2-octenal, HNE e DDE	3-19
3.3.2.3 Síntese e purificação de adutos marcados isotopicamente com ¹⁵ N. 3-19	
3.3.2.3.1 Síntese dos adutos I, II, III e IV.....	3-19
3.3.2.3.2 Síntese de ¹⁵ N ₅ -εdA	3-20
3.3.2.4 Reação de 2-octenal, HNE e DDE na presença de H ₂ O ₂ com DNA de timo de bezerro <i>in vitro</i>	3-20
3.3.2.5 Análise dos hidrolisados do DNA tratado <i>in vitro</i> por HPLC/Fluorescência e HPLC/ESI-MS	3-21
3.3.2.6 Estudos de espectrometria de massa	3-21
3.3.2.6.1 Caracterização química	3-21
3.3.2.6.2 Detecção.....	3-21
3.3.2.7 Acoplamento de espectrometria de massa com cromatografia líquida (LC/MS).....	3-22
3.3.2.8 Análise de DNA <i>in vivo</i>	3-23
3.3.2.8.1 Tratamento de ratos com solução de nitrilotriacetato de ferro (Fe-NTA)	3-23
3.3.2.9 Isolamento e hidrólise do DNA.....	3-24
3.3.2.10 Pré-purificação do DNA e análise do por HPLC/ESI-MS/MS	3-25

3.4 Resultados.....	3-26
3.4.1 Formação de adutos na reação dos produtos de oxidação do DDE com DNA <i>in vitro</i>	3-26
3.4.2 Quantificação do nível de adutos formado na reação entre o 2-octenal, HNE e DDE com DNA <i>in vitro</i>	3-27
3.4.3 Desenvolvimento de um método de detecção por HPLC/ESI-MS/MS	3-30
3.4.3.1 Síntese de padrões internos enriquecidos isotopicamente com ¹⁵ N .	3-30
3.4.3.2 Desenvolvimento de um método de detecção por HPLC/ESI-MS/MS ..	3-32
3.4.3.2.1 Ajuste das condições de análise por MRM.....	3-32
3.4.3.2.2 Interfaceamento HPLC/MS.....	3-35
3.4.3.2.3 Curvas de calibração	3-37
3.4.3.3 Análise de DNA de tecidos de animais	3-39
3.5 Discussão	3-43
3.6 Conclusão	3-46
3.7 Referências Bibliográficas	3-47
Capítulo 4: Incorporação de um aduto em oligonucleotídeos e estudo de algumas propriedades biológicas	4-1
4.1 Introdução.....	4-2
4.1.1 Síntese de oligonucleotídeos	4-2
4.1.2 Princípios gerais da síntese de oligonucleotídeos.....	4-2
4.1.2.1 Proteção P ₁ - Dimetoxitritil	4-3
4.1.2.2 Proteção P ₂ - Fosforamidita	4-4
4.1.2.3 Proteção P ₃	4-5
4.1.2.4 Síntese de oligonucleotídeos em suporte sólido.....	4-6
4.1.2.5 Ciclo de condensação na síntese pelo método da fosforamidita.....	4-7
4.1.2.6 Desproteção dos oligonucleotídeos	4-8
4.1.3 Incorporação de adutos de DNA em oligonucleotídeos.....	4-8
4.1.4 Propriedades mutagênicas dos etenoadutos	4-10
4.1.5 Reparo dos etenoadutos por excisão de base	4-11
4.2 Objetivos e Justificativas	4-13
4.3 Materiais e Métodos	4-14
4.3.1 Materiais	4-14
4.3.1.1 Reagentes e solventes.....	4-14
4.3.1.2 Enzimas.....	4-14
4.3.1.3 Diversos	4-15
4.3.2 Métodos	4-16
4.3.2.1 Cromatografias.....	4-16
4.3.2.1.1 Cromatografia em camada delgada.....	4-16
4.3.2.2 Ressonância magnética nuclear (RMN).....	4-18
4.3.2.3 Espectrometria de massa.....	4-18
4.3.2.3.1 Ionização por <i>electrospray</i>	4-18
4.3.2.3.2 MALDI-TOF	4-18
4.3.2.4 Epoxidação do 2-octenal	4-19
4.3.2.5 Síntese em larga escala do aduto III	4-19
4.3.2.6 Síntese em larga escala da edA	4-20
4.3.2.7 Preparação dos síntons fosforamidita.....	4-20
4.3.2.7.1 Aduto III (vide Figura 4.10)	4-20
4.3.2.7.2 edA (vide Figura 4.16).....	4-22
4.3.2.8 Síntese, desproteção e purificação dos oligonucleotídeos.....	4-23
4.3.2.9 Caracterização dos oligonucleotídeos	4-25
4.3.2.9.1 Espectrometria de massa com interface <i>electrospray</i>	4-25
4.3.2.9.2 MALDI	4-25
4.3.2.9.3 Digestões enzimáticas por nuclease P1 e fosfatase alcalina	4-25

4.3.2.9.4 Marcação dos oligonucleotídeos com ^{32}P	4-26
4.3.2.9.5 Tratamento dos oligonucleotídeos com piperidina e NH_4^+	4-26
4.3.2.10 Hibridação dos oligonucleotídeos para ensaios de reparo	4-26
4.3.2.11 Ensaios de reparo	4-26
4.3.2.11.1 FPG e Endo III	4-26
4.3.2.11.2 Alk A	4-27
4.3.2.12 Estudos de replicação <i>in vitro</i>	4-27
4.4 Resultados	4-29
4.4.1 Aperfeiçoamento da epoxidação do 2-octenal	4-29
4.4.2 Síntese em larga escala do aduto III para a síntese de oligonucleotídeos	4-30
4.4.3 Estudos da estabilidade do aduto III nas condições de síntese dos oligonucleotídeos e consequências sobre as escolhas dos grupos protetores	4-30
4.4.4 Estratégias de proteção do aduto III	4-31
4.4.4.1 Exploração das diferenças de reatividades entre os grupos OH	4-32
4.4.4.2 Proteção simultânea dos grupos 3' e 5'-OH	4-35
4.4.4.2.1 Proteção da 2'-desoxirribose	4-36
4.4.4.2.2 Proteção da base	4-36
4.4.4.2.3 Desproteção da base	4-37
4.4.4.2.4 Preparação do derivado 5'-O-dimetoxitritilado	4-38
4.4.4.2.5 Preparação do sinton fosforamidita	4-39
4.4.5 Síntese do sinton da edA	4-41
4.4.6 Síntese, desproteção e purificação dos oligonucleotídeos	4-41
4.4.7 Caracterização dos oligonucleotídeos	4-43
4.4.7.1 Análise por PAGE analítico	4-43
4.4.7.2 Análise por espectrometria de massas	4-44
4.4.7.2.1 ESI-MS	4-44
4.4.7.2.2 MALDI-TOF	4-45
4.4.7.3 Hidrólise enzimática dos oligonucleotídeos por nuclease P1 e fosfatase alcalina	4-46
4.4.8 Estudos de reparo do aduto III por glicosilases	4-48
4.4.9 Replicação <i>in vitro</i>	4-49
4.5 Discussão	4-51
4.6 Conclusão	4-57
4.7 Referências Bibliográficas	4-58
Curriculum vitae	b
Trabalhos Publicados	d

Abreviações

A (ou Ade)	adenina
Ac	acetila
ACN	acetonitrila
ADP	adenosina-5'-difosfato
Aduto I	(1-[3-(2-desoxi-β-D-eritro-pentofuranosil)-3H-imidazo [2,1-i]purin-7-il]-1,2,3-octanotriol)
Aduto II	(1-[3-(2-desoxi-β-D-eritro-pentofuranosil)-3H-imidazo [2,1-i]purin-7-il]-1,2-heptanodiol)
Aduto III	(1-[3-(2-desoxi-β-D-eritro-pentofuranosil)-3H-imidazo [2,1-i]purin-7-il]-1-hexanol)
Aduto IV	(1-[3-(2-desoxi-β-D-eritro-pentofuranosil)-3H-imidazo [2,1-i]purin-7-il]-2,3-epoxi-1-octanol)
AMB	2-(acetoximetil)benzoila
AP	sítio abásico (apurínico ou apirimidínico)
APCI	<i>atmospheric pressure chemical ionization</i>
API	<i>atmospheric pressure ionization</i>
ATP	adenosina-5'-trifosfato
C (ou Cit)	citosa
C ₁₈	octadecilsilila
(5'R ou S)-ciclodA	5',8-ciclo-2'-desoxiadenosina (isômero R ou S)
(5'R ou S)-ciclodG	5',8-ciclo-2'-desoxiguanosina (isômero R ou S)
COSY	<i>correlation spectroscopy</i>
CPG	<i>controlled pore glass</i>
Da	daltons
dA	2'-desoxiadenosina
dC	2'-desoxicitidina
DDE	trans,trans-2,4-decadienal
DEPT	<i>distortion-less enhancement by polarization transfer</i>
dG	2'-desoxiguanosina
dI	2'-desoxiinosina
DIEA	diisopropiletilamina
DMAP	4-dimetilaminopiridina
DMSO	dimetilsulfóxido
DMTr	4,4'-dimetoxitritila
DNA	ácido desoxirribonucleico
D ₂ O	óxido de deutério
DSS	3-trimetilsilil-1-propanosulfonato de sódio
dT	2'-desoxitimidina
ε	eteno
ECCI	<i>electron capture chemical ionization</i>
EDTA	ácido etilenotriaminotetracético
Endo IV	endonuclease IV de <i>E. coli</i>
ESI	<i>electrospray ionization</i>
Exo III	exonuclease III de <i>E. coli</i>
FAD	flavina adenina dinucleotídeo

FapiAde	4,6-diamino-5-formamidopirimidina
FapidA	4,6-diamino-5-formamidopirimidina-2'-desoxirribose
FapiGua	4,6-diamino-4-hidroxi-5-formamidopirimidina
FMN	flavina mononucleotídeo
5-FordUrd	5-formil-2'-desoxiuridina
FPG	formamidopirimidina DNA N-glicosilase
FT	transformada de Fourier
G (ou Gua)	guanina
GC	<i>gas chromatography</i>
HETCOR	<i>heteronuclear correlation spectroscopy</i>
5-HmdUrd	5-(hidroximetil)-2'-desoxiuridina
HNE	4-hidroxi- <i>trans</i> -2-nonenal, ou 4-OH-nonenal
HMBC	<i>heteronuclear multiple-bond connectivities</i>
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
HMQC	<i>heteronuclear multiple quantum coherence</i>
iBu	isobutirila
IpPac	isopropilfenoxiacetila
Kf	fragmento Klenow da polimerase I de <i>E. coli</i>
L•	radical lipídico
LC	<i>liquid chromatography</i>
LO•	radical alcóxila
LOO•	radical peróxila
LOOH	hidroperóxido lipídico
MALDI	<i>matrix-assisted laser desorption ionization</i>
m ³ A	3-metil-adenina
MDA	malonaldeído
M ₁ G	pirimidopurinona
MRM	<i>multiple reaction monitoring</i>
MS	<i>mass spectrometry</i>
MS/MS	<i>tandem mass spectrometry</i>
1,N ⁶ -εdA ou εdA	1,N ⁶ -eteno-2'-desoxiadenosina
3,N ⁴ -εdC ou εdC	3,N ⁴ -eteno-2'-desoxicitidina
1,N ² -εdG	1,N ² -eteno-2'-desoxiguanosina
N ² ,3-εdG	N ² ,3-eteno-2'-desoxiguanosina
8-nitro-dG	8-nitro-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina
OD	<i>optical density</i>
5-OH-dC	5-hidroxi-2'-desoxicitidina
4-OH-8-oxo-dG	4-hidroxi-8-oxo-4,8-dihidro-2'-desoxiguanosina
ONOO ⁻	peroxinitrito
8-OOH-dG	8-hidroperoxi-2'-desoxiguanosina
8-oxodAdo	8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiadenosina
8-oxo-dG	8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina
5'-OH-dC	5'-hidroxi-2'-desoxicitidina
5'-OH-dU	5'-hidroxi-2'-desoxiuridina
Pac	Fenoxiacetila
PAGE	<i>polyacrylamide gel electrophoresis</i>
p-BQ	p-benzoquinona
PdG	propanodesoxiguanosina
PEI	polietilenoimina

Pol β	polimerase β
RMN	ressonância magnética nuclear
SPE	<i>solid-phase extraction</i>
UV	ultravioleta
T (ou Tim)	timina
Taq pol	DNA polimerase de <i>Taq</i>
TBAF	fluoreto de <i>tert</i> -butilamônio
TEA	trietilamina
TFA	ácido trifluoroacético
ThdGli	5,6-dihidroxy-5,6-dihidrotimidina
THF	tetrahidrofurano
TIPDSCl ₂	cloreto de 1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diila
TLC	<i>thin layer chromatography</i>
TOF	<i>time of flight</i>
Torr	torricelli
Tris	tris(hidroximetil)aminometano

Resumo

Compostos carcinogênicos estruturalmente diversos ligam-se covalentemente ao DNA formando adutos que, se não reparados, provocam mutações. Inicialmente relacionados apenas a compostos exógenos, atualmente há várias evidências de que compostos gerados endogenamente poderiam modificar o DNA gerando adutos. Dentre os compostos endógenos, os produtos carbonílicos α,β -insaturados destacam-se pois reagem como agentes alquilantes bifuncionais com as bases do DNA, formando adutos exocíclicos.

O 2,4-decadienal (DDE) é um aldeído α,β -insaturado que além de estar presente em alimentos e poluentes, é um dos mais importantes produtos da lipoperoxidação. Embora há várias indicações sobre a ação genotóxica do DDE, nenhum aduto deste composto com nucleobases havia sido caracterizado.

O presente trabalho mostrou que o DDE é um agente alquilante versátil sendo capaz de gerar cinco adutos diferentes. Este estudo também mostrou que o DDE é capaz de gerar os mesmos adutos que outros dois importantes produtos da lipoperoxidação: o 4-OH-nonenal e o 2-octenal.

Todos os adutos foram detectados em DNA tratado *in vitro* com o DDE. Para possibilitar a detecção dos adutos em sistemas mais complexos, foi desenvolvido um método extremamente sensível baseado em HPLC interfaceado com espectrometria de massa em *tandem* com ionização por *electrospray*.

Foi também desenvolvida uma estratégia de incorporação de um dos adutos (III) em oligonucleotídeos por via química. A estratégia foi utilizada com sucesso na incorporação do aduto em oligonucleotídeos de sequências diversas. Os oligonucleotídeos foram utilizados em ensaios de reparo por excisão de base e replicação *in vitro*.

Abstract

Structurally diverse carcinogenic compounds bind covalently to DNA producing adducts that can, if not repaired, lead to mutations. Firstly restricted to exogenous compounds, nowadays there are evidences that compounds endogenously generated can modify DNA forming adducts. Among these endogenous compounds, α,β -unsaturated carbonyl products are of special interest due their reactivity as bifunctional alkylating agents towards DNA bases leading to exocyclic adducts.

2,4-decadienal (DDE) is an α,β -unsaturated aldehyde that in addition to be present in food and pollutants, it is one of the most important lipid peroxidation products. Despite of many indications about the DDE genotoxic properties, there was no information about adducts produced between this compounds and nucleobases.

This work showed DDE as a versatile DNA alkylating agent being able to generate five different adducts. This study also showed that DDE can generate the same adducts produced from two other important lipid peroxidation products: 4-OH-nonenal and 2-octenal.

All adducts were detected in DNA treated *in vitro* with DDE. To allow adduct detection in more complex systems, we developed a highly sensitive method based on HPLC coupled to electrospray/tandem mass spectrometry.

A strategy to incorporate one adduct (III) into oligonucleotides was also developed. The strategy was successfully applied in the adduct incorporation into diverse sequences of oligonucleotides. They were utilized in base excision repair and *in vitro* replication experiments.

Capítulo 1: Introdução Geral

1.1 O DNA

O ácido desoxirribonucleico (DNA) possui um papel central na vida celular por ser o repositório da informação hereditária. Essa informação é preservada ao longo das gerações celulares através da replicação, onde o DNA sofre duplicação gerando moléculas idênticas à original. O DNA determina também de uma maneira exata e específica a síntese das proteínas que são características de cada atividade e tipo celular.

O DNA é uma molécula heteropolimérica formada por duas cadeias polinucleotídicas antiparalelas enroladas helicoidalmente uma em torno da outra (dupla hélice) ¹. Essas cadeias têm seu esqueleto constituído por ácido fosfórico e o açúcar 2'-desoxirribose, conectados por ligações éster entre o ácido fosfórico e as hidroxilas das posições C-3' e C-5' do açúcar. À desoxirribose encontram-se ligadas também uma das quatro bases heterocíclicas: adenina e guanina (purinas), e citosina e timina (pirimidinas) (Figura 1.1) com o carbono C-1'.

As duas cadeias polinucleotídicas na dupla hélice estão associadas através de pontes de hidrogênio entre as bases nitrogenadas (Figura 1.2). Em condições usuais, a guanina (G) liga-se especificamente apenas com a citosina (C) enquanto que a adenina (A), liga-se especificamente apenas com a timina (T). Tais interações são chamadas de pareamento das bases e as bases pareadas (C com G ou A com T) são ditas complementares.

O esqueleto açúcar-fosfato se encontra na porção externa da molécula e porta cargas negativas nos grupos fosfato. As bases localizam-se no interior da molécula como estruturas planas perpendiculares ao eixo da hélice. Elas estabilizam a dupla hélice através das pontes de hidrogênio entre as bases complementares e através de interações hidrofóbicas resultantes do empilhamento das bases.

Figura 1.1: Estrutura de um segmento de DNA

Figura 1.2: Representação das pontes de hidrogênio entre as bases complementares

1.2 Danos no DNA

Como qualquer macromolécula biológica, a vida do DNA não é ilimitada ². A integridade da molécula do DNA é ameaçada por diversos agentes externos e internos. Entretanto, essa idéia é recente. Até meados da década de 80 o foco das atenções eram as lesões originadas por xenobióticos como hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, aminas aromáticas, nitrosaminas, drogas anti-tumorais de primeira geração e também aquelas oriundas da ação de radiações ultravioleta (UV-A, B e C) e ionizantes (X e γ). Os pesquisadores naquele período eram incapazes de detectar lesões no DNA

em tecidos não tratados, o que os levou a pensar que o DNA genômico de animais e humanos normais era isento de lesões. Um fato que abalou bastante a idéia do DNA intocável foi a constatação que mesmo na ausência de agentes agressores o DNA se decompõe espontaneamente dentro de cada célula. Uma das alterações espontâneas mais freqüentes é a clivagem da ligação glicosídica entre a desoxirribose e a base. Estima-se que cada célula humana perde entre 2000 e 10000 bases purínicas por dia ³. O resultado desse processo é a geração de os sítios apurínicos e apirimidínicos que induzem quebra da cadeia por eliminação β ^{4,5}. Outra alteração espontânea importante é a desaminação ^{6,7,8}.

O desenvolvimento de métodos analíticos ultra-sensíveis mostrou que além da instabilidade química intrínseca da molécula do DNA, um nível basal de danos no DNA pode ser verificado em tecidos de animais e humanos normais. Isso indica que agentes internos, como produtos gerados no metabolismo energético celular, são capazes de danificar o DNA.

1.2.1 Lesões promovidas por espécies reativas do oxigênio e do nitrogênio

Indispensável à vida aeróbica, o oxigênio pode ser em algumas circunstâncias deletério à célula devido a formação de espécies altamente reativas e capazes de interagir com diversas biomoléculas, incluindo o DNA. Recentemente foi verificado que algumas espécies reativas de nitrogênio também são formadas *in vivo* e poderiam contribuir significativamente nos processos de danos no DNA.

1.2.1.1 Radical hidroxila

Dentre as espécies reativas de oxigênio, o radical hidroxila ($\text{HO}^\bullet$) merece destaque pela multiplicidade de produtos que ele é capaz de gerar reagindo com o DNA (Figura 1.3). Sua produção em organismos vivos é atribuída principalmente à redução do peróxido de hidrogênio por Fe^{+2} (reação de Fenton) ⁹. Esse radical por sua alta reatividade pode interagir com várias porções do DNA, danificando-o.

O radical hidroxila pode se adicionar nas posições 4, 5 e 8 das purinas. Por exemplo, a adição do HO• à posição 8 da dG produz um intermediário radicalar que pode por sua vez gerar 2,6-diamino-4-hidroxi-5-formamidopirimidina (Fapi-dG) ¹⁰ após oxidação e protonação e 8-oxo-2'-desoxiguanosina (8-oxo-dG) ¹¹ após redução. Embora não seja necessariamente o produto de oxidação do DNA mais abundante, a 8-oxo-dG tem sido a mais extensivamente estudada devido simplesmente à facilidade com a qual pode ser medida em tecidos e fluidos biológicos. Outra ação do HO• é a abstração de elétrons, por exemplo, atacando o açúcar, leva a formação de um radical centrado no carbono 5' da dG ou dA e este por sua vez, ataca a dupla ligação C-8,N-7 formando os produtos (5'*R* ou *S*)-ciclodG ¹² e (5'*R* ou *S*)-ciclodA ¹³.

As pirimidinas são também atacadas pelo HO• gerando diversos produtos. A timina, por exemplo, pode sofrer abstração de elétron ou do grupo metila. Os radicais gerados são convertidos em vários peróxidos que posteriormente são decompostos em timina-glicóis ¹⁴. Similarmente, às purinas, as pirimidinas também podem sofrer adições do HO• às duplas ligações. A citosina por exemplo, é convertida a 5-OH-dC após ataque do HO• na dupla ligação C-5,C-6 ¹⁵.

Figura 1.3: Alguns dos produtos gerados pela reação do radical hidroxila com as bases do DNA.

1.2.1.2 Oxigênio singlete

O oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), espécie eletronicamente excitada do oxigênio molecular, pode ser gerado em vários eventos de relevância biológica como a fotossensibilização do oxigênio molecular por moléculas como a riboflavina e seus derivados (FMN e FAD), clorofilas, bilirrubina, retinal e várias porfirinas (livres ou ligadas a proteínas)¹⁶.

Ao contrário do $\text{HO}^\bullet$, o oxigênio singlete é bastante seletivo ao reagir com o DNA. A modificação da dGuo por $^1\text{O}_2$ já é bem conhecida^{17,18,19} e acredita-se que a reação ocorre através de uma cicloadição Diels-Alder (Figura 1.4). A decomposição do endoperóxido correspondente pode originar dois produtos, o 4-hidroxi-8-oxo-4,8-dihidro-2'-desoxiguanosina (4-OH-8-oxo-dG) e o 8-hidroperoxi-2'-desoxiguanosina (8-OOH-dG). O último, após sofrer redução origina a 8-oxo-dG.

Figura 1.4: Mecanismo de formação da 8-oxo-2'-desoxiguanosina e 4-OH-8-oxo-2'-desoxiguanosina pelo ataque oxigênio singlete a 2'-desoxiguanosina.

1.2.1.3 Peroxinitrito

O peroxinitrito ($ONOO^-$) é um agente oxidante extremamente poderoso gerado pela reação do óxido nítrico com o ânion superóxido. A partir de duas constatações infere-se que o $ONOO^-$ pode desempenhar um papel bastante relevante *in vivo*: a eficiência com a qual o óxido nítrico e o superóxido reagem produzindo o $ONOO^-$ ($k \sim 7 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) e o fato de que podem ser produzidos simultaneamente por células como macrófagos, neutrófilos, células de Kupffer, neurônios e endoteliais ^{20,21}.

O padrão de produtos gerados pelo peroxinitrito é complexo. Embora os produtos principais sejam a 8-oxo-dG e a 8-nitro-dG, o $ONOO^-$ reage ainda mais eficientemente com esses produtos gerando vários outros produtos de oxidação ²² (Figura 1.5).

Figura 1.5: Produtos gerados pela oxidação da dG pelo peroxinitrito²²

1.3 A lipoperoxidação

Devido a sua abundância, os ácidos graxos polinsaturados são um dos principais alvos do ataque de radicais livres em células. Esse ataque desencadeia um processo conhecido como lipoperoxidação que funciona como uma cascata autocatalítica e pode ser dividido em três etapas: iniciação, propagação e terminação ^{23,24} (Figura 1).

Figura 1.6: Esquema das etapas da lipoperoxidação ²⁴

Tal processo é iniciado por espécies como o radical hidroxila que possuem reatividade suficiente para abstrair um átomo de hidrogênio de um grupo metileno adjacente a uma insaturação,. O radical $L^\bullet$ formado na abstração do átomo de hidrogênio sofre rearranjo molecular formando um dieno conjugado. Sob condições aeróbicas, o radical $L^\bullet$ combina-se com O_2 originando um radical peróxido ($LOO^\bullet$) que por sua vez pode abstrair um $H^\bullet$ de outro ácido graxo, formando um hidroperóxido ($LOOH$) e outro $L^\bullet$, propagando assim a reação ²⁴. O Fe^{+2} pode catalisar a decomposição do hidroperóxido em radical alcóxido ($LO^\bullet$) e ânion hidroxila. Finalmente, o radical alcóxido pode sofrer decomposição por cisão β gerando uma mistura extremamente complexa de produtos incluindo aldeídos, cetonas, epóxidos e hidrocarbonetos ^{24,23}.

A peroxidação lipídica tem sido relacionada com vários eventos biológicos importantes, como danos celulares causados pela administração de xenobióticos ^{25,26}, com pigmentos associados ao envelhecimento ^{27,28}, à doenças vasculares ^{29,30} e ao câncer ^{24,31}.

Estes efeitos deletérios em sistemas biológicos têm sido associados com os radicais peroxila e alcoxila e os hidroperóxidos lipídicos produzidos durante as etapas iniciais e intermediárias do processo ³². Entretanto, a atenção de vários grupos tem se voltado para produtos não radicalares do processo de lipoperoxidação. Esses produtos finais são mais estáveis do que os radicais livres que iniciaram a peroxidação lipídica e os radicais lipídicos formados durante o processo. Por esta razão podem difundir-se de sua origem (membranas) e alcançar e atacar alvos intra ou extracelular que estão distantes do local em que foram formados e atuariam como segundos mensageiros tóxicos dos radicais livres ³³.

Muitos dos produtos finais da lipoperoxidação são altamente reativos e tem sido demonstrado que podem reagir diretamente com o DNA e causar danos genéticos ou serem metabolizados a epóxidos, conhecidos como agentes alquilantes de DNA com alta atividade mutagênica ^{33,34,35,36}. Entre estes compostos, os mais importantes e mais extensivamente estudados são os aldeídos. O resultado final da lipoperoxidação é dependente da composição da membrana envolvida, na tabela 1.1, estão relacionados os produtos carbonílicos identificados por Esterbauer ³⁷ no clássico modelo de lipoperoxidação de microsossomos de fígado de rato estimulada por ADP-Fe⁺².

n-alcenais	2-alcenais	hidroxialcenais	outros
propanal	acroleína	4-hidroxihexenal	malondialdeído
butanal	pentenal	4-hidroxiocetenal	2,4-heptadienal
pentanal	hexenal	4-hidroxinonenal	2,4-decadial
hexanal	heptenal	4-hidroxiundecenal	hidroxiocetenal
	octenal	4-hidroxi-2,5-nonadienal	butanona
		4,5-dihidroxiundecenal	2-pentanona
			3-pentanona
			2-octanona

Tabela 1.1: Produtos carbonílicos provenientes da peroxidação lipídica de microsossomos de fígado de rato na presença de NADPH, ADP-ferro. Modificado de Esterbauer ³⁷.

1.3.1 Genotoxicidade de compostos carbonílicos α,β -insaturados

Dentre os produtos finais da lipoperoxidação, os carbonílicos α,β -insaturados destacam-se. A conjugação da dupla ligação à carbonila torna-os eficientes agentes eletrofílicos e conseqüentemente podem reagir com macromoléculas biológicas nucleofílicas, como as bases dos ácidos nucleicos³⁸.

Vários destes compostos como a acroleína³⁹, o crotonaldeído⁴⁰, a metil vinil cetona³⁵, a 2-ciclohexen-1-ona⁴¹, os 2-alcenais, os 2,4-alcadienais, e os 4-hidroxiacetalcenais³⁹, são mutagênicos. Isso foi verificado através do teste de Ames, utilizando *Salmonella typhimurium* sem ativação metabólica.

Em eucariotos foi demonstrado que malonaldeído (MDA) provoca aumento de mutações em células de linfoma⁴² e produz vários danos ao DNA em fibroblastos em cultura⁴³. Acroleína induziu efeitos genotóxicos em células epiteliais bronquiais⁴⁴ e mutagênese em fibroblastos de *Xeroderma pigmentosum* humana⁴⁵. Foram verificados vários efeitos do 4-hidroxinonenal (HNE) em células de ovário de hamster em cultura como fragmentação e troca de cromátides irmãs³⁴, mutagênese em células pulmonares de hamster V 79⁴⁶ e danos no DNA de hepatócitos em concentrações equivalentes às encontradas *in vivo*³⁶.

Em sistemas *in vivo*, detectou-se que uma dieta com ácidos graxos polinsaturados oxidados aumenta a taxa de tumores mamários em camundongos⁴⁷. O MDA mostrou-se carcinogênico em ratos e camundongos⁴⁸.

1.3.2 Lesões promovidas por produtos da lipoperoxidação: Adutos exocíclicos

Os adutos exocíclicos são modificações covalentes no DNA resultantes do ataque de compostos eletrofílicos bifuncionais. Tais modificações envolvem os sítios das bases que geralmente estão envolvidas nas pontes de hidrogênio que mantêm a estrutura de dupla hélice do DNA⁴⁹. Tais adutos consistem na adição de um anel de 5 ou 6 membros com vários graus de insaturação às bases: adenina, citosina ou guanina (Figura 1.7). Os tipos de

adutos mais amplamente estudados até o momento são: os derivados do malonaldeído, os propano- e os eteno (ϵ)-adutos.

Figura 1.7. Estruturas de alguns adutos exocíclicos.

O malonaldeído (MDA) é um dos mais abundantes produtos gerados pela lipoperoxidação ⁵⁰. O MDA é capaz de reagir com a adenina, citosina e guanina, sobretudo com a última, formando adutos do tipo pirimidopurinona (M₁dG) ⁵¹ (Figura 1.8).

Figura 1.8. Reação do MDA com a dGuo formando o aduto pirimidopurinona.

Os propano adutos são formados a partir de alcenais como a acroleína, o crotonaldeído e o *trans*-4-hidroxi-2-nonenal (HNE). Eles foram pela primeira vez caracterizados na reação da desoxiguanosina com o crotonaldeído, onde foram encontrados um par de diastereoisômeros da 1,N²-propanodesoxiguanosina ⁵². Posteriormente foi demonstrada a generalidade da formação de propanoadutos por enais via adição de Michael com a acroleína ⁵³ e outros enais de cadeia mais longa como o 2-hexenal e o HNE ⁵⁴ (Figura 1.9).

Figura 1.9: Reação entre alcenais e a guanina via adição de Michael, resultando na formação de propanoadutos.

Embora os alcenais sejam compostos relativamente reativos, eles podem ter sua reatividade aumentada se forem oxidados a epoxialdeídos. A reação de epoxialdeídos com as bases do DNA resulta na formação de etenoadutos. Essa classe de adutos de DNA tem recebido atenção especial de vários grupos de pesquisa no mundo por sua relação com vários compostos carcinogênicos. Os mecanismos de formação e outras propriedades dos etenoadutos serão discutidos no capítulo seguinte.

1.4 O *trans,trans*-2,4-Decadienal (DDE), bases de Schiff e o DNA fluorescente: Justificativa Geral

Existem numerosas possibilidades de se modificar a estrutura do DNA. Tais modificações podem disparar processos patológicos como mutagênese e carcinogênese. Dentre os agentes potencialmente modificadores do DNA, os produtos da lipoperoxidação têm recebido atenção de vários grupos de pesquisa, pois como são formados *in vivo* podem constituir uma fonte endógena e constante de lesão no DNA.

Entretanto praticamente todos os estudos feitos até o início desse projeto envolviam apenas dois dos produtos da lipoperoxidação: o malonaldeído (MDA) e o 4-hidroxinonenal (HNE). Algumas constatações nos motivaram a estudar um terceiro aldeído gerado na lipoperoxidação, o *trans,trans*-2,4-decadienal (DDE). Experimentos realizados no laboratório do Prof. Rogério Meneghini em colaboração com o nosso grupo mostraram que o tratamento de células em culturas com um complexo de ferro, sabidamente forte indutor da lipoperoxidação, tornava o DNA dessas células fluorescente.

As características de fluorescência exibida ($\lambda_{\text{exc}} = 310 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{emis}} = 420 \text{ nm}$) eram bastante próximas daquelas de produtos do tipo base de Schiff³⁷. Alguns autores também haviam constatado a formação de produtos fluorescentes na reação de produtos da oxidação de ácidos graxos (metil linoleato e linolato) com o DNA *in vitro*⁵⁵. O mesmo grupo estudou a formação de compostos fluorescentes pela reação de produtos de oxidação do metil linoleato com o DNA e verificou que dentre eles, dois aldeídos se destacavam, o DDE e o 2-octenal^{56,57}. Os autores tentaram caracterizar quimicamente os produtos fluorescentes, mas não obtiveram sucesso.

Tais indícios sugeriam uma correlação entre a lipoperoxidação e a fluorescência gerada no DNA. Portanto nosso objetivo inicial era a caracterização de algum produto que poderia ser responsável pela fluorescência no DNA. O DDE parecia ser um candidato bastante interessante para esse estudo e a caracterização de algum aduto fluorescente formado entre esse aldeído e o DNA não só responderia a questão inicial como também possibilitaria a utilização do mesmo como marcador da lesão no DNA promovida pela lipoperoxidação.

Portanto nesse trabalho procuramos responder a essas questões inicialmente levantadas e a outras que surgiram no desenvolvimento do projeto. Como três etapas bastante distintas foram realizadas, elas serão apresentadas separadamente em três capítulos.

No capítulo seguinte, são apresentados os estudos envolvendo a caracterização química dos adutos formados entre o DDE e a 2'-desoxiadenosina.

O terceiro capítulo é dedicado à detecção dos adutos, especialmente ao desenvolvimento de um método de detecção dos adutos por cromatografia líquida de alta performance associada à espectrometria em *tandem* com ionização por *electrospray* de elétrons.

Uma estratégia de incorporação de um dos adutos em DNA sintético por via química e alguns estudos de propriedades biológicas do aduto incorporado em oligonucleotídeos são apresentados no último capítulo.

1.5 Referências Bibliográficas

1. Watson, J. D. , Crick, F. H. C. (1953) Molecular Structure of Nucleic Acids - a Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature* **171**, 737-738.
2. Lindahl, T. (1993) Instability and Decay of the Primary Structure of DNA. *Nature* **362**, 709-715.
3. Lindahl, T. , Nyberg, B. (1972) Rate of Depurination of Native Deoxyribonucleic Acid. *Biochemistry* **11**, 3610-3618.
4. Lindahl, T. , Andersson, A. (1972) Rate of Chain Breakage at Apurinic Sites in Double-Stranded Deoxyribonucleic Acid. *Biochemistry* **11**, 3618-3623.
5. Jones, A. S., Mian, A. M., Walker, R. T. (1968) Alkaline Degradation of Deoxyribonucleic Acid Derivatives. *Journal of the Chemical Society C-Organic* 2042-&.
6. Lindahl, T. , Nyberg, B. (1974) Heat-Induced Deamination of Cytosine Residues in Deoxyribonucleic Acid. *Biochemistry* **13**, 3405-3410.
7. Lindahl, T. (1979) DNA Glycosylases, Endonucleases for Apurinic/Apyrimidinic Sites, and Base Excision-Repair. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* **22**, 135-192.
8. Ehrlich, M., Zhang, X. Y., Inamdar, N. M. (1990) Spontaneous Deamination of Cytosine and 5-Methylcytosine Residues in DNA and Replacement of 5-Methylcytosine Residues With Cytosine Residues. *Mutation Research* **238**, 277-286.
9. Fenton, H. J. H. (1894) Oxidation of Tartaric Acid in Presence of Iron. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* **65**, 899-910.
10. Hems, G. (1960) Chemical Effects of Ionizing Radiation on Deoxyribonucleic Acid in Dilute Aqueous Solution. *Nature* **186**, 710-712.
11. Steenken, S. (1989) Purine-Bases, Nucleosides, and Nucleotides - Aqueous-Solution Redox Chemistry and Transformation Reactions of Their Radical Cations and E- and OH Adducts. *Chemical Reviews* **89**, 503-520.
12. Dizdaroglu, M. (1986) Free-Radical-Induced Formation of an 8,5'-Cyclo-2'-Deoxyguanosine Moiety in Deoxyribonucleic-Acid. *Biochemical Journal* **238**, 247-254.
13. Keck, K. Z. (1968) Formation of Cyclonucleotides During Irradiation of Aqueous Purine Nucleotide Solutions. *Zeitschrift Fur Naturforschung Part B-Chemie Biochemie Biophysik Biologie Und Verwandten Gebiete* **B 23**, 1034-&.
14. Wagner, J. R., Vanlier, J. E., Berger, M., Cadet, J. (1994) Thymidine Hydroperoxides - Structural Assignment, Conformational Features, and Thermal-Decomposition in Water. *Journal of the American Chemical Society* **116**, 2235-2242.

15. Ekert, B. , Monier, R. (1960) Effects of X-Rays on Cytosine in Aerated Aqueous Solution. *Nature* **188**, 309-310.
16. Frimer, A. A. (1985) Singlet Molecular Oxygen, Ed. , , 1985.
17. Cadet, J., Berger, M., Douki, T., Morin, B., Raoul, S., Ravanat, J. L. , Spinelli, S. (1997) Effects of UV and Visible Radiation on DNA-Final Base Damage. *Biological Chemistry* **378**, 1275-1286.
18. Sies, H. , Menck, C. F. (1992) Singlet Oxygen Induced DNA Damage. *Mutation Research* **275**, 367-375.
19. Ravanat, J. L., Di Mascio, P., Martinez, G. R., Medeiros, M. H., Cadet, J. (2000) Singlet Oxygen Induces Oxidation of Cellular DNA. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 40601-40604.
20. Assreuy, J., Cunha, F. Q., Epperlein, M., Noronha-Dutra, A., O'Donnell, C. A., Liew, F. Y., Moncada, S. (1994) Production of Nitric Oxide and Superoxide by Activated Macrophages and Killing of Leishmania Major. *European Journal of Immunology* **24**, 672-676.
21. Linares, E., Augusto, O., Barao, S. C., Giorgio, S. (2000) Leishmania Amazonensis Infection Does Not Inhibit Systemic Nitric Oxide Levels Elicited by Lipopolysaccharide in Vivo. *Journal of Parasitology* **86**, 78-82.
22. Burney, S., Niles, J. C., Dedon, P. C., Tannenbaum, S. R. (1999) DNA Damage in Deoxynucleosides and Oligonucleotides Treated With Peroxynitrite. *Chemical Research in Toxicology* **12**, 513-520.
23. Halliwell, B. , Gutteridge, J. M. C. (1999) Free Radicals in Biology and Medicine. **3**, 86-87.
24. Vaca, C. E., Wilhelm, J., Harms-Ringdahl, M. (1988) Interaction of Lipid Peroxidation Products With DNA. A Review. *Mutation Research* **195**, 137-149.
25. Wills, E. D. (1969) Lipid Peroxide Formation in Microsomes. Relationship of Hydroxylation to Lipid Peroxide Formation. *Biochemical Journal* **113**, 333-341.
26. Corongiu, F. P., Lai, M., Milia, A. (1983) Carbon Tetrachloride, Bromotrichloromethane and Ethanol Acute Intoxication. New Chemical Evidence for Lipid Peroxidation in Rat Tissue Microsomes. *Biochemical Journal* **212**, 625-631.
27. Sohal, R. S. , Brunk, U. T. (1989) Lipofuscin As an Indicator of Oxidative Stress and Aging. *Advances in Experimental Medicine and Biology* **266**, 17-26.
28. Eldred, G. E., Miller, G. V., Stark, W. S., Feeney-Burns, L. (1982) Lipofuscin: Resolution of Discrepant Fluorescence Data. *Science* **216**, 757-759.
29. Nilsson, J. (1991) [Atherosclerosis--the Molecular Background]. *Lakartidningen* **88**, 127-129.

30. Kramer, J. H., Misik, V., Weglicki, W. B. (1994) Lipid Peroxidation-Derived Free Radical Production and Postischemic Myocardial Reperfusion Injury. *Annals of the New York Academy of Sciences* **723**, 180-196.
31. Cerutti, P. A. (1985) Prooxidant States and Tumor Promotion. *Science* **227**, 375-381.
32. Coffey, M. D., Cole, R. A., Colles, S. M., Chisolm, G. M. (1995) In Vitro Cell Injury by Oxidized Low Density Lipoprotein Involves Lipid Hydroperoxide-Induced Formation of Alkoxyl, Lipid, and Peroxyl Radicals. *Journal of Clinical Investigation* **96**, 1866-1873.
33. Esterbauer, H., Schaur, R. J., Zollner, H. (1991) Chemistry and Biochemistry of 4-Hydroxynonenal, Malonaldehyde and Related Aldehydes. *Free Radical Biology and Medicine* **11**, 81-128.
34. Brambilla, G., Sciaba, L., Faggin, P., Maura, A., Marinari, U. M., Ferro, M., Esterbauer, H. (1986) Cytotoxicity, DNA Fragmentation and Sister-Chromatid Exchange in Chinese Hamster Ovary Cells Exposed to the Lipid Peroxidation Product 4-Hydroxynonenal and Homologous Aldehydes. *Mutation Research* **171**, 169-176.
35. Lutz, D., EDER, E., Neudecker, T., Henschler, D. (1982) Structure-Mutagenicity Relationship in Alpha,Beta-Unsaturated Carbonylic Compounds and Their Corresponding Allylic Alcohols. *Mutation Research* **93**, 305-315.
36. Esterbauer, H., Eckl, P., Ortner, A. (1990) Possible Mutagens Derived From Lipids and Lipid Precursors. *Mutation Research* **238**, 223-233.
37. Esterbauer, H. (1986) Lipid Peroxidation Products: Formation, Chemical Properties and Biological Activities.
38. Chung, F. L., Roy, K. R., Hecht, S. S. (1988) A Study of Chemical Carcinogenesis. 104. A Study of Reactions of Alpha,Beta-Unsaturated Carbonyl-Compounds With Deoxyguanosine. *Journal of Organic Chemistry* **53**, 14-17.
39. Khudoley, V. V., Mizgireuv, I., Pliss, G. B. (1987) The Study of Mutagenic Activity of Carcinogens and Other Chemical Agents With Salmonella Typhimurium Assays: Testing of 126 Compounds. *Archiv Fur Geschwulstforschung* **57**, 453-462.
40. Marnett, L. J., Hurd, H. K., Hollstein, M. C., Levin, D. E., Esterbauer, H., Ames, B. N. (1985) Naturally Occurring Carbonyl Compounds Are Mutagens in Salmonella Tester Strain TA104. *Mutation Research* **148**, 25-34.
41. Chung, F. L., Tanaka, T., Hecht, S. S. (1986) Induction of Liver Tumors in F344 Rats by Crotonaldehyde. *Cancer Research* **46**, 1285-1289.
42. Yau, T. M. (1979) Mutagenicity and Cytotoxicity of Malonaldehyde in Mammalian Cells. *Mechanisms of Ageing and Development* **11**, 137-144.
43. Bird, R. P., Draper, H. H. (1980) Effect of Malonaldehyde and Acetaldehyde on Cultured Mammalian Cells: Growth, Morphology, and Synthesis of Macromolecules. *Journal of Toxicology and Environmental Health* **6**, 811-823.

44. Grafstrom, R. C., Dypbukt, J. M., Willey, J. C., Sundqvist, K., Edman, C., Atzori, L., Harris, C. C. (1988) Pathobiological Effects of Acrolein in Cultured Human Bronchial Epithelial Cells. *Cancer Research* **48**, 1717-1721.
45. Curren, R. D., Yang, L. L., Conklin, P. M., Grafstrom, R. C., Harris, C. C. (1988) Mutagenesis of Xeroderma Pigmentosum Fibroblasts by Acrolein. *Mutation Research* **209**, 17-22.
46. Cajelli, E., Ferraris, A., Brambilla, G. (1987) Mutagenicity of 4-Hydroxynonenal in V79 Chinese Hamster Cells. *Mutation Research* **190**, 169-171.
47. Tinsley, I. J., Schmitz, J. A., Pierce, D. A. (1981) Influence of Dietary Fatty Acids on the Incidence of Mammary Tumors in the C3H Mouse. *Cancer Research* **41**, 1460-1465.
48. Spalding, J. W. (1988) Toxicology and Carcinogenesis Studies of Malondialdehyde Sodium Salt (3-Hydroxy-2-Propenal, Sodium Salt in F344/N Rats and B6C3F1 Mice. *National Toxicology Program Series* **331**, 5-13.
49. Bartsch, H. (1986) The Role of Cyclic Nucleic Acid Base Adducts in Carcinogenesis and Mutagenesis. *IARC Scientific Publications* 3-14.
50. Liu, J. K., Yeo, H. C., Doniger, S. J., Ames, B. N. (1997) Assay of Aldehydes From Lipid Peroxidation: Gas Chromatography Mass Spectrometry Compared to Thiobarbituric Acid. *Analytical Biochemistry* **245**, 161-166.
51. Marnett, L. J. (1994) DNA Adducts of Alpha,Beta-Unsaturated Aldehydes and Dicarboxyl Compounds. *IARC Scientific Publications* 151-163.
52. Chung, F. L., Hecht, S. S. (1983) Formation of Cyclic 1,N2-Adducts by Reaction of Deoxyguanosine With Alpha-Acetoxy-N-Nitrosopyrrolidine, 4-(Carbethoxynitrosamino)Butanal, or Crotonaldehyde. *Cancer Research* **43**, 1230-1235.
53. Chung, F. L., Young, R., Hecht, S. S. (1984) Formation of Cyclic 1,N2-Propanodeoxyguanosine Adducts in DNA Upon Reaction With Acrolein or Crotonaldehyde. *Cancer Research* **44**, 990-995.
54. Winter, C. K., Segall, H. J., Haddon, W. F. (1986) Formation of Cyclic Adducts of Deoxyguanosine With the Aldehydes Trans- 4-Hydroxy-2-Hexenal and Trans-4-Hydroxy-2-Nonenal in Vitro. *Cancer Research* **46**, 5682-5686.
55. Fujimoto, K., Neff, W. E., Frankel, E. N. (1984) The Reaction of DNA With Lipid Oxidation Products, Metals and Reducing Agents. *Biochimica Et Biophysica Acta* **795**, 100-107.
56. Frankel, E. N., Neff, W. E., Brooks, D. D., Fujimoto, K. (1987) Fluorescence Formation From the Interaction of DNA With Lipid Oxidation Degradation Products. *Biochimica Et Biophysica Acta* **919**, 239-244.
57. Hasegawa, K., Fujimoto, K., Kaneda, T., Frankel, E. N. (1988) Characterization of Fluorescent Products From Reaction of Methyl Linoleate Hydroperoxides With Adenine in the Presence of Fe²⁺ and Ascorbic Acid. *Biochimica Et Biophysica Acta* **962**, 371-376.

**Capítulo 2: Caracterização estrutural de
adutos 1,*N*⁶-eteno-2'-desoxiadenosina
promovidos por produtos da
lipoperoxidação**

2.1 Introdução

2.1.1 Etenoadutos – Descoberta e Mecanismos de Formação

Devido as suas relações com compostos químicos comprovadamente carcinogênicos como o cloreto de vinila e o uretano, os etenoadutos (Figura 2.1) tem sido uma das classes de adutos exocíclicos de DNA mais extensivamente estudada ¹.

Os etenoadutos foram pela primeira vez sintetizados em 1971 por Kochetkov e colaboradores ao reagir *N*-9-metiladenina e a *N*-1-metilcitosina com o cloroacetaldeído obtendo respectivamente 1,*N*⁶-ε-*N*-9-metiladenina e 3,*N*⁴-ε-*N*-1-metilcitosina ². Posteriormente outros autores descreveram a forte fluorescência exibida pela 1,*N*⁶-ε-2'-desoxiadenosina (εdA) principalmente, e também em menor grau pela 3,*N*⁴-ε-2'-desoxicitina (εdC) ³. A fluorescência agregada aos nucleosídeos e coenzimas como o ATP foi utilizada como *probe* em estudos bioquímicos ⁴. O cloroacetaldeído também reage diretamente com a guanina, produzindo dois adutos: 1,*N*²-etenoguanina e *N*²,3-etenoguanina (Figura 2.1) ⁵.

Figura 2.1: Estrutura do etenoadutos formados na reação entre o cloroacetaldeído e os nucleosídeos desoxiadenosina, desoxicitidina e desoxiguanosina. dR = desoxiribose.

Os compostos formadores de eteno adutos podem ser divididos em dois grupos segundo a necessidade de serem convertidos a intermediários mais reativos ou não. Os aldeídos α-halogenados (como o anteriormente mencionado cloroacetaldeído), α-halocetonas e o ácido mucoclórico reagem diretamente com as bases *in vitro*. Os haletos de vinila, os haloalcanos, aldeídos α,β-insaturados e vários outros produtos com potencial de formar

etenoadutos precisam ser previamente convertidos a intermediários mais reativos. Esta ativação pode ser feita *in vivo* pelas enzimas do grupo citocromo P₄₅₀, principalmente pela subforma 2E1, que parece ser o principal catalisador da oxidação do cloreto de vinila, bem como do brometo de vinila, acrilonitrila e vinil carbamato ⁶. O metabólito formado, o haloxirano, pode sofrer rearranjo produzindo o haloacetaldeído, entretanto, há evidências apontando o primeiro como sendo o mais relevante no processo, por ser altamente reativo (Figura 2.2) ⁷.

Figura 2.2: Via proposta para a formação de etenoadutos (como exemplo a 3,N⁴-edC) por haloacetaldéidos.

2.1.2 Formação por aldeídos α,β -insaturados

Aldeídos α,β -insaturados também podem, após serem ativados aos epóxidos correspondentes, reagir com nucleosídeos produzindo etenoadutos. Nair e Offerman ⁸ verificaram que a reação do epóxido do crotonaldeído com a guanosina produziu 1,N²-edG com um rendimento de 40%. Similarmente, o glicidaldeído, o epóxido da acroleína também forma um 1,N²-eduto substituído após sua reação com a guanosina ⁹. O mecanismo proposto por Nair e Offerman para a reação entre os epoxialdeídos e a guanina envolveria a adição nucleofílica do grupo amino exocíclico da guanina ao carbono aldeídico do epóxido e ciclização *via* ataque nucleofílico do nitrogênio 1 ao

carbono do epóxido produzindo um intermediário que, após desidratação, origina os etenoadutos (Figura 2.3).

Figura 2.3: Mecanismo para a formação de etenoadutos por aldeídos α,β-insaturados.

A relevância dos etenoadutos foi largamente ampliada pelos trabalhos de Sodum e Chung que mostraram que o *trans*-4-hidroxinonenal (HNE), após oxidação era também capaz de formar etenoadutos ao reagir *in vitro* com a desoxiguanosina ¹⁰ e com a desoxiadenosina ¹¹. A importância de tais trabalhos reside no fato de que, pela primeira vez, foi mostrado que um composto formado endogenamente também era capaz de gerar esse tipo de lesão. Conseqüentemente, além de estarem relacionados com compostos carcinogênicos exógenos, tais adutos poderiam ser formados por produtos do metabolismo e contribuir nos processos carcinogênicos espontâneos.

Suporte adicional a essa hipótese foi fornecido pelo trabalho de El Ghissassi e colaboradores ¹² que mostrou uma relação direta entre a lipoperoxidação e a formação de etenoadutos. Os autores verificaram que a incubação de uma suspensão de microssomas de fígado de rato na presença de agentes indutores de lipoperoxidação com nucleotídeos levava à formação de edA e edC *in vitro*.

O epóxido correspondente do HNE, o 4-hidroxi-2,3-epoxinonenal, é capaz de formar além da edA e edC, etenoadutos substituídos com o grupo dihidroxiheptila. Devido à escassez de informações acerca de outros produtos

da lipoperoxidação, a responsabilidade da formação dos etenoadutos *in vivo* tem sido atribuída primordialmente ao HNE.

2.1.3 O *trans,trans*-2,4-decadienal (DDE)

Embora o HNE mereça destaque pela sua abundância e toxicidade, há diversos outros aldeídos potencialmente perigosos dentre os produtos da lipoperoxidação. Nosso trabalho concentrou-se em outro produto, o *trans,trans*-2,4-decadienal (DDE).

O DDE é um aldeído amplamente distribuído no ambiente. Ele tem sido encontrado como um contaminante na água ¹³, como aromatizante natural em plantas ^{14,15}, e como aromatizante em vários tipos de alimento como peixe ¹⁶, frango ¹⁷, carne ¹⁸ e pão ¹⁹. O DDE pode ser encontrado ainda na constituição de secreções defensivas de insetos ²⁰ e pode ser gerado também, enzimaticamente a partir de ácidos graxos polinsaturados pela ação de lipoxigenases de plantas ²¹.

Entretanto, além de sua importância ambiental, o DDE tem despertado interesse principalmente por ser um dos principais aldeídos gerados pela lipoperoxidação *in vitro* ^{22,23} e *in vivo* ²⁴. Kaneko e colaboradores ²⁵ estudando o efeito citotóxico de vários produtos da lipoperoxidação em células endoteliais humanas em cultura, verificaram que o DDE foi o mais tóxico dentre os produtos testados. Outros efeitos deletérios do DDE foram verificados por outros grupos como inibição do crescimento celular, depleção de glutathione e fragmentação do DNA ²⁶.

Alguns trabalhos anteriores ao nosso tentaram caracterizar produtos da reação do DDE com o DNA. Esses estudos foram iniciados pela observação da formação de compostos fluorescentes entre produtos da oxidação do linolenato com o DNA. Fujimoto e colaboradores ²⁷, detectaram a formação de produtos com espectro de fluorescência com $\lambda_{exc}=315$ nm e $\lambda_{emis}=420$ nm, na reação entre epidióxidos hidroperóxidos do linolenato e o DNA na presença de metais e agentes redutores. Tais epidióxidos hidroperóxidos são os precursores de 2,4-alcadienais ²⁸. Dentre os produtos da oxidação do linolenato, mostrou-se que os 2,4-alcadienais e o 2,4,7-decatrienal eram os

principais responsáveis pela formação de produtos fluorescentes ²⁸. Hasegawa e colaboradores ²⁹ mostraram posteriormente que o DDE e o 2-octenal, dentre os produtos de oxidação do linolenato, eram os mais eficientes na formação de produtos fluorescentes. Os mesmos autores verificaram que os dois aldeídos reagem mesmo na ausência de Fe^{+2} e ascorbato, sugerindo uma reação direta com o DNA. Esses autores obtiveram alguns dados espectroscópicos dos produtos e propuseram estruturas tentativas (Figura 2.4).

Figura 2.4: Estruturas propostas por Hasegawa e colaboradores. ²⁹ para os produtos fluorescentes formados na reação entre produtos do metil linoleato e a adenina.

2.2 Objetivos e Justificativas

As lesões em DNA estão implicadas em diversas patologias humanas, inclusive o câncer. Até recentemente, assumia-se que as principais fontes de danos em DNA eram os agentes químicos exógenos. Entretanto, cada vez mais surgem evidências de que em células normais, existem adutos de DNA formados por substâncias endógenas, como as produzidas pelo metabolismo oxidativo. Os produtos secundários da peroxidação lipídica são de interesse especial, pois não seriam simplesmente remanescentes ou produtos finais da lipoperoxidação, mas segundos mensageiros tóxicos e amplificadores da ação de radicais livres nas células. Há um número crescente de publicações mostrando a ação genotóxica dos aldeídos gerados na lipoperoxidação, especialmente do malonaldeído e do 4-hidroxinonenal, entretanto, pouca atenção tem sido dada a outros produtos da lipoperoxidação como o *trans,trans*-2,4-decadienal (DDE). O DDE tem sido reportado como um dos mais tóxicos dentre os produtos da lipoperoxidação. Embora haja várias indicações sobre a ação genotóxica do DDE, nenhum aduto deste composto com nucleobases foi até o presente caracterizado. Por esta razão este trabalho visa nesta primeira fase, a determinação da ação do 2,4-decadienal sobre o DNA, através da síntese, purificação e caracterização de adutos formados *in vitro*, pela reação deste aldeído com a desoxiadenosina. A caracterização de adutos formado pela reação do DDE com o DNA é um passo indispensável no prosseguimento dos estudos da genotoxicidade deste aldeído e de outros produtos relacionados.

2.3 Materiais e Métodos

2.3.1 Materiais

2.3.1.1 Reagentes e solventes

Todos os reagentes utilizados eram do mais alto grau de pureza disponível comercialmente.

Aldrich (Milwaukee, USA): *trans,trans*-2,4-Decadienal, *trans*-2-octenal, 3-trimetilsilil-1-propanosulfonato de sódio (DSS), Amberlyst 15, D₂O 99,9% e peneiras moleculares de 3 Å;

Fluka (Bucks, Switzerland): Metanol-d₄;

Merck (Darmstadt, Germany): 2'-Desoxiadenosina;

EM Science (Gibbstown, USA): Solventes em grau gradiente para cromatografia (acetonitrila, tetrahidrofurano, diclorometano e metanol);

Trans-4-OH-nonenal foi fornecido por Thierry Douki (CEA/Grenoble, França).

2.3.1.2 Diversos

Millipore (Bedford, USA): A água utilizada em todos os experimentos foi tratada com o sistema milli-Q. Membranas de filtração de nylon e PTFE Durapore 0,22 mm e Millex-GV₄ 0,22 µm;

Sigma (St. Louis, USA): Todos os demais reagentes, solventes e enzimas não mencionados acima.

2.3.2 Métodos

2.3.2.1 Instrumentais

2.3.2.1.1 Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

Foram utilizados dois tipos de sistemas Shimadzu (Kyoto - Japan). O primeiro era composto de duas bombas LC-10AD, injetor Rheodyne, detector de série de fotodiodos SPD-M10AV e detector de fluorescência RF-535, todos estes componentes eram controlados por um "Communication Bus Module CBM-10A" e software CLASS LC-10AWS. O segundo era constituído de duas bombas LC-6AD, injetor Rheodyne, detector de série de fotodiodos SPD-M10AVP, detector de fluorescência RF-10AXL controlados pelo módulo SCL-10AVP e software CLASS-VP.

Os seguintes sistemas de eluição foram utilizados:

Sistema 1: Coluna Lichrosorb C_{18} 10 μ 250 x 4,0 mm com regime isocrático de água e acetonitrila, na proporção 85:15 a um fluxo de 1 mL/min.

Sistema 2: coluna Bondclone C_{18} 10 μ 300 x 7,8 mm (Phenomenex, Torrance - USA) com gradiente binário de tampão formiato de amônio 50 mM e acetonitrila, fluxo de 1,5 mL/min, variando de 5 a 30% a proporção de acetonitrila utilizando-se a curva 5 em 50 minutos e a seguir mantendo em 30% por mais 30 minutos.

Sistema 3: coluna Bondclone C_{18} 10 μ 300 x 7,8 mm com regime isocrático de água e acetonitrila, na proporção de 70:30 e fluxo de 1,5 mL/min.

2.3.2.1.2 Caracterização espectrofotométrica

Além dos espectros obtidos através do detector de fotodiodos em série Shimadzu SPD-M10AV durante as análises em HPLC, foram obtidos espectros dos adutos em diferentes pHs utilizando um espectrofotômetro Hitachi U3000 (Hitachi, Tokyo - Japan), acoplados a um PC Pentium 100 MHz controlado por software específico.

2.3.2.1.3 Caracterização fluorimétrica

Os espectros de fluorescência dos produtos foram obtidos utilizando-se um espectrofluorímetro Spex 1681 Spectrometer (Spex, Edison, USA), com fendas de 1.0 mm.

Os valores de rendimentos quânticos de fluorescência (Φ_F) dos adutos foram determinados segundo o método de Demas & Crosby ³⁰. Este método consiste na comparação das áreas de emissão fluorescente do composto desconhecido em relação a um composto de referência cujo Φ_F seja conhecido, excitando-se ambos no mesmo comprimento de onda. Deve-se ainda, corrigir o valor pelas diferentes absorções neste comprimento de onda e pelo índice de refração do solvente, quando comparado em dois solventes diferentes. O experimento é feito mantendo-se a mesma geometria de excitação e leitura e a uma mesma temperatura.

$$\Phi_F^x = \Phi_F^r \cdot \frac{I^x}{I^r} \cdot \frac{B^r}{B^x} \left[\frac{n^x}{n^r} \right]^2 \quad \text{onde,}$$

I é a intensidade de emissão integrada;

B é a absorção da solução no comprimento de onda de excitação;

n é o índice de refração do solvente;

x, refere-se ao composto analisado e

r, refere-se ao composto de referência.

Foi utilizado o triptofano como composto de referência pois possui intervalos de excitação e emissão próximos aos dos adutos e também é solúvel em água ³¹. Todos os compostos (triptofano e adutos) foram dissolvidos em tampão fosfato de sódio 25 mM pH 7,2. Foi utilizado o comprimento de onda de 293 nm (intersecção dos espectros de excitação dos adutos e do triptofano) para a excitação e foram registrados espectros de emissão de 310 a 550 nm.

2.3.2.1.4 Análise por ressonância magnética nuclear (RMN)

Os espectros de FT-RMN foram adquiridos usando os espectrômetros Bruker Avance Series DPX-300 e DRX-500 MHz a 20°C. Nos espectros obtidos em D₂O, as amostras eram tratadas com D₂O 99,8 % e liofilizadas repetidas vezes para eliminar a H₂O contaminante e finalmente dissolvidas em D₂O 100%. Nos espectros obtidos em d₆-DMSO, as amostras dissolvidas em água

eram liofilizadas, dissolvidas em d_6 -DMSO 100% e tratadas com peneiras moleculares de 3A previamente ativadas em estufa a 200°C por 2 horas. Todas as amostras foram filtradas através de filtros Millex-GV₄ 0,22 µm.

2.3.2.1.5 Determinação do coeficiente de absortividade molar

Foram preparados três tubos de RMN contendo concentrações diferentes de 3-trimetilsilil-1-propanosulfonato de sódio (DSS; 0.1, 0.2 e 0.5 mg) e do aduto ADIII (alíquotas de 10, 25 e 50 µL) em um volume final de 500 µL de D₂O. Os espectros foram adquiridos a 300 MHz a 20°C utilizando-se um tempo de relaxamento de 3 segundos para tornar a integração dos picos mais precisa. A quantidade em mg do aduto foi estimada comparando-se as áreas dos picos do DSS (0.00, 0.61, 1.71 e 2.85 ppm) e os respectivos números de prótons com as áreas dos picos do aduto. A seguir foram retiradas alíquotas de 100 µL dos tubos que foram diluídas em água e analisadas por UV. Relacionando-se as absorbâncias e as concentrações calculadas por RMN, foram obtidos os coeficientes de absortividade molares.

2.3.2.1.6 Análise por espectrometria de massas

Espectros de massa por ionização por *electrospray* (ESI/MS) foram obtidos em um espectrômetro Platform (Fisons Instruments, Manchester, UK) no modo positivo. Uma mistura de água e acetonitrila [1:1] foi usada como o eluente a um fluxo de 5 µL/min. As amostras (1 µg/µL) foram dissolvidas em ácido fórmico a 0.25% em água/acetonitrila 1:1. Tipicamente uma alíquota de 10 µL foi injetada a cada análise.

2.3.2.2 Sínteses

2.3.2.2.1 Purificação do 2,4-decadienal (DDE)

O DDE adquirido da Aldrich a 85% de pureza foi purificado através de HPLC utilizando-se o sistema 1. O composto é eluído a 12 minutos nestas condições e foi concentrado a um décimo do volume através de *speed-vac*. O DDE foi extraído com CH₂Cl₂ por 3 vezes e novamente concentrado por *speed-*

vac até a total remoção do CH_2Cl_2 e diluído em acetonitrila. A concentração foi determinada espectrofotometricamente ($\lambda_{\text{max}}=274\text{nm}$, $\epsilon_{\text{max}} 31400 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

2.3.2.2.2 Epoxidação do DDE e 2-octenal

Na epoxidação por dioxirano gerado *in situ*, 5 mmol de DDE (700 μL) ou de octenal (746 μL) foram dissolvidos em 37,5 mL de acetonitrila e a esta solução adicionou-se 25 mL de EDTA 0,4 mM. A mistura foi resfriada a $0-1^\circ\text{C}$ e 5 mL de trifluorometilacetona foram adicionados com uma seringa pré-resfriada. A seguir, sob agitação contínua e durante 2 horas uma mistura de bicarbonato de sódio (38,75 mmol - 3,25g) e oxone (25 mmol - 15,38 g) foi adicionada. Após 3 horas, adicionou-se 150 mL de água à solução resultante e em seguida esta foi extraída com diclorometano (2 x 50mL). Após serem combinados, os extratos orgânicos foram secos com MgSO_4 e concentrados sob fluxo de N_2 .

Na epoxidação do DDE ou 2-octenal por peróxido de hidrogênio alcalino, foram adicionados 5 mmol de DDE ou de octenal, 1,44 mL de H_2O_2 30% (15 mmol) e 5 mL de acetonitrila em um frasco com circulação interna de água e agitação magnética. A mistura foi resfriada a 15°C e 0,42 mL de NaOH 6 M (2,5 mmol) foram adicionados gota a gota durante 1 hora. A seguir, a temperatura foi elevada a 25°C e a solução foi incubada sob agitação por mais 8 horas. Ao final da incubação foram adicionados 5 mL de água e os produtos foram extraídos com CH_2Cl_2 (2 x 4 mL). Os extratos orgânicos foram combinados, lavados com 1 volume de água, secos sobre MgSO_4 e concentrados sob fluxo de nitrogênio.

2.3.2.2.3 Síntese e purificação de adutos em larga escala

Foram incubados 150 mg (0,6 mmol) de desoxiadenosina com 1,62 mL de DDE epoxidado por dioxirano gerado *in situ* ou 0,75 mL de octenal epoxidado em 48 mL de tampão fosfato 100 mM pH 7,4 e 12 mL de acetonitrila, sob agitação de 250 rpm por 5 dias a 50°C .

Ao final da incubação o excesso dos aldeídos que não reagiu foi extraído com 1 volume de diclorometano por 3 vezes. As soluções foram a

seguir, liofilizadas em um liofilizador Labconco Lyphe-Lock 12 e o resíduo dissolvido em cerca de 10 mL água/acetonitrila 60:40. As amostras foram filtradas através de membranas Durapore 0,22 µm (Millipore, Bedford - USA), antes de serem injetadas em HPLC.

A solução obtida foi purificada inicialmente pelo sistema 2. Neste sistema os adutos **I**, **II**, **III** e **IV** foram eluídos a 7,0, 7,6, 8,9 e 10,4 minutos respectivamente. As frações coletadas foram liofilizadas, redissolvidas no menor volume possível de água/acetonitrila 70:30 e repurificadas através do sistema 3. As frações foram novamente liofilizadas, redissolvidas em água e reinjetadas no sistema 3 com refluxo. Neste tipo de purificação, assim que as amostras começavam a ser eluídas da coluna, as válvulas de reciclo eram fechadas e acompanhava-se a análise até que houvesse resolução ao nível de linha de base dos picos correspondentes aos isômeros. Então, o sistema era aberto e os picos coletados.

2.4 Resultados

2.4.1 Busca de adutos fluorescentes entre os 2'-desoxinucleosídeos e o 2,4-decadienal (DDE)

Alvo perseguido por vários meses de trabalho, a obtenção de adutos fluorescentes da reação direta do DDE com a dA não foi alcançada apesar das indicações da literatura ²⁹. Entretanto, em uma das tentativas de síntese, ao utilizar como solvente do DDE o THF de um certo frasco, verificamos a formação de vários produtos fortemente fluorescentes. Posteriormente verificamos que esse THF havia acumulado uma grande quantidade de peróxidos, o que foi atestado por um teste com KI. A adição de outros peróxidos orgânicos como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o peróxido de *tert*-butila produziam resultados equivalentes. Na Figura 2-5, observa-se os cromatogramas obtidos da análise dos produtos gerados pela reação do DDE com a dA na ausência e na presença de H_2O_2 . A reação praticamente é inexistente na ausência de peróxidos enquanto que na presença dos mesmos, verifica-se a formação de vários produtos fluorescentes.

Foram feitas reações dos quatro 2'-desoxinucleosídeos com o DDE na presença de peróxidos e verificou-se que de fato, a dA é a responsável pela fluorescência observada, como pode ser constatado na figura 2.6.

Figura 2.5: Separação por HPLC (sistema 1) com detecção fluorimétrica dos produtos da reação entre o DDE e os 2'-desoxiadenosina (dA) na ausência e na presença de H₂O₂.

Figura 2.6: Separação por HPLC (sistema 1) com detecção fluorimétrica dos produtos da reação entre o DDE e os 2'-desoxinucleosídeos na presença de H₂O₂. dA = 2'-desoxiadenosina ; dC = 2'-desoxicitidina ; dG = 2'-desoxiguanosina ; dT = timidina.

2.4.2 Síntese e purificação de adutos formados entre a dA e os produtos do DDE oxidado

Uma vez verificado que a dA era o nucleosídeo responsável pela fluorescência observada na reação entre o DDE oxidado e o DNA, o passo seguinte foi otimizar as condições de síntese com o intuito de aumentar o rendimento dos adutos e permitir o isolamento de quantidades que tornassem a caracterização espectroscópica viável.

2.4.2.1 Otimização da epoxidação do DDE e síntese dos adutos

Os rendimentos das primeiras sínteses nas quais a epoxidação do DDE era promovida por peróxidos contaminantes do THF ou pela adição de peróxidos ao meio de reação eram muito baixos (<1%). Isso dificultou enormemente a obtenção de quantidades suficientes de produtos para as caracterizações espectroscópicas. Portanto, a otimização da síntese era um passo imprescindível para o prosseguimento do projeto. O rendimento baixo devia-se provavelmente a ineficiência da epoxidação do DDE. Além disso, o contato de peróxidos com o nucleosídeo e com os produtos poderia levar a degradação dos mesmos dificultando a identificação dos compostos gerados diretamente pelos produtos da oxidação do DDE. Alcenos conjugados a grupos sacadores de elétrons como a carbonila, são dificilmente oxidados por epoxidantes como os peroxiácidos ³² e conseqüentemente, a epoxidação por peróxidos orgânicos em meio alcalino é um dos mais utilizados. O meio alcalino é necessário para a desprotonação do peróxido possibilitando assim a adição nucleofílica (Figura 2.7).

Figura 2.7: Mecanismo envolvido na epoxidação de compostos carbonílicos α,β -insaturados por peróxidos em meio alcalino.

2.4.2.2 Purificação de adutos formados entre epóxidos do DDE e a 2'-desoxiadenosina (dA)

Na figura 2.8 está representado um cromatograma típico da mistura de reação entre a dA e o DDE epoxidado por H_2O_2 em meio alcalino. Nessas condições, cinco produtos fluorescentes foram observados. O produto eluído a 45 minutos foi identificado como sendo a 1, N^6 - ϵ -desoxiadenosina (ϵ dA) por coeluição com o padrão comercial. Observa-se que além da ϵ dA quatro principais produtos fluorescentes e hidrofóbicos são formados na reação, eles foram provisoriamente designados como adutos **I**, **II**, **III** e **IV**.

Para a caracterização química dos novos produtos, seria necessária a obtenção de vários miligramas dos mesmos. A purificação dos adutos foi uma etapa bastante longa e trabalhosa. Partindo de sínteses utilizando centenas de miligramas de dA e DDE, obteve-se após purificação dos produtos por HPLC cerca de 3, 2, 15 e 10 mg dos produtos **I**, **II**, **III** e **IV**, respectivamente.

Figura 2.8: Separação por HPLC semipreparativa (sistema 2) com detecção por absorbância e fluorimetria dos produtos da reação entre o DDE e a dA na presença de H_2O_2 .

2.4.2.2.1 Purificação diastereoisomérica dos adutos I, II e IV

Os adutos purificados **I**, **II** e **IV** quando reanalisados por diferentes sistemas de HPLC exibiam picos largos e de difícil resolução. Como a análise por espectrometria de massa (apresentada mais adiante) revelava que todos os possíveis subcomponentes possuíam a mesma massa, acreditamos que tais adutos consistiam de uma mistura de isômeros. A separação dos subcomponentes foi possível através de um sistema de HPLC com válvulas que permitem o reciclo da fase móvel, fazendo com que os analitos possam passar diversas vezes pela coluna, simulando assim diversas colunas ligadas em série. A cada passagem pela coluna, a separação dos picos é aumentada e após um certo número de passagens a resolução é completa (Figura 2.9). Entretanto, nesse processo de repurificação ocorre uma grande perda de massa dos produtos e só obtivemos quantidades suficientes dos subprodutos de **I** e **IV** para análise espectroscópica após purificação diastereoisomérica.

Figura 2.9: Separação dos dois isômeros do aduto **IV** por HPLC com sistema de refluxo.

2.4.3 Caracterização estrutural dos adutos

2.4.3.1 Análise espectrofotométrica

Os produtos obtidos na reação entre os epóxidos do DDE e a dA apresentam características espectrofotométricas idênticas entre si. O espectro de UV é bastante característico (Figura 2.10) e difere daquele da dA ($\lambda_{\text{max}}=260$ nm), apresentando uma estrutura fina com picos de absorção máxima a 232, 261, 268, 278 e 300 nm. O composto apresenta ainda uma alteração marcante no espectro em função do pH, abaixo de 4 o espectro apresenta apenas dois picos a 277 e 224 nm. Acompanhando-se o espectro em vários pHs (Figura 2.10) pode se observar que a mudança do espectro ocorre entre os pHs 4 e 3. O produto é instável em pHs acima de 10, sendo completamente decomposto em menos de 30 minutos neste pH (Figura 2.11).

Os dados de UV sugerem fortemente similaridade estrutural entre este composto e etenoadutos. O espectro dos adutos é bastante próximo daquele da 1,*N*⁶-etenoadenina (ϵA)^{33,3} porém com um deslocamento batocrômico de 3 nm que indica a presença de um substituinte alquila no anel eteno. A ϵA apresenta também a alteração no espectro entre os pHs 4 e 3, o que coincide com a protonação do nitrogênio exocíclico ($pK_a=3,9$). Outro dado espectrofotométrico que indica semelhanças estruturais entre os adutos e a ϵA , é a decomposição destes produtos em pHs alcalinos, dado também apontado por Secrist e colaboradores^{33,3}.

Figura 2.10: Espectro de absorção no UV do aduto I em diferentes pHs.

Figura 2.11: Cinética de decomposição do aduto I em pH 10.

2.4.3.2 Análise espectrofluorimétrica

Há algumas evidências na literatura ^{34,29} apontando a formação de produtos fluorescentes na reação do DDE com nucleobases e DNA, entretanto tais produtos não tinham sido ainda caracterizados. A fluorescência apresentada por tais produtos (comprimento máximo de emissão a 420 nm quando excitados a 335 nm) tem sido atribuída na literatura à formação de compostos via base de Schiff ^{27,35 29}.

As características de fluorescência apresentadas por estes produtos, entretanto, não são exclusivas de compostos contendo base de Schiff. Os etenoadutos também apresentam características espectroscópicas similares. A ϵA , apresenta um máximo de emissão em cerca de 415 nm quando excitadas a 300 nm ³.

Na figura 2.12, observa-se o espectro fluorescência típico exibido pelos produtos. Os compostos são fortemente fluorescentes sendo possível obter espectros de soluções de concentração menor que 100 μM . Eles apresentam um máximo de emissão a 414 nm quando excitados a 300 nm.

Figura 2.12: Espectro de fluorescência do aduto I ($\lambda_{exc.} = 310$ nm, $\lambda_{emis.} = 420$ nm)

Os rendimentos quânticos de fluorescência (ϕ_f) dos quatro adutos foram determinados. Segundo Demas & Crosby ³⁰, o rendimento quântico de fluorescência de uma molécula é a fração de moléculas que emitem um fóton depois da excitação direta por uma fonte.

O triptofano foi escolhido como padrão por ter solubilidade e espectros compatíveis com os adutos. Os valores obtidos são apresentados na tabela 2.1. Nota-se que os quatro adutos possuem valores bastante próximos de rendimento quântico, em torno de 0,15.

Aduto	I	II	III	IV
ϕ	$0,16 \pm 0,03$	$0,13 \pm 0,03$	$0,15 \pm 0,04$	$0,16 \pm 0,03$

Tabela 2.1: Rendimentos quânticos de fluorescência dos adutos I, II, III e IV.

2.4.3.3 Análise por espectrometria de massa

Os quatro produtos purificados foram analisados por espectrometria de massa com ionização por *electrospray*. Maiores detalhes da técnica serão fornecidos no próximo capítulo. Os espectros de todos os compostos eram dominados por um único pico. O aumento da voltagem do cone levava a formação de outros íons que diferiam do parental por uma diferença exata de 116 Da, que pode ser interpretada como a fragmentação da ligação *N*-glicosídica e perda da 2'-desoxirribose.

O espectro de massa do aduto I (Figura 2.13) no modo positivo, exibiu um íon pseudomolecular $[M+H^+]$ a $m/z = 436,2$. A incorporação de 184 Da à dA poderia ser explicada pela formação de um aduto entre a dA e o DDE com o ganho de dois átomos de oxigênio. O íon de $m/z = 320,2$, resultante da perda da 2'-desoxirribose, comprova que o composto trata-se de um desoxinucleosídeos.

O aduto II apresentou um espectro dominado pelo sinal a m/z 406,2 que corresponde ao íon pseudomolecular $[M + H]$ e sob voltagens de cone maiores, um fragmento a m/z 290 $[M + H - 2\text{-desoxi-D-eritro-pentose}]$ (Figura 2.14). A adição de 154 Da à dA poderia ser interpretada como a adição de uma

molécula de DDE mais dois átomos de hidrogênio ou a perda de um grupo CHOH do aduto I.

O espectro do aduto **III** (Figura 2.15) mostrou um íon pseudomolecular a $m/z = 376,2$ correspondendo à forma protonada $[M + H]^+$ do composto. Esse dado indica um aumento da massa molecular de 124 Da em relação à dA. Isso foi bastante inesperado, pois a massa molecular do DDE é de 154 Da correspondendo conseqüentemente à perda de 30 Da do aldeído.

O último aduto (**IV**) apresentou um íon pseudomolecular $[M+H^+]$ a $m/z = 418,0$ quando analisado por ESI/MS no modo positivo, correspondendo à adição de 166 Da à dA. Isso representa a adição de uma molécula de DDE e mais 14 Da.

As análises por espectrometria de massa confirmam que os quatro adutos formados são derivados da dA, o que pode ser atestado pela presença da 2'-desoxirribose, cuja perda é a principal fragmentação da molécula, e pelo incremento na massa molecular do nucleosídeo. Entretanto, as informações dessa técnica não são suficientes para a elucidação estrutural completa dos produtos. Tal objetivo foi alcançado através de análises por ressonância magnética nuclear, que serão apresentadas em seqüência.

Figura 2.13: Análise do aduto I por espectrometria de massa com ionização por *electrospray* no modo positivo. Acima: voltagem do cone de 20 V ; abaixo: voltagem do cone de 50 V.

Figura 2.14: Análise do aduto II por espectrometria de massa com ionização por *electrospray* no modo positivo. Acima: voltagem do cone de 20 V ; abaixo: voltagem do cone de 50 V.

Figura 2.15: Análise do aduto **III** por espectrometria de massa com ionização por *electrospray* no modo positivo. Acima: voltagem do cone de 20 V ; abaixo: voltagem do cone de 50 V.

Figura 2.16: Análise do aduto **IV** por espectrometria de massa com ionização por *electrospray* no modo positivo. Acima: voltagem do cone de 20 V; abaixo: voltagem do cone de 50 V.

2.4.3.4 Análise por ressonância magnética nuclear (RMN)

2.4.3.4.1 Aduto I

A característica mais facilmente observável em um espectro ^1H -RMN do aduto I é a presença dos sete sinais correspondentes aos prótons da 2'-desoxirribose (Tabela 2.2, Figura 2.17). Os sinais correspondentes aos prótons H-8 e H-2 do anel purínico da adenina foram observados a $\delta = 8,27$ e $9,22$ ppm, respectivamente. Os altos valores dos deslocamentos químicos sugerem que a aromaticidade da purina foi retida durante a formação do aduto. Cinco sinais característicos do DDE, incluindo quatro prótons vinílicos e o próton carbonílico não são observados no espectro ^1H -RMN do aduto I. Isso exclui possibilidades de reação direta do grupo carbonílico com o NH_2 exocíclico da adenina ou um mecanismo via adição de Michael, pois nessas situações seria possível observar ao menos uma dupla ligação. A presença da cadeia alquila adicionada ao nucleosídeo e proveniente do DDE pode ser inferida pela observação de sinais na região de alto campo do espectro ^1H -RMN ($0.64 < \delta < 1.50$ ppm). A integração destes sinais indica que estes 11 prótons incluem um grupo metil e quatro grupos metileno. Três sinais que se sobrepõem às ressonâncias do açúcar no intervalo de $3.30 - 5.32$ ppm podem ser constatados. Eles foram assinalados como os prótons H-13, H-14 e H-15 com base na análise do espectro ^1H -RMN bidimensional (Figura 2.18). Foi verificado que H-14 está envolvido em acoplamentos vicinais escalares com os prótons H-13 e H-15. Além disso, o último está acoplado com os prótons do grupo metilênico do carbono 16. Por outro lado, H-13 que aparece como um dubleto, não exibe nenhum acoplamento escalar além daquele com H-14. Os deslocamentos químicos de H-13 ($\delta = 5.32$) H-14 ($\delta = 3.86$) e H-15 ($\delta = 3.30$) são consistentes com aqueles de grupos carbinólicos. Finalmente, um último sinal ressona como um singlete à $\delta = 7.44$ ppm. Este sinal é típico de um eteno próton (H-11) que não exibe nenhum acoplamento escalar devido à ausência de átomos de hidrogênio vicinais. Em conjunto, os dados acima indicam que o aduto I trata-se de uma estrutura do tipo $1,N^6$ -etenodA com uma cadeia lateral trihidroxioctila tendo um substituinte trihidroxioctila na posição 12. Tal

estrutura é consistente com a massa molecular de 435 Da apontada pela análise por espectrometria de massa.

Tabela 2.2: Atribuição de ^1H -RMN do aduto I ^a

^1H -RMN				
	δ (ppm)		J (Hz)	
H-1'	6,43	m	$J_{1',2'}$	7.0
H-2'	2,78	m	$J_{1',2''}$	6.1
H-2''	2,48	m	$J_{2',2''}$	-13.9
H-3'	4,53	m	$J_{2',3'}$	7.0
H-4'	4,03	m	$J_{2'',3'}$	4.0
H-5'	3,65	m	$J_{3',4'}$	3.0
H-5''	3,78	m	$J_{4',5'}$	3.8
H-2	9,20	s	$J_{4',5''}$	4.8
H-8	8,27	s	$J_{5',5''}$	-12.6
H-11	7,44	s	$J_{13,14}$	4.7
H-13	5,30	d	$J_{14,15}$	7.2
H-14	3,76	dd	$J_{15,16}$	2.7
H-15	3,58	dt		
H-16	1,50	m		
H-17	1,33	m		
H-18	1,09	m		
H-19	1,09	m		
H-20	0,64	m		

^a m, multiplete; t, tripleto; d, dubleto; s, singlete.

Figura 2.17: Espectro ^1H -RMN (FT: 300,13 MHz) em D_2O do aduto I (atribuições na tabela 2.2).

Figura 2.18: Espectro bidimensional de ^1H -RMN (COSY) (FT: 300,13 MHz) em D_2O do aduto I (correlações entre os prótons H13-H20 destacadas pelas linhas tracejadas).

A repurificação do aduto **I** revelou a presença de quatro compostos diferentes que foram designados com *a*, *b*, *c* e *d*. A análise por ^1H -RMN (Tabela 2.3) revelou que os quatro compostos possuíam valores de deslocamento químico e constantes de acoplamento idênticos para todos os prótons, excetuando-se para os prótons carbinólicos (H-13, H-14 e H-15). Estes prótons são exatamente os que estão conectados aos carbonos quirais, o que explica as pequenas diferenças encontradas nos dados espectroscópicos.

Tabela 2.3: Valores de deslocamento químico (δ) e constante de acoplamento (J) para os quatro isômeros (*a*, *b*, *c* e *d*) do aduto **I**. (n.d. = não determinada)

	A		b		c		d	
^1H	δ (ppm)	J (Hz)	δ (ppm)	J (Hz)	δ (ppm)	J (Hz)	δ (ppm)	J (Hz)
13	5.32	$J_{13,14}=4.8$	5.30	$J_{13,14}=3.5$	5.20	$J_{13,14}=6.6$	5.14	$J_{13,14}=8.0$
14	3.86	$J_{14,15}=7.2$	3.76	$J_{14,15}=7.2$	3.85	$J_{14,15}=3.1$	3.83	$J_{14,15}=2.6$
15	3.30	$J_{15,16}=2.7$	3.56	$J_{15,16}=2.7$	3.39	$J_{15,16} = \text{n.d.}$	3.39	$J_{15,16} = \text{n.d.}$

2.4.3.4.2 Aduto II

O espectro de ^1H -RMN aduto **II** (Figura 2.19), é bastante similar ao do aduto **I**. Na região de campo baixo do espectro são observados os sinais dos prótons H-2 e H-8 ($\delta = 9.29$ e $\delta = 8.39$ ppm, respectivamente) e o eteno próton ($\delta = 7.52$ ppm). Na região compreendida entre $0.74 < \delta < 1.44$ ppm são observados cinco sinais cujas integrações indicam tratarem-se de um grupo metil e quatro grupos metileno. Observando-se as correlações do grupo metileno mais desprotegido através de um espectro ^1H -RMN bidimensional (Figura 2.20), nota-se que o mesmo encontra-se acoplado com um sinal a 4,13 ppm e este por sua vez a outro a 5,09 ppm. Baseados nos deslocamentos químicos e constantes de acoplamento tais sinais foram atribuídos a um diol. Conseqüentemente, conclui-se que esse aduto é um derivado da 1, N^6 - ϵ DA substituído com uma cadeia dihidroxiheptil. Essa estrutura está de acordo com a análise por espectrometria de massa que apontou uma massa molecular de 405 Da.

Tabela 2.4: Atribuição de ^1H -RMN do aduto **II**^a

^1H -RMN				
	δ (ppm)	m	J (Hz)	
H-1'	6,56	<i>m</i>	$J_{1'-2'}$	6.9
H-2'	2,90	<i>m</i>	$J_{1'-2''}$	6.3
H-2''	2,57	<i>m</i>	$J_{2'-2''}$	-14.0
H-3'	4,64	<i>m</i>	$J_{2'-3'}$	6.8
H-4'	4,07	<i>m</i>	$J_{2''-3'}$	3.9
H-5'	3,71	<i>m</i>	$J_{3'-4'}$	3.0
H-5''	3,74	<i>m</i>	$J_{4'-5'}$	3.7
H-2	9,29	<i>s</i>	$J_{4'-5''}$	4.7
H-8	8,39	<i>s</i>	$J_{5'-5''}$	-12.5
H-11	7,52	<i>s</i>	J_{13-14}	5.5
H-13	5,09	<i>d</i>	J_{14-15}	2.4
H-14	4,13	<i>dt</i>		
H-15	1,44	<i>m</i>		
H-16	1,34	<i>m</i>		
H-17	1,22	<i>m</i>		
H-18	1,18	<i>m</i>		
H-19	0,74	<i>m</i>		

^a m, multipeto; t, tripleto; d, dubleto; s, singeto.

Figura 2.19: Espectro ^1H -RMN (FT: 300,13 MHz) em D_2O do aduto **II** (atribuições na tabela 2.4).

Figura 2.20: Espectro bidimensional de ^1H -RMN (COSY) (FT: 300,13 MHz) em D_2O do aduto **II** (correlações entre os prótons H13-H19 destacadas pelas linhas tracejadas).

2.4.3.4.3 Aduto III

Por ser um dos produtos mais abundantes na reação entre o DDE e a dA e não se apresentar como uma mistura de isômeros como os demais, foi possível obter vários miligramas desse produto e conseqüentemente foi o mais facilmente caracterizado.

Na figura 2.21 é apresentado um espectro ^1H -RMN do aduto **III** e na tabela 2.4, as atribuições correspondentes. A observação do eteno próton (H-11) a 7,41 ppm evidencia que assim como os adutos anteriormente descritos esse composto também é um derivado da 1, N^6 - ϵ dA. Os dois prótons purínicos, H-8 e H-2, foram observados a 8,52 e 9,18 ppm respectivamente. Assim como os adutos **I** e **II**, o alto valor do deslocamento químico do próton H-2 sugere que a aromaticidade do anel purínico não foi perdida na reação de adição. Os sinais correspondentes aos prótons da desoxirribose também são facilmente distinguidos no espectro: H-1', 6,48 ppm; H-2', 2,36 ppm; H-2'', 2,73 ppm; H-3', 4,43 ppm; H-4', 3,89 ppm; H-5', 3,55 ppm e H-5'', 3,60 ppm. Além dos prótons conectados aos carbonos, é possível detectar também os prótons das hidroxilas: 3'-OH a 5,34 ppm e 5'-OH a 4,95 ppm, desdobrados em dubleto e um tripleto, respectivamente. Geralmente em espectros de próton não é possível observar desdobramento de prótons ligados ao oxigênio, devido ao processo de troca pelas pontes de hidrogênio. Nesse processo, um próton de uma molécula é transferido para uma segunda molécula em uma velocidade maior que o tempo requerido (10^{-2} a 10^{-3} segundos) para que o RMN observe um único estado ³⁶. Entretanto o uso de DMSO ou acetona diminui a velocidade da troca de prótons possibilitando a observação do desdobramento. Outra porção facilmente reconhecível no espectro é a região compreendida entre 0,8 e 2 ppm, onde se observa a presença dos prótons da cadeia alquila do aduto. O sinal a 0,85 ppm corresponde a metila, e os sinais a 1,23 , 1,29 , 1,51 e 1,92 correspondem aos prótons metilênicos. Embora não tenha sido possível a determinação das constantes de acoplamento desses prótons, devido à complexidade do padrão de desdobramento, nota-se que a multiplicidade observada é bastante próxima à esperada. Além dos sinais anteriormente discutidos, restaram no espectro mais dois: a 5,1 e 5,48 ppm. O deslocamento químico sugeria tratar-se de prótons ligados a heteroátomos. Eles foram

facilmente atribuídos com o auxílio de um espectro bidimensional de próton (COSY). Com este espectro (Figura 2.22) foi possível também confirmar as correlações feitas através da análise do espectro unidimensional. Observa-se a correlação entre os sinais: 0,85 , 1,23 , 1,29 , 1,51 e 1,92 ppm, nesta seqüência confirmando corresponderem a uma cadeia pentila $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$. O último CH_2 (1,92 ppm), encontra-se acoplado a um quarteto a 5,01 ppm e, este a um dubleto a 5,48 ppm. O sinal a 5,01 ppm corresponde a um próton CHOH , e o sinal a 5,48 ppm ao próton CHOH . Similarmente aos prótons do açúcar, também foi possível observar acoplamento do próton carbinólico com o da hidroxila. O valor da constante de acoplamento $J_{13,13\text{-OH}}=6,1$ Hz é próximo a $J_{13,14}=6,6$ Hz, resultando na observação de um quarteto para o próton H-13, ao invés de um duplo-triplete ou triplo-dublete.

Figura 2.21: Espectro ^1H -RMN (FT: 300,13 MHz) em d_6 -DMSO do aduto **III** (atribuições na tabela 2.4).

Figura 2.22: Espectro bidimensional de ¹H-RMN (COSY) (FT: 500,13 MHz) em *d*₆-DMSO do aduto **III** (correlações entre os prótons H13-H18 destacadas pelas linhas tracejadas).

Tabela 2.5: Atribuição de ^1H -RMN (500,13 MHz) e ^{13}C -RMN (125,03 MHz) do aduto **III**^a

^1H -RMN				^{13}C -RMN	
	δ (ppm)	<i>m</i>	<i>J</i> (Hz)		δ (ppm)
H-1'	6.48	<i>t</i>	$J_{1',2'}$ 6.9	C-1'	84.1
H-2'	2.73	<i>m</i>	$J_{1',2''}$ 6.3	C-2'	40.0
H-2''	2.36	<i>m</i>	$J_{2',2''}$ -14.0	C-3'	70.8
H-3'	4.43	<i>m</i>	$J_{2',3'}$ 6.8	C-4'	88.1
3'-OH	5.34	<i>d</i>	$J_{2'',3'}$ 3.9	C-5'	61.8
H-4'	3.89	<i>m</i>	$J_{3',4'}$ 3.0	C-2	136.0
H-5'	3.60	<i>m</i>	$J_{3',3''}$ 4.2	C-4	138.1
H-5''	3.55	<i>m</i>	$J_{4',5'}$ 3.7	C-5	123.2
5'-OH	4.95	<i>t</i>	$J_{4',5''}$ 4.7	C-6	141.0
H-2	9.18	<i>s</i>	$J_{5',5''}$ -12.5	C-8	139.9
H-8	8.52	<i>s</i>	$J_{5',5'}$ 5.5	C-11	129.6
H-11	7.41	<i>s</i>	$J_{13,13-}$ 6.1	C-12	127.7
H-13	5.01	<i>q</i>	$J_{13,14}$ 6.6	C-13	63.6
13-OH	5.48	<i>d</i>		C-14	34.9
H-14	1.92	<i>td</i>		C-15	31.2
H-15	1.51	<i>m</i>		C-16	25.3
H-16	1.29	<i>m</i>		C-17	22.2
H-17	1.23	<i>m</i>		C-18	14.1
H-18	0.85	<i>t</i>			

^a m, multipeto; t, tripleto; d, dubleto; s, singleto.

Os dados de ^{13}C -RMN confirmam a estrutura sugerida pelos espectros de ^1H -RMN. O espectro desacoplado de ^{13}C -RMN (Figura 2.23) apresenta 18 picos, sugerindo uma estrutura de 18 carbonos. Espectros bidimensionais heteronucleares de ^1H - ^{13}C (Figura 2.24) permitiram a atribuição dos carbonos não quaternários. Os carbonos da desoxirribose apresentam deslocamentos químicos bastante próximos aos da dA. Assim como os prótons, os carbonos da cadeia pentila apresentam valores crescentes de deslocamento químico da metila em direção ao anel (14,05 , 22,24 , 25,33 , 31,22 e 34,94 ppm). O carbono 13 apresenta um deslocamento químico de 63,64 ppm, típico de carbonos ligados a hidroxila ³⁶. Os carbonos das posições 2 e 8 apresentaram deslocamentos de respectivamente 136 e 139,9 ppm.

A atribuição dos carbonos quaternários foi uma tarefa bem mais trabalhosa. Inicialmente, foram feitas tentativas de obtenção de um espectro heteronuclear com detecção indireta de acoplamentos de longa distância (HMBC), utilizando o espectrômetro DRX-500 MHz. Entretanto, não conseguimos verificar de maneira clara os acoplamentos 3J dos carbonos 4, 5, 6 e 12, possivelmente por estarmos utilizando os valores de constantes de acoplamento ^{13}C - ^1H incorretos. Como não havia nenhuma indicação sobre os valores corretos na literatura e determiná-los experimentalmente seria inviável, a única alternativa seria a aquisição de vários espectros variando os valores de constantes de acoplamento de longa distância. O problema, portanto foi encontrar o valor ideal de j_{nxh} , que é uma média das constantes de acoplamento multi-CH. A utilização de um valor de 7 Hz possibilitou a observação de todos os acoplamentos desejados para os carbonos quaternários.

Na figura 2.25 é apresentado o espectro obtido. Observa-se que o próton H-2 ($\delta=9,20$ ppm) apresenta acoplamentos $^2J(\text{C,H})$ com os sinais a 138,1 e 141,0 ppm, enquanto que o H-8 está envolvido em acoplamentos $^2J(\text{C,H})$ com os carbonos a 138,1 e 123,2 ppm. Conseqüentemente, o sinal a 138,1 ppm corresponderia ao carbono 4 e aquele a 123,2 ppm, ao carbono 5. A informação que o próton H-11 acopla com os sinais a 127,7 e 141,0 ppm e que o sinal a 141,0 ppm

também acopla com H-2 permite inequivocamente atribuir os sinais a 141,0 e 127,7 ppm respectivamente aos carbonos 6 e 12.

Figura 2.23: Espectro ^{13}C -RMN (FT: 75,03 MHz) em d_6 -DMSO do aduto **III** (atribuições na tabela 2.5).

Figura 2.24: Espectro bidimensional de ^1H - ^{13}C -RMN (HMQC) (FT: 500,13 MHz para ^1H e 125,03 MHz para ^{13}C) em d_6 -DMSO do aduto **III**.

Figura 2.25: Detalhe da região aromática do espectro HETCOR de longa-distância (FT: 300,13 MHz para ^1H e 75,03 MHz para ^{13}C) do aduto **III** em d_6 -DMSO.

2.4.3.4.4 Aduto IV

Os sinais observados nos espectros de ^1H -RMN (Figura 2.26; Tabela 2.6) indicam que o último aduto (IV) também se trata de um derivado da $1,N^6$ - ϵ AdA. Além dos prótons do açúcar, da purina e do etenopróton, observou-se à presença de uma cadeia pentila (0,84-1,53 ppm) e outros três sinais com deslocamentos químicos iguais a 3,12 , 3,45 e 5,06 ppm. Os espectros ^1H -RMN bidimensionais (Figura 2.27), revelaram que os oito sinais encontram-se conectados em ordem crescente de deslocamento químico, sugerindo tratar-se de uma cadeia lateral de oito carbonos similar aquela do aduto I. Assim como o aduto I, no aduto IV a cadeia lateral apresenta na extremidade um grupo metila e quatro metilenos e na conexão com o anel eteno, três prótons com deslocamentos químicos característicos de grupos ligados ao oxigênio. Entretanto, são compostos distintos o que é facilmente evidenciado pela maior hidrofobicidade do aduto IV e pela análise por espectrometria de massa que indicou uma diferença de 18 Da entre os dois compostos. Assim como nas análises do aduto III, foi possível observar os acoplamentos $-\text{CH}-\text{OH}$. Curiosamente, o espectro revelou que apenas o próton H-13 (5,01 ppm) encontra-se acoplado a uma hidroxila (5,95 ppm). A presença um grupo epóxido entre os carbonos 14 e 15 seria compatível com tais dados de RMN e massa.

A repurificação do aduto IV pelo sistema de HPLC com refluxo revelou a presença de dois subcomponentes. A análise por ^1H -RMN mostrou que, de maneira semelhante aos diastereoisômeros do aduto I, os dois produtos diferem apenas nos sinais correspondentes aos prótons carbinólicos: $\delta = 2,98$, 3,28 , 5,01 e 5,95 ppm (diastereoisômero **a**) e $\delta = 2,87$, 3,24 , 5,09 e 6.01 ppm (diastereoisômero **b**). Os valores pequenos de constante de acoplamento entre os prótons 14 e 15 (1.7 Hz) sugerem um arranjo do tipo *trans* e confirma que a estereoquímica é mantida durante a epoxidação. A caracterização de apenas dois diastereoisômeros no aduto IV e não quatro como se esperaria devido à presença de três carbonos quirais poderia ser explicada pelo fato de que na verdade, os carbonos 14 e 15 são centros pró-quirais e a epoxidação se dá de maneira estereoseletiva.

Tabela 2.6: Atribuição de ^1H -RMN (500,13 MHz) e ^{13}C -RMN (125,03 MHz) do aduto **IV**^a

^1H -RMN					^{13}C -RMN				
	δ (ppm)		m	J (Hz)	δ (ppm)				
	a	b			a	b	a	b	
H-1'	6.48	6.48	<i>m</i>	$J_{1',2'}$	6.9	6.9	C-1'	84.0	84.1
H-2'	2.73	2.73	<i>m</i>	$J_{1',2''}$	6.3	6.3	C-2'	39.6	39.6
H-2''	2.36	2.36	<i>m</i>	$J_{2',2''}$	-14.0	-14.0	C-3'	70.6	70.7
H-3'	4.43	4.43	<i>m</i>	$J_{2',3'}$	6.8	6.8	C-4'	87.9	87.9
3'-OH	5.34	5.34	<i>d</i>	$J_{2'',3'}$	3.9	3.9	C-5'	61.5	61.4
H-4'	3.89	3.90	<i>m</i>	$J_{3',4'}$	3.0	3.0	C-2	136.1	136.0
H-5'	3.62	3.62	<i>m</i>	$J_{4',5'}$	3.7	3.7	C-4	n.d.	137.9
H-5''	3.53	3.54	<i>m</i>	$J_{4',5''}$	4.7	4.7	C-5	n.d.	124.0
5'-OH	4.94	4.94	<i>m</i>	$J_{5',5''}$	-12.5	-12.5	C-6	n.d.	141.2
H-2	9.20	9.16	<i>s</i>	$J_{13,13\text{-OH}}$	5.2	5.2	C-8	139.9	140.0
H-8	8.53	8.53	<i>s</i>	$J_{13,14}$	4.8	4.6	C-11	130.4	130.7
H-11	7.49	7.48	<i>s</i>	$J_{14,15}$	1.7	1.7	C-12	n.d.	n.d.
H-13	5.01	5.09	<i>m</i>	$J_{15,16}$	5.6	5.1	C-13	64.3	64.5
13-OH	5.95	6.01	<i>t</i>				C-14	59.9	59.0
H-14	3.28	3.24	<i>m</i>				C-15	55.3	56.4
H-15	2.98	2.87	<i>dt</i>				C-16	30.9*	30.9*
H-16	1.53	1.55	<i>m</i>				C-17	30.8*	30.8*
H-17	1.34	1.38	<i>m</i>				C-18	25.1	25.0
H-18	1.21	1.27	<i>m</i>				C-19	21.9	21.9
H-19	1.21	1.27	<i>m</i>				C-20	13.7	13.7
H-20	0.84	0.85	<i>t</i>						

^a m, multipeto; t, tripleto; d, dubleto; s, singeto - * Essas atribuições podem estar invertidas. - n.d. não detectada.

Figura 2.26: Espectro ^1H -RMN (FT: 500,13 MHz) em d_6 -DMSO do aduto IV (isômero a) (atribuições na tabela 2.6).

Figura 2.27: Espectro bidimensional de ^1H -RMN (COSY) (FT: 500,13 MHz) em d_6 -DMSO do aduto IV (isômero a) (correlações entre os prótons H13-H20 destacadas pelas linhas tracejadas).

As quantidades reduzidas dos compostos **IVa** e **IVb** após os processos de purificação, não permitiram as caracterizações completas por ^{13}C -RMN. Foi possível a obtenção de um DEPT para o aduto **IVa** (Figura 2.28, Tabela 2.6) e um ^{13}C -RMN totalmente desacoplado para o **IVb** (Figura 2.29, Tabela 2.6), entretanto não foi possível observar todos os carbonos quaternários. A atribuição foi feita comparando-se com os dados de ^{13}C -RMN do aduto **III**, pois as ressonâncias do açúcar e do heteroanel são idênticas em ambas estruturas. A estrutura da cadeia lateral foi confirmada pela observação dos sinais a 59,9 e 55,3 ppm (isômero **a**) e a 59,0 e 56,4 ppm (isômero **b**) que correspondem aos carbonos 14 e 15. Os valores de deslocamento químico para estes carbonos são menores quando comparados aos valores típicos de epóxidos alifáticos, entretanto isso poderia ser explicado por uma desblindagem causada pela corrente de elétrons π do anel eteno.

Figura 2.28: Espectro ^{13}C -RMN DEPT (FT: 125,03 MHz) em d_6 -DMSO do aduto **IV** (isômero **a**) (atribuições na tabela 2.6).

Figura 2.29: Espectro ^{13}C -RMN totalmente desacoplado (FT: 75,13 MHz) em d_6 -DMSO do aduto **IV** (isômero **b**) (atribuições na tabela 2.6).

2.5 Discussão

Um número apreciável de agentes carcinogênicos e mutagênicos estruturalmente diversos podem formar adutos com bases de ácidos nucleicos. Tem havido um acúmulo de evidências na literatura relacionando diretamente tais adutos com os efeitos genotóxicos. Recentemente, foi mostrado que produtos da lipoperoxidação reagem com as bases do DNA na presença de indutores, produzindo etenodesoxiadenosina e etenodesoxicitidina ¹². A formação de tais adutos tem sido atribuída quase que exclusivamente ao 4-hidroxinonenal, um dos produtos da lipoperoxidação mais estudado. Entretanto, pouca atenção tem sido dada a outros produtos da lipoperoxidação. O DDE tem sido reportado como um dos mais tóxicos dentre os produtos da lipoperoxidação e, no entanto, até o momento sua reatividade frente a biomoléculas era totalmente desconhecida.

Os estudos preliminares de Hasegawa e colaboradores ²⁹ apontavam para a possibilidade de uma reação direta entre o DDE e o os desoxinucleosídeos, especialmente a dA, gerando produtos fluorescentes. Portanto, nossos primeiros esforços se concentraram na tentativa de isolamento de um produto gerado pela reação entre o DDE e a dA. Embora diversas condições de síntese tenham sido testadas, não foi possível reproduzir os resultados desses autores. A utilização acidental de um THF altamente oxidado levou à formação dos produtos. Ficou bem claro que a reação depende da presença de peróxidos que ativam o DDE a intermediários reativos. Uma possibilidade para explicar tais dados seria uma contaminação por peróxidos nos experimentos de Hasegawa e colaboradores. Embora os mesmos autores não tivessem obtido uma quantidade de dados espectroscópicos suficientes para efetuar a caracterização estrutural dos produtos formados, eles propuseram algumas estruturas tentativas (Figura 2.4). Nosso trabalho mostrou que tais estruturas estavam incorretas.

Todos os adutos caracterizados possuem a mesma estrutura básica. A dupla substituição eletrofílica leva a formação de um aduto exocíclico do tipo 1,N⁶-edA. A posição 12 do anel eteno é substituída por cadeias alifáticas contendo os grupos epoxi e/ou hidroxí (Figura 2.29).

Figura 2.29: Estrutura dos adutos formados entre a dA e os produtos do DDE oxidado.

A caracterização completa dos produtos possibilita a elucidação dos mecanismos de reação de outros 2,4-alcadienais e pode possivelmente ser estendido a outras bases do DNA (guanina e citosina). Embora o mecanismo de ligação à dA seja semelhante em todos os compostos, as diferenças nas cadeias laterais sugerem que o DDE pode ser ativado através de vários mecanismos.

Para a formação do aduto I (Figura 2.30), é necessária a epoxidação das duas duplas ligações do aldeído, sendo que o segundo grupo epóxido (C4-C5), sofreria hidrólise originando um diol. O produto resultante, o 2,3-epoxi 4,5-

dihidroxidecanal sofreria uma adição nucleofílica do grupo amino exocíclico ao seu carbono aldeído, seguido de ciclização pelo ataque do nitrogênio da posição 1 ao carbono do epóxido. Após a desidratação do intermediário cíclico formado, seria então obtido o aduto **I** ³⁷.

Figura 2.30: Mecanismo proposto para a formação do aduto **I**.

A formação do aduto **II** (Figura 2.31), seria ainda mais complexa. A adição de apenas nove dos dez carbonos do DDE sugere a prévia formação do composto 2,3-epoxi-4-hidroxinonanal, o epóxido correspondente ao importante produto HNE. Grein e colaboradores ³⁸ descreveram a formação do HNE a partir do DDE em soluções aquosas. Um mecanismo similar poderia estar levando à formação do 2,3-epoxi-4-hidroxinonanal a partir do DDE. O DDE seria inicialmente oxidado ao ácido peroxicarboxílico correspondente e esse após descarboxilação, originaria o 2-nonenal. Esse por sua vez, sofreria uma peroxidação alílica e após rearranjo formaria o epoxi-aldeído que reagiria com a dA por um mecanismo similar ao descrito para o aduto **I**. De fato, o aduto **II** é idêntico ao descrito por Sodum e Chung ¹¹ que é gerado pelo HNE

epoxidado. É importante destacar que essa constatação mostra que o HNE não é o único responsável pela formação de ϵ dA, como também seu aduto hidrofóbico dihidroxiheptil- ϵ dA não pode ser considerado como um marcador específico da formação desse composto, pois o DDE é capaz de gerar o mesmo produto após sofrer oxidação.

Figura 2.31: Possível mecanismo para a formação do aduto II.

O aduto **III** resulta da adição de apenas oito dos dez carbonos do DDE. A cadeia lateral do tipo hidroxihexila sugere que tal aduto é proveniente da reação da dA com o 2,3-epoxioctanal, o epoxialdeído seria formado a partir do 2-octenal. Devido a importância do DDE como aromatizante natural, sua decomposição em principalmente 2-octenal e hexanal é bem discutida na literatura³⁹. O mecanismo de formação do 2-octenal seria através de degradação retro-aldólica após a hidrólise da ligação 2-3. A hidrólise dos grupos epóxidos seria decisiva na formação do aduto **I** ou do **III**. No primeiro caso, a geração do diol nas posições 4 e 5 acarretaria na formação do aduto **I**.

Caso a hidrólise ocorra na posição 2-3, ocorreria uma degradação retro-aldólica formando etanal e o 2,3-epoxioctanal. Esse epoxi-aldeído em seguida, reagiria com a dA através de um mecanismo similar aos dois descritos anteriormente formando o aduto **III** (Figura 2.32). É importante salientar que o 2-octenal também é descrito como um dos produtos da lipoperoxidação com alta toxicidade ²⁶.

Figura 2.32: Possível mecanismo para a formação do aduto **III**.

O mecanismo envolvido na formação do aduto **IV** seria o mais simples dentre os quatro. Tudo indica que tal produto é derivado diretamente da reação do duplo epóxido do DDE, o 4,5-2,3-diepoxi-decanal com a dA.

Figura 2.33: Possível mecanismo para a formação do aduto IV

Recentemente outros etenoadutos substituídos foram caracterizados. O trabalho do grupo de Blair mostrou que a decomposição de um hidropéroxido gerado a partir do ácido linoleico, o ácido 13-hidroxiperoxi-octadecanóico, produz além do já conhecido HNE, dois outros produtos: o 4-hidroperoxi-2-nonenal e o 4-oxo-2-nonenal ⁴⁰. Esse último produto é especialmente interessante pois é capaz de reagir diretamente com a dG e a dA gerando eteno adutos substituídos com um grupo 2-heptanona ^{41,42,43}. O mecanismo envolvido seria similar ao dos epoxialdeídos, ou seja, a adição nucleofílica do nitrogênio exocíclico da guanina ou da adenina ao carbono carbonílico seguida da adição do nitrogênio da posição 1 das purinas ao carbono olefínico 2, a desidratação do intermediário resulta na formação dos etenoadutos substituídos. Na verdade, a reatividade de 4-oxo-alcenais não é uma constatação nova, pois foi inicialmente verificada na reação entre o 4-oxo-2-pentanal, um metabólito do carcinógeno ambiental α -acetoxi-*N*-nitrosopiperidina e a dG^{44,45}.

Em outro trabalho recente de nosso grupo foi realizada a caracterização parcial de eteno adutos gerados na reação entre produtos de oxidação do DDE e a dG ⁴⁶. Assim como no nosso trabalho, foi verificada a formação de eteno aduto não substituído, no caso da dG foi encontrada a 1,*N*²-edG. Curiosamente foi detectado um eteno aduto substituído com uma cadeia lateral 3-hidroxi-2-octanona. No mecanismo envolvido na formação desse aduto, o DDE sofreria

epoxidação em apenas uma das duplas ligações (4-5) e o grupo epoxi formado seria hidrolisado a diol. A hidroxila da posição 4 seria oxidada à carbonila gerando o produto 4-oxo-5-hidroxi-2-decenal que reagiria com a dG de acordo com o mecanismo proposto por Blair e colaboradores ^{41,42}. A formação desse produto pode ser facilitada pelas condições de oxidação do DDE (THF oxidado).

As condições de oxidação do DDE sem dúvida, têm um papel determinante no padrão de produtos formados. Verificamos que condições de oxidação do DDE mais brandas como a pré-oxidação do DDE por H₂O₂ ou dioxirano resultam em um predomínio dos adutos **III** e **IV**, cujos mecanismos de formação são mais simples em relação àqueles dos adutos **I** e **II**. Esses adutos foram caracterizados utilizando inicialmente THF oxidado, cuja composição é desconhecida, ou H₂O₂ adicionado diretamente à mistura dA e DDE e incubações prolongadas. Portanto, acreditamos que os etenoadutos substituídos com as cadeias laterais 1-hidroxi-hexano e 1-hidroxi-2,3-epoxi-octano sejam os mais significativos dentre a complexa mistura de adutos gerada pelos produtos de oxidação do DDE.

2.6 Conclusão

Os dados nessa etapa do projeto mostram que o DDE é um agente alquilante versátil, pois tem potencialidade para formar vários tipos diferentes de adutos com a dA após sofrer epoxidação. Uma constatação importante de nosso trabalho é a capacidade do DDE ser capaz de gerar o mesmo aduto que o HNE e também os adutos que poderiam ser potencialmente formados pelo 4,5-dihidroxi-2-decenal e 2-octenal (Figura 2.34). Tais dados reforçam a importância desse aldeído e o seu papel nos mecanismos de genotoxicidade associados a lipoperoxidação

A caracterização química dos adutos formados pelo DDE é a uma etapa indispensável no prosseguimento dos estudos das propriedades genotóxicas desse composto. A obtenção dos quatro adutos permitiu o prosseguimento de outros estudos como a detecção dessas lesões em DNA e a incorporação de uma delas em oligonucleotídeos com o objetivo de avaliar as propriedades mutagênicas e seu reparo, temas que serão abordados nos capítulos que se seguem.

A caracterização, síntese, purificação dos todos os produtos gerados pelo DDE e também o desenvolvimento de métodos de detecção dos adutos é um pré-requisito para outros estudos, como a detecção dos adutos em sistemas *in vivo*, sob diversas situações.

Figura 2.34: Formação de 1,N⁶-εdA adutos pelo DDE e outros produtos da lipoperoxidação relacionados.

2.7 Referências Bibliográfica

1. Bartsch, H., Barbin, A., Marion, M. J., Nair, J., Guichard, Y. (1994) Formation, Detection, and Role in Carcinogenesis of Ethenobases in DNA. *Drug Metabolism Reviews* **26**, 349-371.
2. Kochetko, N. K., Shibaev, V. N., Kost, A. A. (1971) New Reaction of Adenine and Cytosine Derivatives, Potentially Useful for Nucleic Acids Modification. *Tetrahedron Letters* 1993-&.
3. Barrio, J. R., Secrist, J. A., III, Leonard, N. J. (1972) Fluorescent Adenosine and Cytidine Derivatives. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **46**, 597-604.
4. Secrist, J. A., III, Barrio, J. R., Leonard, N. J. (1972) A Fluorescent Modification of Adenosine Triphosphate With Activity in Enzyme Systems: 1,N 6 - Ethenoadenosine Triphosphate. *Science* **175**, 646-647.
5. Sattsangi, P. D., Leonard, N. J., Frihart, C. R. (1977) 1,N2-Ethenoguanine and N2,3-Ethenoguanine Synthesis and Comparison of Electronic Spectral Properties of These Linear and Angular Triheterocycles Related to Y Bases. *Journal of Organic Chemistry* **42**, 3292-3296.
6. Guengerich, F. P., Kim, D. H., Iwasaki, M. (1991) Role of Human Cytochrome P-450 IIE1 in the Oxidation of Many Low Molecular Weight Cancer Suspects. *Chemical Research in Toxicology* **4**, 168-179.
7. Guengerich, F. P. (1992) Roles of the Vinyl Chloride Oxidation Products 1-Chlorooxirane and 2-Chloroacetaldehyde in the in Vitro Formation of Etheno Adducts of Nucleic Acid Bases [Corrected] [Published Erratum Appears in Chem Res Toxicol 1992 Mar-Apr;5(2):309]. *Chemical Research in Toxicology* **5**, 2-5.
8. Nair, V. , Offerman, R. J. (1985) Ring-Extended Products From the Reaction of Epoxy Carbonyl-Compounds and Nucleic-Acid Bases. *Journal of Organic Chemistry* **50**, 5627-5631.
9. Goldschm, B. M., Blazej, T. P., Vanduuere, B. L. (1968) Reaction of Guanosine and Deoxyguanosine With Blycidaldehyde. *Tetrahedron Letters* 1583-&.
10. Sodum, R. S. , Chung, F. L. (1988) 1,N2-Ethenodeoxyguanosine As a Potential Marker for DNA Adduct Formation by Trans-4-Hydroxy-2-Nonenal. *Cancer Research* **48**, 320-323.
11. Sodum, R. S. , Chung, F. L. (1991) Stereoselective Formation of in Vitro Nucleic Acid Adducts by 2,3-Epoxy- 4-Hydroxynonanal. *Cancer Research* **51**, 137-143.
12. el Ghissassi, F., Barbin, A., Nair, J., Bartsch, H. (1995) Formation of 1,N6-Ethenoadenine and 3,N4-Ethenocytosine by Lipid Peroxidation Products and Nucleic Acid Bases. *Chemical Research in Toxicology* **8**, 278-283.

13. Bao, M. L., Pantani, F., Griffini, O., Burrini, D., Santianni, D., Barbieri, K. (1998) Determination of Carbonyl Compounds in Water by Derivatization-Solid-Phase Microextraction and Gas Chromatographic Analysis. *Journal of Chromatography A* **809**, 75-87.
14. Moshonas, M. G., Shaw, P. E. (1979) Isolation of Trans,Trans-2,4-Decadienal and Intermedeol From Cold-Pressed Citrus Oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **27**, 210-211.
15. Boosfeld, J., Vitzthum, O. G. (1995) Unsaturated Aldehydes Identification From Green Coffee. *Journal of Food Science* **60**, 1092-1096.
16. Cha, Y. J., Cadwallader, K. R. (1998) Aroma-Active Compounds in Skipjack Tuna Sauce. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **46**, 1123-1128.
17. Farkas, P., Sadecka, J., Kovac, M., Siegmund, B., Leitner, E., Pfannhauser, W. (1997) Key Odourants of Pressure-Cooked Hen Meat. *Food Chemistry* **60**, 617-621.
18. Brewer, M. S., Vega, J. D. (1995) Detectable Odor Thresholds of Selected Lipid Oxidation Compounds in a Meat Model System. *Journal of Food Science* **60**, 592-595.
19. Schieberle, P., Grosch, W. (1991) Potent Odorants of the Wheat Bread Crumb - Differences to the Crust and Effect of a Longer Dough Fermentation. *Zeitschrift Fur Lebensmittel-Untersuchung Und-Forschung* **192**, 130-135.
20. Boeve, J. L., Gfeller, H., Schlunegger, U. P., Francke, W. (1997) The Secretion of the Ventral Glands in *Hoplocampa* Sawfly Larvae. *Biochemical Systematics and Ecology* **25**, 195-201.
21. Almosnino, A. M., Belin, J. M. (1991) Apple Pomace - an Enzyme System for Producing Aroma Compounds From Polyunsaturated Fatty-Acids. *Biotechnology Letters* **13**, 893-898.
22. Thomas, C. E., Jackson, R. L., Ohlweiler, D. F., Ku, G. (1994) Multiple Lipid Oxidation-Products in Low-Density Lipoproteins Induce Interleukin-1-Beta Release From Human Blood Mononuclear Cells. *Journal of Lipid Research* **35**, 417-427.
23. Girona, J., La Ville, A. E., Heras, M., Olive, S., Masana, L. (1997) Oxidized Lipoproteins Including HDL and Their Lipid Peroxidation Products Inhibit TNF-Alpha Secretion by THP-1 Human Macrophages. *Free Radical Biology and Medicine* **23**, 658-667.
24. Buffinton, G. D., Hunt, N. H., Cowden, W. B., Clark, I. A. (1988) Detection of Short-Chain Carbonyl Products of Lipid Peroxidation From Malaria-Parasite (*Plasmodium Vinckei*)-Infected Red Blood Cells Exposed to Oxidative Stress. *Biochemical Journal* **249**, 63-68.
25. Kaneko, T., Kaji, K., Matsuo, M. (1988) Cytotoxicities of a Linoleic-Acid Hydroperoxide and Its Related Aliphatic-Aldehydes Toward Cultured Human Umbilical Vein Endothelial-Cells. *Chemico-Biological Interactions* **67**, 295-304.

26. Nappez, C., Battu, S., Beneytout, J. L. (1996) Trans,Trans-2,4-Decadienal: Cytotoxicity and Effect on Glutathione Level in Human Erythroleukemia (HEL) Cells. *Cancer Letters* **99**, 115-119.
27. Fujimoto, K., Neff, W. E., Frankel, E. N. (1984) The Reaction of DNA With Lipid Oxidation Products, Metals and Reducing Agents. *Biochimica Et Biophysica Acta* **795**, 100-107.
28. Frankel, E. N., Neff, W. E., Selke, E. (1983) Analysis of Autoxidized Fats by Gas-Chromatography Mass-Spectrometry .8. Volatile Thermal-Decomposition Products of Hydroperoxy Cyclic Peroxides. *Lipids* **18**, 353-357.
29. Hasegawa, K., Fujimoto, K., Kaneda, T., Frankel, E. N. (1988) Characterization of Fluorescent Products From Reaction of Methyl Linoleate Hydroperoxides With Adenine in the Presence of Fe²⁺ and Ascorbic Acid. *Biochimica Et Biophysica Acta* **962**, 371-376.
30. Demas, J. N. , Crosby, G. A. (1971) Measurement of Photoluminescence Quantum Yields - Review. *Journal of Physical Chemistry* **75**, 991-&.
31. Eaton, D. F. (1988) Reference Materials for Fluorescence Measurement. *Pure and Applied Chemistry* **60** , 1107-1114.
32. Haines, A. H. (1985) Methods for the Oxidation of Organic Compounds. Alkanes, Alkenes, Alkynes and Arenes. 116-117.
33. Secrist, J. A., III, Barrio, J. R., Leonard, N. J., Weber, G. (1972) Fluorescent Modification of Adenosine-Containing Coenzymes. Biological Activities and Spectroscopic Properties. *Biochemistry* **11**, 3499-3506.
34. Frankel, E. N., Neff, W. E., Brooks, D. D., Fujimoto, K. (1987) Fluorescence Formation From the Interaction of DNA With Lipid Oxidation Degradation Products. *Biochimica Et Biophysica Acta* **919**, 239-244.
35. Beppu, M., Murakami, K., Kikugawa, K. (1986) Fluorescent and Cross-Linked Proteins of Human-Erythrocyte Ghosts Formed by Reaction With Hydroperoxylinoleic Acid, Malonaldehyde and Monofunctional Aldehydes. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* **34**, 781-788.
36. Pavia, D. L., Lampman, G. M., Kriz, G. S. (1996) Introduction to Spectroscopy. 2,511.
37. Benedetti, A., Comporti, M., Fulceri, R., Esterbauer, H. (1984) Cytotoxic Aldehydes Originating From the Peroxidation of Liver Microsomal Lipids. Identification of 4,5-Dihydroxydecenal. *Biochimica Et Biophysica Acta* **792**, 172-181.
38. Grein, B., Huffer, M., Scheller, G., Schreier, P. (1993) 4-Hydroxy-2-Alkenals and Other Products Formed by Water-Mediated Oxidative Decomposition of Alpha,Beta-Unsaturated Aldehydes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **41**, 2385-2390.
39. Josephson, D. B. , Lindsay, R. C. (1987) Retro-Aldol Related Degradations of 2,4-Decadienal in the Development of Staling Flavors in Fried Foods. *Journal of Food Science* **52**, 1186-&.

40. Lee, S. H. , Blair, I. A. (2000) Characterization of 4-Oxo-2-Nonenal As a Novel Product of Lipid Peroxidation. *Chemical Research in Toxicology* **13**, 698-702.
41. Rindgen, D., Nakajima, M., Wehrli, S., Xu, K., Blair, I. A. (1999) Covalent Modifications to 2'-Deoxyguanosine by 4-Oxo-2-Nonenal, a Novel Product of Lipid Peroxidation. *Chemical Research in Toxicology* **12**, 1195-1204.
42. Lee, S. H., Rindgen, D., Bible, R. H., Hajdu, E., Blair, I. A. (2000) Characterization of 2'-Deoxyadenosine Adducts Derived From 4-Oxo-2-Nonenal, a Novel Product of Lipid Peroxidation. *Chemical Research in Toxicology* **13**, 565-574.
43. Rindgen, D., Lee, S. H., Nakajima, M., Blair, I. A. (2000) Formation of a Substituted 1,N(6)-Etheno-2'-Deoxyadenosine Adduct by Lipid Hydroperoxide-Mediated Generation of 4-Oxo-2-Nonenal. *Chemical Research in Toxicology* **13**, 846-852.
44. Hecht, S. S., Young-Sciame, R., Chung, F. L. (1992) Reaction of Alpha-Acetoxy-N-Nitrosopiperidine With Deoxyguanosine: Oxygen-Dependent Formation of 4-Oxo-2-Pental and a 1,N2- Ethenodeoxyguanosine Adduct. *Chemical Research in Toxicology* **5**, 706-712.
45. Liu, Z., Young-Sciame, R., Hecht, S. S. (1996) Liquid Chromatography--Electrospray Ionization Mass Spectrometric Detection of an Ethenodeoxyguanosine Adduct and Its Hemiaminal Precursors in DNA Reacted With Alpha-Acetoxy-N-Nitrosopiperidine and Cis-4-Oxo-2-Pental. *Chemical Research in Toxicology* **9**, 774-780.
46. Loureiro, A. P., Di Mascio, P., Gomes, O. F., Medeiros, M. H. (2000) Trans,Trans-2,4-Decadienal-Induced 1,N(2)-Etheno-2'-Deoxyguanosine Adduct Formation. *Chemical Research in Toxicology* **13**, 601-609.

Capítulo 3: Detecção de adutos 1,*N*⁶-eteno-2'- desoxiadenosina em DNA

3.1 Introdução

3.1.1 Algumas implicações da detecção de adutos de DNA

O estudo da formação de adutos como o resultado da reação de alguns compostos com o DNA, tanto diretamente quanto após bioativação, é uma área de pesquisa que vem crescendo em importância no campo da toxicologia. O interesse nos adutos de DNA reside na capacidade dos mesmos em gerar pareamentos incorretos em seqüências de DNA que podem iniciar processos mutagênicos e carcinogênicos e funcionar como indicadores, marcadores ou como dosímetros da exposição a esses compostos ¹.

A detecção de adutos de DNA e a determinação de seus níveis são atualmente uma das medidas mais sensíveis da exposição do DNA a certos compostos carcinogênicos. Os adutos podem ser medidos em DNA de diferentes fontes e em várias condições de exposição. Estas incluem a detecção de adutos em DNA isolado tratado em solução, em DNA de células expostas *in vitro* ou de DNA proveniente de tecidos animais expostos (*in vivo*). Cada combinação de condições de exposição e fonte de DNA tem um papel importante na avaliação global do potencial de um determinado agente em produzir adutos. A implicação de cada modelo na avaliação da importância biológica dos adutos de DNA deve levar em consideração os vários fatores envolvidos na formação e detecção dos adutos como a via de exposição, ativação metabólica, detoxificação, reparo e divisão celular. Embora um experimento *in vitro* tenha uma importância limitada na avaliação do risco biológico de um aduto, ele fornece informações valiosas sobre o aspecto mecanístico envolvido ².

De fato, para a maior parte dos carcinógenos humanos, existe forte correspondência entre o nível de adutos promovido e o potencial associado a indução de câncer ³. Conseqüentemente, se um composto químico é capaz de gerar aduto ou algum intermediário reativo capaz de modificar o DNA, ele terá grandes chances de exercer alguma atividade carcinogênica ².

Recentemente o desenvolvimento de métodos ultra-sensíveis tem alterado a ênfase no estudo dos adutos de DNA. Antes, limitada à detecção de níveis relativamente altos induzidos por carcinógenos químicos poderosos,

atualmente os limites de detecção permitem realizar uma dosimetria molecular com ordens de magnitude bem inferiores aos bioensaios de carcinogenicidade clássicos e próxima aos níveis aos quais os humanos são expostos. Inesperadamente, tais técnicas permitiram a descoberta de níveis basais de adutos de DNA em animais experimentais e humanos não expostos a carcinógenos. Esse achado foi de grande impacto, pois poderia ser pelo menos parcialmente, uma das explicações para o surgimento de processos carcinogênicos espontâneos.

3.1.2 Detecção de adutos de DNA

3.1.2.1 ³²P-postlabelling

3.1.2.1.1 O ³²P-postlabelling e os compostos indígenas

A detecção por ³²P-postlabelling desenvolvida no princípio da década de 80 por Randerath e colaboradores ⁴ é atualmente a técnica mais difundida na detecção de adutos de DNA. Ela já é aplicada na detecção de modificações do DNA por arilaminas, arilamidas, nitroaromáticos, nitrosaminas, azo-compostos, corantes, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, heterocíclicos policíclicos aromáticos, epóxidos, quinonas, agentes alquilantes, micotoxinas, alcenilbenzenos, antibióticos e também produtos gerados por espécies reativas do oxigênio ⁵.

O procedimento básico do ensaio de ³²P-postlabelling está esquematizado na Figura 3.1. O DNA é inicialmente hidrolisado enzimaticamente a 3'-mononucleotídeos. Os nucleotídeos modificados são enriquecidos por um ou mais procedimentos que exploram as diferenças estruturais em relação aos nucleotídeos normais. Os mononucleotídeos são a seguir fosforilados na posição 5' com um excesso de [γ-³²P]-ATP pela enzima T4 polinucleotídeo quinase. Finalmente, os nucleotídeos 3',5'-bifosfato obtidos são separados cromatograficamente por TLC ou HPLC com detecção radiométrica. O primeiro método cromatográfico é que vem sendo usado mais amplamente. A fase PEI-celulose permite separações em várias dimensões

utilizando diferentes combinações de fatores como força iônica, pH, agentes denaturantes e aditivos orgânicos ⁵.

Embora se trate de um método pouco seletivo pois o único parâmetro utilizado nesse aspecto é a migração cromatográfica, o ³²P-*postlabelling* é extremamente sensível sendo possível detectar níveis tão baixos quanto 1 aduto por 10⁹-10¹⁰ nucleotídeos normais, requerendo apenas alguns microgramas de DNA por ensaio. A incrível sensibilidade desse método possibilitou a constatação da presença de certos adutos hidrofóbicos cujas origens não podem ser relacionadas com nenhuma exposição a carcinógenos exógenos, tais compostos foram denominados de compostos indígenas (compostos-I) ⁶.

A natureza química dos compostos-I permanece desconhecida. Através de suas propriedades cromatográficas é possível inferir que são estruturalmente diferentes das modificações do DNA polares tais como produtos de oxidação do DNA por espécies reativas do oxigênio ⁷. Mesmo sem conhecer suas identidades químicas, a detecção e “quantificação” dos compostos-I vem sendo usada como um método de triagem extremamente eficaz. Além de suas detecções na ausência de carcinógenos externos, os compostos-I apresentam várias propriedades interessantes como aumento com a idade ^{8,6}, correlação com a expectativa de vida ⁹, dependência de dieta ¹⁰, seus perfis variam de acordo com os tecidos ⁸ e são aumentados por processos como reação de Fenton ¹¹ e pela peroxidação lipídica ¹².

Figura 3.1: Esquema da detecção de adutos por ^{32}P -postlabelling.

3.1.2.1.2 Detecção de adutos endógenos através de ^{32}P -postlabelling

A obtenção de anticorpos monoclonais para a 1, N^6 - ϵ dA e 3, N^4 - ϵ dC permitiu a detecção desses dois adutos em diversas situações. Os anticorpos foram utilizados na preparação de colunas de imunoafinidade, utilizadas na pré-purificação desses adutos. Conjugando-se o enriquecimento dos adutos por imunoafinidade com a técnica de ^{32}P -Postlabelling (IPPA), Nair e colaboradores ¹³ obtiveram um limite de detecção impressionante, 25 amol utilizando 50 μg de DNA. Tal técnica permitiu a detecção dessas lesões tanto em indivíduos (animais experimentais e humanos) normais quanto situações patológicas ou exposição a condições que induziam a lipoperoxidação. A análise de DNA de humanos revelou a presença de ϵ dA e ϵ dC em níveis da ordem de 0-27 adutos por 10^9 bases normais ¹³. Os níveis detectados de ϵ dA e ϵ dC em células brancas de sangue humano foram cerca de dez vezes menores que os níveis de adutos $M_1\text{dG}$, o produto gerado pela reação do abundante malonaldeído com a dG ¹⁴.

Níveis elevados de ϵ dA e ϵ dC, presumivelmente devido à produção extensiva de produtos de peroxidação lipídica, foram observados em amostras de fígado de rato da linhagem Long-Evans-Cinnamon que apresentam metabolismo de cobre anormal, acarretando acúmulo de cobre no fígado ¹⁵.

Em humanos, de forma similar, foram verificados níveis elevados de ϵ dA e ϵ dC em análises de biópsias de fígado de pacientes com patologias que acarretam acúmulo de metais como a doença de Wilson e a hemocromatose ¹⁶.

Níveis elevados de ϵ dA e ϵ dC foram verificados também em outros tecidos em associação com o estresse oxidativo e inflamação, como em baço de camundongo estimulado para produzir óxido nítrico em excesso ¹⁷ ou em pâncreas de pacientes acometidos de pancreatite ¹⁸.

Os níveis basais de eteno adutos podem ser altamente variáveis. A dieta parece ter um papel importante nessas variações tanto em roedores quanto em humanos ^{19,14}. Além disso outros fatores como hormonais devem desempenhar um papel crítico no nível dos adutos, por exemplo, uma dieta rica em ácidos graxos ω -6-polinsaturados produziu um aumento de 40% em média nos níveis de ϵ dA e ϵ dC em DNA de linfócitos de mulheres mas nenhum aumento em linfócitos de homem ¹⁴.

Devido à alta variabilidade nas concentrações basais desses adutos, os níveis observados em animais não expostos podem se sobrepor àqueles observados em animais expostos a xenobióticos como o cloreto de vinila e o vinil carbamato. Por exemplo, foi verificado um nível de $4,3 \pm 1,2$ ϵ dA/ 10^8 dA em linfócitos de ratos não tratados e $6,2 \pm 2,1$ ϵ dA/ 10^8 dA em linfócitos de ratos expostos ao cloreto de vinila ²⁰.

3.1.2.2 Espectrometria de massa

Devido aos níveis extremamente baixos em que os adutos são encontrados e à disponibilidade de reduzidas quantidades de DNA para a análise, a detecção desses produtos torna-se um grande desafio analítico. Para obtenção de êxito nesse processo, o método analítico precisa preencher dois quesitos fundamentais: sensibilidade e seletividade. A espectrometria de massa (MS) é atualmente uma das técnicas mais eficientes na identificação

molecular o que a torna extremamente seletiva. O acoplamento dessa técnica com métodos de separação como a cromatografia gasosa e o HPLC e mais recentemente, o desenvolvimento de sistemas que permitem a análise de massa em tandem tornaram essa técnica altamente sensível.

A análise por espectrometria de massa consiste em: *(i)* gerar íons através de perda ou ganho de carga (p. ex.: ejeção de elétrons, protonação ou desprotonação), *(ii)* separar os íons de acordo com suas relações massa/carga (m/z) e *(iii)* determinar as intensidades relativas de cada um desses íons.

Do ponto de vista instrumental, um espectrômetro de massa é composto de três partes principais: uma fonte de ionização, um analisador responsável pela separação dos íons em tempo no espaço e um detector. Um sistema adequado de introdução de amostras é ligado à fonte de ionização como, por exemplo, o interfaceamento com um sistema cromatográfico (GC ou HPLC). O percurso dos íons entre a fonte de ionização e o detector deve se dar sob pressões muito baixas (da ordem de 10^{-6} Torr) caso contrário, as colisões dos íons com outras moléculas gasosas reduziriam a resolução e a sensibilidade do instrumento pelo aumento da distribuição das energias cinéticas dos íons, pela indução de fragmentação ou simplesmente bloqueando os íons e impedindo-os de alcançar o detector. Tais pressões reduzidas são obtidas através da combinação de bombas de vácuo mecânicas com bombas turbomoleculares, de difusão ou criogênicas. Finalmente, uma interface computacional é necessária para o controle dos diversos componentes do espectrômetro e para o processamento dos dados obtidos (Figura 3.2).

Figura 3.2: Componentes de um espectrômetro de massa.

Atualmente, dispõem-se de uma grande variedade de métodos de ionização. Entretanto, os métodos clássicos como o impacto eletrônico e a

ionização química vêm perdendo espaço para métodos recentes mais suaves que permitem a análise de moléculas polares (maioria das biomoléculas). Dentre os últimos, destacam-se o *electrospray* e o MALDI. Entretanto, na análise de adutos um método “clássico” ainda permanece promissor: a ionização química por captura de elétrons (ECCI).

3.1.2.2.1 Detecção de adutos endógenos por espectrometria de massa com ionização química por captura de elétrons

Esse método de ionização envolve a captura de um elétron de baixa energia por uma molécula precursora. Os elétrons de baixa energia são geralmente produzidos pelo bombardeamento de um gás (geralmente metano a um pressão de 1 Torr) na fonte de ionização com elétrons de alta energia (100 eV). Esse gás possui três funções na ionização química: fonte de elétrons secundários, resfriamento colisional dos elétrons secundários em elétrons termais e resfriamento colisional dos íons com excesso de energia ²¹. É necessária uma derivatização dos analitos, geralmente através de pentafluorobenzilação, para torná-los mais voláteis e estáveis durante a separação por cromatografia gasosa (GC) e introduzir um forte grupo eletróforo.

A hipótese de que produtos endógenos, mais especificamente um produto da lipoperoxidação – o malonaldeído (MDA), poderiam modificar o DNA gerando adutos foi confirmada pela primeira vez utilizando essa técnica. Chaudhary e colaboradores ²² detectaram o aduto M₁G, resultante da reação do MDA com a dG, em fígado humano proveniente de doadores saudáveis. Os níveis encontrados desse aduto foram de 5-11 adutos por 10⁷ bases, o que corresponde à cerca de 5400 adutos por célula.

A associação de uma pré-purificação por imunoafinidade com a detecção por espectrometria de massa com ionização química por captura de elétrons permitiu a detecção do aduto M₁G em níveis ainda mais baixos. Analisando-se o DNA proveniente dos leucócitos de dez doadores saudáveis, verificou-se a presença de $6,2 \pm 0,4$ M₁G por 10⁸ bases ²³.

Figura 3.3: Representação esquemática do mecanismo de ionização por *electrospray*.

O analisador mais comumente utilizado em equipamentos do tipo ESI é o do tipo quadrupolar que é constituído por quatro bastões de aço inoxidável dispostos simetricamente em relação ao eixo do sistema. Os bastões são conectados dois a dois a um gerador de tensão contínua sobreposto a uma tensão senoidal (radiofrequência). A combinação ESI/quadrupolos é bastante interessante, pois a ionização ocorre à pressão atmosférica e esse tipo de analisador é relativamente tolerante a altas pressões ($\sim 5 \times 10^{-5}$ Torr). Além disso, o analisador quadrupolar é capaz de analisar m/z de até 3000, o que é bastante útil, pois a ionização de biomoléculas por ESI produz uma distribuição de carga abaixo de m/z 3000. Outra vantagem adicional é o custo reduzido desse tipo de analisador.

Embora de alto custo, os analisadores do tipo triplo quadrupolo ou MS/MS ou ainda *tandem MS*, vem se popularizando devido a possibilidade de obter informações estruturais e um enorme incremento de sensibilidade. Uma análise por *tandem MS* pode ser definida como a seleção de um íon parental no primeiro analisador, seguido pela detecção do íon filho no terceiro analisador, formado na câmara de colisão (segundo analisador). A fragmentação dos íons parentais em íons filhos é obtida através da conversão

da energia translacional dos íons parentais em energia interna após a colisão com moléculas de gás energizadas. O MS/MS apresenta duas grandes vantagens em relação à espectrometria de massa clássica que são o aumento da sensibilidade e da seletividade da técnica. O aumento da sensibilidade está relacionado à diminuição do ruído químico que é provocado por outros componentes da amostra analisada. A filtragem dos íons reduz bastante tal ruído, conseqüentemente, outras filtrações o reduzem ainda mais, levando a um ganho na relação sinal/ruído. O ganho de seletividade é resultado da baixa probabilidade de duas moléculas gerarem íons pai e filho idênticos em MS/MS.

O equipamento utilizado no presente trabalho, um espectrômetro triplo quadrupolar com ionização por *electrospray* está esquematizado na Figura 3.4.

Figura 3.4: Representação esquemática de ESI-MS/MS.

O princípio de separação por MS/MS pode ser expresso pela seguinte equação:

Onde, m_p é o íon precursor ou o íon parental (que pode ser o íon molecular ou outro íon fragmento), m_f é o íon filho e m_n é o fragmento neutro produzido durante a reação de dissociação. O m_n não pode ser detectado, pois um espectrômetro de massa pode detectar apenas partículas carregadas.

Como as três variáveis m_p , m_f e m_n são independentes, elas podem ser mantidas fixas ou ser variadas resultando em diferentes modos de aquisição por MS/MS:

Modo de aquisição	m_p	m_f	m_n
Íons filhos	Fixa	Variável	Variável
Íons parentais	Variável	Fixa	Variável
Perda neutra constante	Variável	Variável	Fixa
Monitoramento de reações múltiplas	Fixa	Fixa	Variável

Tabela 3.1: Tipos de varredura em MS/MS.

Um espectro de íons filhos (Figura 3.5) é obtido através da seleção de um íon parental representativo da molécula no primeiro analisador seguido de sua passagem pela câmara de colisão onde as reações de dissociação são produzidas. O segundo analisador efetua uma varredura dos íons filhos gerados. Esse tipo de análise é utilizada freqüentemente para obter informações estruturais sobre o íon parental selecionado.

Figura 3.5: Esquema da monitoração de íons filhos.

Um espectro de íons parentais (Figura 3.6), é obtido pela seleção de um íon fragmentado no segundo analisador. É realizada uma varredura no primeiro analisador com o intuito de se determinar os íons precursores que se fragmentam gerando aquele íon filho. A aquisição de um espectro desse tipo tem por objetivo identificar dentro de uma mistura os diferentes componentes que se fragmentam em uma estrutura idêntica.

Figura 3.6: Esquema da monitoração de íons parentais.

Na aquisição de um espectro por perda neutra constante (Figura 3.7), são realizadas varreduras simultâneas nos dois analisadores mantendo-se entre eles uma diferença de massa constante que corresponde ao fragmento neutro considerado. Esse tipo de análise é muito versátil e permite detectar as famílias de compostos que se caracterizam pela perda do mesmo grupamento químico.

Figura 3.7: Esquema da monitoração por varredura de perda neutra constante.

O modo de aquisição que responde pelas excelentes sensibilidades e seletividades do MS/MS é a monitoração de reações múltiplas (MRM) (Figura 3.8). A aquisição é efetuada pela seleção do íon precursor no primeiro analisador e detecção de um ou mais íons filhos conhecidos provenientes da fragmentação do precursor na câmara de colisão. O segundo analisador não efetua uma varredura como no caso da aquisição de espectros filhos, mas focaliza-se em um ou mais fragmentos característicos.

Figura 3.8: Esquema da monitoração por varredura de perda neutra constante.

Os diferentes modos de varredura em MS/MS estão resumidos na tabela 3.2.

	MS1	Câmara de colisão	MS2
Espectro de íons filhos	Fixa (massa do íon parental)	<i>rf only</i> (todas as massas passam)	Varredura
Espectro de íons parentais	Varredura	<i>rf only</i> (todas as massas passam)	Fixa (massa do íon filho)
Perda neutra constante	Varredura (sincronizada com o MS2)	<i>rf only</i> (todas as massas passam)	Varredura (sincronizada com o MS1)
Monitoramento de reações múltiplas	Fixa (massa do íon parental)	<i>rf only</i> (todas as massas passam)	Fixa (massa do íon filho)

Tabela 3.2: Diferentes modos de varredura em MS/MS.

3.1.2.2.3 Detecção de adutos endógenos por espectrometria de massa com ionização por *electrospray*

Apesar de altamente promissora no estudo de adutos gerados endogenamente, até o momento apenas dois trabalhos descreveram a detecção de adutos endógenos, isto é, na ausência de tratamentos que induzissem a formação dos mesmos.

O primeiro foi o do grupo de L. J. Marnett onde confirmaram os dados obtidos por GC/ECCIMS sobre a formação endógena do aduto gerado na reação

entre o malonaldeído e a dG. Através de HPLC/ESI-MS/MS foi obtido um resultado equivalente ao obtido pela outra técnica, mostrando inequivocamente que adutos formados pela reação de produtos da lipoperoxidação com o DNA são gerados endogenamente e em indivíduos normais ²⁷.

O eteno aduto $N^2,3$ -edG foi também detectado em DNA proveniente de fígados de pacientes saudáveis ²⁸. Entretanto nesse trabalho o espectrômetro utilizado era do tipo simples quadrupolo e o nível verificado (0,1-2,5 adutos/ 10^6 guaninas) parece ser demasiadamente alto.

3.2 *Objetivos e Justificativas*

Recentemente foi mostrado que a dosagem das bases oxidadas do DNA até então amplamente utilizadas como possíveis biomarcadores, é uma tarefa muito mais difícil do que se imaginava. Durante anos foram publicados trabalhos que reportavam uma detecção artefactual de bases como a 8-oxodG. Atualmente, um consenso quanto aos níveis basais dessas lesões *in vivo* e técnicas totalmente isentas de geração artefactual das lesões parece estar distante. O problema reside principalmente no fato de ser difícil evitar a oxidação das bases durante os processos de extração do DNA e análise. Um novo bom marcador é objetivo comum de vários grupos de pesquisa no mundo. Nesse sentido, os etenoadutos parecem ser excelentes candidatos.

Após a caracterização de quatro novos etenoadutos relacionados com produtos importantes da lipoperoxidação, nossa preocupação se voltou para a detecção das lesões em sistemas mais complexos. Embora os adutos sejam altamente fluorescentes e a detecção por fluorescência bastante sensível, a baixa seletividade da técnica só possibilitou a detecção dos adutos em sistemas *in vitro*. Conseqüentemente, tornou-se necessário o desenvolvimento de outro método altamente seletivo e sensível para possibilitar a detecção de tais lesões em sistemas mais complexos.

A espectrometria de massa em tandem com ionização por *electrospray* (ESI-MS/MS) é uma técnica extremamente poderosa aliando sensibilidade e seletividade e acessível a uma grande variedade de biomoléculas. A facilidade no interfaceamento com HPLC é outra característica altamente interessante na ESI-MS/MS. Por essas razões a técnica seria potencialmente a mais indicada na detecção de adutos de DNA.

3.3 Materiais e Métodos

3.3.1 Materiais

3.3.1.1 Reagentes e solventes

Todos os reagentes utilizados eram do mais alto grau de pureza disponível comercialmente.

Aldrich (Milwaukee, USA): *trans,trans*-2,4-Decadienal, *trans*-2-octenal, 3-trimetilsilil-1-propanosulfonato de sódio (DSS), Amberlyst 15, D₂O 99,9% e peneiras moleculares de 3 Å;

Fluka (Bucks, Switzerland): Metanol-d₄;

Merck (Darmstadt, Germany): 2'-Desoxiadenosina;

EM Science (Gibbstown, USA): Solventes em grau gradiente para cromatografia (acetonitrila, tetrahydrofurano, diclorometano e metanol);

Cambridge Isotopes (Boston, USA): [¹⁵N₅]-2'-desoxiadenosina;

3.3.1.2 Diversos

Millipore (Bedford, USA): A água utilizada em todos os experimentos foi tratada com o sistema milli-Q. Membranas de filtração de nylon e PTFE Durapore 0,22 mm e Millex-GV₄ 0,22 mm;

Sigma (St. Louis, USA): Todos os demais reagentes, solventes e enzimas não mencionados acima.

3.3.2 Métodos

3.3.2.1 Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

Foram utilizados dois tipos de sistemas Shimadzu (Kyoto - Japan). O primeiro era composto de duas bombas LC-10AD, injetor Rheodyne, detector de série de fotodiodos SPD-M10AV e detector de fluorescência RF-535, todos estes componentes eram controlados por um “Communication Bus Module CBM-10A” e software CLASS LC-10AWS. O segundo era constituído de duas bombas LC-6AD, injetor Rheodyne, detector de série de fotodiodos SPD-M10AVP, detector de fluorescência RF-10AXL controlados pelo módulo SCL-10AVP e software CLASS-VP.

Os seguintes sistemas de eluição foram utilizados:

Sistema 1: coluna Luna C₁₈ (150 x 4,6 mm, 3 µm; Phenomenex) eluída com um gradiente binário de água e acetonitrila, variando-se a concentração de acetonitrila de 5 a 30% em 15 minutos e a seguir de 30 a 45% em mais 15 minutos e retornando 5% em dois minutos. O fluxo utilizado foi de 1 mL/min.

Sistema 2: coluna analítica Luna C₁₈ (150 x 2 mm, 3 µm) eluída com 10% acetonitrila em água durante 5 minutos, a seguir a proporção de acetonitrila foi elevada para 20% e variada de 20 a 40% em 23 minutos a um fluxo de 0,25 mL/min.

Sistema 3: coluna analítica Luna C₁₈ (150 x 4,6 mm, 3 µm) eluída com 5% acetonitrila em água durante 5 minutos, a seguir a proporção de acetonitrila foi elevada para 20% e variada de 20 a 40% em 23 minutos a um fluxo de 1 mL/min.

3.3.2.2 Síntese dos aldeídos e dos epóxidos

3.3.2.2.1 Epoxidação do DDE e 2-octenal

A uma solução de 5 mmol de DDE ou de octenal em 5 mL de acetonitrila, foram adicionados 1,44 mL de H₂O₂ 30 % (15 mmol). A mistura foi mantida em um frasco com circulação interna de água e agitação magnética e resfriada a 15°C. Foram adicionados 0,42 mL de NaOH 6M (2,5 mmol) gota a gota durante 1 hora. A seguir, a temperatura foi elevada a 25°C e a solução foi

mantida sob agitação por mais 8 horas. Ao final da incubação foram adicionados 5 mL de água e os produtos foram extraídos com CH_2Cl_2 (2 x 4 mL). Os extratos foram combinados, lavados com um volume de água, secos sobre MgSO_4 e concentrados sob fluxo de nitrogênio.

3.3.2.2.2 Síntese e epoxidação do HNE

O HNE foi sintetizado através do método descrito por Esterbauer e Weger ²⁹. Em 0,5 mL de acetona foram dissolvidos 25 μL de hidroxinonenal dietilacetil. A essa solução foram adicionados 10 μL de água e 5 mg de Amberlyst 15 e foi mantida sob agitação durante 30 minutos. Ao final da incubação, a solução foi filtrada e concentrada sob fluxo de N_2 . O resíduo obtido foi dissolvido em 400 μL de ACN a 50% e a esta mistura, adicionou-se 50 μL de H_2O_2 60 %. Durante uma hora foram adicionados 100 μL de NaOH a 6M e incubou-se a mistura por mais 3 horas a 15°C. Ao final da incubação foi adicionado 1 mL de água e os produtos foram extraídos com CH_2Cl_2 (2 x 1 mL). Os extratos foram combinados, lavados com um volume de água, secos sobre MgSO_4 e concentrados sob fluxo de N_2 .

3.3.2.2.3 Quantificação de 2-octenal, HNE e DDE

Todos os aldeídos foram quantificados por ^1H -RMN usando DSS como padrão interno. Os tubos de RMN foram preparados com 25 μL de cada um dos aldeídos (octenal, HNE ou DDE), 0,4 mg de DSS (em 20 μL de metanol- d_4) e 660 μL de metanol- d_4 . As concentrações dos aldeídos foram determinadas comparando-se as áreas dos picos correspondentes aos aldeídos e ao DSS.

3.3.2.3 Síntese e purificação de adutos marcados isotopicamente com ^{15}N

3.3.2.3.1 Síntese dos adutos I, II, III e IV

A uma solução contendo 125 μL de acetonitrila e 100 μL de tampão fosfato (0,2 M pH 7,2), foram adicionados 100 μg de $^{15}\text{N}_5$ -dA (dissolvida em

50 µL de água) e 25 µL de octenal, HNE ou DDE epoxidados. Após 72 horas de incubação a 37°C, os aldeídos que não reagiram foram extraídos com 500 µL de CH₂Cl₂. Os adutos foram purificados através do sistema 1 e suas concentrações foram determinadas pela absorbância a 278 nm.

3.3.2.3.2 Síntese de ¹⁵N₅-εdA

A εdA foi sintetizada pela reação entre 100 µg de [¹⁵N₅]-dA (dissolvida em 50 µL de água) e 25 µL de cloroacetaldeído em 125 µL de tampão fosfato (0,2 M pH 7,2) durante 4 horas a 37°C. A εdA foi purificada através do sistema 1 e sua concentração foi determinada pela absorbância a 275 nm.

3.3.2.4 Reação de 2-octenal, HNE e DDE na presença de H₂O₂ com DNA de timo de bezerro *in vitro*

DNA de timo de bezerro (0,1 mg) foi dissolvido em 100 µL de tampão fosfato a 0,1 M (pH 7,4) e a esta solução foram adicionados 10 µmol de H₂O₂ e 10 µmol de cada um dos seguintes aldeídos: 2-octenal, HNE e DDE (dissolvidos em 50 µL de metanol). As misturas resultantes foram incubadas a 37°C sob agitação durante cinco dias. O DNA foi então precipitado pela adição de 150 µL de isopropanol, foi mantido a -20°C por 2 horas e centrifugado a 14000 ×g durante 30 minutos. O resíduo foi dissolvido em 0,4 mL de tampão acetato 20 mM (pH 4.8) e subsequentemente digerido durante uma noite com 33 unidades de nuclease P1 a 37°C. Então, 25 unidades de fosfatase alcalina e 50 µL do tampão fornecido com a enzima foram adicionados à solução e incubou-se a 37°C por mais 2 horas. As enzimas foram precipitadas pela adição de 0,5 mL de clorofórmio e centrifugação a 14000 ×g durante 30 minutos.

3.3.2.5 Análise dos hidrolisados do DNA tratado *in vitro* por HPLC/Fluorescência e HPLC/ESI-MS

As amostras obtidas na seção anterior foram analisadas e quantificadas por HPLC com detecção por fluorescência e absorbância no UV (sistema 3). As análises foram efetuadas em quadruplicata. As quantidades de dA foram determinadas por detecção da absorbância no UV ($\lambda=260$ nm). As detecções do adutos foram efetuadas por fluorescência com excitação a 300 nm e emissão 410 nm. Os picos fluorescentes correspondentes aos adutos foram coletados, liofilizados, redissolvidos em 10 μ L de água e reanalisados através do sistema LC/MS 1.

3.3.2.6 Estudos de espectrometria de massa

3.3.2.6.1 Caracterização química

Nos estudos de caracterização química foram utilizados dois espectrômetros diferentes: LC-Q (Finnigan) e Quattro II (Micromass). Em ambos, a ionização é do tipo ionização *electrospray*. O primeiro possui um analisador por captura de íons (*ion trap*) e o segundo um triplo analisador quadrupolar (MS/MS).

Uma mistura de água e acetonitrila [1:1] foi usada como o eluente a um fluxo de 5 μ L/min. As amostras (1 μ g/ μ L) foram dissolvidas em ácido fórmico a 0.25% em água/acetonitrila 1:1. Tipicamente uma alíquota de 10 μ L foi injetada a cada análise.

3.3.2.6.2 Detecção

Nos experimentos de detecção dos adutos foi utilizado o espectrômetro Quattro II. Este equipamento possui uma fonte de ionização a pressão atmosférica (API) e dois tipos de *probes*: ionização por *electrospray* de elétrons (ESI) e ionização química a pressão atmosférica (APCI). O controle do equipamento e a aquisição de dados foram realizados através do software Masslynx.

A resposta do instrumento para os compostos analisados foi otimizada através das injeções diretas dos compostos em fluxos de cerca de $5 \mu\text{L min}^{-1}$ com uma bomba de seringa Harvard modelo 11 (Harvard Apparatus, South Natick, USA) e variando-se parâmetros como: geometrias da probe e fonte, fluxo do nebulizador e de secagem, temperatura da fonte, potenciais do capilar, lentes de alta voltagem, cone, *skimmer*, resoluções LM e HM, fatores de multiplicação, pressão do gás na câmara de colisão e energia de colisão.

Os espectros obtidos sem prévia separação cromatográfica foram obtidos através de injeções diretas dos compostos previamente purificados através de um injetor Rheodyne. A fase móvel era constituída por uma mistura de água/acetonitrila (1:1) bombeada através de uma bomba de HPLC Shimadzu LC-10AD a um fluxo de 2 mL/min . A bomba foi acoplada a um *splitter* que destinava 1/100 ($20 \mu\text{L/min}$) ao injetor e espectrômetro.

3.3.2.7 Acoplamento de espectrometria de massa com cromatografia líquida (LC/MS)

Foram utilizados dois tipos de arranjos cromatográficos nas análises por LC/MS:

O **sistema LC/MS 1**, compunha-se do mesmo arranjo de bomba e detector de fluorescência descrito para o sistema 1 mas com uma coluna Hypersil C_{18} ($150 \times 1 \text{ mm}$, $3 \mu\text{m}$; Supelco, Bellefonte, PA) eluída com um fluxo de $100 \mu\text{L/min}$ de uma mistura de água/acetonitrila (65:35) contendo 3 mM de ácido fórmico. As análises foram feitas em modo positivo utilizando-se um potencial de 4 kV para o capilar da probe de ESI, uma voltagem de cone de 25 V e uma temperatura da 150°C para a fonte de API. Alíquotas de $0.5 \mu\text{L}$ foram injetadas em cada análise.

O **sistema LC/MS 2** era composto por duas bombas LC-6AD, injetor Rheodyne e detector de fluorescência RF-10AXL controlados pelo módulo SCL-10AVP e software CLASS-VP. Uma coluna Luna C_{18} ($150 \times 2 \text{ mm}$, $3 \mu\text{m}$; Phenomenex) era eluída com um gradiente binário de formiato de amônio/ácido fórmico 99:1 5 mM /acetonitrila. A concentração de acetonitrila variou de 5 a 30% em 15 minutos e a seguir de 30 a 45% em mais 15 minutos

e retornando a 5% em dois minutos. O fluxo utilizado foi de 250 $\mu\text{L}/\text{min}$. Utilizou-se um *splitter* construído para esse fim com uma razão de separação de 1/5, sendo que 50 μL foram destinados à probe de ESI e 200 μL ao detector de fluorescência. As análises foram realizadas com a fonte de ionização a 110°C e voltagens de 2.2 kV e 17 V foram aplicadas ao capilar da probe e fonte de ionização respectivamente. Utilizou-se uma pressão de argônio no Q2 igual a 3×10^{-3} Torr e uma energia de colisão de 18 eV foi aplicada.

O sistema LC/MS 3 era composto por duas bombas LC-6AD controlados pelo módulo SCL-10AVP e injetor Rheodyne. Uma coluna Luna C₁₈ (150 x 2 mm, 3 μm ; Phenomenex) era eluída com um gradiente binário de solução de ácido fórmico a 0,1% e acetonitrila/ácido fórmico a 0,1% (1:1). A concentração da fase móvel composta de acetonitrila/ácido fórmico variou de 4 a 8% em 4 minutos, a seguir de 8 a 50% em 6 minutos, de 50 a 60% em 10 minutos e finalmente retornou a condição inicial em mais 2 minutos. O fluxo utilizado foi de 0,2 mL/min. O fluxo total era direcionado à probe de *electrospray*. Os parâmetros da fonte de ionização eram idênticos aos do sistema anterior.

3.3.2.8 Análise de DNA *in vivo*

3.3.2.8.1 Tratamento de ratos com solução de nitrilotriacetato de ferro (Fe-NTA)

A solução de Fe-NTA foi preparada imediatamente antes do uso misturando-se soluções de FeCl₃ 0,3 M e NTA 0,6 M na proporção 1:2. O pH foi acertado para 7,4 com carbonato de sódio. As soluções foram diluídas em duas vezes com solução salina (NaCl 0,9%) e esterilizadas por filtração. Ratos machos *Wistar* com 3 meses de idade foram tratados, através de injeção intraperitoneal, com 15 mg Fe/kg. Os animais do grupo controle receberam apenas injeções de solução salina. Após 24 horas os animais foram anestesiados com CO₂, sacrificados e os órgãos fígado, rins e pulmões foram retirados. Os órgãos foram lavados com solução salina e imediatamente congelados em N₂ líquido e armazenados em freezer -80°C até o uso.

3.3.2.9 Isolamento e hidrólise do DNA

A extração do DNA foi efetuada utilizando o método caotrópico com NaI³⁰ com algumas modificações. Cerca de 500 mg de fígado, rins e pulmões foram finamente divididos com uma tesoura cirúrgica em 6 mL do tampão A (sacarose, 320 mM; MgCl₂, 5 mM; Tris-HCl, 10 mM; desferroxamina, 0,1 mM; Triton x100, 1%; pH 7,5) e a seguir, homogeneizados. As amostras foram centrifugadas a 1500×g por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado, o precipitado foi ressuspensão em 6 mL do tampão A e recentrifugado como descrito acima. O sobrenadante foi novamente descartado e o precipitado foi ressuspensão em 1,8 mL do tampão B (Tris-HCl, 10 mM; desferroxamina, 0,1 mM; EDTA, 10 mM; pH 8,0). À solução resultante, foram adicionados 105 µL de SDS a 10%. Após suave agitação, foram adicionados 30 µL de RNase A (1 mg/mL) e 8 mL de RNase T1 (1 U/µL) aos tubos e incubou-se a 50°C por 15 minutos. A seguir, adicionou-se 90 µL de uma solução de proteinase K a 20 mg/mL e incubou-se a 37°C por 1 hora. As amostras foram então centrifugadas por 15 minutos a 5000×g. O sobrenadante foi coletado e a este, foram adicionados 3,6 mL de tampão NaI (NaI a 7,6 M, Tris a 40 mM, EDTA a 20 mM, desferroxamina a 0,3 mM, pH 8,0) e 6 mL de isopropanol. Os tubos foram invertidos algumas vezes para homogeneização e mantidos em freezer -20°C por uma noite. As amostras foram então centrifugadas a 5000×g por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e 3 mL de isopropanol 40% foram adicionados. Os tubos foram novamente centrifugados como acima, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com etanol 70%. Após nova centrifugação, o precipitado foi seco ao ar e dissolvido em 1,5 mL de água.

As concentrações obtidas de DNA foram determinadas espectrofotometricamente e suas purezas foram estimadas pela relação Abs_{260/280}. As quantidades obtidas de DNA foram entre 500 e 1500 µg.

O DNA obtido na etapa anterior foi dividido em alíquotas de 200 µg e os volumes foram igualados a 600 µL com a adição de água. A cada tubo foram adicionados 10 µL de uma solução contendo 1µM dos padrões ¹⁵N₅-edA, ¹⁵N₅-I, ¹⁵N₅-II, ¹⁵N₅-III e ¹⁵N₅-IV. À solução resultante, foram adicionados 60 µL de

tampão para nuclease P1 (acetato de sódio a 2 M, ZnCl_2 a 10 mM, pH 5.2) e 30U de nuclease P1. As amostras foram incubadas por 4 horas a 37°C. Ao final dessa incubação, foram adicionados 4U de fosfatase alcalina e 66 μL do tampão fornecido com a enzima. As amostras foram incubadas por mais 2 horas.

3.3.2.10 Pré-purificação do DNA e análise do por HPLC/ESI-MS/MS

Colunas de extração em fase sólida Supelclean LC-18 6 mL (Supelco) foram lavadas com 5 mL de acetonitrila e equilibradas com 10 mL de água. Então, foram aplicados 200 μg do DNA hidrolisado na etapa anterior. A coluna foi eluída com 3 mL de acetonitrila a 10% e a seguir, com 3 mL de acetonitrila a 40%. Essa última fração foi filtrada em filtros de nylon de 0,22 μm , liofilizada e o resíduo obtido foi dissolvido em 20 μL de acetonitrila a 50%. Os 20 μL obtidos no passo anterior foram analisados pelo sistema LC/MS 2 ou LC/MS 3.

3.4 Resultados

3.4.1 Formação de adutos na reação dos produtos de oxidação do DDE com DNA *in vitro*

No capítulo anterior foi mostrado que o DDE é um agente alquilante bastante versátil sendo capaz de produzir vários adutos ao reagir com dA *in vitro*. O passo seguinte seria verificar se os mesmos adutos também são formados na reação dos produtos de oxidação do DDE com o DNA.

A fluorescência intensa apresentada pelos adutos permite a detecção de quantidades tão baixas quanto 0,5 pmol dos compostos. A análise por HPLC com detecção fluorimétrica dos produtos da hidrólise enzimática de DNA de timo de bezerro tratado com DDE e H₂O₂ revelou a presença dos quatro novos adutos caracterizados como pode ser constatado na figura 3.9. Entretanto devido a grande complexidade do perfil cromatográfico apresentado pelo hidrolisado enzimático do DNA e pela baixa seletividade da detecção fluorimétrica, foi necessária a confirmação estrutural dos adutos por espectrometria de massa com ionização por *electrospray* de elétrons. A análise dos picos fluorescentes eluídos nos tempos de retenção relativos aos adutos por espectrometria de massa confirmou inequivocamente a formação dos adutos na reação *in vitro* do DDE com o DNA na presença de peróxidos.

Figura 3.9: Análise por HPLC/Fluorescência ($\lambda_{\text{exc}} = 300$ e $\lambda_{\text{emis}} = 410$ nm) dos produtos da hidrólise enzimática de DNA de timo de bezerro tratado *in vitro* com DDE na presença de H_2O_2 . À direita, espectros de ESI-MS obtidos da análise dos picos coletados na análise por HPLC/Fluorescência.

3.4.2 Quantificação do nível de adutos formado na reação entre o 2-octenal, HNE e DDE com DNA *in vitro*

A caracterização completa dos adutos mostrou que o DDE é capaz de gerar o aduto (II) que julgava-se ser um marcador exclusivo do HNE. Até o momento, não havia informações a respeito da reatividade do DDE em relação ao HNE e também ao 2-octenal que é o principal produto da degradação do DDE. Com o intuito de se determinar a reatividade de cada aldeído frente ao DNA, realizamos experimentos onde as quantidades dos aldeídos foram

cuidadosamente determinadas através de ^1H -RMN. A seguir, quantidades idênticas de cada aldeído foram incubadas com DNA *in vitro*. Os DNAs tratados foram então hidrolisados enzimaticamente e analisados por HPLC com detecção fluorimétrica com confirmação por espectrometria de massa.

A análise dos produtos da hidrólise enzimática do DNA tratado com HNE revelou a presença de um pico intenso com tempo de retenção característico do aduto **II**. A identidade do produto foi confirmada pela análise por ESI-MS do pico coletado (Figura 3.10).

Figura 3.10: Análise por HPLC/Fluorescência ($\lambda_{\text{exc}} = 300$ e $\lambda_{\text{emis}} = 410$ nm) dos produtos da hidrólise enzimática de DNA de timo de bezerro tratado *in vitro* com HNE na presença de H_2O_2 . À direita, espectro de ESI-MS obtido da análise do pico coletado na análise por HPLC/Fluorescência.

O 2-octenal também levou a formação de um único aduto fluorescente hidrofóbico (Figura 3.11). O tempo de retenção e a posterior análise desse por produto por ESI-MS mostraram que tal pico corresponde ao aduto **III**.

Figura 3.11: Análise por HPLC/Fluorescência ($\lambda_{\text{exc}} = 300$ e $\lambda_{\text{emis}} = 410$ nm) dos produtos da hidrólise enzimática de DNA de timo de bezerro tratado *in vitro* com 2-octenal na presença de H_2O_2 . À direita, espectro de ESI-MS obtido da análise do pico coletado na análise por HPLC/Fluorescência.

Na tabela 3.3 são apresentados os resultados referentes à quantificação dos adutos formados no tratamento *in vitro* de DNA com os três aldeídos. A análise revelou que o HNE é cerca de 1,6 vezes mais reativo em relação ao 2-

octenal e 4 vezes mais reativo que o DDE. Entretanto o DDE produz uma maior variedade de produtos.

Tabela 3.3: Níveis de adutos formados na reação *in vitro* de DNA de timo de bezerro com o 2-octenal, HNE e DDE na presença de H₂O₂.

	Nível de adutos (adutos/10 ³ dAdo)			
	I	II	III	IV
Octenal			114,1 ± 17,7	
HNE		179,8 ± 2,9		
DDE	6,5 ± 2,1	4,9 ± 0,5	26,4 ± 3,0	6,9 ± 0,4

3.4.3 Desenvolvimento de um método de detecção por HPLC/ESI-MS/MS

Embora seja bastante sensível, a detecção fluorimétrica possui aplicação limitada na análise dos adutos devido à baixa seletividade. De fato, como apresentado anteriormente, já na análise de DNA tratado *in vitro* com DDE encontramos dificuldades na utilização dessa técnica, pois outros produtos fluorescentes também são formados e as identificações dos produtos baseiam-se apenas nos tempos de retenção. Conseqüentemente, a técnica seria inviável na análise de matrizes mais complexas como DNA celular e o desenvolvimento de um método de detecção por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa em tandem com ionização por *electrospray* era imprescindível no prosseguimento do projeto.

3.4.3.1 Síntese de padrões internos enriquecidos isotopicamente com ¹⁵N

Ao contrário de outros sistemas de detecção para HPLC, as análises por ESI apresentam uma grande variabilidade entre diferentes injeções, pois a eficiência de ionização não é constante. Conseqüentemente, a utilização de padrões externos na quantificação não é confiável e se torna necessária a

utilização de padrões internos. Por outro lado, a possibilidade de se detectar simultaneamente compostos eluídos com mesmo tempo de retenção (massas diferentes) permite a utilização do tipo de padrão interno mais preciso, os enriquecidos isotopicamente, ou seja, diferindo do analito em apenas alguns nêutrons. Como são quimicamente idênticos, eles são coeluídos com precisão e apresentam características de ionização também idênticas.

A síntese dos padrões enriquecidos isotopicamente foi realizada a partir da [$^{15}\text{N}_5$]-2'-desoxiadenosina por métodos estabelecidos na etapa anterior. Devido ao preço altíssimo da [$^{15}\text{N}_5$]-2'-desoxiadenosina, foram realizadas sínteses a partir de poucos microgramas do nucleosídeo. Os sistemas de HPLC utilizados na purificação dos padrões enriquecidos com $^{15}\text{N}_5$ foram cuidadosamente analisados com o objetivo de detectar contaminações dos adutos $^{14}\text{N}_5$. Os produtos tiveram suas identidades confirmadas através de análises por espectrometria de massa (Figura 3.12). Os produtos obtidos apresentaram um íon pseudomolecular ($[\text{M} + \text{H}]^+$) com 5 unidades de massa em relação aos adutos não marcados (**II**, $m/z = 411$; **III**, $m/z = 381$ e **IV**, $m/z = 423$), confirmando a presença de cinco isótopos ^{15}N de nitrogênio. A fragmentação dos adutos também ocorre pela perda de um fragmento de 116 Da (2'-desoxirribose) gerando as bases alquiladas de massas 294, 264 e 306, correspondentes aos adutos **II**, **III** e **IV**, respectivamente.

Figura 3.12: Análise dos adutos $^{15}\text{N}_5$ por ESI-MS/MS. Espectros superiores: *full scan* ; Espectros inferiores: espectros filhos do íon principal.

3.4.3.2 Desenvolvimento de um método de detecção por HPLC/ESI-MS/MS

3.4.3.2.1 Ajuste das condições de análise por MRM

A utilização da espectrometria de massa acoplada a técnicas de ionização suaves como a ionização por *electrospray* permitiu a análise de

substâncias não-voláteis, termossensíveis e ainda dos componentes de uma mistura após separação por técnicas como o HPLC e a eletroforese capilar. Embora seja um detector de HPLC bastante universal, o espectrômetro de massa possui vários componentes a serem ajustados para cada composto a ser analisado. Os parâmetros mais importantes são o alinhamento geométrico da probe em relação à fonte e da fonte em relação ao analisador, os fluxos de N₂ do nebulizador e de secagem na fonte, a temperatura da fonte, ajuste de diversos potenciais (capilar, lentes de alta voltagem, cone e *skimmer*), a pressão de argônio na câmara de colisão e energia transferida a esse gás. O ajuste destes parâmetros foi feito através da monitoração da intensidade dos sinais correspondentes aos produtos injetados por infusão constante.

Na detecção por MRM a primeira condição a ser estabelecida é o tipo de fragmentação a ser gerada. Para que o método atinja a sensibilidade desejada é necessário não somente que as moléculas (parentais) a serem analisadas ionizem eficientemente, mas também que fragmentem com alta eficiência gerando de preferência um único íon (filho). Portanto, é essencial o conhecimento do perfil de fragmentação dos analitos.

A figura 3.13 mostra os espectros obtidos da análise do aduto **III** [¹⁵N₅] por espectrometria de massa com um outro tipo de analisador quadrupolar, o tipo *ion trap*. Nesse tipo de análise, é possível realizar múltiplos estágios de espectrometria de massa em tandem, aumentando a quantidade de informação estrutural obtível de uma molécula. As fragmentações observadas nas análises por *ion trap* são induzidas por mecanismos similares aos gerados através da câmara de colisão de sistemas do tipo triplo quadrupolo. No caso do aduto **III** foi possível observar até o estágio 4 (“íons bisnetos”). A análise por *ion trap* confirmou que a ligação mais facilmente rompida na molécula é a glicosídica resultando na formação da base alquilada protonada e à perda do açúcar como molécula neutra. Embora a perda do fragmento de 116 Da correspondente a 2'-desoxirribose seja inespecífica, pois todos os desoxinucleosídeos apresentariam a mesma fragmentação, a grande diferença de massa entre os adutos e os nucleosídeos não modificados não prejudicaria a seletividade do método. Além disso, como o método se destinaria à detecção simultânea de vários adutos, seria interessante que as características de

fragmentação fossem próximas, pois facilitaria a padronização do método. De fato a única etapa compartilhada pelos adutos na fragmentação é a perda do açúcar. Depois da ligação glicosídica, as ligações mais vulneráveis a quebras são aquelas dos grupos álcool e como os adutos diferem estruturalmente nesse ponto, cada produto exibe um espectro de íons “netos” diferentes.

Figura 3.13: Análise do aduto III [15N₅] por ESI/ion trap (MS₄)

Portanto, as condições de análise foram ajustadas de forma a maximizar ao mesmo tempo ionização dos adutos protonados $[M + H]^+$ ($\epsilon dA = 276$, $I =$

436, **II** = 406, **III** = 376 e **IV** = 418) e a quebra da ligação glicosídica gerando os íons $[B + H_2]^+$ (m/z = 160, **I** = 320, **II** = 290, **III** = 260 e **IV** = 302). A sensibilidade máxima foi obtida através da combinação entre tensão no capilar de 2,2 kV, voltagem do cone de 17 V, energia de colisão de 18 keV e pressão de argônio de (3×10^{-3} Torr).

3.4.3.2.2 Interfaceamento HPLC/MS

O interfaceamento da cromatografia líquida à espectrometria de massa também requer a padronização de várias condições. A escolha de colunas e eluentes deve levar em consideração suas compatibilidades com as condições de ionização. A probe de *electrospray* permite a princípio, a utilização desde fluxos de poucos microlitros até fluxos próximos a 1 mL/min no modo *megafLOW*. Entretanto, como a resposta do *electrospray* é altamente dependente da concentração do analito ^{31,32}, a utilização de colunas de diâmetros internos menores é preferível pois fluxos menores aumentam a concentração do pico do analito e a resposta do *electrospray* ^{33,34}. Embora já dispuséssemos de várias condições cromatográficas para a análise simultânea dos adutos, pelas razões acima mencionadas, elas eram incompatíveis com a análise por ESI-MS sendo necessária a repadronização das condições cromatográficas. A primeira dificuldade encontrada foi devida à composição da fase móvel, pois a utilização de tampões pouco voláteis como o fosfato é impraticável no ESI-MS. A utilização de uma pequena quantidade (<1%) de um ácido fraco e volátil é bastante desejada, pois minimiza a formação de íons pseudomoleculares por cationização $[M+Na]^+$ e $[M+K]^+$ e conseqüentemente amplificando a detecção do íon pseudomolecular protonado $[M+H]^+$. A utilização de ácido fórmico a 0,1% solucionou esse problema e nas situações onde a presença de algum sal era indispensável, uma solução de formiato de amônio/ácido fórmico (99:1) 5 mM foi utilizada. O formiato de amônio é um tampão bastante adequado a este tipo de análise devido a sua volatilidade.

Outra dificuldade na utilização do ESI-MS como detector está no fluxo utilizado. Embora seja possível a utilização de fluxos relativamente altos no modo *megafLOW*, há uma perda significativa de sensibilidade e rapidamente a

fonte é contaminada, portanto a utilização de colunas analíticas típicas (diâmetros de 4 ou 4,6 mm) não é interessante. Por essa razão, desenvolvemos métodos de separação dos adutos com colunas do tipo *narrow bore* (2 ou 2,1 mm de diâmetro), onde fluxos de 0,2-0,3 mL/min são utilizados. O método de separação inicialmente desenvolvido é capaz de separar os cinco adutos simultaneamente como observa-se na figura 3.14.

Figura 3.14: Análise por HPLC/ESI-MS/MS (sistema LC/MS-2) em modo MRM de 125 fmol dos padrões *edA*, **I**, **II**, **III** e **IV**. Os canais 276>160, 436>320, 406>290, 376>260 e 418>302 referem-se às detecções dos adutos *edA*, **I**, **II**, **III** e **IV** respectivamente.

Embora o método possa potencialmente detectar as cinco lesões, as dificuldades encontradas na manipulação do DNA e sobretudo os problemas de contaminação nos forçaram a simplificar o método. Embora teria sido interessante a detecção da *edA* para a comparação com os dados já disponíveis na literatura obtidos através de ³²P-*postlabelling*, as dificuldades encontradas na pré-purificação da *edA* por SPE nos forçaram a descartá-la pelo momento.

As diferenças de hidrofobicidade desse aduto em relação aos desoxinucleosídeos normais são muito pequenas e conseqüentemente é difícil extraí-la seletivamente. Os dados obtidos *in vitro* indicavam que os adutos **III** e **IV** são os principais produtos da reação dos epóxidos do DDE com o DNA. Devido ao enorme interesse que cerca o HNE, o método inclui também o aduto **II**. Assim decidimos nos concentrar somente na detecção dos adutos **II**, **III** e **IV**.

O método simplificado (LC-MS3), permitiu abreviar o tempo de análise e aumentou a resolução cromatográfica dos produtos. Um cromatograma típico da análise dos padrões pelo sistema desenvolvido está representado na figura 3.15. Nessa análise, próxima ao limite de detecção da técnica, foram injetados apenas 25 fmol de cada padrão. Considerando uma relação sinal/ruído de 5:1 como sendo razoável, o limite de detecção da técnica é de 20 fmol.

Figura 3.15: Análise por HPLC/ESI-MS/MS (sistema LC/MS-3) em modo MRM de 25 fmol dos padrões $^{15}\text{N}_5$ dos adutos **II**, **III** e **IV**. Os canais 411>295, 381>265 e 423>307 referem-se às detecções dos adutos **II**, **III** e **IV** respectivamente.

3.4.3.2.3 Curvas de calibração

As figuras 3.16-3.18 mostram os resultados de experimentos onde quantidades conhecidas dos adutos **II**, **III** e **IV** foram adicionadas a quantidades fixas dos padrões internos $^{15}\text{N}_5$ correspondentes (1 pmol). Foram

obtidas linearidades muito boas ($r^2 \geq 0,99$) na relação entre as áreas dos picos dos adutos e as relações entre as áreas dos adutos e os padrões internos $^{15}\text{N}_5$ respectivos. É importante ressaltar que a linearidade é mantida mesmo na região próxima ao limite de detecção do método (50 fmol).

Figura 3.16: Curva de calibração para o aduto **II** obtida da integração dos picos MRM ($^{14}\text{N}_5$: 406>290 e $^{15}\text{N}_5$: 411>295).

Figura 3.17: Curva de calibração para o aduto **III** obtida da integração dos picos MRM ($^{14}\text{N}_5$: 376>260 e $^{15}\text{N}_5$: 381>265).

Figura 3.18: Curva de calibração para o aduto **IV** obtida da integração dos picos MRM (¹⁴N₅: 418>302 e ¹⁵N₅: 423>307).

3.4.3.3 Análise de DNA de tecidos de animais

Após a detecção dos adutos *in vitro* e do desenvolvimento de um método altamente sensível, nosso próximo desafio era a detecção dos adutos em sistemas mais complexos como em DNA de tecidos animais (*in vivo*). Dos cinco adutos que detectamos *in vitro*: edA, **I**, **II**, **III** e **IV**, apenas a edA já havia sido detectada *in vivo*, como descrito anteriormente. Embora o aduto **II** já tivesse sido caracterizado ²⁴ e um método muito sensível para a detecção desse aduto já encontra-se disponível ²⁵, ele foi detectado apenas em DNA tratado *in vitro*.

A análise direta utilizando grandes quantidades de DNA seria inviável devido às pequenas capacidades de retenção das colunas *narrow bore*, portanto seria necessária uma maneira de pré-concentrar os adutos antes da análise por ESI-MS/MS. A concentração consistiria na remoção seletiva dos desoxinucleosídeos não modificados, presentes em concentrações além de milhões de vezes maiores que os adutos. As altas hidrofobicidades dos adutos em relação aos nucleosídeos normais são as características mais facilmente exploráveis em uma pré-purificação. A princípio, isso poderia ser realizado através de HPLC com colunas de fase reversa, entretanto o tempo necessário

para pré-purificar grandes quantidades de amostra e o risco de contaminação cruzada nos levaram a buscar outras alternativas. O emprego de colunas de extração em fase sólida (SPE) parecia uma alternativa interessante pelas razões que se seguem: (i) a disponibilidade da fase do tipo C_{18} facilitaria o desenvolvimento, pois as condições de eluição seriam próximas às já estabelecidas para HPLC, (ii) as colunas são descartáveis e dessa forma anula o risco de contaminações cruzadas e (iii) permitem o processamento simultâneo de várias amostras.

Surpreendentemente, logo nos primeiros experimentos utilizando DNA de rins e fígados de ratos da linhagem *Whistar* não tratados, foi possível detectar os adutos utilizando apenas 100 µg de DNA. Tal resultado gerou bastante entusiasmo pois mostrava a detecção de níveis endógenos dos adutos utilizando pequenas quantidades de DNA. Entretanto, experimentos posteriores revelaram que não passavam de contaminações de origem ainda desconhecida, provavelmente oriundos de resíduos das preparações sintéticas em larga escala (mg) uma vez que os produtos são bastante estáveis. Apesar da realização de vários controles em paralelo (enzimas, soluções, colunas de SPE), a contaminação não foi durante muito tempo descoberta, pois só surgia nas amostras onde o DNA estava presente, sugerindo contaminação durante as etapas de isolamento e purificação do DNA. Realizando todo o procedimento em outro laboratório, foi possível eliminar as contaminações pelos adutos **II** e **IV**. Entretanto, a contaminação do aduto **III** ainda persiste e por este motivo optamos por não trabalhar mais em estudos *in vivo* com o aduto **III**, enquanto esse problema não tenha sido resolvido. Infelizmente, os falsos positivos detectados inicialmente custaram meses de trabalho. Este fato alertou o laboratório para a necessidade de áreas como as “salas limpas” de laboratórios de toxicologia, uma vez que a detecção é sensível a contaminações da ordem de femtomol.

A detecção dos adutos (**II** e **IV**) tem sido uma tarefa difícil e constatamos que é impossível com quantidades de DNA inferiores a 1 mg. A obtenção de grandes quantidades de DNA é trabalhosa e cara devido a necessidade de utilização de grandes quantidades de enzimas. Por essas razões conseguimos até o presente apenas indícios de que eles estejam

presentes no DNA *in vivo*. Embora preliminares alguns resultados bastante sugestivos tem sido obtidos com a utilização de quantidades maiores de DNA. Utilizando cerca de 1,5 mg de DNA proveniente de pulmões de ratos tratados pelo complexo de ferro e ácido nitrilotriacético (Fe-NTA) fornecido pelo doutorando Humberto Reis Matos obtivemos um bom indício da detecção do aduto **II** como mostra a figura 3.19.

Figura 3.19: Análise dos hidrolisados de DNA de pulmões de rato tratado com Fe-NTA por HPLC/ESI-MS/MS em modo MRM. A detecção do aduto **II** é realizada no canal 406>290 e do padrão interno $^{15}\text{N}_5$ correspondente no canal 411>295.

As análises de cerca de 2 mg de DNA de rins de ratos não tratados forneceram forte indício da presença do aduto **IV** no DNA. Embora isso tenha sido verificado em apenas 2 dos 5 ratos analisados, esse resultado é interessante pois representaria a detecção de níveis endógenos basais dessa lesão (Figura 3.20).

Figura 3.20: Análise dos hidrolisados de DNA de fígado de ratos não tratado por HPLC/ESI-MS/MS em modo MRM. A detecção do aduto **IV** é realizada no canal 418>302 e do padrão interno $^{15}\text{N}_5$ correspondente no canal 423>307.

3.5 Discussão

Embora várias metodologias de detecção de modificações endógenas do DNA já foram descritas, a procura por uma ideal ainda não foi alcançada. Os produtos de oxidação do DNA por muito tempo eleitos como marcadores potenciais, têm sido agora revistos pela dificuldade em se eliminar as gerações artefatuais dessas lesões durante os processos de extração e processamento do DNA.

A presença endógena dos compostos indígenas, ainda de natureza química desconhecida, continua intrigando os pesquisadores da área ⁶. As características químicas dessa classe de compostos descartam a possibilidade de se tratarem de lesões oxidativas simples ou pequenas lesões de DNA⁷. Já foi sugerido que produtos da lipoperoxidação como o malonaldeído, a acroleína e o crotonaldeído poderiam ser candidatos a responsáveis pela geração interna desses produtos ³⁵, porém isso ainda é puramente especulativo. A caracterização de novos adutos mais hidrofóbicos formados a partir de produtos da lipoperoxidação de cadeia longa aumenta a gama de candidatos a compostos indígenas.

Embora os etenoadutos não substituídos já vêm sendo detectados em diferentes sistemas desde 1995, como mencionado na introdução desse capítulo, até o momento nenhum etenoaduto substituído foi detectado *in vivo*. Embora nossos resultados mostrem indicações bastante promissoras da detecção dessas lesões em DNA de órgãos de ratos tratados ou não, nossos esforços nesse sentido mostraram que a detecção dos etenoadutos substituídos é de fato, uma tarefa extremamente difícil. A utilização de quantidades crescentes de DNA tem mostrado que há fortes indícios da presença desses adutos *in vivo*. Embora altamente sensível e seletivo, nosso método ainda não é suficientemente sensível para detectar inequivocamente os adutos. Infelizmente, com a configuração que dispomos não é possível ampliar o limite de detecção. A sensibilidade que obtivemos, 20 fmol, é bastante alta comparando-se com outros métodos descritos na literatura. Recentemente foi descrito um método para a detecção da edA por LC/ESI-MS/MS onde o limite de detecção obtido foi de apenas 0,28 ng (~1 pmol) ³⁶. Os limites de detecção

obtidos por Frelon e colaboradores na análise de oito lesões oxidativas diferentes do DNA (ThdGli, 5-FordUrd, 5-HmdUrd, 5-OhdUrd, 8-oxodGuo, 8-oxodAdo, FapiGua e FapiAde) variaram de 5 a 214 fmol, dependendo do tipo de lesão ³⁷.

Atualmente novas tecnologias como as fontes de ionização com arranjos ortogonais como a *Z-spray* e a *turbo ion spray*, e os analisadores híbridos como o Q-TOF têm tornado a técnica ainda mais sensível, entretanto ainda não temos acesso a elas.

Como não resta nenhum outro recurso para aumentar a sensibilidade do nosso método com o equipamento que dispomos, a outra alternativa seria aumentar a quantidade de DNA em cada experimento. Um cálculo simples levando em conta o limite de detecção da técnica e o possível nível em que tais adutos estariam presentes sugere que realmente uma grande quantidade de DNA seria necessária para a detecção das lesões:

1. Em ratos, a adenina corresponde a 28,6% das bases, conseqüentemente a 2'-desoxiadenosina corresponde a 22,9% da massa do DNA;
2. Em 1 mg de DNA, portanto, há 0,23 mg de dA ou $5,49 \times 10^{17}$ moléculas de dA;
3. Considerando um limite de detecção de 20 fmol, $1,20 \times 10^{10}$ moléculas de aduto poderiam ser detectadas;
4. Portanto, para um dado nível de aduto seriam necessárias as quantidades de DNA seguintes:

Nível de aduto/dA	Quantidade de DNA (mg)
$1/10^6$	0,02
$1/10^7$	0,22
$1/10^8$	2,19
$1/10^9$	21,94
$1/10^{10}$	219,39

O fato de não ter sido possível detectar com segurança os adutos utilizando até 2 miligramas de DNA indica que eles possam estar presentes em níveis inferiores a $1/10^7$. Embora não seja possível inferir o nível em que os adutos estariam presentes a partir de dados de outros adutos, eles forneceria

alguma idéia a respeito da ordem de grandeza da presença dessas lesões. Os níveis encontrados de M₁G-dG em DNA proveniente de fígado humano e leucócitos foram de 9/10⁷ e 6/10⁸, respectivamente ^{22,23}. Já os níveis de 3,N⁴-edG também em DNA de fígado humano foi de 2 adutos por 10⁸ bases normais ²⁸.

A detecção da 1,N⁶-edA e da 3,N⁴-edC em vários sistemas também tem revelado que estão presentes em níveis baixos em DNA de órgãos de roedores e de humanos. A análise de DNA proveniente de fígados de ratos mostrou a que os adutos 1,N⁶-edA e da 3,N⁴-edC estão presentes nos respectivos níveis: 0,02-10/10⁸ e 0,03-24/10⁸ ¹⁹. Em fígado humano a análise do DNA revelou a presença de 1,N⁶-edA e da 3,N⁴-edC respectivamente em 0,05-3/10⁸ e 0,05-4/10⁸ ¹³. A análise de outros tecidos humanos como esôfago¹⁹, pâncreas¹⁸ e linfócitos¹⁴ revelou níveis de 1,N⁶-edA e da 3,N⁴-edC da mesma ordem de grandeza. Curiosamente, DNA de placenta humana apresenta níveis de 1,N⁶-edA muito altos, 10²-10³ mais elevados em relação aqueles encontrados em fígados de ratos e de humanos³⁶. Isso estaria de acordo com o alto estresse oxidativo que se observa nesse tecido ³⁸. Esse tecido poderia ser um bom modelo na detecção de nossos adutos.

Recentemente níveis basais de um aduto estruturalmente próximo aos nossos adutos foi detectado através de ³²P-*postlabelling* em roedores e humanos ³⁹. Tal aduto, o 1,N²-propano-dG substituído, é proveniente da reação direta do HNE com a dG via adição de Michael⁴⁰. Os níveis detectados foram de 3-10 adutos por 10⁹ bases normais. O tratamento com CCl₄, um forte indutor de lipoperoxidação ⁴¹, causou um aumento de 37 vezes no nível desse aduto. O aumento de várias ordens de grandeza no nível de adutos em situações de exposição ou patológicas tornam a medida desses adutos nessas situações bastante interessantes para estudos populacionais.

Além do prosseguimento dos experimentos de detecção por HPLC/ESI-MS/MS com quantidades mais elevadas de DNA e ampliando o número de animais estudados, analisaremos também a presença dos adutos em situações que induzem a formação de etenoadutos. Estamos desenvolvendo também um método de detecção por ³²P-*postlabelling*. Embora mais trabalhoso e menos seletivo, a sensibilidade alcançada tem sido bem maior.

3.6 Conclusão

Foi realizado um estudo comparativo *in vitro* entre reatividades dos aldeídos 2-octenal, HNE e DDE em relação ao DNA. Mostramos que embora produza um nível menor de adutos que o 2-octenal e o HNE, o DDE produz uma variedade maior de adutos o que pode explicar ao menos em parte, sua alta citotoxicidade e genotoxicidade reportadas. Além disso, demonstramos que os adutos formados a partir de HNE e 2-octenal também podem ser produtos de reação com o DDE. Isto tem importância na compreensão dos mecanismos de formação dessas lesões.

Foi desenvolvida uma técnica de detecção por HPLC/ESI-MS/MS que permite detectar os cinco adutos simultaneamente em níveis tão baixos quanto 20 fmol. Resultados preliminares indicam a presença dos adutos em DNA de pulmões de ratos tratados com um indutor da lipoperoxidação, o complexo Fe-NTA e também em rins de animais não submetidos a qualquer tratamento.

Embora mais trabalho seja necessário, os resultados são animadores e indicam a possibilidade de utilização dessa técnica na monitoração de possíveis níveis alterados de etenoadutos por exposição ambiental ou situações patológicas onde o estresse oxidativo esteja envolvido.

3.7 Referências Bibliográficas

1. Groopman, J. D. , Kensler, T. W. (1993) Molecular Biomarkers for Human Chemical Carcinogen Exposures. *Chemical Research in Toxicology* **6**, 764-770.
2. Nestmann, E. R., Bryant, D. W., Carr, C. J., Fennell, T. T., Gallagher, J. E., Gorelick, N. J., Swenberg, J. A., Williams, G. M. (1996) Toxicological Significance of DNA Adducts: Summary of Discussions With an Expert Panel. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* **24**, 9-18.
3. Williams, G. M. (1992) DNA Reactive and Epigenetic Carcinogens. *Experimental and Toxicologic Pathology* **44**, 457-463.
4. Randerath, K., Reddy, M. V., Gupta, R. C. (1981) 32P-Labeling Test for DNA Damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **78**, 6126-6129.
5. Randerath, K. , Randerath, E. (1994) 32P-Postlabeling Methods for DNA Adduct Detection: Overview and Critical Evaluation. *Drug Metabolism Reviews* **26**, 67-85.
6. Randerath, K., Reddy, M. V., Disher, R. M. (1986) Age- and Tissue-Related DNA Modifications in Untreated Rats: Detection by 32P-Postlabeling Assay and Possible Significance for Spontaneous Tumor Induction and Aging. *Carcinogenesis* **7**, 1615-1617.
7. Randerath, K., Yang, P. F., Danna, T. F., Reddy, R., Watson, W. P., Randerath, E. (1991) Bulky Adducts Detected by 32P-Postlabeling in DNA Modified by Oxidative Damage in Vitro. Comparison With Rat Lung I-Compounds. *Mutation Research* **250**, 135-144.
8. Randerath, K., Liehr, J. G., Gladek, A., Randerath, E. (1989) Age-Dependent Covalent DNA Alterations (I-Compounds) in Rodent Tissues: Species, Tissue and Sex Specificities. *Mutation Research* **219**, 121-133.
9. Randerath, K., Zhou, G. D., Hart, R. W., Turturro, A., Randerath, E. (1993) Biomarkers of Aging: Correlation of DNA I-Compound Levels With Median Lifespan of Calorically Restricted and Ad Libitum Fed Rats and Mice. *Mutation Research* **295**, 247-263.
10. Randerath, K., Li, D. H., Randerath, E. (1990) Age-Related DNA Modifications (I-Compounds): Modulation by Physiological and Pathological Processes. *Mutation Research* **238**, 245-253.
11. Carmichael, P. L., She, M. N., Phillips, D. H. (1992) Detection and Characterization by 32P-Postlabelling of DNA Adducts Induced by a Fenton-Type Oxygen Radical-Generating System. *Carcinogenesis* **13**, 1127-1135.
12. Wang, M. Y. , Liehr, J. G. (1995) Lipid Hydroperoxide-Induced Endogenous DNA Adducts in Hamsters: Possible Mechanism of Lipid Hydroperoxide-

- Mediated Carcinogenesis. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **316**, 38-46.
13. Nair, J., Barbin, A., Guichard, Y., Bartsch, H. (1995) 1,N6-Ethenodeoxyadenosine and 3,N4-Ethenodeoxycytine in Liver DNA From Humans and Untreated Rodents Detected by Immunoaffinity/³²P-Postlabeling. *Carcinogenesis* **16**, 613-617.
14. Nair, J., Vaca, C. E., Velic, I., Mutanen, M., Valsta, L. M., Bartsch, H. (1997) High Dietary Omega-6 Polyunsaturated Fatty Acids Drastically Increase the Formation of Etheno-DNA Base Adducts in White Blood Cells of Female Subjects. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention* **6**, 597-601.
15. Nair, J., Sone, H., Nagao, M., Barbin, A., Bartsch, H. (1996) Copper-Dependent Formation of Miscoding Etheno-DNA Adducts in the Liver of Long Evans Cinnamon (LEC) Rats Developing Hereditary Hepatitis and Hepatocellular Carcinoma. *Cancer Research* **56**, 1267-1271.
16. Nair, J., Carmichael, P. L., Fernando, R. C., Phillips, D. H., Strain, A. J., Bartsch, H. (1998) Lipid Peroxidation-Induced Etheno-DNA Adducts in the Liver of Patients With the Genetic Metal Storage Disorders Wilson's Disease and Primary Hemochromatosis. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention* **7**, 435-440.
17. Nair, J., Gal, A., Tamir, S., Tannenbaum, S. R., Wogan, G. N., Bartsch, H. (1998) Etheno Adducts in Spleen DNA of SJL Mice Stimulated to Overproduce Nitric Oxide. *Carcinogenesis* **19**, 2081-2084.
18. Kadlubar, F. F., Anderson, K. E., Haussermann, S., Lang, N. P., Barone, G. W., Thompson, P. A., MacLeod, S. L., Chou, M. W., Mikhailova, M., Plastaras, J., Marnett, L. J., Nair, J., Velic, I., Bartsch, H. (1998) Comparison of DNA Adduct Levels Associated With Oxidative Stress in Human Pancreas. *Mutation Research* **405**, 125-133.
19. Nair, J., Barbin, A., Velic, I., Bartsch, H. (1999) Etheno DNA-Base Adducts From Endogenous Reactive Species. *Mutation Research* **424**, 59-69.
20. Barbin, A. (1999) Role of Etheno DNA Adducts in Carcinogenesis Induced by Vinyl Chloride in Rats. *IARC Scientific Publications* 303-313.
21. Giese, R. W. (2000) Electron-Capture Mass Spectrometry: Recent Advances. *Journal of Chromatography A* **892**, 329-346.
22. Chaudhary, A. K., Nokubo, M., Reddy, G. R., Yeola, S. N., Morrow, J. D., Blair, I. A., Marnett, L. J. (1994) Detection of Endogenous Malondialdehyde-Deoxyguanosine Adducts in Human Liver. *Science* **265**, 1580-1582.
23. Rouzer, C. A., Chaudhary, A. K., Nokubo, M., Ferguson, D. M., Reddy, G. R., Blair, I. A., Marnett, L. J. (1997) Analysis of the Malondialdehyde-2'-Deoxyguanosine Adduct Pyrimidopurinone in Human Leukocyte DNA by Gas Chromatography/Electron Capture/Negative Chemical Ionization/Mass Spectrometry. *Chemical Research in Toxicology* **10**, 181-188.

24. Sodum, R. S. , Chung, F. L. (1991) Stereoselective Formation of in Vitro Nucleic Acid Adducts by 2,3-Epoxy- 4-Hydroxynonanal. *Cancer Research* **51**, 137-143.
25. Chen, H. J., Zhang, L., Cox, J., Cunningham, J. A., Chung, F. L. (1998) DNA Adducts of 2,3-Epoxy-4-Hydroxynonanal: Detection of 7-(1', 2'-Dihydroxyheptyl)-3H-Imidazo[2,1-i]Purine and 1,N6-Ethenoadenine by Gas Chromatography/Negative Ion Chemical Ionization/Mass Spectrometry. *Chemical Research in Toxicology* **11**, 1474-1480.
26. Gaskell, S. J. (1997) Electrospray: Principles and Practice. *Journal of Mass Spectrometry* **32**, 677-688.
27. Chaudhary, A. K., Nokubo, M., Oglesby, T. D., Marnett, L. J., Blair, I. A. (1995) Characterization of Endogenous DNA-Adducts by Liquid-Chromatography Electrospray-Ionization Tandem Mass-Spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* **30**, 1157-1166.
28. Yen, T. Y., ChristovaGueoguieva, N. I., Scheller, N., Holt, S., Swenberg, J. A., Charles, M. J. (1996) Quantitative Analysis of the DNA Adduct N-2,3-Ethenoguanine Using Liquid Chromatography/Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* **31**, 1271-1276.
29. Esterbauer, H. , Weger, W. (1967) Action of Aldehydes on Normal and Malignant Cells .3. Synthesis of Homologues of 4-Hydroxy-2-Aldenals .2. *Monatshefte Fur Chemie* **98**, 1994-&.
30. Wang, L., Hirayasu, K., Ishizawa, M., Kobayashi, Y. (1994) Purification of Genomic DNA From Human Whole Blood by Isopropanol- Fractionation With Concentrated Nal and SDS. *Nucleic Acids Research* **22**, 1774-1775.
31. Fenn, J. B. (1993) Ion Formation From Charged Droplets - Roles of Geometry, Energy and Time. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **4**, 524-535.
32. Kebarle, P. , Tang, L. (1993) From Ions in Solution to Ions in the Gas-Phase - The Mechanism of Electrospray Mass-Spectrometry. *Analytical Chemistry* **65**, A972-A986.
33. Emmett, M. R. , Caprioli, R. M. (1994) Micro-Electrospray Mass-Spectrometry - Ultra-High-Sensitivity Analysis of Peptides and Proteins. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **5**, 605-613.
34. Tomer, K. B., Moseley, M. A., Deterding, L. J., Parker, C. E. (1994) Capillary Liquid-Chromatography Mass-Spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews* **13**, 431-457.
35. Marnett, L. J. (1994) DNA Adducts of Alpha,Beta-Unsaturated Aldehydes and Dicarboxyl Compounds. *IARC Scientific Publications* 151-163.
36. Chen, H. J., Chiang, L. C., Tseng, M. C., Zhang, L. L., Ni, J., Chung, F. L. (1999) Detection and Quantification of 1,N(6)-Ethenoadenine in Human Placental DNA by Mass Spectrometry. *Chemical Research in Toxicology* **12**, 1119-1126.

37. Frelon, S., Douki, T., Ravanat, J. L., Pouget, J. P., Tornabene, C., Cadet, J. (2000) High-Performance Liquid Chromatography--Tandem Mass Spectrometry Measurement of Radiation-Induced Base Damage to Isolated and Cellular DNA. *Chemical Research in Toxicology* **13**, 1002-1010.
38. Walsh, S. W. (1998) Maternal-Placental Interactions of Oxidative Stress and Antioxidants in Preeclampsia. *Seminars in Reproductive Endocrinology* **16**, 93-104.
39. Chung, F. L., Nath, R. G., Ocando, J., Nishikawa, A., Zhang, L. (2000) Deoxyguanosine Adducts of T-4-Hydroxy-2-Nonenal Are Endogenous DNA Lesions in Rodents and Humans: Detection and Potential Sources. *Cancer Research* **60**, 1507-1511.
40. Winter, C. K., Segall, H. J., Haddon, W. F. (1986) Formation of Cyclic Adducts of Deoxyguanosine With the Aldehydes Trans- 4-Hydroxy-2-Hexenal and Trans-4-Hydroxy-2-Nonenal in Vitro. *Cancer Research* **46**, 5682-5686.
41. Klaassen, C. D. , Plaa, G. L. (1969) Comparison of the Biochemical Alterations Elicited in Livers From Rats Treated With Carbon Tetrachloride, Chloroform, 1,1,2-Trichloroethane and 1,1,1-Trichloroethane. *Biochemical Pharmacology* **18**, 2019-2027.

Capítulo 4: Incorporação de um aduto em oligonucleotídeos e estudo de algumas propriedades biológicas

4.1 Introdução

4.1.1 Síntese de oligonucleotídeos

Um fato amplamente comprovado é que o DNA é constantemente modificado por agentes químicos ou físicos. Embora a célula possua sistemas enzimáticos complexos que possibilitam o reparo destes defeitos e restabeleçam a integridade do código genético, esse aparato de defesa não é 100% eficaz e tal eficácia depende do tipo de lesão. A presença de uma lesão não reparada em uma das cadeias do DNA pode ocasionar erros de leitura nas etapas de replicação e transcrição. Esse evento, por sua vez pode provocar processos patológicos tais como letalidade celular, mutagênese, carcinogênese e envelhecimento celular.

Um desafio que tem sido proposto aos pesquisadores da área, é poder avaliar e compreender o papel biológico de cada lesão. Atualmente dispomos de vários estudos físico-químicos e bioquímicos que ajudam na compreensão de tal papel. Dentre os físico-químicos destaca-se a ressonância magnética nuclear (RMN) que permite determinar alterações conformacionais induzidas pelas lesões. Dentre os bioquímicos poderíamos citar os estudos da especificidade do reconhecimento das lesões por enzimas de reparo, fidelidade de replicação com polimerases e estudos de mutagenicidade em células de bactérias ou de mamífero. Em razão do grande número de lesões que poderiam ser formadas no DNA celular, é necessário a utilização de moléculas modelo. Atualmente, os sistemas mais precisos que se encontram disponíveis são os oligonucleotídeos modificados, preparados quimicamente e comportando uma única modificação em um sítio específico.

4.1.2 Princípios gerais da síntese de oligonucleotídeos

Sintetizar um fragmento de DNA consiste em ligar nucleosídeos entre si através de ligações fosfodiéster de um grupo fosfato. A conexão entre os nucleosídeos deve respeitar a ordem natural de uma cadeia de ácido nucléico, ou seja, consiste em ligar a função álcool secundária (3'-OH) da 2'-desoxirribose do primeiro nucleosídeo a função álcool primária (5'-OH) da 2'-

desoxirribose do segundo. A idéia é simples, mas a execução do ponto de vista químico, é bastante complexa.

A dificuldade na conexão entre os monômeros produzindo uma seqüência correta e desejada reside principalmente nas diferentes funções químicas presentes nos nucleotídeos. Sem uma devida proteção, os grupos aminoexocíclicos presentes nas bases A, C e G, poderiam reagir com as hidroxilas da desoxirribose ou com os grupamentos fosfato, produzindo ramificações na cadeia do DNA e conseqüentemente, estruturas não-naturais e indesejadas. A fim de se evitar tais reações secundárias, foi desenvolvida uma técnica de proteção funcional que confere aos monômeros utilizados um alto grau de seletividade. A estrutura geral destes nucleosídeos totalmente protegidos e utilizáveis na construção de fragmentos de DNA é apresentada na figura 1.4.

Figura 4.1: Estrutura geral de um monômero utilizado na síntese de oligonucleotídeos.

4.1.2.1 Proteção P_1 - Dimetoxitritil

A proteção P_1 é destinada a evitar uma autopolimerização dos monômeros durante a etapa de condensação. Essa proteção deve ser eliminada a cada ciclo permitindo o acréscimo de uma nova unidade nucleotídica. A estratégia mais utilizada atualmente para a proteção da função álcool primária 5'-OH é sob a forma de éter de um derivado tritílico, principalmente o 4,4'-dimetoxitritil ou DMTr ¹. O grupo DMTr (Figura 4.2) é lábil em meio ácido (enquanto que os demais grupos protetores – P_2 e P_3 são lábeis em meio alcalino) sendo dessa forma, possível removê-lo unicamente preparando o oligonucleotídeo para o recebimento de um monômero seguinte. Tal proteção possui outras características convenientes à síntese dos oligonucleotídeos:

- seu alto impedimento estérico favorece uma introdução seletiva sobre a função álcool primária 5'-OH;
- confere ao nucleosídeo uma lipofilicidade que permite sua solubilização nos solventes orgânicos utilizados na síntese;
- o cátion DMTr⁺ liberado a cada ciclo de condensação durante a hidrólise ácida, permite a monitoração do rendimento de acoplamento internucleotídica através de detecção condutométrica ou colorimétrica a 500 nm.

Figura 4.2: Proteção de 2'-desoxinucleosídeos por DMTr.

4.1.2.2 Proteção P₂ - Fosforamidita

A função álcool 3'-OH é funcionalizada possibilitando a acoplamento com um grupamento 5'-OH livre de outro nucleosídeo. A química atualmente mais amplamente utilizada na acoplamento dos monômeros é a da fosforamidita^{2,3,4}, esquematizada na figura 4.3. O fósforo trivalente reage com a função 5'-OH do nucleosídeo precedente produzindo uma ligação do tipo fosfito-triéster. A forma trivalente do fósforo é instável e, portanto é mais conveniente oxidá-la à forma fosfotriéster. A fosforamidita necessita prévia ativação por um ácido fraco como o tetrazol para reagir no acoplamento. Durante a oxidação o grupo diisopropilamino é perdido mas o grupo β-cianoetila permanece, sendo necessária sua desproteção após a síntese.

Figura 4.3: Fosforamidita e reação de acoplamento.

O grupo 3'-OH terminal do oligonucleotídeo é ligado ao suporte sólido através de um espaçador (adiante).

4.1.2.3 Proteção P_3

As bases A, C e G requerem uma proteção que permaneça durante todo o processo da síntese dos oligonucleotídeos. A maioria dos grupos protetores utilizados para bloquear as funções aminoexocíclicas é do tipo amida. Os derivados do ácido benzóico e do ácido isobutírico são os mais amplamente empregados (Figura 4.4). Entretanto, suas estabilidades excessivas requerem condições de desproteção duras como aquecimento e tratamento prolongados em solução concentrada de amônia ^{5,1,6}. Portanto, é um tipo de proteção proibida a produtos mais sensíveis que os nucleotídeos normais.

Vários outros grupos de utilização mais conveniente têm sido desenvolvidos, um dos mais notáveis é o grupo fenoxiacetila (Pac - Figura 4.4) desenvolvido por Schulhof e colaboradores ^{7,8}. A remoção desse grupo pode ser feita em condições bastante brandas como veremos adiante.

Figura 4.4: Grupos protetores das funções aminoexocíclicas utilizados na síntese de oligonucleotídeos.

4.1.2.4 Síntese de oligonucleotídeos em suporte sólido

Esta técnica consiste em imobilizar o primeiro nucleosídeo através de uma ligação covalente a um suporte sólido insolúvel. Os nucleosídeos seguintes são então adicionados sequencialmente e basta lavagens a cada ciclo para eliminar o excesso dos reagentes utilizados. Como dispensa purificações intermediárias tal técnica possui vários pontos positivos como a facilidade de manipulação, rapidez da síntese, possibilidade de síntese em escala reduzida (na ordem de micro - milimoles) e permite a automatização. Talvez seu único (e no nosso caso grande) inconveniente é requerer um grande excesso dos reagentes para compensar a diminuição da reatividade na fase heterogênea.

Dentre os diferentes tipos de suporte sólido disponíveis, as microesferas de vidro, são as mais utilizadas. Há vários tamanhos de poro disponíveis (CPG, 200 a 3000 Å) e funcionalizados com diferentes tipos de espaçadores.

Tal tipo de suporte apresenta como vantagens: ser apolar, mecanicamente estável e não se dilatar em solventes orgânicos.

Os espaçadores são longas cadeias bifuncionalizadas com ligações amida e éster entre o suporte e a função 3'-OH do nucleosídeo terminal. Tais ligações são lábeis em pHs altos e conseqüentemente, clivadas durante a etapa de desproteção das bases.

4.1.2.5 Ciclo de condensação na síntese pelo método da fosforamidita

O ciclo completo para a adição de cada novo nucleotídeo ao oligonucleotídeo compreende quatro etapas: a detritilação, a condensação, o *capping* e a oxidação (Figura 4.5).

O nucleosídeo terminal, fixado por seu grupo ao suporte sólido através de um espaçador, é detritilado por tratamento com ácido liberando sua função álcool primária 5'-OH. Esta reage com o grupo fosforamidita do nucleosídeo seguinte, previamente ativado por tetrazol. Como a reação não é quantitativa, uma pequena porcentagem de seqüências truncadas é produzida a cada novo ciclo. Se fosse permitido que essas seqüências continuassem a ser alongadas nas etapas seguintes, seria muito difícil isolar o produto dentre a mistura de seqüências produzidas. Esse problema é amenizado pelo *capping* dos grupos hidroxilas livres remanescentes por acetilação através de um forte agente acetilante, o *N*-acetildimetilaminopiridínio formado na reação entre quantidades equimolares de anidrido acético e 4-dimetilaminopiridina.

A ligação internucleotídeo formada é do tipo fosfito e muito instável, sendo susceptível a clivagens tanto em meio ácido quanto básico. Assim, após o *capping*, o triéster fosfito trivalente é oxidado à forma triéster fosfato pentavalente, muito estável. Na oxidação, é utilizada uma solução de iodo em tetrahydrofurano com água como doadora de oxigênio. Após esta etapa o ciclo é completo. A síntese pode continuar removendo o grupo DMTr do terminal 5' e repetindo um outro ciclo de acoplamento.

Figura 4.5: Ciclo de condensação pelo método da fosforamidita.

4.1.2.6 Desproteção dos oligonucleotídeos

A condição padrão para a desproteção dos oligonucleotídeos é um tratamento com amônia concentrada, a temperatura ambiente ou com aquecimento, dependendo da estabilidade dos grupos protetores dos grupos amino exocíclicos. O grupo DMTr terminal é geralmente conservado no fim da síntese (modo *trityl-on*), pois a hidrofobicidade que ele confere ao oligonucleotídeo, facilita sua purificação por HPLC. Após a purificação, o tritila é removido por tratamento ácido.

4.1.3 Incorporação de adutos de DNA em oligonucleotídeos

A introdução de nucleosídeos modificados em um ou vários sítios determinados de um oligonucleotídeo pode ser efetuada através de três abordagens:

- • incorporação por via enzimática;
- • incorporação por modificação pós-sintética de oligonucleotídeos “normais”;
- • incorporação por via química.

A via enzimática utiliza os mesmos princípios da biossíntese de ácidos nucleicos ao nível celular. A modificação que se deseja incorporar deve estar na forma de nucleotídeo 5'-trifosfato para ser reconhecido e inserido pela enzima responsável pelo alongamento da cadeia oligonucleotídica. Esse método foi utilizado com sucesso na incorporação de vários produtos de oxidação de bases nucleicas ⁹. Todavia, os problemas de especificidade e a impossibilidade de escolher um sítio de inserção único têm limitado consideravelmente seu campo de ação.

Na segunda abordagem acima mencionada, um oligonucleotídeo já sintetizado é submetido a uma reação que irá produzir a modificação desejável. A seguir, os produtos formados são purificados geralmente por HPLC e a identidade da lesão analisada por método como espectrometria de massa. Esse método é limitado principalmente pela escolha de seqüências (composição e comprimento) e pelo rendimento da etapa de pós-modificação.

Os dois métodos acima descritos têm sido atualmente suplantados pelo método de incorporação por via química que oferece uma grande flexibilidade quanto à escolha de seqüências a sintetizar e grande rendimento dos oligonucleotídeos.

Esse método implica na preparação do monômero fosforamídita derivado do nucleosídeo modificado que se deseja inserir (sinton). Este é utilizado na síntese automatizada em suporte sólido a fim de se construir oligonucleotídeos comportando uma ou mais lesões em posições precisas.

Um número grande de bases modificadas já foram introduzidas em oligonucleotídeos como *O*(6)-alquilguaninas ^{10,11}, *O*(4)-alquiltiminas ^{12,13,14}, 8-hidroxiguanina ¹⁵, adutos de guanina com 2-aminofluoreno ¹⁶, 2-(acetilamino)fluoreno ¹⁷, benzo{ α }pireno ^{18,19} e aflatoxinas ²⁰.

Dentre as lesões incorporadas ao DNA até o momento, destacamos em especial: a 3-(2-desoxi- β -D-*eritro*-pentofuranosil)-pirimido[1,2a]purin-10(3*H*)-

ona que é resultante da adição do malonaldeído (MDA) à dG²¹ e os eteno adutos 1,N⁶-εdA e 3,N⁴-εdC²².

O aduto do MDA, importante produto da lipoperoxidação, foi incorporado por Reddy & Marnett²¹ utilizando uma estratégia clássica de síntese mas devido à instabilidade do produto em tratamento amoniacal, utilizou-se o grupo protetor 2-(acetoximetil)benzoila (AMB) que pode ser eliminado tratando os oligonucleotídeos com uma solução anidra de carbonato de sódio em metanol.

4.1.4 Propriedades mutagênicas dos eteno adutos

Antes mesmo de se relacionar os eteno adutos com seu potencial carcinogênico, já haviam sido produzidos oligonucleotídeos contendo tais adutos devido à propriedade de serem altamente fluorescentes e, portanto eram utilizados como probes para detecção de ácidos nucleicos por fluorescência. A síntese de εdA e εdC, assim como o aduto do MDA, requer procedimentos suaves de desproteção devido à instabilidade em meio alcalino.

Os primeiros oligonucleotídeos sintetizados para o estudo das propriedades, não foram obtidos por incorporação de síntons, mas por modificação de polinucleotídeos sintéticos por cloroacetaldeído ou cloroetileno. Tais estudos verificaram que durante a replicação εA levava à incorporação incorreta de G^{23,24} ou A²⁵, e que a εC levava à incorporação de T e A²⁶.

Além de suas relações com compostos carcinogênicos, outra característica que ampliou ainda mais o interesse no estudo dos eteno adutos é o potencial mutagênico dessas lesões. As propriedades mutagênicas dos adutos εdA e εdC já foram avaliadas através de ensaios utilizando vetores ponte simples fita construídos a partir de oligonucleotídeos com as modificações em posições definidas. O uso de vetores simples fita minimiza o reparo do DNA e permite determinar a fidelidade da síntese trans-lesional em células.

Em *E. coli* e células de rins de macaco, ϵ dC produz principalmente transversões ϵ C·G $\rightarrow$ A·T e transições ϵ C·G $\rightarrow$ T·A^{27,28}. Em um vetor simples-fita contendo uma única ϵ dC, as frequências de mutação verificadas foram de 2% em *E. coli*, 32% em *E. coli* com o sistema SOS induzido e 81% em células de mamífero²⁸.

De maneira semelhante, ϵ dA foi altamente mutagênica em células de mamífero, onde causou principalmente transições ϵ A·T $\rightarrow$ G·C²⁹ e fracamente mutagênica em *E. coli*.

$N^2,3$ - ϵ dG e $1,N^2$ - ϵ dG só foram analisadas em sistemas bacterianos e apresentaram também propriedades mutagênicas provocando respectivamente transições ϵ G·C $\rightarrow$ A·T³⁰ e transições ϵ G·C $\rightarrow$ A·T³¹.

4.1.5 Reparo dos etenoadutos por excisão de base

Dentre os diferentes mecanismos de correção que as células possuem, acredita-se que o sistema de reparo por excisão de base é o responsável por eliminar a maior parte das lesões simples do DNA³². Um vasto espectro de lesões pode ser eliminado pelas enzimas de reparo por excisão de base e várias enzimas já foram descritas em *E. coli* como a glicosilase de uracila, a endonuclease III (Endo III), a glicosilase de formamidopirimidina (FPG) e glicosilases de alquilações do DNA. Os etenoadutos foram alvo de vários estudos visando o reparo do DNA após a lesão. Esses estudos forneceram um panorama bastante completo a respeito de como a célula consegue evitar que lesões tão perigosas permaneçam no DNA. O mecanismo preferencial parece ser por excisão de base e várias glicosilases específicas já foram descritas para organismos como *E. coli*, levedura e homem.

A 3-metiladenina (3-MeA)-DNA glicosilase merece destaque no processo. Mostrou-se inicialmente que a enzima purificada é capaz de excisar $N^2,3$ - ϵ G do DNA³³ e posteriormente, também ϵ dA. Aliás, dentre todos os substratos conhecidos para as 3-MeA-DNA glicosilases de levedura e humana, seu melhor substrato é exatamente a ϵ dA³⁴.

Mostrou-se que a ϵ dC é reparada por uma enzima apenas parcialmente purificada mas diferente da proteína alquil-*N*-purina glicosilase (ANPG) que é

a homóloga humana à AlkA (*E. coli*)^{35,36}. A enzima homóloga em *E. coli* também é capaz de remover εdC através de uma atividade glicosilásica³⁷. A enzima humana foi identificada como a glicosilase específica de *mismatch* de timina (hTDG)³⁸ e a bacteriana é exatamente a homóloga da hTDG, a enzima glicosilase de uracilas em dupla fita (dsUDG)³⁹. De forma semelhante à εdA, a enzima hTDG apresenta uma constante cinética para a εC/G muito maior (52x) que para o substrato inicialmente identificado, o pareamento incorreto U/G.

O reparo de N²,3-εdG também já foi verificado por glicosilases presentes em extratos brutos de células de mamífero^{40 41}.

A descoberta de glicosilases que reconhecem e excisam com boa eficiência os etenoadutos *in vitro* reforça a hipótese de sua presença endógena em diversos organismos.

4.2 Objetivos e Justificativas

Existem numerosas possibilidades de se modificar a estrutura do DNA. Tais modificações podem disparar processos patológicos como mutagênese e carcinogênese. Dentro os agentes potencialmente modificadores do DNA, os produtos da lipoperoxidação têm recebido grande atenção por vários grupos de pesquisa no mundo, pois como são formados *in vivo* podem constituir uma fonte interna e constante de lesão no DNA. Já foi mostrado que os adutos 1,*N*⁶- ϵ dA e 3,*N*⁴- ϵ dC são altamente mutagênicos em células de mamífero. Nas etapas anteriores deste projeto, realizamos a caracterização de 4 novos ϵ dA adutos que podem ser gerados pelo 2,4-decadienal e 2-octenal, importantes produtos da lipoperoxidação. Tais adutos são estruturalmente distintos de todos os demais que já foram integrados em oligonucleotídeos para estudos de replicação, reparo e mutagênese. Portanto, nosso desafio nessa etapa do projeto foi à introdução de um dos adutos, o 1-[3-(2-desoxi- β -D-*eritro*-pentofuranosil)-3H-imidazo[2,1-i]purin-7-il]-1-hexanol (aduto **III**) em oligonucleotídeos por via química. A obtenção de oligonucleotídeos contendo o aduto em diversas sequências abre perspectivas para outros projetos envolvendo mecanismo de reparo e mutagênese da lesão.

Essa etapa do trabalho foi desenvolvida no laboratório do Dr. Jean Cadet, em colaboração com o Dr. Didier Gasparutto no CEA/Grenoble.

4.3 Materiais e Métodos

4.3.1 Materiais

4.3.1.1 Reagentes e solventes

Todos os reagentes utilizados eram do mais alto grau de pureza disponível comercialmente.

Acros (Geel, Bélgica): ácido trifluoroacético, trietilamina;

Aldrich (Milwaukee, USA): *trans,trans*-2,4-Decadienal, *trans*-2-octenal, 3-trimetilsilil-1-propanosulfonato de sódio (DSS), Amberlyst 15, D₂O 99,9% e cloroacetaldeído;

Fluka (Bucks, Switzerland): Metanol-d₄, 4-dimetilamino-piridina;

Merck (Darmstadt, Germany): 2'-Desoxiadenosina, ácido fórmico;

SDS (Peypin, França): Solução de amônia a 32%, sulfato de sódio

EM Science (Gibbstown, USA): Solventes em grau gradiente para cromatografia (acetonitrila, tetrahidrofurano, diclorometano e metanol);

Glen Research (Sterling, USA): Todos os desoxinucleosídeos fosforamidita não modificados e os suportes CPG;

Trans-4-OH-nonenal foi fornecido por Thierry Douki (CEA/Grenoble, França).

4.3.1.2 Enzimas

Amershan Pharmacia Biotech (Upsala, Sweden): Fosfatase alcalina de intestino de bezerro, T4 polinucleotídeo quinase;

USB Corporation (Cleveland, USA): Nuclease P1;

Boehringer Mannheim (Mannheim, Alemanha): fosfodiesterase, Taq polimerase;

Pharmingen (San Diego, EUA): Alk A;

Trevigen-Interchim (Montluçon, França): Polimerase β;

Fpg e endo III foram fornecidas por Serge Boiteux (CEA/Fontenay aux Roses, França)

4.3.1.3 Diversos

Millipore (Bedford, USA): A água utilizada em todos os experimentos foi tratada com o sistema milli-Q. Membranas de filtração de nylon e PTFE Durapore 0,22 µm e Millex-GV4 0,22 µm;

Amershan Pharmacia Biotech (Upsala, Sweden): [γ - 32 P]ATP, colunas G-25 *microspin*;

Sigma (St. Louis, USA): Todos os demais reagentes, solventes e enzimas não mencionados acima.

4.3.2 Métodos

4.3.2.1 Cromatografias

4.3.2.1.1 Cromatografia em camada delgada

4.3.2.1.1.1 Analítica

As cromatografias em camada delgada (TLC) analíticas foram realizadas com placas de sílica Mackerey-Nagel Polygram SIL G/UV₂₅₄.

Três sistemas de eluição foram utilizados:

Sistema 1: diclorometano/metanol 9:1;

Sistema 2: acetato de etila/isopropanol/água 75:16:9;

Sistema 3: diclorometano/metanol 9:1 com 1% de trietilamina.

As revelações foram feitas por iluminação com uma lâmpada de UV e/ou pulverização com uma solução de cisteína a 0,4% em ácido sulfúrico 3N e carbonização a cerca de 150°C. Devido à fluorescência natural dos adutos e derivados, era possível observá-los seletivamente irradiando a placa a 365 nm (os adutos apresentavam fluorescência azul). Irradiando a placa com UV a 254 nm, era ainda possível distingui-los de outros produtos pois apresentavam uma fluorescência violeta (enquanto que os demais produtos apenas bloqueiam a fluorescência verde de fundo da placa). Na revelação por solução de cisteína em H₂SO₄, os nucleosídeos (protegidos ou não) apareciam como manchas marrons enquanto que os derivados DMTr revelavam sob a forma de manchas alaranjadas.

4.3.2.1.1.2 Preparativa

A cromatografia em camada delgada também foi utilizada na purificação de quantidades de produtos compreendidas entre 2-20 mg. Foram utilizadas placas Merck PSC-Fertigplatten Kieselgel 60 F₂₅₄ 20x20 cm 2 mm de espessura. Nas purificações em geral utilizou-se como eluente diclorometano/metanol 9:1 e na purificação de derivados fosforamidita, uma mistura de diclorometano/metanol 9:1 com 1% de trietilamina.

Após a localização dos produtos na placa feita por iluminação com uma lâmpada de UV, as regiões correspondentes aos produtos eram excisadas com o auxílio de uma espátula, transferidas para uma seringa de 10 mL acoplada a um filtro de 0,45 µm e com algodão na base. A sílica era então eluída com 5 x 10 mL de metanol. O extrato metanólico era novamente filtrado e evaporado.

4.3.2.1.1.3 Cromatografia em coluna aberta

As purificações por cromatografia em sílica foram realizadas com sílica de granulometria média compreendida entre 70-200 µm. A coluna era eluída por gravidade utilizando um gradiente de metanol em diclorometano de 0 a cerca de 12,5%.

4.3.2.1.1.4 Cromatografia líquida de alta performance (HPLC)

Foram utilizados três tipos de sistemas de HPLC. O primeiro era um sistema Shimadzu (Kyoto - Japan) composto de 2 bombas LC-10AD, injetor Rheodyne, detector de série de fotodiodos SPD-M10AV e detector de fluorescência RF-535, todos estes componentes eram controlados por um *Communication Bus Module* CBM-10A e software CLASS LC-10AWS. O segundo também um sistema Shimadzu mas constituído de 2 bombas LC-6AD, injetor Rheodyne, detector de série de fotodiodos SPD-M10AVP, detector de fluorescência RF-10AXL controlados pelo módulo SCL-10AVP e software CLASS-VP. O último sistema era composto por uma bomba Merck L-6200, injetor Rheodyne, detector de fluorescência Merck F1000 e detector de série de fotodiodos Waters 990.

Os seguintes sistemas de eluição foram utilizados nas etapas analíticas e de purificação:

Sistema 1: Coluna preparativa Prodigy C₁₈ 250 x 21.2 mm 10 µm (Phenomenex, Torrance - USA) eluída com regime isocrático com 40% de acetonitrila em água a um fluxo de 9 mL/min. Com o intuito de atenuar a detecção por fluorescência, os comprimentos de onda de excitação e emissão foram ajustados para 300 e 500 nm respectivamente;

Sistema 2: Coluna preparativa Prodigy C₁₈ 250 x 21.2 mm 10 µm eluída com 12% de acetonitrila em água a um fluxo de 9 mL/min.

Sistema 3: coluna semipreparativa Bondclone C₁₈ 10 µm 300 x 7,8 mm com regime isocrático de TEAA 10 mM pH 7.0 e acetonitrila, na proporção 20:80 a um fluxo de 5 mL/min;

Sistema 4: coluna semipreparativa Bondclone C₁₈ 10 µm 300 x 7,8 mm eluída com um gradiente linear de 5 a 30 % de acetonitrila em TEAA 10 mM pH 7.0 durante 30 minutos e a seguir, 30 a 90% em mais 25 minutos a um fluxo de 5 mL/min;

Sistema 5: coluna analítica Luna C₁₈ 3 µm 150 x 4,6 mm (Phenomenex) eluída com um gradiente binário de TEAA 10 mM pH 7.0 e acetonitrila, variando-se a concentração de acetonitrila de 2 a 10% em 15 minutos e a seguir de 10 a 45% em mais 15 minutos e retornando 2% em dois minutos a um fluxo de 1 mL/min.

4.3.2.2 Ressonância magnética nuclear (RMN)

Foram utilizados dois espectrômetros diferentes nas análises por RMN: Bruker AC-200 MHz e Varian INOVA 400 MHz. Quantidades de amostra compreendidas entre 5-20 mg eram dissolvidas em cerca de 0,7 mL dos seguintes solventes deuterados: D₂O, DMSO-*d*₆, metanol-*d*₄ e acetona-*d*₆.

4.3.2.3 Espectrometria de massa

4.3.2.3.1 Ionização por *electrospray*

Dois espectrômetros diferentes foram utilizados: LC-Q (Mat-Finnigan) e um API 365 equipado com uma fonte *turboionspray* (SCIEX, Thornill, Canada). Em ambos, a ionização é do tipo ionização *electrospray*. O primeiro possui um analisador por captura de íons (*ion trap*) e o segundo um triplo analisador quadrupolar (MS/MS).

4.3.2.3.2 MALDI-TOF

Os espectros de massa por MALDI-TOF (dessorção e ionização por laser assistidos por matriz com análise por tempo de voo) foram realizados em um equipamento Voyager-DE (Perseptive Biosystems).

4.3.2.4 Epoxidação do 2-octenal

O 2-octenal foi epoxidado através da geração de dioxirano *in situ*. Foram dissolvidos 60 mmol de octenal (9 mL) em 70 mL de acetonitrila e a esta solução adicionou-se 60 mL de EDTA 0,4 mM. A mistura foi resfriada a 0-1°C e foram adicionados 12 mL de trifluorometilacetona com uma seringa pré-resfriada. A seguir, sob agitação contínua e durante 2 horas uma mistura de bicarbonato de sódio (98 mmol - 7,8 g) e oxone (60 mmol - 36,9 g) foi adicionada. Após 3 horas, adicionou-se 150 mL de água à solução resultante e em seguida esta foi extraída com diclorometano (2 x 50mL). Após serem combinados, os extratos orgânicos foram secos com Na₂SO₄ e concentrados sob fluxo de N₂. O epóxido formado foi utilizado sem purificação.

4.3.2.5 Síntese em larga escala do aduto III

Foram incubados 3 g (12 mmol) de desoxiadenosina com 9 mL de octenal epoxidado em 100 mL de tampão fosfato 100 mM pH 7.4 e 100 mL de acetonitrila, sob agitação de 250 rpm por 5 dias a 50°C.

Ao final da incubação o excesso do aldeído que não reagiu foi extraído com 1 volume de diclorometano por 3 vezes. As soluções foram a seguir, liofilizadas em um liofilizador Labconco Lyph-Lock 12 e o resíduo dissolvido em cerca de 250 mL água/acetonitrila 60:40. As amostras foram filtradas através de membranas Durapore 0,22 µm (Millipore, Bedford - USA), antes de serem injetadas em HPLC.

A solução obtida foi purificada pelo sistema 1. Neste sistema o aduto **III** era eluído a 8,9 minutos. A fração correspondente ao aduto, foi coletada e liofilizada. Foram feitas injeções de cerca de 25 mg de produto.

4.3.2.6 Síntese em larga escala da **edA**

Foram submetidos à reação 1,5 g (6 mmol) de desoxiadenosina com 4 mL de cloroacetaldeído em 100 mL de tampão acetato de sódio 0,5 M pH 5,5 contendo 30% de acetonitrila durante 3 dias a 50°C sob agitação de 250 rpm.

O cloroacetaldeído que não reagiu e o solvente, foram removidos por rotoevaporação. O resíduo obtido foi redissolvido em 15 mL de uma mistura água/acetonitrila 4:1, filtrado através de membranas Durapore 0,22 µm e os produtos foram purificados por HPLC (sistema 2).

4.3.2.7 Preparação dos síntons fosforamidita

4.3.2.7.1 Aduto III (vide Figura 4.10)

4.3.2.7.1.1 Sililação

Foram dissolvidos 261 mg do aduto **III** (0,70 mmol) em 5 mL de piridina anidra e a esta solução adicionou-se 4,5 equivalentes de imidazol (3,1 mmoles - 379 mg). A mistura foi seca sob alto vácuo e mantida sob argônio, tal procedimento foi repetido outras duas vezes. O resíduo foi então dissolvido em 4 mL de dimetilformamida anidra e a mistura foi resfriada a 0°C com um banho gelo/água. Foram adicionados então 2 equivalentes de trietilamina (1,4 mmol - 197 µL) e 0,55 equivalente de 1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diila (TIPDSCl₂ - 0,38 mmol - 234 µL), um precipitado branco resultante da formação de cloridrato de trietilamina é formado após a adição do TIPDSCl₂. A mistura foi mantida sob agitação a temperatura ambiente e após uma hora adicionou-se mais 0,55 equivalente de TIPDSCl₂. A progressão da reação foi monitorada por TLC e após o consumo quase completo do produto de partida, a reação foi interrompida com a adição de 2 mL de água. A mistura foi neutralizada com a adição de 5 mL de solução de bicarbonato de sódio a 5% e extraída com 10 mL de diclorometano. A solução aquosa foi reextraída com diclorometano e os extratos orgânicos combinados foram secos com sulfato de sódio. O extrato orgânico foi então seco por rotoevaporação e o resíduo obtido foi purificado por cromatografia em sílica. Após a purificação foram obtidas cerca de 350 mg de produto **2** (rendimento de cerca de 70%).

4.3.2.7.1.2 Acetilação

Ao produto obtido no passo anterior (2 - 0,58 mmol), foram adicionados 3,5 mmol de DMAP (392 mg). A mistura foi seca por coevaporação com piridina anidra por duas vezes. O resíduo seco foi então redissolvido em piridina anidra e foram adicionados 2 mmoles de anidrido acético (266 μ L). A reação foi monitorada por TLC e depois de completada (~30 minutos), foi interrompida com a adição de 2 mL de metanol. A mistura foi seca por rotoevaporação, o resíduo dissolvido em 5 mL de diclorometano, extraído com solução de NaHCO_3 a 5% e seco com Na_2SO_4 . O resíduo após ser concentrado sob vácuo, foi purificado por cromatografia em sílica. Nessa etapa obteve-se um rendimento de 83% do produto 3.

4.3.2.7.1.3 Desililação

O produto obtido no passo anterior (0,34 mmol) foi seco por duas evaporações consecutivas com piridina anidra. O resíduo foi redissolvido em 5 mL de dimetilformamida anidra e a esta solução foram adicionados 500 mg de CsF (3,3 mmoles). A solução foi mantida sob agitação a temperatura ambiente durante uma noite. A mistura foi liofilizada e o resíduo dissolvido em 5 mL de diclorometano e lavado com 5 mL de NaHCO_3 a 5%. O extrato orgânico foi concentrado sob vácuo e purificado por cromatografia em sílica. Foram obtidos 122 mg do composto 4 (0,29 mmol - rendimento de 85%).

4.3.2.7.1.4 Tritilação

O produto obtido na etapa anterior foi seco por coevaporação com piridina anidra por 3 vezes e redissolvido em piridina. A essa solução foram adicionados 1,1 equivalentes de DMTrCl_2 (0,32 mmol - 108mg) e foi mantida sob agitação a temperatura ambiente. A reação foi monitorada por TLC e verificou-se que havia sido completada após 1 hora. A reação foi interrompida com a adição de 2 mL de metanol, seca por rotoevaporação, o resíduo foi redissolvido em 2 mL de diclorometano, extraído com NaHCO_3 a 5%, seco

com Na_2SO_4 , concentrado sob vácuo e os produtos purificados por cromatografia em sílica. Foram obtidos 151 mg do composto 5 (rendimento de 72%).

4.3.2.7.1.5 Fosfitilação

O produto obtido na etapa anterior (151 mg - 0,21 mmol) foi seco por coevaporação com piridina por 3 vezes e dissolvido em 2,5 mL de diclorometano anidro. A solução foi resfriada com um banho de gelo/água e foram adicionados 80 μL de DIEA e 2 equivalentes de (2-cianoetil)-*N,N'*-diisopropilclorofosforamidita (83,7 μL - 0,42 mmol). A reação foi mantida sob agitação a temperatura ambiente e foi verificado através de análises por TLC que se completava após uma hora. A interrupção da reação foi então feita com a adição de 2 mL de metanol e a mistura foi seca sob vácuo. O produto foi então extraído com diclorometano e NaHCO_3 por duas vezes. Os extratos orgânicos combinados foram concentrados sob vácuo e o resíduo dissolvido em 2 mL de acetonitrila. Os produtos da fosfitilação foram então purificados por HPLC semipreparativo através do sistema 3. O sinton foi eluído a 6 minutos e assim que coletado foi mantido em gelo. O excesso de solvente foi removido sob vácuo a fase aquosa foi saturada com NaCl e o produto extraído com acetato de etila por 3 vezes. Os extratos orgânicos combinados foram secos com Na_2SO_4 e concentrados sob vácuo. Foram obtidos 119 mg do produto final (rendimento na etapa de 62%). O produto foi seco por 3 vezes com diclorometano com 1% de trietilamina, acondicionado sob argônio e armazenado a -20°C .

4.3.2.7.2 ϵdA (vide Figura 4.16)

4.3.2.7.2.1 Tritilação

Foram secos 200 mg de ϵdA (0,73 mmol) por coevaporação com piridina anidra por duas vezes consecutivas. O resíduo foi então ressuspense em 5 mL de piridina anidra e 1,1 equivalentes de DMTrCl_2 (0,8 mmol - 335 mg) foram adicionados. A mistura foi mantida sob agitação durante 1 hora a

temperatura ambiente e depois de transcorrido esse tempo verificou-se por TLC que a reação havia se completado. A reação foi interrompida com a adição de 2 mL de metanol e seca por rotoevaporação. O resíduo obtido foi redissolvido em 2 mL de diclorometano e extraído com NaHCO_3 . O extrato orgânico combinado foi seco com Na_2SO_4 , concentrado sob vácuo e os produtos foram submetidos a uma purificação por cromatografia em sílica. Foram obtidos 124 mg da edA tritilada (0,21 mmol - rendimento de 62%).

4.3.2.7.2.2 Fosfitilação

O produto obtido no passo anterior foi seco por coevaporação com piridina anidra por duas vezes consecutivas e com diclorometano anidro por mais uma vez. O resíduo foi dissolvido em 2 mL de diclorometano anidro e a solução foi resfriada com um banho de gelo/água. Adicionou-se a solução, 80 μL de DIEA e 2 equivalentes de (2-cianoetil)-*N,N'*-diisopropilclorofosforamidita (83,7 μL - 0,42 mmol). Após uma hora a reação havia sido completada, como atestado por TLC. A reação foi então interrompida com a adição de 2 mL de metanol e a mistura foi seca sob vácuo. O produto foi então extraído com diclorometano e NaHCO_3 por duas vezes. Os extratos orgânicos combinados foram secos a vácuo, mantidos sob atmosfera de argônio e conservados a -20°C .

4.3.2.8 Síntese, desproteção e purificação dos oligonucleotídeos

A sínteses foram feitas em um sintetizador de DNA/RNA Applied Biosystems 392. Utilizou-se um ciclo de condensação adaptado à escala de 1 μmol com uma única modificação, o tempo da reação de acoplamento na etapa referente aos adutos foi estendido a 10 minutos. Foi utilizado o modo *trityl-on* (conservação do grupamento DMTr no último nucleosídeo incorporado). Os rendimentos de acoplamento foram obtidos através da medição condutométrica do cátion DMTr^+ liberado. O suporte utilizado foi do tipo CPG. Os diferentes síntons fosforamidita foram dissolvidos em acetonitrila e usados nas seguintes concentrações: dAdo^{Pac} (0,1 M ; 500 mg em 5,6 mL), $\text{dGuo}^{\text{Isop-Pac}}$ (0,1 M ; 500 mg em 5,5 mL), dCit^{Ac} (0,1 M ; 500 mg em 6,5

mL), Tim (0,1 M ; 500 mg em 6,6 mL), edA (0,4 M ; 100 em 0,9 mL) e ADIII^(Ac) (0,25 M ; 100 mg em et 1 mL).

Ao fim das sínteses, as colunas foram secas com fluxo de argônio, transferidas para tubos de 2 mL e 1,5 mL de solução anidra de carbonato de potássio a 0,05 M em metanol foram adicionados. A suspensão foi incubada durante uma noite. O metanol foi transferido para outro tubo e a resina lavada por duas vezes com 1 mL de água. Os extratos combinados foram imediata e cuidadosamente neutralizados com ácido acético e concentrados por *speed-vac*.

Os oligonucleotídeos foram então purificados inicialmente por HPLC utilizando-se o sistema 4. Às frações coletadas foi adicionado 1% de TFA e após cerca de 10 minutos, a solução foi concentrada por *speed-vac*. Os produtos obtidos foram repurificados pelo mesmo sistema.

Em alguns casos foi necessária a repurificação dos oligonucleotídeos através de eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (PAGE) preparativo a 20%. Os oligonucleotídeos a serem purificados foram secos e ressuspensos em tampão de aplicação (95% formamida, 0,1% de azul de bromofenol e 0,1% de xilenocianol). As amostras foram aplicadas em géis de cerca de 1 mm de espessura e submetidos à eletroforese a 1500V durante 3 horas. Ao final da corrida o gel foi envolvido com filme de PVC do tipo Saran e as amostras foram visualizadas através de *UV shadowing*. As regiões do gel contendo os oligonucleotídeos de interesse foram excisadas com o auxílio de um bisturi e transferidas para um tubo de polipropileno. A seguir, foi adicionado 0,5 mL de água e o gel foi triturado com uma espátula. Os tubos foram mantidos sob agitação durante uma noite para a eluição do oligonucleotídeos. As amostras foram centrifugadas a 8000 rpm durante 15 minutos e os sobrenadantes cuidadosamente transferidos para outro tubo. Os precipitados foram ressuspensos em 0,25 mL de água e o procedimento repetido como anteriormente descrito. Os sobrenadantes combinados foram então filtrados a 0,22 µm e os oligonucleotídeos foram precipitados durante uma noite a -20°C após a adição de 2 volumes de etanol e 0,5 volume de solução de acetato de sódio (3 M, pH 5,2).

4.3.2.9 Caracterização dos oligonucleotídeos

4.3.2.9.1 Espectrometria de massa com interface *electrospray*

Frações de 0,10 UA_{260nm} de cada oligonucleotídeo foram secas e redissolvidas em 10 µL de água. Adicionou-se a seguir 10 µL de acetonitrila contendo 2% de TEA. Após agitação e centrifugação, 10 µL de amostra foram injetadas através de válvula Rheodyne. As análises de massa foram efetuadas no modo negativo.

4.3.2.9.2 MALDI

Os volumes correspondentes a 0,10 UA_{260nm} de cada oligonucleotídeo foram secos e redissolvidos em 50 µL de água. Foram adicionados então 1 volume de acetato de amônio a 1M e 4 volumes de etanol. As amostras foram mantidas a -20°C por uma noite, centrifugadas a 10000 rpm durante 10 minutos e ressuspensas em 5 µL de uma solução aquosa a 0,1% de TFA. Foram combinados 1 µL dessa solução a 1 µL de matriz que era constituída de ácido 3-hidroxipicolínico e ácido picolínico 4/1 em solução de acetonitrila contendo 0,1 % de TFA e uma pequena quantidade de resina de troca catiônica Dowex-50W. A mistura foi então aplicada no suporte e seca ao ar. Os espectros foram adquiridos a partir de 256 pulsos de laser e os íons foram acelerados com uma tensão de extração de 30 keV. O instrumento foi calibrado com uma solução de mioglobina (*m/z* 16952), 1 pmol/µL, analisada de maneira idêntica aos oligonucleotídeos.

4.3.2.9.3 Digestões enzimáticas por nuclease P1 e fosfatase alcalina

Frações de 0,2 UA_{260nm} de cada oligonucleotídeo foram aliquoteados, secos por *speed-vac* e redissolvidos em 45 µL de água. Foram adicionados 5 µL (1U/µL) de nuclease P1 em tampão P1 10× (0,3 M acetato de sódio/ZnCl₂, pH = 5,3) e a mistura foi incubada a 37°C durante 2 h. A seguir, adicionou-se 5 µL de tampão PA 10× (1 M Tris-HCl/MgCl₂/ZnCl₂) e 2 µL de PA (1U/µL) e incubou-se por mais 1 h. As amostras foram centrifugadas e analisadas por HPLC (sistema 5).

4.3.2.9.4 Marcação dos oligonucleotídeos com ^{32}P

Os oligonucleotídeos (10 pmoles) foram dissolvidos em 6 μL de água. A seguir, adicionou-se 1 μL de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$, 1 μL de tampão 10x (fornecido pelo fabricante) e 1 μL de T4 polinucleotídeo quinase (10 U). A mistura foi incubada a 37°C durante 30 minutos. Os oligonucleotídeos com 12 ou mais bases de extensão foram purificados através de colunas de exclusão do tipo G-25 *micro-spin*. O excesso de ATP foi retido na coluna enquanto que os oligonucleotídeos foram eluídos. Os oligonucleotídeos com menos de 12 nucleotídeos de extensão foram precipitados com 2 volumes de etanol e 0,5 volume de solução de acetato de sódio (3 M, pH 5,2) a -20°C por uma noite e centrifugados.

4.3.2.9.5 Tratamento dos oligonucleotídeos com piperidina e NH_4^+

Oligonucleotídeos marcados com ^{32}P (1 pmol) foram tratados com 30 μL de piperidina a 1 M (a 90°C) ou NH_4OH a 30% (a 50°C) durante 30 e 60 minutos. Ao final das incubações, os tubos foram resfriados em gelo e o solvente foi removido por *speed-vac*. Os resíduos foram então redissolvidos em 5 μL de água e 5 μL de tampão de amostra e analisados por PAGE a 20%.

4.3.2.10 Hibridação dos oligonucleotídeos para ensaios de reparo

A um tubo *ependorf* adicionou-se 10 pmol dos oligonucleotídeos marcados com ^{32}P (em 2 μL), 50 pmol dos oligonucleotídeos complementares (1 μL do estoque a 20 pmol/ μL) e 17 μL dos tampões das enzimas 1× (FPG, Endo III e AlkA). Foi adicionado 1 volume de óleo mineral e as amostras foram aquecidas a 80°C em banho-maria durante 4 minutos. A seguir, permitiu-se que o banho resfriasse lentamente (durante cerca de 3 horas).

4.3.2.11 Ensaios de reparo

4.3.2.11.1 FPG e Endo III

A 1 pmol do oligonucleotídeo duplex (2 μL), adicionou-se 1 μL de tampão Tris-HCl 200 mM, EDTA 10 mM e KCl 100 mM (pH 7,5), 0,7 μL de FPG (1,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) ou 0,5 μL de Endo III (2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) e o volume de água suficiente para 10 μL . A mistura foi incubada a 37°C durante 1 hora. Transcorrido esse período, a reação foi interrompida pela adição de 5 μL de formamida seguida de aquecimento a 80°C durante 3 minutos e rápido resfriamento. As amostras foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (20%, 7M de uréia) de 0,4 mm de espessura a 1300 V durante 30 minutos em tampão TBE (Tris-HCl 50 mM, ácido bórico 50 mM, EDTA 50 mM, pH 8). Os géis foram envolvidos com filme de PVC do tipo Saran. A radioatividade das bandas foi detectada por radiografia ou através de um *phosphorimager* Molecular Dynamics (Hercules, CA).

4.3.2.11.2 Alk A

Oligonucleotídeo duplex (1 pmol) foi tratado com 0,02 a 0,4 μg de Alk A em 10 μL de tampão (Hepes-KOH 70 mM, EDTA 0,5M, β -mercaptoetanol 5 mM e 5% de glicerol) a 37°C em tempos que variavam de 1 a 24 horas. Ao final da incubação, as reações foram interrompidas e analisadas similarmente ao descrito para FPG e Endo III.

4.3.2.12 Estudos de replicação *in vitro*

Foram marcados 100 pmol do *primer* 10mer (4,5 μL do estoque a 22,2 $\mu\text{mol}/\mu\text{L}$) com ^{32}P incubando-se com 1 μL de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (10 μCi , 5 mCi/mmol), 1 μL de tampão fornecido com a enzima e 2,5 μL de água a 37°C durante 30 minutos. Os produtos marcados foram precipitados pela adição de 20 μL de etanol 100% e 4,5 μL de acetato de sódio 2M pH 4,5. As amostras foram mantidas a -80°C durante 2 horas e a seguir, centrifugadas a 12000 rpm durante 15 minutos. O sobrenadante foi cuidadosamente descartado e o precipitado foi lavado com 20 μL de etanol 70% e novamente centrifugado. O resíduo obtido foi redissolvido em 10 μL de água.

Oligonucleotídeos (25 pmol) foram aliquotados em tubos *ependorf* e secos por *speed-vac*. Aos resíduos foram adicionados 2 µL (20 pmol) do *primer* marcado, 2 µL de tampão 10× (Tris-HCl 50 mM pH 7,5, MgCl₂ 10 mM, DTT 1 mM e BSA 0,02 mg/mL) e 16 µL de água. Foram adicionados 20 µL de óleo mineral para evitar a evaporação e as amostras foram incubadas a 80°C durante 5 minutos e lentamente resfriadas a 4°C (durante cerca de 3 horas)

Duplex (1 pmol - 1 µL) foi incubado com 2,5 µL de dNTPs (1 mM), 2,5 µL de tampão da enzima 10× (Kf *exo*⁻: Tris-HCl 500 mM pH 7,5, MgCl₂ 100 mM, BSA 0,5 mg/mL e DTT 1 mM ; Taq polimerase: Tris-HCl 500 mM pH 8,3, MgCl₂ 15 mM e KCl 500 mM ; Polimerase β: Tris-HCl 500 mM pH 8,8, MgCl₂ 100 mM, BSA 4 mg/mL, DTT 10 mM e 15% de glicerol), 1 µL de enzima (Kf *exo*⁻, Taq polimerase ou Polimerase β) a 0,01 , 0,1 ou 1 U/µL e 18,5 µL de água. As reações de polimerização foram realizadas a 25°C durante 1 hora e ao final, liofilizadas. Os resíduos foram redissolvidos em 5 µL de água e 5 µL de tampão de aplicação de amostra (95% formamida, 0,1% de azul de bromofenol e 0,1% de xilenocianol), aquecidos a 70°C durante 5 minutos e resfriados em gelo.

As amostras foram analisadas através de eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (20%, 7M de uréia).

4.4 Resultados

4.4.1 Aperfeiçoamento da epoxidação do 2-octenal

Embora o método de epoxidação dos aldeídos α,β -insaturados por peróxido de hidrogênio tenha sido relativamente eficaz na etapa de caracterização química dos adutos, o rendimento obtido na síntese de adutos utilizando esse método não passava de 10%. Para a obtenção de grandes quantidades do aduto **III** que possibilitasse a incorporação em oligonucleotídeos seria necessário aumentar o rendimento da síntese dos adutos. Aumentar a eficiência da epoxidação era portanto, um passo indispensável.

A epoxidação por dioxiranos tem sido apontada como bastante eficiente sob condições de reação neutra e seletiva em relação tanto a olefinas ricas em elétrons quanto a olefinas deficientes em elétrons como os compostos carbonílicos α,β -insaturados ⁴². Dioxiranos são peróxidos cíclicos de 3 membros e comportam-se como oxidantes seletivos e suaves frente aos produtos de oxidação. Um dioxirano é capaz de transferir diretamente um átomo de oxigênio a uma dupla ligação (Figura 4.6).

Figura 4.6: Mecanismo envolvido na epoxidação promovida por dioxirano.

Como o isolamento de dioxiranos é bastante trabalhoso, a epoxidação usando dioxiranos gerados *in situ* é mais conveniente. A utilização de metil(trifluorometil)dioxirano é especialmente interessante pois esse é o dioxirano de maior reatividade e catalisa a epoxidação muito eficientemente quando a reação se dá em uma mistura homogênea de água e acetonitrila⁴³. Esse método foi empregado na epoxidação do 2-octenal e resultou em um aumento de cerca de cinco vezes no rendimento do aduto.

4.4.2 Síntese em larga escala do aduto III para a síntese de oligonucleotídeos

Um pré-requisito fundamental para a síntese de um oligonucleotídeo contendo o aduto em uma posição precisa seria obter uma quantidade elevada do produto puro. Isso corresponderia a algo acima de 200 mg se a estratégia de síntese funcionasse logo de início, entretanto como provavelmente seria necessário testar várias estratégias diferentes, uma quantidade próxima a 1 g seria mais viável. A obtenção dessa quantia não era uma tarefa fácil devido aos rendimentos baixos na síntese e pela dificuldade de purificação por HPLC. O aperfeiçoamento da reação de epoxidação do octenal foi muito importante nesse aspecto. Utilizando um excesso de epóxido em relação à dA, foi obtido um rendimento próximo a 50% que resolveu o primeiro problema. A aquisição de uma coluna preparativa acelerou bastante o processo de purificação. Era possível injetar cerca de 25 mg de cada vez e como havia cerca 3 g de produtos da síntese a serem purificados, foi necessária uma centena de injeções. Foram obtidos no final da purificação, 1,3 g do aduto.

4.4.3 Estudos da estabilidade do aduto III nas condições de síntese dos oligonucleotídeos e conseqüências sobre as escolhas dos grupos protetores

Como explanado anteriormente, durante os ciclos de síntese e desproteção, os oligonucleotídeos são submetidos a tratamentos ácidos, alcalinos e oxidantes. Conseqüentemente é necessário verificar se o aduto é estável durante estes tratamentos e se permanecerá intacto até o final do processo. Para atestar a estabilidade do aduto **III**, ele foi submetido aos seguintes tratamentos: ácido acético 80%, solução de amônia a 32%, carbonato de potássio 0,05M em metanol e solução oxidante (I_2 0,1 M em THF/água). Os dados obtidos através de análise por HPLC são apresentados na figura 4.7.

Figura 4.7: Estabilidade do aduto **III** nas soluções: ácido acético 80%, solução de amônia a 32%, carbonato de potássio 0,05M em metanol e solução oxidante.

O aduto **III** é estável em meio ácido, oxidante e na solução fracamente alcalina de K_2CO_3 . Entretanto, é extremamente instável na solução de amônia mesmo em tratamentos curtos. Conseqüentemente, não é possível a utilização de grupos protetores muito estáveis. Entretanto, sua estabilidade na solução alcalina anidra de K_2CO_3 , permitiria a utilização de grupos lábeis nestas condições. A solução de K_2CO_3 já foi utilizada com sucesso pelos grupos de Marnett^{21,44} e Singer⁴⁵ na síntese de oligonucleotídeos contendo aduto alcali-lábeis. Portanto, escolhemos os grupo protetores fenoxiacetila para a dA (dA^{Pac}), isopropilfenoxiacetila para a dG (dG^{IpPac}) e acetila para a dC (dC^{Ac}), todos passíveis de serem removidos em solução de K_2CO_3 (Figura 4.4).

Quanto ao aduto, a impossibilidade de submetê-lo a tratamentos fortemente alcalinos restringiu a possibilidades de proteção a uns poucos grupos: acetila, isobutirila, levulinila e derivados sililados.

4.4.4 Estratégias de proteção do aduto **III**

Para a síntese de oligonucleotídeos contendo o aduto **III** é necessário obter um monômero (síntron) como o apresentado na figura 4.4. Este síntron deve possuir as seguintes características:

- o um grupo DMTr na posição 5'-OH;

- o grupo (*N,N*-diisopropilamino)(2-cianoetil)fosfinila na posição 3'-OH;
- um grupo protetor álcali-lábil ou removível em condições seletivas e que não degradem o composto.

Figura 4.8: Estrutura geral do sínton

4.4.4.1 Exploração das diferenças de reatividades entre os grupos OH

Como pode ser verificado na figura 4.8, três grupos OH precisam ser protegidos por três grupos diferentes. Por se tratar de um álcool primário, a reatividade do grupo 5'-OH é bem maior que a dos demais e não encontraríamos problemas em protegê-lo seletivamente. Nessa estratégia, buscou-se explorar as diferenças de reatividade entre os grupos 3'-OH e 13-OH. Foram utilizados vários grupos protetores que pudessem ser removidos em condições brandas como o acetila e levulinoila e os derivados silila. A estratégias estão esquematizadas na figura 4.9. Na proteção do aduto **III** tritilado, três situações seriam possíveis:

- Caso a reatividade do grupo 3'-OH fosse maior, este seria bloqueado pelo primeiro grupo (X) e posteriormente, o grupo 13-OH poderia ser protegido por um outro grupo (Y). Para a introdução do grupo fosforamidita na posição 3'-OH, seria necessário remover a proteção X seletivamente, os grupos escolhidos foram o *tert*-butilsilila e o levulinoila, que poderiam ser removidos através de tratamentos com F⁻ ou hidrazina em piridina/ácido acético, respectivamente. O grupo 3'-OH estaria livre para ser fosfitilado e a proteção na posição 13-OH seria removida do oligonucleotídeo pronto.

- Se a reatividade do grupo 13-OH fosse maior, a estratégia seria mais simples. Após a proteção desse grupo, a posição 3'-OH permaneceria livre para ser fosfitilada na etapa seguinte e a proteção no grupo 13-OH seria removida após a síntese do oligonucleotídeo.
- Entretanto, caso a reatividade dos dois grupos álcool fossem muito próximas, a proteção se daria em ambas hidroxilas inviabilizando o prosseguimento da síntese.

Infelizmente, a reatividade dos dois grupos era muito próxima e o que obtínhamos na maior parte das vezes era uma mistura dos produtos gerados nas três possibilidades. Seria possível purificar os produtos formados por HPLC, mas como seriam necessários vários miligramas de produto para prosseguir a síntese e obter pelo menos 50 mg finais do sinton, portanto tal estratégia seria pouco viável. A utilização de grupos protetores volumosos como o benzoila talvez aumentasse a diferença de reatividade entre os dois grupos, entretanto, tais protetores são muito estáveis tornando necessária a utilização de condições duras de desproteção. Como mostrado anteriormente, os adutos não seriam estáveis durante esse processo.

Figura 4.9: Estratégias de preparação do sínton pela exploração de diferenças de reatividade entre os grupos 3'-OH e 13-OH.

4.4.4.2 Proteção simultânea dos grupos 3' e 5'-OH

Devido às semelhanças de reatividade dos grupos 3' e 5'-OH e à instabilidade do aduto, a única alternativa que restava era a proteção simultânea dos dois grupos da 2'-desoxirribose. Isso foi possível graças a utilização do protetor sililado bifuncional 1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diila (TIPDS). Após o bloqueio dos grupos álcool do açúcar, o grupo 13-OH poderia ser tranqüilamente bloqueado por algum protetor lábil em solução K_2CO_3 0,05 M/metanol. A remoção seletiva do diéter de TIPDS permitiria a liberação das duas funções álcool 5'- e 3'-OH que seriam em seguida funcionalizadas segundo os procedimentos padrões de tritilação e fosfitação. A estratégia completa está ilustrada na figura 4.10.

Figura 4.10: Estratégia de preparação do sinton utilizando o TIPDS.

4.4.4.2.1 Proteção da 2'-desoxirribose

A introdução do grupo TIPDS foi efetuada nas condições descritas por Markiewicz⁴⁶ para os ribonucleosídeos. Após uma hora de reação, uma TLC controle mostrou a formação de um produto majoritário. Os produtos formados foram isolados por cromatografia em sílica e analisados por espectrometria de massa (Figura 4.11). O produto majoritário realmente se tratava do produto esperado (2). O fragmento a $m/z = 260$, indica que a adição da molécula de TIPDS foi feita no açúcar e a base permaneceu inalterada. Embora a distância entre os grupos 13-OH e 5'-OH seja muito maior que aquela entre 3'-OH e 5'-OH, haveria uma pequena possibilidade que a reação também se desse entre o açúcar e a base. Esse espectro mostra claramente que o produto está bastante puro.

Figura 4.11: Espectro de massa *electrospray/ion trap* do derivado 3',5'-O-(TIPDS) do aduto III (composto 2) adquirido em modo positivo.

4.4.4.2.2 Proteção da base

Como as hidroxilas do açúcar encontram-se bloqueadas o único grupo reativo livre na molécula é o grupo 13-OH. O grupo acetila foi escolhido para proteger essa posição por ser possível removê-lo ao mesmo tempo em que as demais proteções (base dos monômeros não modificados e grupo cianoetila). A

reatividade do complexo anidrido acético/DMAP é bastante alta sendo necessário apenas alguns minutos para que a reação ocorra quantitativamente.

4.4.4.2.3 Desproteção da base

A desproteção de éteres sililados como o TIPDS pode ser realizada seletivamente tratando a molécula com íons fluoreto. Dois métodos são geralmente utilizados, o fluoreto de tetrabutylamônio em solução molar em THF e o fluoreto de cério em dimetilformamida. Testamos ambas condições e verificamos que a desproteção era mais veloz utilizando o segundo tratamento. Através desse método, após cerca de 1,5 hora a desililação era completa. Após a purificação por cromatografia em sílica detectamos a formação de dois produtos. Constatamos que o minoritário, tratava-se do aduto **III**. Isso indica que ocorre um pouco de desacetilação do produto provavelmente durante a cromatografia. O grupo acetila é realmente muito lábil o que dificulta seu uso. O grupo acetila poderia ser substituído pelo grupo isobutirila. Realizamos alguns testes de desproteção do grupo isobutirila em K_2CO_3 /metanol e constatamos que embora a remoção seja muito mais lenta, é possível fazê-la.

De qualquer maneira, a análise da fração majoritária por espectrometria de massa confirmou a perda do grupo TIPDS e a integridade da proteção na base (Figura 4.12). Foram observados dois íons, $m/z = 418$ que corresponde ao nucleosídeo acetilado e 2'-desoxirribose livre e $m/z = 302$, base acetilada.

Figura 4.12: Espectro de massa *electrospray/ion trap* em modo positivo do aduto **III** acetilado na posição 13-OH (composto 4).

4.4.4.2.4 Preparação do derivado 5'-O-dimetoxitritilado

A introdução do grupo DMTr na função álcool primária 5'-OH do nucleosídeo acetilado foi realizada sob condições experimentais geralmente empregadas em síntese nucleica^{6,1}. A fim de se obter uma reação completa, foi utilizado um ligeiro excesso de DMTrCl₂ e uma quantidade catalítica de 4-*N,N*-dimetilaminopiridina (DMAP). Esse aditivo reage com o cloro do DMTrCl₂ formando um intermediário do tipo piridínio altamente reativo e seletivo do álcool primário da 2'-desoxirribose^{47,48}. O espectro de massa do produto obtido após purificação por cromatografia em sílica, mostrou a adição de uma molécula de DMTr ($m/z = 720$) ao aduto acetilado.

Figura 4.13: Espectro de massa *electrospray/ion trap* em modo positivo do aduto **III** acetilado na posição 13-OH e dimetoxitritilado (composto 5).

4.4.4.2.5 Preparação do sinton fosforamidita

O sinton fosforamidita do aduto **III** foi obtido segundo condições clássicas de fosfitilação pela (2-cianoetil)-*N,N'*-diisopropilclorofosforamidita conjugada à base do tipo amino terciária *N,N*-diisopropiletilamina ⁴.

A análise por massa do produto bruto obtido na fosfitilação revelou a presença de alguns contaminantes, principalmente de um produto desconhecido de peso molecular igual 871. Como a instabilidade do sinton é alta, seria muito difícil purificá-lo através de cromatografia em sílica, portanto foi necessária a purificação do produto por HPLC. Embora fossem necessárias dezenas de injeções para purificar todo produto, cada corrida durava menos de 10 minutos e assim que eram purificados, os produtos eram imediatamente mantidos em gelo. A purificação permitiu a obtenção do sinton altamente puro. Na figura 4.14 é apresentado um espectro de massa do produto, nota-se que o espectro é dominado pelo m/z 920. A identificação e o controle de pureza do produto foram confirmados por RMN de fósforo (Figura 4.15). Essa análise revelou a presença de dois picos a 149,3 e 149,2 ppm correspondendo aos dois diastereoisômeros da fosforamidita formada. Além disso, ele permite confirmar a ausência de produtos de degradação. No espectro nota-se um pequeno pico a 8,4 ppm que é característico de

nucleosídeos H-fosfonados (região de 0-10 ppm), entretanto, levando em conta a purificação por HPLC, o produto encontra-se altamente puro.

Figura 4.14: Espectro de massa *electrospray/ion trap* em modo positivo do sinton (composto 6)

Figura 4.15: Espectro de RMN ^{31}P do sinton fosforamidita adquirido a 101 MHz em acetona- d_6 .

4.4.5 Síntese do sinton da ϵ A

Como as propriedades mutagênicas e mecanismo de reparo da ϵ A já foram largamente estudados e o aduto **III** é um derivado substituído da ϵ A, seria interessante possuir oligonucleotídeos contendo a ϵ A que serviriam como controle positivo. Embora o sinton fosforamidita da ϵ A já fosse comercializado pela Glen Research (Sterling, EUA), decidimos sintetizá-lo devido ao alto custo do produto comercial e a relativa simplicidade da síntese, que envolve apenas três etapas (síntese de ϵ A, dimetoxitritilação e fosfitilação). Na figura 4.16 está esquematizada a estratégia utilizada na síntese desse produto. O monômero contendo a ϵ A foi utilizado de modo idêntico ao do aduto **III**.

Figura 4.16: Estratégia de preparação do sinton fosforamidita da ϵ A.

4.4.6 Síntese, desproteção e purificação dos oligonucleotídeos

Os sintons fosforamidita do AD**III** e ϵ A foram utilizados em síntese automatizada sobre suporte sólido para a preparação de oligonucleotídeos contendo as lesões em posições definidas. Em todos os casos foram sintetizados também oligonucleotídeos controle, onde o X (AD**III** ou ϵ A) foi substituído por uma adenina.

As sínteses foram realizadas na escala de 1 μ mol utilizando o ciclo de condensação clássico dos oligonucleotídeos. O tempo de acoplamento de X foi aumentado para 9 minutos ao invés dos 30 segundos utilizados no nucleosídeos normais com o objetivo de aumentar a eficiência do

acoplamento. Embora bastante variável, no decorrer das várias tentativas foi possível obter rendimentos tão altos quanto 85%.

Utilizamos exclusivamente monômeros fosforamidita de desproteção ultra-rápida para as bases normais: Pac-dA, IsopropilPac-dG e Ac-dC ^{7,8} e também suportes CPG funcionalizados com nucleosídeos comportando grupos protetores Pac (para a dA e dG) ou iBu (para a dC). Todos esses produtos são completamente desprotegidos pelo tratamento de K₂CO₃/metanol. As etapas de detritilação, oxidação e de *capping* foram realizadas utilizando ácido dicloroacético a 3% em diclorometano, uma solução de iodo a 0,02 M e uma solução de anidrido acético e metilimidazol em THF, respectivamente. As sínteses foram realizadas no modo *trityl-on*, onde o último nucleotídeo da sequência permanece com o grupo tritila. Essa característica facilita a purificação do oligonucleotídeo completo das sequências truncadas geradas durante a síntese pois o grupo tritila confere um grande aumento na hidrofobicidade do oligonucleotídeo.

A desproteção foi feita incubando-se a resina CPG com a solução de K₂CO₃ 50 mM/metanol durante 12 horas. Verificamos que o aduto é totalmente estável nessas condições. Entretanto, uma etapa delicada é a eluição dos oligonucleotídeos desprotegidos da resina. Como a desproteção é feita em metanol, onde a solubilidade do DNA é muito baixa, é necessária a adição de água para a eluição do DNA. Nesse momento o pH da solução sobe acima de 10 e os adutos podem ser degradados, portanto a solução deve ser rapidamente neutralizada com ácido acético.

Os oligonucleotídeos obtidos foram purificados por HPLC em duas etapas, na primeira etapa foram removidas as sequências truncadas. O oligonucleotídeo completo é então detritilado pelo tratamento com ácido trifluoroacético e repurificado por HPLC. Na maior parte dos casos é ainda necessária uma repurificação através de eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante. Após a separação eletroforética as bandas contendo os oligonucleotídeos foram visualizadas sobrepondo o gel a uma placa de sílica com fluoresceína (F₂₅₄) e iluminando a montagem com UV. O DNA bloqueia a fluorescência de fundo e observam-se manchas escuras (Figura 4.17). Embora a recuperação do gel seja inferior a 20%, o material obtido é bastante puro.

As sequências sintetizadas estão descritas na tabela 4.1.

Oligonucleotídeo	Sequência (5'→3')	Modificação
10 mer (<i>primer</i>)	AGA TCA GTC A	
14mer (εdA ou ADIII)	ATC GTG XCT GAT CT	X= A , εdA ou ADIII
22mer (εdA ou ADIII)	CAC TTC GGX TCG TGA CTG ATC T	X= A , εdA ou ADIII
22mer (8-oxodG)*	CAC TTC XGA TCG TGA CTG ATC T	X= G ou 8-oxodG
22mer (5-OH-dC)*	CAC TTC GGA TXG TGA CTG ATC T	X= C ou 5-OH-dC
22mer (complementar)	AGA TCA GTC ACG ATC CGA AGT G	

Tabela 4.1: Sequências de oligonucleotídeos sintetizados. *Sequências sintetizadas por Didier Gasparutto (CEA/Grenoble)

4.4.7 Caracterização dos oligonucleotídeos

A pureza e identidade química dos oligonucleotídeos sintetizados foram verificadas através de vários métodos incluindo a eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (PAGE), espectrometria de massa (*electrospray* e MALDI) e através da digestão enzimática dos oligonucleotídeos e análise por HPLC.

4.4.7.1 Análise por PAGE analítico

Aplicando-se quantidades de oligonucleotídeos acima de 0,2 O.D. em géis de poliacrilamida, é possível detectar os oligonucleotídeos por bloqueio da fluorescência emitida por uma placa colocada sob o gel (*UV shadowing*). Através dessa técnica é possível monitorar contaminações bem como verificar se o peso molecular aproximado está correto. Na figura 4.17, observa-se à análise dos oligonucleotídeos 14 mer e 22 mer (controle, εdA e ADIII). Nota-se que o grau de pureza é bastante elevado.

Figura 4.17: Visualização por *UV shadowing* de um gel preparativo de oligonucleotídeos (AB = azul de bromofenol).

4.4.7.2 Análise por espectrometria de massas

4.4.7.2.1 ESI-MS

Um espectro de massa por *electrospray* em modo negativo de um oligonucleotídeo 22-mer comportando um aduto **III** é apresentado na figura 4.18. Nesse tipo de análise, são detectadas as espécies multicarregadas do oligo, os m/z 1705, 1364, 1136, 974 e 852 correspondem respectivamente aos íons de carga -4, -5, -6, -7 e -8. Entretanto, através de uma deconvolução, é possível simular o espectro que seria obtido caso fosse possível detectar o íon molecular (Figura 4.18 - inferior). As massas obtidas nas análises por ESI-MS corresponderam exatamente àsquelas esperadas teoricamente (Tabela 4.2).

Tabela 4.2: Sequências e massas dos oligonucleotídeos obtidas através da análise por ESI-MS.

Oligo	Seqüência	Massa calculada	Massa encontrada
14merX	5'-ATC GTG XCT GAT CT-3'	4378,0	4378,0
22merX	5'-CAC TTC GGX TCG TGA CTG ATC T-3'	6825,6	6825,6

Figura 4.18: Espectro de massa (ESI-MS) do oligonucleotídeo 22mer contendo o aduto **III** (X). Superior: espectro adquirido. Inferior: espectro obtido por deconvolução.

4.4.7.2.2 MALDI-TOF

A análise por espectrometria de massa MALDI-TOF permitiu confirmar a pureza dos oligonucleotídeos sintetizados (Tabela 4.3) e a integridade das lesões (edA ou AD**III**) inseridas. A grande vantagem do MALDI-TOF sobre o ESI-MS é a observação de um único pico molecular, como ilustrado na figura 4.19 onde o pico de m/z 4376 corresponde ao íon $[M+H]^+$ em acordo com a massa calculada para o oligo 14mer contendo o aduto **III**.

Tabela 4.3: Sequências e massas dos oligonucleotídeos obtidas através da análise por ESI-MS.

Oligo	Seqüência	Massa calculada	Massa encontrada
14mer-controle	5'-ATC GTG ACT GAT CT-3'	4253,8	4251,3
14mer-εdA	5'-ATC GTG ECT GAT CT-3'	4277,9	4276,5
14mer-X	5'-ATC GTG XCT GAT CT-3'	4378,0	4375,3
22mer-controle	5'-CAC TTC GGA TCG TGA CTG ATC T-3'	6701,4	6701,2
22mer-εdA	5'-CAC TTC GGE TCG TGA CTG ATC T-3'	6725,5	6725,1
22mer-X	5'-CAC TTC GGX TCG TGA CTG ATC T-3'	6825,6	6825,0

Figura 4.19: Espectro de massa MALDI-TOF do oligonucleotídeo 14mer contendo o aduto III obtido em modo positivo.

4.4.7.3 Hidrólise enzimática dos oligonucleotídeos por nuclease P1 e fosfatase alcalina

Os oligonucleotídeos sintéticos obtidos foram submetidos a um tratamento com nuclease P1 e fosfatase alcalina. A nuclease P1 é uma endonuclease que hidrolisa o DNA em nucleotídeos 5'-monofosfato e a fosfatase alcalina é uma exonuclease que hidrolisa os grupos fosfatos dos nucleotídeos tanto da posição 5' quanto os da posição 3'.

Os produtos da digestão foram analisados por HPLC. Na figura 4.20 são apresentados os cromatogramas obtidos da digestão de um oligo controle (contendo apenas as 4 bases do DNA) e outro contendo o aduto **III**. A digestão do oligonucleotídeo controle resulta na liberação dos quatro nucleosídeos: dC, dI, dG e dT. A dI (2'-desoxiinosina) foi formada devido a uma contaminação da nuclease P1 pela enzima adenosina desaminase, o que é extremamente comum. Observa-se apenas um pequeno pico da dA. Na digestão do oligonucleotídeo modificado, nota-se a presença de um produto hidrofóbico (RT=23'). Esse pico foi isolado e confirmou-se que se tratava do aduto **III**.

Esse experimento comprova além da incorporação da base correta, que as enzimas podem liberar a lesão do DNA. Algumas lesões como a formilamina, reduzem ou inibem completamente a atividade de enzimas como a nuclease P1 ^{49,50}. Esse dado é importante pois a hidrólise completa do DNA é imprescindível nos métodos de detecção da lesão como por HPLC-ESI/MSMS.

Figura 4.20: Separação dos produtos da digestão dos oligonucleotídeos 14mer controle (A) e contendo o aduto **III** (B) por HPLC (detecção a 260 nm).

4.4.8 Estudos de reparo do aduto III por glicosilases

O ensaio para verificação do reparo por excisão de bases é relativamente simples: os oligonucleotídeos são marcados no terminal 5'-OH com [γ - ^{32}P]ATP pela quinase do fago T4 hibridizados com as seqüências complementares e a seguir, tratados com as glicosilases. Caso haja reconhecimento e reparo da lesão, será formado um sítio abásico na posição da lesão. Submetendo-se o oligo a um tratamento alcalino, haverá uma hidrólise da ligação fosfodiéster na posição do sítio abásico e os produtos podem ser então analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante e exposição do gel a filmes de raio X.

Os oligos sintetizados foram tratados com três glicosilases diferentes: a Endo III, a FPG e a Alk A. Foram utilizados oligonucleotídeos “normais” (sem qualquer base modificada) como controle negativo e os seguintes controles positivos: 22mer ϵ dA (Alk A), 22mer 8-oxodG (FPG) e 5-OH-dC (Endo III).

Na figura 4.21 é apresentado o resultado obtido no ensaio. Como esperado, os oligonucleotídeos controle não foram clivados por nenhum dos três tratamentos. O oligonucleotídeo contendo a 8-oxodG foi completamente clivado após o tratamento com a enzima FPG. Essa enzima além de possuir uma atividade glicosilásica, atua também como endonuclease dispensando o tratamento alcalino. O controle positivo para a glicosilase Endo III (5-OH-dC) também foi clivado (embora não completamente) no tratamento. Assim como a FPG, a Endo III também atua como endonuclease.

Surpreendentemente, a Alk A não foi capaz de remover a lesão ϵ dA do oligo correspondente. Testamos várias concentrações de enzima e tempos de incubação e não verificamos qualquer atividade. Possivelmente, as quantidades utilizadas de enzima ainda eram baixas (embora tenhamos utilizado quase um frasco inteiro de enzima) ou a enzima adquirida (proveniente da Pharmingen, a única empresa que a comercializa) tenha perdido a atividade. Será necessário repetir tal experimento utilizando quantidades ainda maiores dessa enzima.

O experimento mostrou claramente que nem a FPG nem a Endo III são capazes de excisar a lesão do DNA.

Figura 4.21: Análise por eletroforese em gel de poliacrilamida dos oligonucleotídeos 22mer (controle, 8-oxodG, 5-OH-dC, εdA e X) após o tratamento com as enzimas FPG, Endo III e Alk A.

4.4.9 Replicação *in vitro*

Com o intuito de se determinar o efeito do aduto nas polimerases de DNA, os oligonucleotídeos 22mer sintetizados foram hibridizados com um *primer* 10mer marcado com ^{32}P na posição 5', formando o seguinte heteroduplex:

O heteroduplex foi incubado com polimerases de DNA na presença dos quatro dNTPs, e os produtos formados pela extensão do *primer* pelas polimerases foram analisados em gel de poliacrilamida desnaturante. Foram testadas três polimerases diferentes, duas de microorganismos (fragmento

Klenow de *E. coli* e a polimerase *Taq*) e uma humana (polimerase β). Como o efeito observado depende da quantidade de enzima empregada, testamos várias concentrações para as três enzimas.

Na figura 4.22 observam-se os resultados obtidos. Embora as polimerases apresentem especificidades bastante diferentes (pol. β > Kf > *Taq*), os resultados foram bastante similares. Nota-se que apenas nos oligonucleotídeos controles a polimerização se deu até o fim (formação de oligonucleotídeos 22mer). Com quantidades maiores de polimerases foi observado um aumento da proporção dos oligonucleotídeos 22mer em relação aos incompletos.

Nos oligonucleotídeos contendo a ϵ dA e o aduto (X), as polimerases foram completamente bloqueadas. Na maior parte dos casos, a síntese foi interrompida após a adição do 13º nucleotídeo, ou seja, na posição exatamente anterior às lesões. Observa-se que quando se utilizava a menor quantidade das enzimas a síntese era interrompida ainda antes, na 12ª posição e mesmo com quantidades até 100 vezes maiores de enzima, a síntese chegava apenas à posição 14.

Figura 4.22: Síntese de DNA *in vitro*. Extensão de *primer* catalisada pela Kf *exo*⁻, polimerase *Taq* e polimerase β .

4.5 Discussão

Uma das características mais atraentes na síntese química de oligonucleotídeos é a possibilidade de se criar moléculas artificiais direcionadas a usos específicos. Oligonucleotídeos contendo adutos em posições definidas são os melhores modelos atualmente disponíveis para investigar as consequências biológicas dessas lesões através de estudos de mutagênese e reparo.

A síntese de oligonucleotídeos com lesões em posições definidas já foi utilizada com sucesso no estudo das propriedades biológicas de várias lesões, principalmente de lesões resultantes da oxidação do DNA por espécies reativas do oxigênio e/ou radiação ionizante como 8-oxo-dG ⁵¹, 5-OH-dC ⁵², 5',8-ciclo-dA e 5',8-ciclo-dG ^{53,54}, 4,8-dihidro-4-OH-8-oxo-dG ⁵⁵, 5,6-ciclo-5,6-dihidro-dT ⁵⁶ e ácido cianúrico ⁵⁷. Embora uma considerável diversidade estrutural de bases oxidadas já foi incorporada em oligonucleotídeos, o desafio químico da incorporação dos adutos que caracterizamos é bastante distinto visto que as bases oxidadas, por serem resultantes da degradação das bases do DNA, são muitas vezes menores e apresentam estabilidades maiores ou iguais às das bases normais.

Alguns adutos exocíclicos gerados endogenamente já foram incorporados em oligonucleotídeos. Embora bastante instável, o aduto extensivamente estudado gerado na reação entre o MDA e a dG (M₁G-dR) foi incorporado em oligonucleotídeos pelo grupo de Marnett ^{21,44}. Estratégias de incorporação dos etenoadutos εdA ⁵⁸, εdC ⁵⁹ e 1,N²-εdG ³¹ também já foram descritas. O anel acrescido aos anéis heterocíclicos das bases do DNA acarreta redução da estabilidade dos adutos exocíclicos. De fato, um problema enfrentado nos desenvolvimentos de estratégias de incorporação de todos os adutos exocíclicos anteriormente mencionados é a alta instabilidade em pHs altos. Conseqüentemente, foi necessária a utilização de nucleosídeos não modificados protegidos por grupos de desproteção rápida como o 2-(acetoximetil)benzoila (AMB) ⁶⁰, fenoxiacetila (Pac) ⁸ e *tert*-butilfenoxiacetila ⁶¹. Tais grupos podem ser removidos por tratamentos curtos com amônia concentrada ou ainda mais convenientemente, por K₂CO₃ em metanol anidro.

Os adutos exocíclicos substituídos que caracterizamos compartilham com os adutos anteriormente descritos a instabilidade em meio alcalino. Entretanto, as cadeias laterais portando grupos funcionais como o hidroxila e o epóxi acrescentam ainda mais dificuldades à sua incorporação em oligonucleotídeos. Os grupos funcionais presentes são reativos e poderiam reagir durante o ciclo de síntese de DNA levando a ramificações da cadeia impossibilitando a obtenção de sequências precisas. Dessa forma, a estratégia de síntese do sinton deveria contemplar também a proteção seletiva e lábil dos grupos funcionais da cadeia lateral. Dentre os adutos caracterizados, o aduto **III** seria um bom modelo, por possuir a estrutura mais simples e apenas um grupo a ser protegido na cadeia lateral (13-OH).

A constatação da estabilidade do aduto **III** frente à quase todas as etapas de síntese dos oligonucleotídeos, excetuando o tratamento com amônia, indicava que a incorporação poderia ser alcançável pois a desproteção poderia ser realizada em solução de K_2CO_3 /metanol.

O primeiro desafio seria a obtenção de uma grande quantidade do composto que possibilitasse testar várias estratégias de síntese. Essa quantidade deveria ser a partir de um grama. Além dos rendimentos baixos que eram obtidos anteriormente, outro problema era a necessidade de se obter o produto em alto grau de pureza, o que somente seria viável através de HPLC. A epoxidação do 2-octenal por dioxirano gerado *in situ*, especialmente o protocolo desenvolvido por Yang e colaboradores⁴³ utilizando metil(trifluorometil)dioxirano, possibilitou a obtenção de rendimentos de aduto maiores que 50% utilizando um excesso de epóxido. Por ser uma oxidação bastante seletiva e suave, o número de produtos secundários gerados foi bastante reduzido. A purificação das quantidades necessárias do aduto foi possibilitada pelo desenvolvimento de um método de purificação preparativa por HPLC.

Devido às semelhanças de reatividades dos grupos 13-OH (cadeia lateral) e do grupo 3'-OH da 2'-desoxirribose, todas as tentativas em que se explorou pequenas diferenças de reatividades entre esses grupos falharam. A instabilidade do aduto limitou tremendamente a utilização de outros grupos protetores. Após extensa revisão bibliográfica, restava uma única outra

possibilidade, um protetor sililado bifuncional utilizado por Markiewicz ⁴⁶ para proteger seletivamente as funções 3'- e 5'-OH ribonucleosídicas. Devido a seu impedimento estérico, esse grupo protetor é estável diante de numerosas condições de reação e purificação incluindo cromatografia em sílica. O bloqueio dos grupos álcool do açúcar, permitiu a proteção seletiva do grupo 13-OH com substituintes lábeis em solução K_2CO_3 0,05 M/metanol como o acetila e o isobutirila. Assim como em outros grupos protetores sililados, tal proteção pode ser seletivamente removida com fluoreto. Essa estratégia foi utilizada com êxito na obtenção do sinton. Após a proteção seletiva do grupo hidroxila da cadeia lateral e o desbloqueio dos grupos hidroxilas do açúcar, foi possível realizar a tritilação seletiva do grupo 5'-OH e a fosfitilação do grupo 3'-OH.

O sinton obtido foi utilizado com sucesso na obtenção de oligonucleotídeos de diferentes seqüências. As análises dos oligonucleotídeos obtidos por espectrometria de massa (*electrospray* e MALDI) e por digestão enzimática seguida de análise por HPLC, confirmaram a incorporação correta e a não degradação durante o processo de desproteção. Essa é a primeira vez em que um derivado fosforamidita de aduto exocíclico substituído com uma longa cadeia lateral foi sintetizado. Além disso, o aduto **III** é o mais complexo a ser incorporado dentre os adutos gerados por produtos da lipoperoxidação já descritos. Essa estratégia poderia ser utilizada na obtenção de sintons de outros etenoadutos substituídos como aqueles gerados pelas reações do HNE com a dA (aduto **II**) e com outras bases.

Até o momento nada se conhece a respeito das propriedades biológicas dos adutos exocíclicos substituídos gerados pela lipoperoxidação. A estratégia desenvolvida será nesse aspecto muito importante pois possibilitará a obtenção das primeiras informações a respeito das propriedades mutagênicas e do reparo dessa classe de adutos de DNA. Dentre os estudos que poderiam ser realizados com esse modelo poderíamos destacar o reparo *in vitro* utilizando enzimas de reparo purificadas ou extratos nucleares, a ação de polimerases frente a essas lesões *in vitro*, a obtenção de dados termodinâmicos através da avaliação da presença da lesão sobre a estabilidade da dupla hélice do DNA, a elucidação estrutural do duplex em solução através

de ressonância magnética nuclear e a construção de vetores contendo o aduto para o estudo da mutagenicidade e reparo do aduto em células de mamífero e bactérias.

A aplicação das seqüências obtidas em estudos biológicos foi mostrada através de dois experimentos: replicação *in vitro* e reparo *in vitro* por glicosilases.

A replicação *in vitro* é um modelo muito simples porém eficaz na simulação do comportamento das polimerases do DNA ao se depararem com um segmento contendo um aduto. Os resultados que obtivemos mostraram que o aduto **III** é um potente bloqueador de polimerases. Embora tanto a edA quanto o aduto **III** sejam potentes bloqueadores de polimerases, nota-se que o efeito do aduto é ainda maior. Já foi demonstrado que outras lesões relacionadas, como o 1,*N*²-etanodG e o HO-etanodG ³¹ e o propanodG ⁶² também são bloqueadores de polimerases como a Kf mas não totais como a edA e o AD**III**.

Dentre as enzimas envolvidas em reparo por excisão de base em *E. coli*, estudamos três em especial por suas disponibilidades e por possuírem uma grande variedade de substratos: Endo III, FPG e Alk A. A Endo III é uma das glicosilases que possui a mais ampla variedade de substratos podendo remover lesões distintas como a 5,6-dihidrotimina, a 5,6-dihidroxi-5,6-dihidrotimina, a 5,6-hidroxiuracila, a 6-hidroxi-5,6-dihidrocitosina, a 5-hidroxicitosina, a uréia, a 5-metilhidantoína, a *trans*-1-carbamoil-2-oxo-4,5-dihidroxiimidazolidina, purinas oxidadas ^{63,64}. Os substratos reconhecidos pela FPG também são bastante variados incluindo sítios abásicos, purinas e pirimidinas modificadas como a 8-oxodG, a 2,6-diamino-4-hidroxi-5-N-formamidopirimidina (Fapi-Gua), 2,6-diamino-5-formamido-pirimidina (Fapi-Ade) e a oxazolona ^{63,64}. Nossos resultados indicam que o aduto **III** não é substrato para ambas enzimas. Isso é compreensível pois apesar das baixas especificidades da Endo III e da FPG, todos os substratos são modificações pequenas e muitas resultantes da abertura dos anéis purínicos ou pirimidínicos.

Dentre as glicosilases já caracterizadas em *E. coli*, a Alk A (ver Item 1.5) seria a mais forte candidata à reparadora do aduto **III** por estar envolvida na

remoção de várias lesões resultantes da alquilação do DNA. Inicialmente descrita como a responsável pela remoção da 3-metil-adenina, mostrou-se a seguir capaz de remover pelo menos 17 modificações não relacionadas (3-metil-dA, 3-metil-dG, 7-metil-dG, O²-metil-dT, O²-metil-dC, 1,N⁶- ϵ dA, 1,N²- ϵ dG, N²,3- ϵ dG, N²,3- ϵ dG, desoxiinosina, 8-oxo-dG, 5-formil-dU, 5-hidroximetil-dU, 7-(2-hidroxietil)-dG, 1,2-bis(7-guanil)etano, 7-(2-cloroetil)-dG e 7-(2-etoxietil)-dG ⁶⁵. Infelizmente, os nossos experimentos não foram suficientemente conclusivos para descartar essa enzima no reparo do aduto

III. O controle positivo utilizado (ϵ dA) não funcionou como substrato para a AlkA, provavelmente devido à baixa atividade da enzima. De fato a AlkA e a correspondente m³A-DNA glicosilase de levedura (MAG) apresentam uma atividade baixa em excisar ϵ dA, pelo menos em comparação com a enzima homóloga de mamíferos cuja atividade é 1000 vezes maior em relação as duas anteriormente citadas ³⁴. Outros experimentos utilizando quantidades maiores de enzima e a obtenção de outros controles positivos como a m³A serão necessários para confirmar os resultados obtidos.

Embora seja amplamente aceito que o reparo de lesões volumosas e que provocam grande distorção da cadeia de DNA seja feito através de excisão de nucleotídeo, estudos recentes envolvendo adutos exocíclicos têm mostrado que a lei que relaciona quais características estruturais determinam as especificidades enzimáticas e o mecanismo de reparo está distante de ser alcançada. Dois bons exemplos são os adutos M₁G-dR, pBQ-dC e pBQ-dG.

No caso do primeiro, o exaustivamente estudado aduto gerado entre o MDA e a dG, o mecanismo de reparo inicialmente descrito foi o reparo por excisão de nucleotídeos em *E. coli* ⁶⁶. Um análogo estrutural ao M₁G, o propanodesoxiguanosina (PdG), é removido em *E. coli* e células de mamífero através de reparo por excisão de nucleotídeos *in vitro* ⁶⁷. Além de serem reparados por excisão de nucleotídeos, recentemente foi mostrado *in vitro* e *in vivo* que os dois adutos são reconhecidos pela proteína MutS e podem ser reparados por *mismatch repair* quando genoma não é metilado na fita contendo o aduto ⁶⁸.

Outra informação surpreendente a respeito do reparo de adutos exocíclicos surgiu no estudo do reparo dos adutos gerados pelo composto

exógeno *p*-benzoquinona (*p*-BQ), o metabólito carcinogênico do benzeno. A *p*-BQ forma derivados cíclicos benzetenos (um anel benzeno fundido a um anel eteno) ao reagir *in vitro* com os desoxinucleosídeos dA⁶⁹, dC⁷⁰ e dG^{71,72}. Quando oligonucleotídeos contendo *p*-BQ-dC foram tratados com extratos de células HeLa foi verificada a presença de uma glicosilase que reconhecia a lesão. A “nova” enzima após ter sido purificada e parcialmente caracterizada mostrou ser idêntica à principal endonuclease AP humana (HAP1)^{73,74}. Até então, acreditava-se que as endonucleases AP (apurínica/apirimidínicas) estariam envolvidas apenas na clivagem de sítios abásicos. Posteriormente verificou-se que as enzimas homólogas em *E. coli*, Exo III e Endo IV também são capazes de reparar o aduto *p*-BQ-dC e também o *p*-BQ-dG.

Portanto, quatro mecanismos diferentes podem estar envolvidos no reparo de adutos exocíclicos: reparo por glicosilases, por endonucleases AP, *mismatch repair* e por excisão de nucleotídeos. Com o modelo que desenvolvemos será possível verificar pela primeira vez qual é o mecanismo envolvido no reparo dessa nova classe de adutos.

4.6 Conclusão

Na última etapa do projeto, uma estratégia de síntese de monômeros fosforamidita (sinton) de etenoadutos hidrofóbicos gerados por produtos da lipoperoxidação foi desenvolvida. A estratégia foi utilizada com sucesso na incorporação desse aduto em oligonucleotídeos. Os oligonucleotídeos gerados foram caracterizados através de vários métodos como eletroforese, espectrometria de massa e HPLC. Os oligonucleotídeos foram também utilizados em experimentos preliminares de reparo por excisão de base e na replicação *in vitro* utilizando três polimerases diferentes.

É importante destacar que essa foi a primeira vez que um aduto desse tipo é incorporado em oligonucleotídeos em posições definidas. Os oligonucleotídeos obtidos foram utilizados em experimentos que mostraram que o aduto **III** é um forte inibidor de polimerases de DNA. Embora até o momento só verificamos que o aduto não é reparado pelas glicosilases FPG e Endo III, através dessa técnica será possível gerar outros oligonucleotídeos que poderão ser utilizados em ensaios que abordem outros mecanismos de reparo. Os oligonucleotídeos poderão ser utilizados ainda em estudos físico-químicos e na construção de vetores para estudos de mutagênese em bactérias e células de mamífero.

4.7 Referências Bibliográficas

1. Schaller, H., Weimann, G., Khorana, H. G., Lerch, B. (1963) Studies on Polynucleotides .24. Stepwise Synthesis of Specific Deoxyribopolynucleotides (4) - Protected Derivatives of Deoxyribonucleosides and New Synthesis of Deoxyribonucleoside-3 Phosphates . *Journal of the American Chemical Society* **85**, 3821-&.
2. Adams, S. P., Kavka, K. S., Wykes, E. J., Holder, S. B., Galluppi, G. R. (1983) Hindered Dialkylamino Nucleoside Phosphite Reagents in the Synthesis of 2 DNA 51-Mers. *Journal of the American Chemical Society* **105**, 661-663.
3. McBride, L. J. , Caruthers, M. H. (1983) Nucleotide Chemistry .10. An Investigation of Several Deoxynucleoside Phosphoramidites Useful for Synthesizing Deoxyoligonucleotides. *Tetrahedron Letters* **24**, 245-248.
4. Sinha, N. D., Biernat, J., Koster, H. (1983) Beta-Cyanoethyl N,N-Dialkylamino/N-Morpholinomono-chloro Phosphoramidites, New Phosphitylating Agents Facilitating Ease of Deprotection and Work-Up of Synthesized Oligonucleotides. *Tetrahedron Letters* **24**, 5843-5846.
5. Gilham, P. T. , Khorana, H. G. (1959) Studies on Polynucleotides .5. Stepwise Synthesis of Oligonucleotides - Syntheses of Thymidyl-(5'-]3')-Thymidyl-(5'-]3')-Thymidine and Deoxycytidyl-(5'-]3')-Deoxyadenyl-(5'-]3')-Thymidine. *Journal of the American Chemical Society* **81**, 4647-4650.
6. Agarwal, K. L., Cashion, P. J., Yamazaki, A., Khorana, H. G. (1972) Chemical Synthesis of Polynucleotides. *Angewandte Chemie-International Edition* **11**, 451-&.
7. Schulhof, J. C., Molko, D., Teoule, R. (1987) The Final Deprotection Step in Oligonucleotide Synthesis Is Reduced to a Mild and Rapid Ammonia Treatment by Using Labile Base-Protecting Groups. *Nucleic Acids Research* **15** , 397-416.
8. Schulhof, J. C., Molko, D., Teoule, R. (1987) Facile Removal of New Base Protecting Groups Useful in Oligonucleotide Synthesis. *Tetrahedron Letters* **28**, 51-54.
9. Hatahet, Z., Purmal, A. A., Wallace, S. S. (1993) A Novel Method for Site Specific Introduction of Single Model Oxidative DNA Lesions into Oligodeoxyribonucleotides. *Nucleic Acids Research* **21**, 1563-1568.
10. Singer, B., Chavez, F., Goodman, M. F., Essigmann, J. M., Dosanjh, M. K. (1989) Effect of 3' Flanking Neighbors on Kinetics of Pairing of DCTP or DTTP Opposite O6-Methylguanine in a Defined Primed Oligonucleotide When Escherichia Coli DNA Polymerase I Is Used. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **86**, 8271-8274.

11. Spratt, T. E. , Campbell, C. R. (1994) Synthesis of Oligodeoxynucleotides Containing Analogs of O6- Methylguanine and Reaction With O6-Alkylguanine-DNA Alkyltransferase. *Biochemistry* **33**, 11364-11371.
12. Preston, B. D., Singer, B., Loeb, L. A. (1986) Mutagenic Potential of O4-Methylthymine in Vivo Determined by an Enzymatic Approach to Site-Specific Mutagenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **83**, 8501-8505.
13. Preston, B. D., Singer, B., Loeb, L. A. (1987) Comparison of the Relative Mutagenicities of O-Alkylthymines Site- Specifically Incorporated into Phi X174 DNA. *Journal of Biological Chemistry* **262**, 13821-13827.
14. Li, B. F., Reese, C. B., Swann, P. F. (1987) Synthesis and Characterization of Oligodeoxynucleotides Containing 4-O- Methylthymine. *Biochemistry* **26**, 1086-1093.
15. Bodepudi, V., Iden, C. R., Johnson, F. (1991) An Improved Method for the Preparation of Phosphoramidites of Modified 2'-Deoxynucleotides - Incorporation of 8-Oxo-2'-Deoxy-7H-Guanosine into Synthetic Oligomers. *Nucleosides & Nucleotides* **10**, 755-761.
16. Michaels, M. L., Johnson, D. L., Reid, T. M., King, C. M., Romano, L. J. (1987) Evidence for in Vitro Translesion DNA Synthesis Past a Site-Specific Aminofluorene Adduct. *Journal of Biological Chemistry* **262**, 14648-14654.
17. Shibutani, S., Suzuki, N., Grollman, A. P. (1998) Mutagenic Specificity of (Acetylamino)Fluorene-Derived DNA Adducts in Mammalian Cells. *Biochemistry* **37**, 12034-12041.
18. Schurter, E. J., Sayer, J. M., Oh-hara, T., Yeh, H. J., Yagi, H., Luxon, B. A., Jerina, D. M., Gorenstein, D. G. (1995) Nuclear Magnetic Resonance Solution Structure of an Undecanucleotide Duplex With a Complementary Thymidine Base Opposite a 10R Adduct Derived From Trans Addition of a Deoxyadenosine N6-Amino Group to (-)- (7R,8S,9R,10S)-7,8-Dihydroxy-9,10-Epoxy-7,8,9,10-Tetrahydrobenzo[a]Pyrene. *Biochemistry* **34**, 9009-9020.
19. Schurter, E. J., Yeh, H. J., Sayer, J. M., Lakshman, M. K., Yagi, H., Jerina, D. M., Gorenstein, D. G. (1995) NMR Solution Structure of a Nonanucleotide Duplex With a DG Mismatch Opposite a 10R Adduct Derived From Trans Addition of a Deoxyadenosine N6-Amino Group to (-)- (7S,8R,9R,10S)-7,8-Dihydroxy-9,10-Epoxy-7,8,9,10-Tetrahydrobenzo[a]Pyrene. *Biochemistry* **34**, 1364-1375.
20. Buchi, G., Fowler, K. W., Nadzan, A. M. (1982) Photochemical Epoxidation of Aflatoxin-B1 and Sterigmatocystin - Synthesis of Guanine-Containing Adducts. *Journal of the American Chemical Society* **104**, 544-547.
21. Reddy, G. R. , Marnett, L. J. (1995) Synthesis of an Oligodeoxynucleotide Containing the Alkaline Labile Malonaldehyde-Deoxyguanosine Adduct Pyrimido[1,2- A]Purin-10(3H)-One. *Journal of the American Chemical Society* **117**, 5007-5008.

22. Srivastava, S. C., Raza, S. K., Misra, R. (1994) 1,N6-Etheno Deoxy and Ribo Adenosine and 3,N4-Etheno Deoxy and Ribo Cytidine Phosphoramidites. Strongly Fluorescent Structures for Selective Introduction in Defined Sequence DNA and RNA Molecules. *Nucleic Acids Research* **22**, 1296-1304.
23. Barbin, A., Bartsch, H., Leconte, P., Radman, M. (1981) Studies on the Miscoding Properties of 1,N6-Ethenoadenine and 3,N4- Ethenocytosine, DNA Reaction Products of Vinyl Chloride Metabolites, During in Vitro DNA Synthesis. *Nucleic Acids Research* **9**, 375-387.
24. Hall, J. A., Saffhill, R., Green, T., Hathway, D. E. (1981) The Induction of Errors During in Vitro DNA Synthesis Following Chloroacetaldehyde-Treatment of Poly(DA-DT) and Poly(DC-DG) Templates. *Carcinogenesis* **2**, 141-146 .
25. Spengler, S. , Singer, B. (1981) Transcriptional Errors and Ambiguity Resulting From the Presence of 1,N6-Ethenoadenosine or 3,N4-Ethenocytidine in Polyribonucleotides. *Nucleic Acids Research* **9**, 365-373.
26. Palejwala, V. A., Rzepka, R. W., Simha, D., Humayun, M. Z. (1993) Quantitative Multiplex Sequence Analysis of Mutational Hot Spots. Frequency and Specificity of Mutations Induced by a Site-Specific Ethenocytosine in M13 Viral DNA. *Biochemistry* **32**, 4105-4111.
27. Basu, A. K., Wood, M. L., Niedernhofer, L. J., Ramos, L. A., Essigmann, J. M. (1993) Mutagenic and Genotoxic Effects of Three Vinyl Chloride-Induced DNA Lesions: 1,N6-Ethenoadenine, 3,N4-Ethenocytosine, and 4-Amino-5-(Imidazol-2-Yl)Imidazole. *Biochemistry* **32**, 12793-12801.
28. Moriya, M., Zhang, W., Johnson, F., Grollman, A. P. (1994) Mutagenic Potency of Exocyclic DNA Adducts: Marked Differences Between Escherichia Coli and Simian Kidney Cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**, 11899-11903.
29. Pandya, G. A. , Moriya, M. (1996) 1,N6-Ethenodeoxyadenosine, a DNA Adduct Highly Mutagenic in Mammalian Cells. *Biochemistry* **35**, 11487-11492.
30. Cheng, K. C., Preston, B. D., Cahill, D. S., Dosanjh, M. K., Singer, B., Loeb, L. A. (1991) The Vinyl Chloride DNA Derivative N2,3-Ethenoguanine Produces G----A Transitions in Escherichia Coli. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**, 9974-9978.
31. Langouet, S., Muller, M., Guengerich, F. P. (1997) Misincorporation of dNTPs Opposite 1,N2-Ethenoguanine and 5,6,7,9- Tetrahydro-7-Hydroxy-9-Oxoimidazo[1,2-a]Purine in Oligonucleotides by Escherichia Coli Polymerases I Exo- and II Exo-, T7 Polymerase Exo-, Human Immunodeficiency Virus-1 Reverse Transcriptase, and Rat Polymerase Beta. *Biochemistry* **36**, 6069-6079.
32. Jaiswal, M., Lipinski, L. J., Bohr, V. A., Mazur, S. J. (1998) Efficient in Vitro Repair of 7-Hydro-8-Oxodeoxyguanosine by Human Cell Extracts:

- Involvement of Multiple Pathways. *Nucleic Acids Research* **26**, 2184-2191.
33. Matijasevic, Z., Sekiguchi, M., Ludlum, D. B. (1992) Release of N2,3-Ethenoguanine From Chloroacetaldehyde-Treated DNA by Escherichia Coli 3-Methyladenine DNA Glycosylase II. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**, 9331-9334.
 34. Sapparbaev, M., Kleibl, K., Laval, J. (1995) Escherichia Coli, Saccharomyces Cerevisiae, Rat and Human 3- Methyladenine DNA Glycosylases Repair 1,N6-Ethenoadenine When Present in DNA. *Nucleic Acids Research* **23**, 3750-3755.
 35. Hang, B., Chenna, A., Rao, S., Singer, B. (1996) 1,N6-Ethenoadenine and 3,N4-Ethenocytosine Are Excised by Separate Human DNA Glycosylases. *Carcinogenesis* **17**, 155-157.
 36. Hang, B., Singer, B., Margison, G. P., Elder, R. H. (1997) Targeted Deletion of Alkylpurine-DNA-N-Glycosylase in Mice Eliminates Repair of 1,N6-Ethenoadenine and Hypoxanthine but Not of 3,N4- Ethenocytosine or 8-Oxoguanine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**, 12869- 12874.
 37. Sapparbaev, M. , Laval, J. (1998) 3,N4-Ethenocytosine, a Highly Mutagenic Adduct, Is a Primary Substrate for Escherichia Coli Double-Stranded Uracil-DNA Glycosylase and Human Mismatch-Specific Thymine-DNA Glycosylase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 8508-8513.
 38. Neddermann, P., Gallinari, P., Lettieri, T., Schmid, D., Truong, O., Hsuan, J. J., Wiebauer, K., Jiricny, J. (1996) Cloning and Expression of Human G/T Mismatch-Specific Thymine-DNA Glycosylase. *Journal of Biological Chemistry* **271**, 12767-12774.
 39. Gallinari, P. , Jiricny, J. (1996) A New Class of Uracil-DNA Glycosylases Related to Human Thymine-DNA Glycosylase. *Nature* **383**, 735-738.
 40. Oesch, F., Adler, S., Rettelbach, R., Doerjer, G. (1986) Repair of Etheno DNA Adducts by N-Glycosylases. *IARC Scientific Publications* 373-379.
 41. Singer, B., Antoccia, A., Basu, A. K., Dosanjh, M. K., Fraenkel-Conrat, H., Gallagher, P. E., Kusmierek, J. T., Qiu, Z. H., Rydberg, B. (1992) Both Purified Human 1,N6-Ethenoadenine-Binding Protein and Purified Human 3-Methyladenine-DNA Glycosylase Act on 1,N6-Ethenoadenine and 3- Methyladenine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**, 9386-9390.
 42. Adam, W., Hadjarapoglou, L., Nestler, B. (1990) Dimethyldioxirane Epoxidation of Alpha,Beta-Unsaturated Ketones, Acids and Esters. *Tetrahedron Letters* **31**, 331-334.
 43. Yang, D., Wong, M. K., Yip, Y. C. (1995) Epoxidation of Olefins Using Methyl(Trifluoromethyl)Dioxirane Generated in-Situ. *Journal of Organic Chemistry* **60**, 3887-3889.

44. Schnetz-Boutaud, N. C., Mao, H., Stone, M. P., Marnett, L. J. (2000) Synthesis of Oligonucleotides Containing the Alkali-Labile Pyrimidopurinone Adduct, M(1)G. *Chemical Research in Toxicology* **13**, 90-95.
45. Chenna, A., Perry, A., Singer, B. (2000) Synthesis of 8-(Hydroxymethyl)-3,N(4)-Etheno-2'-Deoxycytidine, a Potential Carcinogenic Glycidaldehyde Adduct, and Its Site-Specific Incorporation into DNA Oligonucleotides. *Chemical Research in Toxicology* **13**, 208-213.
46. Markiewicz, W. T. (1979) Tetraisopropylidisiloxane-1,3-Diyl, a Group for Simultaneous Protection of 3'-Hydroxy and 5'-Hydroxy Functions of Nucleosides. *Journal of Chemical Research-S* 24-25.
47. Chaudhary, S. K. , Hernandez, O. (1979) Simplified Procedure for the Preparation of Thiphenylmethylethers. *Tetrahedron Letters* 95-98.
48. Hernandez, O., Chaudhary, S. K., Cox, R. H., Poster, J. (1981) Synthesis and Characterization of 4-Dimethylamino-N-Triphenylmethylpyridinium Chloride, a Postulated Intermediate in Tritylation of Alcohols. *Tetrahedron Letters* **22**, 1491-1494.
49. Falcone, J. M. , Box, H. C. (1997) Selective Hydrolysis of Damaged DNA by Nuclease P1. *Biochimica Et Biophysica Acta* **1337**, 267-275.
50. Schroder, E., Budzinski, E. E., Wallace, J. C., Zimbrick, J. D., Box, H. C. (1995) Radiation Chemistry of D(ApCpGpT). *International Journal of Radiation Biology* **68**, 509-523.
51. Roelen, H. C., Saris, C. P., Brugghe, H. F., van den, E. H., Westra, J. G., van der Marel, G. A., van Boom, J. H. (1991) Solid-Phase Synthesis of DNA Fragments Containing the Modified Base 7- Hydro-8-Oxo-2'-Deoxyguanosine. *Nucleic Acids Research* **19**, 4361-4369.
52. Romieu, A., Gasparutto, D., Molko, D., Cadet, J. (1997) A Convenient Synthesis of 5-Hydroxy-2'-Deoxycytidine Phosphoramidite and Its Incorporation into Oligonucleotides. *Tetrahedron Letters* **38**, 7531-7534.
53. Romieu, A., Gasparutto, D., Molko, D., Cadet, J. (1998) Site-Specific Introduction of (5' S)-5',8-Cyclo-2'- Deoxyadenosine into Oligodeoxyribonucleotides. *Journal of Organic Chemistry* **63**, 5245-5249.
54. Romieu, A., Gasparutto, D., Molko, D., Cadet, J. (1999) Synthesis and Characterization of Oligodeoxynucleotides Containing 5',8-Cyclopurine-2'-Deoxyribonucleosides. *Nucleosides & Nucleotides* **18**, 1331-1333.
55. Romieu, A., Gasparutto, D., Molko, D., Ravanat, J. L., Cadet, J. (1999) Synthesis of Oligonucleotides Containing the (4R) and (4S) Diastereoisomers of 4,8-Dihydro-4-Hydroxy-8-Oxo-2'- Deoxyguanosine. *European Journal of Organic Chemistry* 49- 56.
56. Romieu, A., Gasparutto, D., Cadet, J. (1999) Synthesis and Characterization of Oligodeoxynucleotides Containing the Two 5R and 5S Diastereomers of (5' S,6S)-5',6- Cyclo-5,6-Dihydrothymidine; Radiation-Induced Tandem

Lesions of Thymidine. *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 1* 1257-1263.

57. Gasparutto, D., Da Cruz, S., Bourdat, A. G., Jaquinod, M., Cadet, J. (1999) Synthesis and Biochemical Properties of Cyanuric Acid Nucleoside-Containing DNA Oligomers. *Chemical Research in Toxicology* **12**, 630-638.
58. Basu, A. K., Niedernhofer, L. J., Essigmann, J. M. (1987) Deoxyhexanucleotide Containing a Vinyl Chloride Induced DNA Lesion, 1,N6-Ethenoadenine: Synthesis, Physical Characterization, and Incorporation into a Duplex Bacteriophage M13 Genome As Part of an Amber Codon. *Biochemistry* **26**, 5626-5635.
59. Zhang, W., Rieger, R., Iden, C., Johnson, F. (1995) Synthesis of 3,N4-Etheno, 3,N4-Ethano, and 3-(2-Hydroxyethyl) Derivatives of 2'-Deoxycytidine and Their Incorporation into Oligomeric DNA. *Chemical Research in Toxicology* **8**, 148-156.
60. Kuijpers, W. H., Kuyl-Yeheskiely, E., van Boom, J. H., van Boeckel, C. A. (1993) The Application of the AMB Protective Group in the Solid-Phase Synthesis of Methylphosphonate DNA Analogues. *Nucleic Acids Research* **21**, 3493-3500.
61. Sinha, N. D., Davis, P., Usman, N., Perez, J., Hodge, R., Kremsky, J., Casale, R. (1993) Labile Exocyclic Amine Protection of Nucleosides in DNA, RNA and Oligonucleotide Analog Synthesis Facilitating N-Deacylation, Minimizing Depurination and Chain Degradation. *Biochimie* **75**, 13-23.
62. Hashim, M. F., Marnett, L. J. (1996) Sequence-Dependent Induction of Base Pair Substitutions and Frameshifts by Propanodeoxyguanosine During in Vitro DNA Replication. *Journal of Biological Chemistry* **271**, 9160-9165.
63. D'Ham, C., Romieu, A., Jaquinod, M., Gasparutto, D., Cadet, J. (1999) Excision of 5,6-Dihydroxy-5,6-Dihydrothymine, 5,6-Dihydrothymine, and 5-Hydroxycytosine From Defined Sequence Oligonucleotides by Escherichia Coli Endonuclease III and Fpg Proteins: Kinetic and Mechanistic Aspects. *Biochemistry* **38**, 3335-3344.
64. Duarte, V., Gasparutto, D., Jaquinod, M., Cadet, J. (2000) In Vitro DNA Synthesis Opposite Oxazolone and Repair of This DNA Damage Using Modified Oligonucleotides. *Nucleic Acids Research* **28**, 1555-1563.
65. Singer, B., Hang, B. (1997) What Structural Features Determine Repair Enzyme Specificity and Mechanism in Chemically Modified DNA? *Chemical Research in Toxicology* **10**, 713-732.
66. Fink, S. P., Reddy, G. R., Marnett, L. J. (1997) Mutagenicity in Escherichia Coli of the Major DNA Adduct Derived From the Endogenous Mutagen Malondialdehyde. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**, 8652-8657.

67. Johnson, K. A., Fink, S. P., Marnett, L. J. (1997) Repair of Propanodeoxyguanosine by Nucleotide Excision Repair in Vivo and in Vitro. *Journal of Biological Chemistry* **272**, 11434-11438.
68. Johnson, K. A., Mierzwa, M. L., Fink, S. P., Marnett, L. J. (1999) MutS Recognition of Exocyclic DNA Adducts That Are Endogenous Products of Lipid Oxidation. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 27112-27118.
69. Pongracz, K., Bodell, W. J. (1991) Detection of 3'-Hydroxy-1,N6-Benzetheno-2'-Deoxyadenosine 3'-Phosphate by ³²P Postlabeling of DNA Reacted With P-Benzoquinone. *Chemical Research in Toxicology* **4**, 199-202.
70. Pongracz, K., Kaur, S., Burlingame, A. L., Bodell, W. J. (1990) Detection of (3'-Hydroxy)-3,N4-Benzetheno-2'-Deoxycytidine-3'-Phosphate by ³²P-Postlabeling of DNA Reacted With P-Benzoquinone. *Carcinogenesis* **11**, 1469-1472.
71. Jowa, L., Winkle, S., Kalf, G., Witz, G., Snyder, R. (1986) Deoxyguanosine Adducts Formed From Benzoquinone and Hydroquinone. *Advances in Experimental Medicine and Biology* **197**, 825-832.
72. Jowa, L., Witz, G., Snyder, R., Winkle, S., Kalf, G. F. (1990) Synthesis and Characterization of Deoxyguanosine-Benzoquinone Adducts. *Journal of Applied Toxicology* **10**, 47-54.
73. Chenna, A., Hang, B., Rydberg, B., Kim, E., Pongracz, K., Bodell, W. J., Singer, B. (1995) The Benzene Metabolite P-Benzoquinone Forms Adducts With DNA Bases That Are Excised by a Repair Activity From Human Cells That Differs From an Ethenoadenine Glycosylase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**, 5890-5894.
74. Hang, B., Chenna, A., Fraenkel-Conrat, H., Singer, B. (1996) An Unusual Mechanism for the Major Human Apurinic/Apyrimidinic (AP) Endonuclease Involving 5' Cleavage of DNA Containing a Benzene-Derived Exocyclic Adduct in the Absence of an AP Site. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 13737-13741.

Curriculum vitae

Valdemir Melechco CARVALHO

Nascido em 3 de março de 1972
 São Paulo, Brasil
 Solteiro

Av. Lineu Prestes, 748
 São Paulo, SP, Brazil CEP 05508-900
 Fone: +5511 818-2153
 Fax: +5511 815-5579
 valdemir@iq.usp.br

Educação

- 1996-2001 *Doutorado em Bioquímica* – Universidade de São Paulo – Instituto de Química: São Paulo, Brasil.
 1993-1995 *Bacharelado e Licenciatura Plena em Ciências Biológicas* – Universidade de São Paulo - Instituto de Biociências: São Paulo, Brasil
 1990-1992 *Licenciatura em Ciências* – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul: Aquidauana, Brasil

Pesquisa**Pós-Graduação**

- 1996-2001 *Universidade de São Paulo – Instituto de Química - Dep. of Bioquímica: São Paulo, Brasil*
 Tese: Adutos de DNA Gerados por Produtos da Lipoperoxidação: Caracterização, Detecção, Incorporação em Oligonucleotídeos e Implicações Biológicas - Orientadora: Profa. Dra. Marisa Medeiros
 - Síntese e caracterização de adutos 1,N⁶-*edA* produzidos por produtos da lipoperoxidação
 - Desenvolvimento de metodologias de detecção de adutos (LC-MS/MS e ³²P-postlabelling)
 02-08/2000 *Commisariat a l'Energie Atomique - Department de Recherche Fondamentale sur la Matière Condensée - Laboratoire des Lésions des Acides Nucleiques: Grenoble, França*
 Estágio de doutoramento - Orientadores: Dr. Jean Cadet e Dr. Didier Gasparutto
 - Incorporação de adutos em oligonucleotídeos
 - Estudos de reparo *in vitro*
 - Comet assay

Graduação

- 1994-1995 *Universidade de São Paulo – Instituto de Química - Dep. de Bioquímica: São Paulo, Brasil.*
 Iniciação Científica em Bioquímica – Orientadora: Profa. Dra. Marisa H. G. Medeiros
 Treinamento em técnicas como HPLC, NMR, espectrofotometria de UV e fluorescência, cultura de células e isolamento de DNA.
 02-12/1995 *Universidade de São Paulo - Instituto de Biociências - Dep.de Ecologia: São Paulo, Brasil.*
 Iniciação Científica em Ecologia - Orientadora: Profa. Dra. Vania Pivello
 Estudo conservacional da reserva biológica do "Cerrado de Emas, Pirassununga (SP)".
 03-12/1992 *Universidade Federal de Mato Grosso do Sul –Departmeto de Biologia: Campo Grande, Brasil.*
 Iniciação Científica em Botânica – Orientadora: Profa. Dra. Edna Scremin-Dias
 Anatomia foliar de *Drosera communis* St. Hil.

Publicações

- Carvalho, V. M., Asahara, F., Di Mascio, P., de Arruda Campos, I. P., Cadet, J., Medeiros, M. H. 2000. Novel 1,N⁶-etheno-2'-deoxyadenosine adducts from lipid peroxidation products. *Chem. Res. Toxicol.* **13**, 397-405.
- Carvalho, V. M., Di Mascio, P., Campos, I. P. A., Douki, T., Cadet, J., Medeiros, M. H. G. 1998. Formation of 1,N⁶-etheno-2'-deoxyadenosine adducts by *trans,trans*-2,4-decadienal. *Chem. Res. Toxicol.* **11**, 1042-1047.
- Cadet, J., Carvalho, V. M., Onuki, J., Douki, T., Medeiros, M. H., Di Mascio, P. D. 1999. Purine DNA adducts of 4,5-dioxovaleric acid and 2,4-decadienal. *IARC Sci. Publ.* **150**, 103-13.
- Medeiros, M. H. G., Carvalho, V. M., Farias, L. P. and Loureiro, A. P. M. 1996. DNA Damage Induced by Secondary Lipid Peroxidation Products. *Ciência e Cultura.* **47**, 336-339.
- Pivello, V. R., Carvalho V. M., Lopes, P. F., Peccinini, A. A. and Rosso, S. A. 1999. Abundance and distribution of native and alien grasses in a "cerrado" (Brazilian savanna) biological reserve. *Biotropica.* **31**, 71-8

Trabalhos Publicados

Formation of 1,*N*⁶-Etheno-2'-deoxyadenosine Adducts by *trans,trans*-2,4-Decadienal

Valdemir M. Carvalho,[†] Paolo Di Mascio,[†] Ivan P. de Arruda Campos,[‡]
Thierry Douki,[§] Jean Cadet,[§] and Marisa H. G. Medeiros*,[†]

Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, CP 26.077,
CEP 05599-970 São Paulo, Brazil, Instituto de Ciências Exatas e Tecnologia, Universidade
Paulista, Avenida Alphaville, 3500 Santana do Parnaíba, SP, CEP 06500-000 São Paulo, Brazil,
and Département de Recherche Fondamentale sur la Matière Condensée SCIB/LAN,
CEA/Grenoble, F-38054 Grenoble Cedex 9, France

Received April 3, 1998

trans,trans-2,4-Decadienal (DDE) is an important breakdown product of lipid peroxidation. This aldehyde is cytotoxic to mammalian cells and is known to be implicated in DNA damage. Therefore, attempts were made in this work to assess the reactivity of DDE with 2'-deoxyadenosine (dAdo). It was shown that DDE is able to bind to 2'-deoxyadenosine, yielding highly fluorescent products. Besides 1,*N*⁶-etheno-2'-deoxyadenosine (edAdo), two other related adducts, 1-[3-(2-deoxy-β-D-erythro-pentofuranosyl)-3*H*-imidazo[2,1-*i*]purin-7-yl]-1,2,3-octanetriol and 1-[3-(2-deoxy-β-D-erythro-pentofuranosyl)-3*H*-imidazo[2,1-*i*]purin-7-yl]-1,2-heptanediol, were isolated by reverse phase high-performance liquid chromatography and characterized on the basis of their UV, fluorescence, nuclear magnetic resonance, and mass spectrometry features. The reaction mechanism for the formation of the DDE-2'-deoxyadenosine adducts involves 2,4-decadienal epoxidation and subsequent addition to the *N*² amino group of 2'-deoxyadenosine, followed by cyclization at the *N*-1 site. Adducts differ by the length of carbon side chain and the number of hydroxyl groups. The present data indicate that DDE can be epoxidized by peroxides, and the resulting products are able to form several adducts with 2'-deoxyadenosine and/or DNA. Endogenous DNA adduct formation can contribute to the already reported high cytotoxicity of DDE to mammalian cells.

Introduction

α,β-Unsaturated aldehydes are frequently found in plants, water, and environmental pollutants and are generated in a variety of industrial processes (1). They are also produced during autoxidation of unsaturated lipids and are considered to contribute to the aroma of some freshly prepared foods (2, 3). This class of compounds exhibits a number of cytopathological effects, including inhibition of protein and DNA synthesis, lysis of erythrocytes, and modification of protein activity (4).

Several carcinogenic and mutagenic compounds, including vinyl monomers, α-halogenated aldehydes, and α-haloketones, were shown to form etheno adducts with DNA (5). Etheno nucleosides appear to accumulate and persist in the liver of rodents exposed to vinyl chloride and ethyl carbamate. The detection of background levels of etheno bases in tissues of untreated animals is suggestive of endogenous sources of reactive aldehyde intermediates, possibly from lipid peroxidation processes (reviewed in ref 5).

In fact, highly reactive α,β-unsaturated aldehydes, such as acrolein, crotonaldehyde, and *trans*-4-hydroxy-2-nonenal (HNE¹), were found to react with DNA amino-

bases, yielding cyclic adducts (6-8). Interestingly, the formation of 1,*N*⁶-etheno adducts from the reaction of purine nucleosides with 2,3-epoxy-4-hydroxynonanal was reported by Sodem and Chung (9). In vitro studies have shown that α,β-unsaturated aldehydes are converted into the corresponding epoxides either enzymatically or through reaction with endogenously generated peroxides (10). The latter process was considered as a possible endogenous route for the in vivo formation of DNA etheno adducts.

Among the α,β-unsaturated aldehydes formed from the lipid peroxidation of liver microsomes (11), HNE has been extensively studied. It was found that several genotoxic effects associated with lipid peroxide formation were related to the presence of HNE (4). In this respect, *trans,trans*-2,4-decadienal (DDE) has been reported to be one of the breakdown products of lipid peroxidation most toxic to cells. This was inferred from the observed lethal effects exerted by the latter aldehyde on human diploid fibroblasts and umbilical vein endothelial cells (12, 13). 2,4-Decadienal is also highly cytotoxic to human erythroleukemia cells. It was shown, among other effects, to inhibit cell growth, to affect cell viability, to change the cellular glutathione level, and to be involved in DNA fragmentation (14). Furthermore, quantification of al-

* To whom correspondence should be addressed. Fax: ++55-11-8155579. E-mail: mhgdmede@iq.usp.br.

[†] Universidade de São Paulo.

[‡] Universidade Paulista.

[§] CEA/Grenoble.

¹ Abbreviations: DDE, *trans,trans*-2,4-decadienal; edAdo, 1,*N*⁶-etheno-2'-deoxyadenosine; HNE, *trans*-4-hydroxy-2-nonenal; dAdo, 2'-deoxyadenosine; ESI/MS, electrospray ionization mass spectrometry; adduct I, 1-[3-(2-deoxy-β-D-erythro-pentofuranosyl)-3*H*-imidazo[2,1-*i*]purin-7-yl]-1,2,3-octanetriol; adduct II, 1-[3-(2-deoxy-β-D-erythro-pentofuranosyl)-3*H*-imidazo[2,1-*i*]purin-7-yl]-1,2-heptanediol.

dehydes generated during oxidation of low-density lipoproteins (LDLs) indicates similar amounts of DDE formation (2.6 nmol/mg of LDL) when compared with that with HNE (2.7 nmol/mg of LDL) (15).

The purpose of this study was to characterize the products of the reaction of DDE with 2'-deoxyadenosine (dAdo) used as a DNA model compound. The chemical identification of nucleoside adducts produced by such reactions is of fundamental importance in unveiling the structural features that influence the ability of α,β -unsaturated aldehydes to alkylate DNA. This knowledge is a requisite for a better understanding of the genotoxic risks associated with exposure to this class of compounds.

Materials and Methods

Chemicals. All chemicals were of the highest purity grade that is commercially available. Water was purified on a Milli-Q system (Millipore, Bedford, MA). *trans,trans*-2,4-Decadienal was obtained from Aldrich (Milwaukee, WI) and purified using HPLC system 4. The identity and purity of DDE were checked by ^1H and ^{13}C NMR. 2'-Deoxyadenosine was from Merck (Darmstadt, Germany). Chromatography grade acetonitrile and THF were from EM Science (Gibbstown, NJ). Tetrahydrofuran was distilled with FeSO_4 before it was used. The concentration of the peroxides in the batches was measured by the Fe^{2+} /xylenol orange assay (16). All other chemicals were from Sigma (St. Louis, MO).

Instrumentation and Methods. UV spectra were obtained with a Hitachi U3000 spectrophotometer (Hitachi, Tokyo, Japan) coupled to a Pentium 100 MHz personal computer. Fluorescence spectra were recorded on a Spex 1681 spectrometer (Spex, Edison, NJ) coupled to a 386DX personal computer.

(1) **NMR Spectroscopy.** One-dimensional (1D) and two-dimensional (2D) ^1H NMR spectra were acquired using both a DPX-300 and a DRX-500 MHz Bruker Avance Series Fourier transform NMR spectrometer at 27 °C. The samples were dissolved in either D_2O or $\text{Me}_2\text{SO}-d_6$, and the solvent peaks were used as the reference.

(2) **Mass Spectrometry.** Electrospray ionization mass spectra (ESI/MS) were obtained on a Platform spectrometer (Fisons Instrument, Manchester, U.K.) in the positive mode. A mixture of water and acetonitrile (1:1) was used as the eluent at a flow rate of 5 $\mu\text{L}/\text{min}$. The samples (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) were dissolved in 0.25% formic acid in water. Typically, a 10 μL aliquot was injected for each analysis.

(3) **HPLC Separations.** HPLC analyses were performed on a Shimadzu HPLC system (Shimadzu, Kyoto, Japan). This included two LC-10AD pumps, a Rheodyne injector, a SPD-M10AV photodiode array detector, and a RF-535 fluorescence detector, controlled by a CBM-10A communication bus module and CLASS LC-10AWS software. HPLC conditions were as follows. For system 1, a Bondclone C_{18} (300 mm $\times$ 7.8 mm i.d., 10 μm) semipreparative column (Phenomenex, Torrance, CA) was first eluted with a gradient (curve 5) of 25 mM ammonium formate and acetonitrile (0–50 min) and 5 to 30% acetonitrile, and then the mobile phase concentration consisted of 30% acetonitrile for an additional 30 min. The flow rate was 1.5 mL/min. For system 2, a Bondclone C_{18} (300 mm $\times$ 7.8 mm i.d., 10 μm) semipreparative column was eluted with 25% acetonitrile in water at a flow rate of 1.5 mL/min. For system 3, a Supelcosil NH_2 (250 mm $\times$ 4.6 mm i.d., 5 μm) analytical column (Supelco, Bellefonte, CA) was eluted with 90% acetonitrile in water at a flow rate of 1 mL/min. For system 4, a Bondclone C_{18} (300 mm $\times$ 7.8 mm i.d., 10 μm) semipreparative column was eluted with 70% acetonitrile in water at a flow rate of 1 mL/min.

(4) **Synthesis and Purification of *trans,trans*-2,4-Decadienal-2'-Deoxyadenosine Adducts.** A mixture of *trans,trans*-2,4-decadienal (600 mg, 5 mmol) and H_2O_2 (30%, 1.25 mL) dissolved in 20 mL of THF was added to 2'-deoxyadenosine (250 mg, 0.995 mmol) in 80 mL of 0.1 M carbonate-bicarbonate

Table 1. ^1H NMR Chemical Shifts of Adducts I and II in D_2O ^a

adduct I				adduct II			
	δ (ppm)	J (Hz)			δ (ppm)	J (Hz)	
H-1'	6.44	m $J_{1'-2'}$	7.0	H-1'	6.56	m $J_{1'-2'}$	6.9
H-2'	2.78	m $J_{1'-2'}$	6.1	H-2'	2.90	m $J_{1'-2'}$	6.3
H-2''	2.46	m $J_{2'-2''}$	-13.9	H-2''	2.57	m $J_{2'-2''}$	-14.0
H-3'	4.53	m $J_{2'-3'}$	7.0	H-3'	4.64	m $J_{2'-3'}$	6.8
H-4'	4.01	m $J_{2'-3'}$	4.0	H-4'	4.07	m $J_{2'-3'}$	3.9
H-5'	3.62	m $J_{3'-4'}$	3.0	H-5'	3.71	m $J_{3'-4'}$	3.0
H-5''	3.65	m $J_{4'-5''}$	3.8	H-5''	3.74	m $J_{4'-5''}$	3.7
H-2	9.22	s $J_{4'-5''}$	4.8	H-2	9.29	s $J_{4'-5''}$	4.7
H-8	8.27	s $J_{5'-5''}$	-12.6	H-8	8.39	s $J_{5'-5''}$	-12.5
H-11	7.43	s J_{13-14}	4.7	H-11	7.52	s J_{13-14}	5.5
H-13	5.32	d J_{14-15}	7.2	H-13	5.09	d J_{14-15}	2.4
H-14	3.86	dd J_{15-16}	2.7	H-14	4.13	dt	
H-15	3.30	dt		H-15	1.44	m	
H-16	1.50	m		H-16	1.34	m	
H-17	1.33	m		H-17	1.22	m	
H-18	1.09	m		H-18	1.18	m	
H-19	1.09	m		H-19	0.74	m	
H-20	0.64	m					

^a m, multiplet; t, triplet; d, doublet; s, singlet.

buffer (pH 9.2). After incubation at 50 °C for 5 days while being shaken, the reaction mixture was extracted three times with 1 volume of dichloromethane. The aqueous phase was lyophilized and the resulting dry residue dissolved in the HPLC mobile phase of system 1 (15 mL). The DDE-dAdo adducts were purified by HPLC using the conditions of system 1. Fractions that eluted at 61 (adduct I) and 64 min (adduct II) were collected, dried, and purified using system 2. Finally, the collected individual adducts were further purified by HPLC using the conditions of system 3.

(5) **Characterization of the Adducts.** Evaporation to dryness of the HPLC fractions that eluted at 61 and 64 min yielded 5 and 3 mg of homogeneous compounds designated as adducts I and II, respectively. The adducts were characterized as follows. The UV spectra of adducts I and II are presented in Figure 2. The ^1H NMR spectrum of adduct I is shown in Figure 3. The ^1H NMR spectrum of adduct II is depicted in Figure 4. The ^1H NMR data of both compounds are summarized in Table 1. The positive mode ESI/MS analysis of adduct I shows two fragments: m/z 436.16 (MH^+ , 100% relative intensity) and 320.17 ($\text{MH}^+ - 2\text{-D-erythro-pentose}$, 31% relative intensity). Two fragments were also observed by ESI/MS analysis of adduct II: m/z 406.23 (MH^+ , 100% relative intensity) and 290.24 ($\text{MH}^+ - 2\text{-D-erythro-pentose}$, 74% relative intensity).

(6) **Reaction of *trans,trans*-2,4-Decadienal with 2'-Deoxyadenosine and Calf Thymus DNA in the Presence of Peroxides.** Either 2'-deoxyadenosine (9.95 μmol) or calf thymus DNA (3 mg) was dissolved in 800 μL of 0.1 M carbonate-bicarbonate buffer (pH 9.2), to which 200 μL of peroxide-free THF was added. The resulting solution was incubated with *trans,trans*-2,4-decadienal (40 μmol) and 200 μmol of the following peroxides: H_2O_2 , *tert*-butyl hydroperoxide, and THF-containing peroxides. The resulting mixtures were stirred at 50 °C for 7 days. The unreacted aldehyde was removed by two extractions with dichloromethane. The mixture of dAdo reaction products was analyzed by HPLC system 1.

The DNA was precipitated by addition of 0.3 mol of sodium acetate (pH 4.8) and 1 volume of 2-propanol. The pellet was dissolved in 1.5 mL of 20 mM acetate buffer (pH 4.8) and digested with 300 units of nuclease P1 at 37 °C for 4 h. Then, 225 μL of 1 M Tris-HCl buffer (pH 7.4) and 45 units of alkaline phosphatase were added for incubation for an additional 2 h. The enzymes were removed by phenol/chloroform extraction, and the hydrolysates were analyzed using HPLC system 1.

Results

Formation of Adducts from the Reaction of 2,4-Decadienal with 2'-Deoxyadenosine. A typical HPLC

Figure 1. HPLC elution profile of the reaction mixture of dAdo and DDE in the presence of H_2O_2 . (A) UV detection at 278 nm. (B) Fluorescence detection at $\lambda_{exc} = 310$ nm and $\lambda_{em} = 420$ nm. Conditions were as described in Materials and Methods.

chromatogram of the products of the reaction of DDE with dAdo is depicted in Figure 1. The reaction products were found to consist of eight major components together with several minor ones. Elucidation of the structure of adducts I and II which exhibit retention times of 61 and 64 min, respectively, was the focus of this study. It must be mentioned that the product which is eluted at 45 min corresponds to 1, N^6 -etheno-2'-deoxyadenosine (edAdo). This was inferred from the comparison of its UV and HPLC features with those of the authentic standard (data not shown). Products I and II showed a bathochromic shift of 3 nm in their UV absorption spectra when compared with that of edAdo (Figure 2A). Interestingly, adducts I and II exhibited similar UV absorption features at pH 7. The pH effect on the UV spectrum of adduct I is shown in Figure 2B. The latter UV features strongly suggest an etheno structure for both I and II which is similar to that of edAdo adducts previously reported (9, 17). It should be added that the bathochromic shift ($\Delta = 3$ nm) is consistent with the presence of an alkyl side chain in the etheno ring. In addition, I and II exhibit a strong fluorescence ($\lambda_{em} = 420$ nm and $\lambda_{exc} = 310$ nm) (data not shown). The latter feature is also characteristic of edAdo derivatives (18, 19).

Structural Determination of I and II by NMR and Mass Spectroscopy Analysis. The ESI mass spectrum of adduct I in the positive mode exhibits a pseudomolecular ion $M + H$ at m/z 435.16. This may be rationalized in terms of a 1:1 adduct between dAdo and DDE with a gain of two oxygen atoms. In addition, the presence of a 2-deoxyribose moiety in adduct I is illustrated by the loss of the characteristic 116 amu fragment from the $M + H$ ion. This received further confirmation from the assignment of the seven signals of the sugar protons in the 1H NMR COSY analysis (data not shown). The 1H NMR spectra of adducts I and II are illustrated in Figures 3 and 4, whereas the related features are reported in Table 1. The H-8 and H-2 resonances of the

Figure 2. (A) UV absorption spectra of 1, N^6 -etheno-2'-deoxyadenosine (edAdo) and adducts I and II. (B) UV absorption spectra of adduct I at different pHs. Conditions were as described in Materials and Methods.

Figure 3. 1D 300.13 MHz 1H NMR spectrum of adduct I in D_2O .

adenine moiety of adduct I were observed at $\delta = 8.27$ and 9.22 ppm, respectively. The high values of the chemical shift suggest that the aromaticity of the purine ring is retained during the adduct formation. It should be added that the five characteristic signals of the DDE moiety, including four vinyl protons and one aldehyde proton, are not observed in the 1H NMR spectrum of adduct I. This would rule out either a direct reaction of the aldehyde carbonyl group with the exocyclic NH_2 of the adenine ring or a Michael addition mechanism for the formation of adduct I. The presence of an alkyl chain in adduct I was inferred from the observation of signals in the high-field region of the 1H NMR spectrum (0.64

Figure 4. 1D 500.13 MHz ^1H NMR spectrum of adduct II in D_2O .

ppm $< \delta < 1.50$ ppm). The integration of the related signals indicates that the 11 protons involve one methyl and four methylene groups. Three other signals which overlap with the bulk of the sugar resonances over the range of 3.30–5.32 ppm were assigned to H-13, H-14, and H-15 protons on the basis of a ^1H NMR COSY analysis (data not shown). It was found that H-14 is involved in vicinal scalar couplings with both H-13 and H-15 protons. In addition, the latter proton is coupled with the protons of the methylene group at C-16. On the other hand, H-13 which appears as a doublet does not exhibit any additional scalar coupling besides that with H-14. Finally, a last signal which resonates as a singlet is observed at $\delta = 7.44$ ppm. This is typical of an etheno proton (H-11) which does not exhibit any scalar couplings due to the lack of vicinal hydrogen atoms. Altogether, the above data are consistent with an etheno structure having an octyl substituent at C-12. It should be added that the chemical shifts of H-13 ($\delta = 5.32$ ppm), H-14 ($\delta = 3.86$ ppm), and H-15 ($\delta = 3.30$ ppm) of the side chain are consistent with those of carbinol groups. This is consistent with the molecular mass inferred from EIS/MS analysis only if the oxygen of the aldehyde function of DDE is lost during the addition to dAdo. Therefore, it is likely that the double bond at the 11 and 12 positions arose from a dehydration reaction involving the former C-1 position of DDE, after its covalent binding to the adenine exocyclic amino group. This is consistent with the mechanism proposed for the formation of etheno bases.

The EIS/MS spectrum in the positive mode of adduct II shows a significant pseudomolecular ion $M + H$ at m/z 406.23 and a predominant fragment at m/z 290 ($M + H - 2\text{-deoxy-D-erythro-pentose}$). Both pieces of information are indicative of a loss of 30 amu in the molecular weight of adduct II with respect to that of I. This may be explained in terms of a difference of one carbinol group in the structures of adducts I and II. This received further confirmation from the careful consideration of the ^1H NMR features as inferred from extensive 1D (Figure 4) and 2D correlated spectrum analyses (data not shown). It should be noted that the signals of the H-2 and H-8 protons of adenine were observed at $\delta = 9.29$ and 8.39 ppm, together with an etheno proton ($\delta = 7.52$ ppm) in the low-field region of the spectrum (Figure 4). The presence of a heptyl chain is shown by the presence of the pentane signals (0.74 ppm $< \delta < 1.44$ ppm) and two carbinol protons assigned as H-13 and H-14 at $\delta = 5.09$ and 4.13 ppm, respectively. Altogether, these data may be rationalized in terms of a structure which is identical to the substituted etheno base adduct generated upon incubation of dAdo with 2,3-epoxy-4-hydroxynonanal (9).

Figure 5. HPLC fluorescence analysis chromatogram of enzymatically hydrolyzed calf thymus DNA treated with DDE and H_2O_2 . Fluorescence detection ($\lambda_{\text{exc}} = 310$ nm and $\lambda_{\text{em}} = 420$ nm) of ϵdAdo and adducts I and II.

Table 2. Levels of Adducts Formed in the Reaction of dAdo and DNA with DDE in the Presence of Different Peroxides*

		adduct level (adducts/10 ⁵ dAdo)		
		ϵ dAdo	I	II
dAdo	DDE and peroxidized THF	37.6 $\pm$ 7.8	93.7 $\pm$ 14.8	40.8 $\pm$ 2.2
	DDE and H ₂ O ₂	98.0 $\pm$ 9.3	42.1 $\pm$ 13.3	27.8 $\pm$ 1.4
	DDE and tBOOH	41.6 $\pm$ 5.6	9.3 $\pm$ 0.8	1.7 $\pm$ 0.1
		adduct level (adducts/10 ⁵ dAdo)		
		ϵ dAdo	I	II
DNA	DDE and peroxidized THF	64.0 $\pm$ 4.0	111.4 $\pm$ 57.5	42.5 $\pm$ 15.3
	DDE and H ₂ O ₂	14.9 $\pm$ 3.9	11.1 $\pm$ 1.2	4.6 $\pm$ 1.2
	DDE and tBOOH	9.5 $\pm$ 1.2	4.0 $\pm$ 0.7	1.0 $\pm$ 0.2

* Experimental conditions were as described in Materials and Methods, with the exception that the incubation was performed for 60 h and the mixture was quantified using system 2.

In principle, eight and four stereoisomeric adducts are expected to be formed for adducts I and II, respectively, due to the presence of chiral carbons. The different adducts, if they are formed, were not resolved by HPLC. However, at least two diastereoisomers of adduct II could be observed as inferred from the presence of two methyl signals at $\delta = 0.74$ and 0.79 ppm, respectively.

Detection of Etheno dAdo Adducts in Calf Thymus DNA. Calf thymus DNA was allowed to react with DDE under conditions similar to those described for dAdo. After enzymatic hydrolysis, the resulting nucleosides were analyzed by RP-HPLC system 1. Figure 5 shows a typical HPLC chromatogram of the nucleosides obtained after enzymatic digestion of modified DNA. Three main altered nucleosides were observed. They exhibit retention times identical to those of ϵAdo and adducts I and II as inferred from coelution with authentic standards at retention times of 45, 61, and 64 min, respectively (data not shown).

Effect of Peroxide on Product Formation. Depending on the batch of THF used to dissolve the aldehyde, different yields of adducts I and II were observed. These results suggest that the reaction was dependent on the kind of peroxide present in the reaction mixture. To check this possibility, the reactions of DDE with dAdo and calf thymus DNA were carried out with peroxidized THF, H_2O_2 , and *tert*-butyl hydroperoxide, respectively (Table 2). This effect is consistent with previous data reported by Sodum and Chung (8).

Scheme 1. Structure and Proposed Mechanism for the Formation of Adduct I

Scheme 2. Structure and Proposed Mechanism for the Formation of Adduct II

Discussion

The formation of adducts between nucleosides and secondary lipid oxidation products, including α,β -unsaturated aldehydes, has been postulated as one of the mechanisms involved in the carcinogenic action of these reactive breakdown compounds. Adducts between 2'-deoxyguanosine and β -alkyl-substituted acroleins, including 2-pentenal, 2-hexenal, 2,4-hexadienal, 4-hydroxy-2-nonenal, and 4-hydroxy-2-hexenal, have already been described (20–22). The reaction of adenine nucleosides with 2,3-epoxy-4-hydroxynonanal yields adducts with an extended 1, N^8 -etheno ring (9). The result of this study demonstrates that DDE, a well-known lipid peroxidation product, is able to react with 2'-deoxyadenosine, giving rise to cyclic adducts. Besides 1, N^8 -etheno-2'-deoxyadenosine (edAdo) (23, 24), two other related adducts, [1-[3-(2-deoxy- β -D-erythro-pentofuranosyl)-3H-imidazo[2,1-*i*]purin-7-yl]-1,2,3-octanetriol (adduct I) and 1-[3-(2-deoxy- β -D-erythro-pentofuranosyl)-3H-imidazo[2,1-*i*]purin-7-yl]-1,2-heptanediol (adduct II), were isolated and

identified on the basis of extensive spectroscopic analysis. We propose for the formation of adduct I a mechanism that involves initial epoxidation of the two aldehyde double bonds. Then, subsequent hydrolysis of the C4–C5 epoxide would give rise to a diol (Scheme 1). The observed peroxide dependence on the yield of generation of adducts I and II provides further support for the proposed mechanism. The formation of adduct II can be rationalized in terms of the initial generation of 4-hydroxynonenal from DDE. This was expected to be followed by further epoxidation of C2=C3 (Scheme 2). In fact, adduct II is identical to the product of the reaction of 2,3-epoxy-4-hydroxynonanal with dAdo which was characterized by Sodum and Chung (9). It should be pointed out that Grein et al. (25) already reported HNE formation from DDE in water solutions (Scheme 2). The formation of adducts I and II requires electrophilic addition of the reactive aldehyde, DDE, at N-1 and N-6 of the adenine. Subsequent ring closure with either an octyl or heptyl substituent at C-12 will give rise to adduct

I and II, respectively. NMR and mass spectroscopic data of the adducts are consistent with the proposed structures.

There is evidence in the literature showing the formation of fluorescent products from the reaction between adenine nucleosides and fatty acid degradation products (26–29). 2,4-Decadienal and 2-octenal were found to be the more active products (30), being able to react with adenine yielding highly fluorescent products even in the absence of peroxides. However, these products were not successfully characterized (31). Our results indicate that DDE alone is not able to react efficiently with dAdo and that the fluorescent products are etheno-2'-deoxyadenosine derivatives.

1,N⁶-Etheno-2'-deoxyadenosine has been reported to be highly mutagenic in mammalian cells (32). Preliminary experiments on the reaction of calf thymus DNA with DDE have shown the formation of εdAdo, adduct I, and adduct II together with other fluorescent products that are not yet characterized. These results can contribute to a better assessment of the genotoxic risks associated with this class of compounds.

Acknowledgment. This work was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP (Brazil), the Conselho Nacional para o Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq (Brazil), Pró-Reitoria de Pesquisa da Universidade de São Paulo (Brazil), and Comité Français d'Evaluation de la Coopération Universitaire avec le Brésil (USP-COFECUB/UC-23/96). V.M.C. is a recipient of a FAPESP fellowship. We thank Miriam Uemi and Rute Almeida Santos (IQ-USP, São Paulo, Brazil) for their assistance in the NMR analyses. We also acknowledge Daniel Ruffieux (LCR/CEA, CHU Grenoble, Grenoble, France) and Didier Gasparutto (SCIB/LAN, CEA/Grenoble, Grenoble, France) for the ESI/MS analyses.

References

- Committee on Aldehydes (1981) Aldehyde concentrations, emission, and environmental generation and transportation reactions. In *Formaldehyde and other aldehydes*, pp 36–131, National Academic Press, Washington, DC.
- Josephson, D. B., and Lindsay, R. C. (1987) Retro-aldol related degradations of 2,4-decadienal in the development of staling flavors in fried foods. *J. Food Sci.* 52, 1186–1190.
- Milo, C., and Grosch, W. (1996) Changes in the odorants of boiled salmon and cod as affected by the storage of the raw material. *J. Agric. Food Chem.* 44, 2366–2371.
- Esterbauer, H., Schaur, R. J., and Zollner, H. (1991) Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radical Biol. Med.* 11, 81–128.
- Bartsch, H., Barbin, A., Marion, M.-J., Nair, J., and Guichard, Y. (1994) Formation, detection, and role in carcinogenesis of ethenobases in DNA. *Drug Metab. Rev.* 26, 349–371.
- Smith, R. A., Williamson, D. S., Cerny, R. L., and Cohen, S. M. (1990) Detection of 1,N⁶-propanodeoxyadenosine in acrolein-modified polydeoxyadenylic acid and DNA by ³²P postlabeling. *Cancer Res.* 50, 3005–3012.
- Eder, E., and Hoffman, C. (1992) Identification and characterization of deoxyguanosine-crotonaldehyde adducts. Formation of 7,8-cyclic adducts and 1,N²,7,8 bis-cyclic adducts. *Chem. Res. Toxicol.* 5, 802–808.
- Sodum, R. M., and Chung, F.-L. (1988) 1,N²-Ethenodeoxyguanosine as a potential marker for DNA adduct formation by trans-4-hydroxy-2-nonenal. *Cancer Res.* 48, 320–323.
- Sodum, R. M., and Chung, F.-L. (1991) Stereoselective formation of *in vitro* nucleic acid adducts by 2,3-epoxy-4-hydroxynonenal. *Cancer Res.* 51, 137–143.
- Chen, H.-J. C., and Chung, F.-L. (1996) Epoxidation of trans-4-hydroxy-2-nonenal by fatty acid hydroperoxides and hydrogen peroxide. *Chem. Res. Toxicol.* 9, 306–312.
- Esterbauer, H. (1985) Lipid peroxidation products: formation, chemical properties and biological activities. In *Free Radicals in Liver Injury* (Poli, G., Cheesman, K. H., Dianzani, M. U., and Slater, T. F., Eds.) pp 29–47, IRL Press, Oxford, U.K.
- Kaneko, T., Honda, S., Nakano, S., and Matsuo, M. (1987) Lethal effects of a linoleic acid hydroperoxide and its autooxidation products, unsaturated aliphatic aldehydes, on human diploid fibroblasts. *Chem.-Biol. Interact.* 63, 127–137.
- Kaneko, T., Kaji, K., and Matsuo, M. (1988) Cytotoxicities of a linoleic acid hydroperoxide and its related aliphatic aldehydes toward cultured human umbilical vein endothelial cells. *Chem.-Biol. Interact.* 67, 295–304.
- Nappe, C., Battu, S., and Beneytout, J. L. (1996) Trans,trans-2,4-decadienal: cytotoxicity and effect on glutathione level in human erythroleukemia (HEL) cells. *Cancer Lett.* 99, 115–119.
- Thomas, C. E., Jackson, R. L., Ohlweiler, D. L., and Ku, G. (1994) Multiple lipid oxidation products in low-density lipoproteins induce interleukin-1 beta release from human blood mononuclear cells. *J. Lipid Res.* 35, 417–427.
- Jiang, Z.-Y., Woollard, A. C. S., and Wolff, S. P. (1991) Lipid hydroperoxide measured by oxidation of Fe²⁺ in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and an iodometric method. *Lipids* 26, 853–856.
- Barrio, J. R., Secrist, J. A., and Leonard, N. J. (1972) Fluorescent adenosine and cytidine derivatives. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 46, 597–604.
- Kochetkov, N. K., Shibaev, V. N., Kost, A. A., and Zelinsky, N. D. (1971) New reaction of adenine and cytosine derivatives, potentially useful for nucleic acids modification. *Tetrahedron Lett.* 22, 1993–1996.
- Secrist, J. A., Barrio, J. R., Leonard, N. J., and Weber, G. (1972) Fluorescent modification of adenosine-containing coenzymes. Biological activities and spectroscopic properties. *Biochemistry* 11, 3499–3506.
- Winter, C. K., Segall, H. J., and Haddon, W. F. (1986) Formation of cyclic adducts of deoxyguanosine with the aldehydes trans-4-hydroxy-2-hexenal and trans-4-hydroxy-2-nonenal *in vitro*. *Cancer Res.* 46, 5682–5686.
- Douki, T., and Ames, B. N. (1994) An HPLC-EC assay for 1,N²-propano adducts of 2'-deoxyguanosine with 4-hydroxynonenal and other α,β-unsaturated aldehydes. *Chem. Res. Toxicol.* 7, 511–518.
- Eder, E., and Hoffman, C. (1993) Identification and characterization of deoxyguanosine adducts of mutagenic β-alkyl-substituted acrolein congeners. *Chem. Res. Toxicol.* 6, 486–494.
- Ghiassassi, F. El., Barbin, A., Nair, J., and Bartsch, H. (1995) Formation of 1,N⁶-ethenocytosine by lipid peroxidation products and nucleic acid bases. *Chem. Res. Toxicol.* 8, 278–283.
- Chung, F.-L., Chen, H.-J., and Nath, R. G. (1996) Lipid peroxidation as a potential endogenous source for the formation of exocyclic DNA adducts. *Carcinogenesis* 17, 2105–2111.
- Grein, B., Huffer, M., Scheller, G., and Schreier, P. (1993) 4-Hydroxy-2-alkenals and other products formed by water-mediated oxidative decomposition of α,β-unsaturated aldehydes. *J. Agric. Food Chem.* 41, 2385–2390.
- Marnett, L. J. (1994) DNA adducts of α,β-unsaturated aldehydes and dicarbonyl compounds. In *DNA adducts: Identification and biological significance* (Hemminki, K., Dipplé, A., Shuker, D. E. G., Kadlubar, F. F., Segerbäck, D., and Bartsch, H., Eds.) pp 151–163, IARC Scientific Publication 125, IARC, Lyon, France.
- Fujimoto, K., Neff, W. E., and Frankel, E. N. (1984) The reaction of DNA with lipid oxidation products, metals and reducing agents. *Biochim. Biophys. Acta* 795, 100–107.
- Frankel, E. N., Neff, W. E., and Selke, E. (1983) Analysis of autoxidized fats by gas chromatography-mass spectrometry: VIII. Volatile thermal decomposition products of hydroperoxy cyclic peroxides. *Lipids* 18, 353–357.
- Frankel, E. N., Neff, W. E., Brooks, D. D., and Fujimoto, K. (1987) Fluorescence formation from the interaction of DNA with lipid oxidation degradation products. *Biochim. Biophys. Acta* 919, 239–244.
- Hasegawa, K., Fujimoto, K., Kaneda, T., Neff, W. E., and Frankel, E. N. (1989) Formation of fluorescent products in the reaction of adenine and other bases with secondary oxidation products of methyl linoleate hydroperoxides. *Agric. Biol. Chem.* 53, 1575–1581.
- Hasegawa, K., Fujimoto, K., Kaneda, T., and Frankel, E. N. (1988) Characterization of fluorescent products from reaction of methyl linoleate hydroperoxides with adenine in the presence of Fe²⁺ and ascorbic acid. *Biochim. Biophys. Acta* 962, 371–376.
- Pandya, G. A., and Moriya, M. (1996) 1,N⁶-Ethenodeoxyadenosine, a DNA adduct highly mutagenic in mammalian cells. *Biochemistry* 35, 11487–11492.

TX9800710

Novel 1,*N*⁶-Etheno-2'-deoxyadenosine Adducts from Lipid Peroxidation Products

Valdemir M. Carvalho,[†] Flavio Asahara,[†] Paolo Di Mascio,[†]
Ivan P. de Arruda Campos,[‡] Jean Cadet,[§] and Marisa H. G. Medeiros^{*,†}

Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, CP 26.077,
CEP 05513-970, São Paulo, Brazil, Instituto de Ciências Exatas e Tecnologia,
Universidade Paulista, Avenida Alphaville, 3500 Santana do Parnaíba, SP, CEP 06500-000, Brazil,
and Département de Recherche Fondamentale sur la Matière Condensée SCIB/LAN,
CEA/Grenoble, F-38054 Grenoble Cedex 9, France

Received September 24, 1999

trans,trans-2,4-Decadienal (DDE) is a widespread α,β -unsaturated aldehyde found, for example, in food, water, and environmental pollutants. DDE is also endogenously generated as a breakdown product of lipid peroxidation in cell membranes. In the work presented here, the reaction of DDE with 2'-deoxyadenosine (dAdo) was investigated in an effort to assess its possible DNA damage potential. Besides 1,*N*⁶-etheno-2'-deoxyadenosine and two products, namely, 1-[3-(2-deoxy- β -D-erythro-pentofuranosyl)-3*H*-imidazo[2,1-*f*]purin-7-yl]-1,2,3-octanetriol (adduct I) and 1-[3-(2-deoxy- β -D-erythro-pentofuranosyl)-3*H*-imidazo[2,1-*f*]purin-7-yl]-1,2-heptanediol (adduct II), previously described by our group, two novel etheno adducts were identified. Thus, 1-[3-(2-deoxy- β -D-erythro-pentofuranosyl)-3*H*-imidazo[2,1-*f*]purin-7-yl]-1-hexanol (adduct III) and 1-[3-(2-deoxy- β -D-erythro-pentofuranosyl)-3*H*-imidazo[2,1-*f*]purin-7-yl]-2,3-epoxy-1-octanol (adduct IV) were isolated by reverse-phase high-performance liquid chromatography and characterized on the basis of extensive spectroscopic measurements. The formation of the adducts is likely to involve initial DDE oxidation followed by generation of reactive intermediates such as diepoxides, epoxides, and/or hydroperoxides. The subsequent reaction of the latter oxidation products with dAdo will give rise to the four described adducts. We also demonstrated here that upon oxidation, DDE reacts with calf thymus DNA, producing the four dAdo adducts. Interestingly, two of them are the expected products arising from the reaction of dAdo with 4-hydroxy-*trans*-2-nonenal (HNE) and *trans*-2-octenal, two other important breakdown lipid peroxidation products. The reactivity of DDE with DNA is lower than that of the latter aldehydes. However, DDE produced a wider variety of adducts. The characterization of the different DNA-etheno adducts and the determination of the mechanism of formation are of great importance for a better understanding of the deleterious biological effects associated with this class of compounds.

Introduction

trans,trans-2,4-Decadienal (DDE)¹ is a widespread environmental aldehyde. DDE is found as a contaminant in water (1) and is present as a natural flavoring in plants (2, 3). It is also detected in food, including fish (4–6), chicken (7, 8), meat (9, 10), and bread (11). DDE is a part of the defensive secretions of some insects (12) and is also generated from polyunsaturated fatty acids by the action of plant lipoxygenases (13, 14).

However, besides its environmental importance, DDE has aroused interest mainly because it is an important

aldehyde generated by in vitro (15, 16) and in vivo (17) lipid peroxidation. In fact, DDE was reported as the main toxic lipid peroxidation product toward cultured human endothelial cells (18). Moreover, DDE exhibits a number of cytotoxic effects, including inhibition of cell growth, variation in the cellular glutathione level, and promotion of DNA fragmentation (19). Like other α,β -unsaturated aldehydes, part of the cytotoxic effects of DDE can be related to its ability to react with cellular nucleophiles, such as nucleic acids and proteins.

A number of biologically relevant adducts have been characterized as products of the reactions of α,β -unsaturated aldehydes with nucleosides and bases (reviewed in refs 20 and 21). It has been extensively shown that epoxidation is the chemical step that increases the reactivity of these compounds toward nucleobases, resulting in etheno adduct formation. Indeed, epoxyaldehydes from acrolein (22), crotonaldehyde (23), and 4-hydroxy-2-nonenal (HNE) (24) have been found to be more reactive than their parent aldehydes.

In previous studies, we have shown that DDE epoxides are able to produce etheno adducts with 2'-deoxyadenosine (dAdo) (25). Indeed, the number of adducts detected

* To whom correspondence should be addressed.
Fax: ++55-11-8155579. E-mail: mhgdmede@iq.usp.br.

[†] Universidade de São Paulo.

[‡] Universidade Paulista.

[§] CEA/Grenoble.

¹ Abbreviations: dAdo, 2'-deoxyadenosine; DDE, *trans,trans*-2,4-decadienal; HNE, 4-hydroxy-*trans*-2-nonenal; edAdo, 1,*N*⁶-etheno-2'-deoxyadenosine; adduct I, 1-[3-(2-deoxy- β -D-erythro-pentofuranosyl)-3*H*-imidazo[2,1-*f*]purin-7-yl]-1,2,3-octanetriol; adduct II, 1-[3-(2-deoxy- β -D-erythro-pentofuranosyl)-3*H*-imidazo[2,1-*f*]purin-7-yl]-1,2-heptanediol; adduct III, 1-[3-(2-deoxy- β -D-erythro-pentofuranosyl)-3*H*-imidazo[2,1-*f*]purin-7-yl]-1-hexanol; adduct IV, 1-[3-(2-deoxy- β -D-erythro-pentofuranosyl)-3*H*-imidazo[2,1-*f*]purin-7-yl]-1-(3-pentyl-2-oxiranyl)methanol; ESI-MS, electrospray ionization mass spectrometry.

in the reaction of dAdo with DDE epoxides is higher than with HNE epoxides. Besides 1, *N*⁶-etheno-2'-deoxyadenosine (edAdo), two products were characterized {1-[3-(2-deoxy- β -D-erythro-pentofuranosyl)-3H-imidazo[2,1-*f*]purin-7-yl]-1,2,3-octanetriol (adduct I) and 1-[3-(2-deoxy- β -D-erythro-pentofuranosyl)-3H-imidazo[2,1-*f*]purin-7-yl]-1,2-heptanediol (adduct II)}, the latter being the same adduct generated in the HNE epoxide-dAdo reaction. The mechanism and the detailed structures of etheno nucleobases have been of major interest since it has been shown that they accumulate in DNA after chronic carcinogen exposure (reviewed in ref 26). Another interesting observation dealt with the fact that etheno-DNA adducts are present in tissues from nonexposed animals and humans, suggesting endogenous sources of reactive aldehydes (26). We report herein the complete characterization of the main etheno-dAdo adducts arising from the reaction of DDE epoxides and their assessment in calf thymus DNA. In addition, information about the mechanism of their formation is provided.

Experimental Procedures

Chemicals. All chemicals that were employed were of the highest purity grade commercially available. 2'-Deoxyadenosine was acquired from Merck (Darmstadt, Germany). *trans,trans*-2,4-Decadienal, *trans*-2-octenal, 3-(trimethylsilyl)-1-propanesulfonic acid (DSS), and Amberlyst 15 were obtained from Aldrich (Milwaukee, WI). DDE was purified by HPLC as previously described (25). HNE was a gift from T. Douki (CEA/Grenoble, Grenoble, France). Methanol-*d*₄ was from Fluka (Buchs, Switzerland). The identity and purity of all aldehydes were checked by ¹H NMR. Chromatography grade acetonitrile, chloroform, dichloromethane, methanol, and THF were from EM Science (Gibbstown, NJ). Nuclease P1 was purchased from U.S. Biochemicals Corp. (Cleveland, OH). Alkaline phosphatase was obtained from Pharmacia Biotech (Uppsala, Sweden). Water was purified on a Milli-Q system (Millipore, Bedford, MA). All other chemicals were from Sigma (St. Louis, MO).

Chromatographic Methods. HPLC analyses were performed on a Shimadzu HPLC system (Shimadzu, Kyoto, Japan). This included two LC-10AD pumps, a Rheodyne injector, an SPD-M10AV photodiode array, and RF-535 fluorescence detectors, controlled by a CBM-10A communication bus module and CLASS LC-10AWS software. HPLC conditions were as follows: system 1, a Prodigy C₁₈ (250 mm $\times$ 21.2 mm i.d., 10 μ m) preparative column which was eluted with 40% acetonitrile in water at a flow rate of 9 mL/min; system 2, a Bondclone C₁₈ (300 mm $\times$ 7.8 mm i.d., 10 μ m) semipreparative column (Phenomenex, Torrance, CA) which was eluted with 30% acetonitrile in water at a flow rate of 2 mL/min; and system 3, a Luna C₁₈ (150 mm $\times$ 4.6 mm i.d., 3 μ m) analytical column (Phenomenex) which was first eluted with a water and acetonitrile gradient (5% acetonitrile from 0 to 5 min, 5 to 20% acetonitrile from 5 to 7 min, and 20 to 40% acetonitrile from 7 to 30 min, linearly) at a flow rate of 1 mL/min.

NMR Spectroscopy. One-dimensional (1D) and two-dimensional (2D) ¹H and ¹³C NMR spectra were acquired at 27 °C on Varian INOVA 300 MHz (Varian) and Bruker Avance DRX-500 MHz (Bruker) NMR spectrometers. The samples (5–100 mg) were dissolved in 0.7 mL of either D₂O or DMSO-*d*₆. DSS was used as the internal reference in both solvents.

LC/MS Analyses. Liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry analysis (LC/ESI-MS) was performed using a Quattro II mass spectrometer (Micromass, Manchester, U.K.) interfaced with a Shimadzu LC-10AD HPLC pump. LC/ESI-MS system 1 consisted of a Supelcosil C₁₈ reverse-phase column (250 mm $\times$ 2.1 mm i.d., 5 μ m; Supelco, Bellefonte, PA) which was eluted at a flow rate of 250 μ L min⁻¹ with a mixture of water and acetonitrile (76:24). The mass spectrometer was

operated in the positive ion mode with a potential of 3.5 kV applied to the ESI needle and a cone voltage of 30 V, whereas the ion source temperature was held at 100 °C. A 10 μ L aliquot was injected for each analysis. LC/ESI-MS system 2 consisted of a Hypersil C₁₈ reverse-phase column (150 mm $\times$ 1.00 mm i.d., 3 μ m; Supelco) which was eluted at a flow rate of 100 μ L min⁻¹ with a mixture of water and acetonitrile (65:35) that contained 3 mmol L⁻¹ formic acid. The analysis was carried out in the positive ion mode. A potential of 4 kV was applied to the ESI needle, whereas the cone voltage was set at 25 V and the ion source temperature held at 150 °C. A 0.5 μ L aliquot was injected for each analysis. Nitrogen was used as both the nebulizing and drying gas. Data were processed with Masslynx software.

UV and Fluorescence Spectroscopy. UV spectra were obtained with a Hitachi U3000 spectrophotometer (Tokyo, Japan). Fluorescence spectra were recorded on a Spex 1681 spectrometer (Edison, NJ).

Oxidation of *trans,trans*-2,4-Decadienal and *trans*-2-Octenal. To a solution of 4 mmol of either *trans,trans*-2,4-decadienal or *trans*-2-octenal in 4 mL of acetonitrile was added 1.15 mL of 30% H₂O₂. This solution was stirred at 15 °C, and 0.35 mL of 6 M NaOH was added over the course of 1 h. After the mixture had been stirred for an additional 6 h, 7.5 mL of water was added and the products were extracted twice with 7.5 mL of CH₂Cl₂. The combined extracts were concentrated under vacuum.

Synthesis and Purification of *trans,trans*-2,4-Decadienal and *trans*-2-Octenal-2'-Deoxyadenosine Adducts. Either oxidized DDE (480 mg, 4 mmol) or *trans*-2-octenal (250 mg, 2 mmol) was dissolved in 20 mL of acetonitrile. The resulting mixture was added to a solution of 2'-deoxyadenosine (250 mg, 0.995 mmol) in 80 mL of 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4). After incubation at 50 °C for 4 days with stirring, the reaction mixture was extracted three times with 1 volume of CH₂Cl₂. The aqueous phase was lyophilized, and the resulting dry residue was dissolved in 15 mL of acetonitrile and water (40:60). Subsequently, the adducts were purified by HPLC using system 1 conditions. Fractions that eluted at 9.0 min (adduct III) and 10.4 min (adduct IV) were collected and evaporated to dryness under reduced pressure. The resulting dry material was repurified using system 2.

Characterization of the Adducts. After purification, 4.8 and 6.0 mg of adducts III and IV, respectively, were obtained for DDE synthesis, and 50 mg of adduct III was obtained for octenal synthesis. The adducts were characterized as follows. All compounds displayed similar fluorescence spectra in 25 mM sodium phosphate buffer (pH 7.2) ($\lambda_{\text{exc,max}}$ = 310 nm, $\lambda_{\text{em,max}}$ = 421 nm). They exhibited similar UV spectra as well with UV_{max} values at 231, 262, 268, 278, and 300 nm. The molar extinction coefficient (ϵ_{278} = 5200 M⁻¹ cm⁻¹) of adduct III was determined by a mixed approach involving ¹H NMR and UV measurements. Sodium 3-(trimethylsilyl)-1-propanesulfonate (DSS) was used as the internal standard with an aliquot of pure adduct III in D₂O. A standard solution was prepared by taking an aliquot of the NMR sample and subsequent dilution at different concentrations with an appropriate volume of water. After measurement of the absorbance of the solutions at 278 nm, the ϵ was determined by the ratio between absorbance and concentration. The ¹H NMR spectroscopic data of adducts III and IV are shown in Tables 1 and 2, respectively.

Quantitation of Octenal, HNE, and DDE. All aldehydes were quantified by ¹H NMR using DSS as the internal standard. The NMR samples were prepared with 25 μ L of each one of the aldehydes (octenal, HNE, or DDE), 0.4 mg of DSS (in 20 μ L of methanol-*d*₄), and 660 μ L of methanol-*d*₄. The aldehyde concentrations were estimated by comparing the aldehyde and DSS peak areas.

Reaction of DDE, *trans*-2-Octenal, and HNE with Calf Thymus DNA in the Presence of H₂O₂. Calf thymus DNA (0.1 mg) was dissolved in 100 μ L of 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4) to which 10 μ mol of H₂O₂ and 10 μ mol of each of the

Table 1. 500 MHz ^1H and 125 MHz ^{13}C NMR Features of Adduct III^a

^1H NMR				^{13}C NMR	
	δ (ppm)			δ (ppm)	
H-1'	6.48	t	$J_{1',2'} = 6.9$ Hz	C-1'	84.1
H-2'	2.73	m	$J_{1',2'} = 6.3$ Hz	C-2'	40.0
H-2''	2.36	m	$J_{2',2''} = -14.0$ Hz	C-3'	70.8
H-3'	4.43	m	$J_{2',3'} = 6.8$ Hz	C-4'	88.1
3'-OH	5.34	d	$J_{2',3'} = 3.9$ Hz	C-5'	61.8
H-4'	3.89	m	$J_{3',4'} = 3.0$ Hz	C-2	136.0
H-5'	3.60	m	$J_{3',5'-\text{OH}} = 4.2$ Hz	C-4	138.1
H-5''	3.55	m	$J_{4',5'} = 3.7$ Hz	C-5	123.2
5'-OH	4.95	t	$J_{4',5'} = 4.7$ Hz	C-6	141.0
H-2	9.18	s	$J_{5',5''} = -12.5$ Hz	C-8	139.9
H-8	8.52	s	$J_{5',5''-\text{OH}} = 5.5$ Hz	C-11	129.6
H-11	7.41	s	$J_{13,14-\text{OH}} = 6.1$ Hz	C-12	127.7
H-13	5.01	m	$J_{13,14} = 6.6$ Hz	C-13	63.6
13-OH	5.48	d		C-14	34.9
H-14	1.92	td		C-15	31.2
H-15	1.51	m		C-16	25.3
H-16	1.29	m		C-17	22.2
H-17	1.23	m		C-18	14.1
H-18	0.85	t			

^a m, multiplet; t, triplet; d, doublet; s, singlet.

following aldehydes had been added: DDE, *trans*-2-octenal, and HNE (dissolved in 50 μL of methanol). The resulting mixtures were incubated at 37 $^\circ\text{C}$ with stirring for 5 days. The DNA was precipitated by addition of 2-propanol (150 μL), left at -20 $^\circ\text{C}$ for 2 h, and centrifuged at 14000g for 30 min. The residue was dissolved in 0.4 mL of 20 mM acetate buffer (pH 4.8) and subsequently digested overnight with 33 units of nuclease P1 at 37 $^\circ\text{C}$. Then, 50 μL of enzyme buffer and 25 units of alkaline phosphatase were added for an additional 2 h incubation. The enzymes were precipitated by the addition of 0.5 mL of chloroform followed by centrifugation at 14000g for 30 min.

Analysis of the DNA Hydrolysates by HPLC/Fluorescence and LC/ESI-MS. The samples obtained in the previous section were analyzed and quantified by HPLC with fluorescence detection (system 3). The reported data are from analyses which were made in quadruplicate. The amount of dAdo was quantified by UV detection ($\lambda = 260$ nm). The fluorescence detection of etheno-dAdo adducts was achieved with the excitation wavelength set at 300 nm and the emission wavelength set at 410 nm. The fluorescent peaks corresponding to the adducts were collected and dried under vacuum. The resulting residue was dissolved in 10 μL of water prior to re-analysis using LC/ESI-MS (system 2).

Results

Formation and Structural Determination of Adducts III and IV from the Reaction of 2,4-Decadienal Oxidation Products with 2'-Deoxyadenosine. The H_2O_2 -mediated DDE oxidation products with 2'-deoxyadenosine (dAdo) gave rise to four main adducts which were separated and purified by HPLC. The four modified nucleosides displayed a strong fluorescence ($\lambda_{\text{ex,max}} = 310$ nm, $\lambda_{\text{em,max}} = 421$ nm) (data not shown) together with similar UV absorption properties. Interestingly, the absorption spectra are also similar to that of

dAdo with, however, a bathochromic shift of 3 nm. Altogether, the fluorescence and UV features are strongly indicative of an dAdo structure for the four modified dAdo nucleosides.

Figure 1 shows the HPLC/ESI-MS detection profile of the four compounds. Products that eluted at 10.2 and 15.0 min exhibited pseudomolecular ions $[\text{M} + \text{H}]^+$ at m/z 436.22 and 406.20, respectively. They correspond to the etheno adducts to dAdo previously characterized and already designated as adducts I and II (25). In the work presented here, emphasis was placed on structure elucidation of the not yet characterized adducts, III and IV, which exhibited retention times of 28 and 36–38 min, respectively.

The ESI-MS of adduct III showed a pseudomolecular ion at m/z 376.20 and a quasi-molecular ion at m/z 398.19, corresponding to the protonated form $[\text{M} + \text{H}]^+$ and the sodium adduct $[\text{M} + \text{Na}]^+$, respectively. The MS data are indicative of an increase in the molecular mass (MW) of the adduct by 124 Da with respect to dAdo. This was unexpected since DDE has a MW of 154 Da, implying a loss of 30 Da from the aldehyde (vide infra). Further insights into the structure of III were obtained from extensive ^1H NMR measurements (Table 1) involving 2D-COSY and 2D-J resolved analysis. The signal that resonates as a singlet at 7.41 ppm in the ^1H NMR spectrum recorded in $\text{DMSO}-d_6$ was assigned to the etheno proton (H-11). This is characteristic of 1, N^8 -dAdo derivatives (25), corroborating the UV and fluorescence data which were discussed above. The other signals in the low-field region (8.52 and 9.18 ppm) which appear as two singlets correspond to the purine protons (H-8 and H-2, respectively). The high chemical shift values of H-2 and H-8 protons suggest that the purine ring aromaticity was retained during adduct formation. In addition, the resonance signals of the 2-deoxyribose protons were assigned starting from the pseudotriplet pattern for the anomeric proton at $\delta = 6.48$ ppm. The exchangeable 3'- and 5'-hydroxyl protons (3'-OH and 5'-OH, respectively) were observed at $\delta = 5.34$ and 4.95 ppm, respectively, in the spectra acquired in $\text{DMSO}-d_6$. The presence of an alkyl chain on the etheno ring was inferred from the observation of signals in the high-field region of the spectrum ($0.8 < \delta < 2$ ppm). The signal at $\delta = 0.85$ ppm was assigned to a methyl group, whereas the resonances at $\delta = 1.23$, 1.29, 1.51, and 1.92 ppm correspond to four methylenic protons. Although it was not possible to determine most of the individual coupling constants pertaining to the alkyl chain due the complexity of the splitting patterns, the integration data are consistent with 11 protons. Interestingly, a scalar correlation between the methylenic protons at $\delta = 1.92$ ppm and methinic proton at $\delta = 5.01$ ppm was observed in the 2D-COSY experiments. It was further confirmed that the latter signal corresponds to a carbinol group, a hydroxyl proton being observed at $\delta = 5.48$ ppm in $\text{DMSO}-d_6$.

Further support for the structure of adduct III was gained from ^{13}C NMR measurements in $\text{DMSO}-d_6$ (Table 1). Eighteen carbon resonances were observed. All the nonquaternary carbons were assigned from HMQC experiments. Thus, the five resonances of the sugar moiety of III exhibit chemical values similar to those of the 2'-deoxyribose moiety of dAdo. We note a decrease in the chemical shift values of the carbons of the hydroxy-substituted alkyl chain, starting from the carbinol carbon

Table 2. 500 MHz ^1H and 125 MHz ^{13}C NMR Features of Adduct IV^a

¹H NMR

¹³C NMR

δ (ppm)

δ (ppm)

a

b

a

b

a

b

H-1'	6.48	6.48	m	$J_{1',2'} = 6.9$ Hz	$J_{1',2'} = 6.9$ Hz	C-1'	84.0	84.1
H-2'	2.73	2.73	m	$J_{1',2'} = 6.3$ Hz	$J_{1',2'} = 6.3$ Hz	C-2'	39.6	39.6
H-2''	2.36	2.36	m	$J_{2',2''} = -14.0$ Hz	$J_{2',2''} = -14.0$ Hz	C-3'	70.6	70.7
H-3'	4.43	4.43	m	$J_{2',3'} = 6.8$ Hz	$J_{2',3'} = 6.8$ Hz	C-4'	87.9	87.9
3'-OH	5.34	5.34	d	$J_{2',3'} = 3.9$ Hz	$J_{2',3'} = 3.9$ Hz	C-5'	61.5	61.4
H-4'	3.89	3.90	m	$J_{3',4'} = 3.0$ Hz	$J_{3',4'} = 3.0$ Hz	C-2	136.1	136.0
H-5'	3.62	3.62	m	$J_{4',5'} = 3.7$ Hz	$J_{4',5'} = 3.7$ Hz	C-4	nd ^b	137.9
H-5''	3.53	3.54	m	$J_{4',5'} = 4.7$ Hz	$J_{4',5'} = 4.7$ Hz	C-5	nd ^c	124.0
5'-OH	4.94	4.94	m	$J_{5',5''} = -12.5$ Hz	$J_{5',5''} = -12.5$ Hz	C-6	nd	141.2
H-2	9.20	9.16	s	$J_{13,13-\text{OH}} = 5.2$ Hz	$J_{13,13-\text{OH}} = 5.2$ Hz	C-8	139.9	140.0
H-8	8.53	8.53	s	$J_{13,14} = 4.8$ Hz	$J_{13,14} = 4.6$ Hz	C-11	130.4	130.7
H-11	7.49	7.48	s	$J_{14,15} = 1.7$ Hz	$J_{14,15} = 1.7$ Hz	C-12	nd	nd
H-13	5.01	5.09	m	$J_{15,16} = 5.6$ Hz	$J_{15,16} = 5.1$ Hz	C-13	64.3	64.5
13-OH	5.95	6.01	t			C-14	59.9	59.0
H-14	3.28	3.24	m			C-15	55.3	56.4
H-15	2.98	2.87	dt			C-16	30.9 ^c	30.9 ^c
H-16	1.53	1.55	m			C-17	30.8 ^c	30.8 ^c
H-17	1.34	1.38	m			C-18	25.1	25.0
H-18	1.21	1.27	m			C-19	21.9	21.9
H-19	1.21	1.27	m			C-20	13.7	13.7
H-20	0.84	0.85	t					

^a m, multiplet; t, triplet; d, doublet; s, singlet. ^b nd, not detected. ^c These assignments might be reversed.

Figure 1. Separation by reverse-phase HPLC and MS analysis of the adducts formed between dAdo and DDE epoxides. Mass scanning from m/z 370 to 450. Conditions are described in Experimental Procedures.

($\delta = 63.6$ ppm) down to the terminal methyl group ($\delta = 14.1$ ppm). The signals corresponding to C-2, C-8, and C-11 were observed at 136.0, 139.9, and 129.6 ppm, respectively. The assignment of the four quaternary carbons was obtained from a long-range HETCOR experiment (Figure 2). The proton H-2 underwent $^2J(\text{C},\text{H})$

Figure 2. Long-range HETCOR (7.05 T) spectrum of adduct III in $\text{DMSO}-d_6$.

couplings with signals at 138.1 and 141.0 ppm, while H-8 is involved in $^2J(\text{C},\text{H})$ couplings with the carbons resonating at 138.1 and 123.2 ppm; therefore, the signal at 138.1 ppm was assigned as C-4 and that at 123.2 ppm as C-5. The existence of couplings between resonances at 127.7 and 141.0 ppm on one hand and H-11 on the other hand allows the assignments of C-12 and C-6, respectively. Taken together, the ^1H and ^{13}C NMR data are consistent with an etheno structure bearing a six-carbon alkyl side chain substituted with a hydroxyl group.

Figure 3. Representative reverse-phase HPLC separation with fluorescence detection ($\lambda_{\text{exc}} = 300$ nm, $\lambda_{\text{emis}} = 410$ nm) of hydrolyzed calf thymus DNA treated with 2-octenal (top), HNE (middle), and DDE (bottom) as described in Experimental Procedures.

Two HPLC peaks whose content exhibits similar EIS-MS features were observed on the chromatogram shown in Figure 1. Both show pseudomolecular ions at m/z 418.21 $[M + H]^+$ and a quasi-molecular ion at m/z 440.19 $[M + Na]^+$. These findings strongly suggest they could be diastereoisomers, and therefore, they were designated as adducts IV (diastereoisomers a and b). The UV and fluorescence properties of IV are indicative of a 1, Δ^6 -dAdo structure as was shown for adduct III. Thus, it may be proposed that adducts IV exhibit a side alkyl chain of 143 Da attached to the etheno ring. Both compounds were analyzed by ^1H NMR, and their chemical shifts and coupling constants are reported in Table 2. In particular, the signals of the 2-deoxyribose moiety, the purine base, the etheno ring together with the methyl substituent, and the four methylene groups of the alkyl chain exhibit features similar to those of adduct III. In addition, four other resonances are observed in the spectra: $\delta = 2.98, 3.28, 5.01$, and 5.95 ppm (diastereoisomer a) and $\delta = 2.87, 3.24, 5.09$, and 6.01 ppm (diastereoisomer b). Relevant structural information was gained from the scalar couplings involving these protons in the 2D-COSY spectrum. It appears that the latter protons undergo one or two scalar couplings, whereas the signal at low field ($\delta = 5.95$ or 6.01 ppm) is not observed in the spectra recorded in D_2O . The NMR and EIS-MS features may be rationalized in terms of an etheno adduct to dAdo which exhibits an alkyl chain with a hydroxyl group at C-13 and an epoxide involving C-14 and C-15 (see the structure shown in Table 2). The only observed differences in the ^1H NMR spectra of a and b involved the protons attached to the chiral carbons. The small

Figure 4. ESI-MS analysis of the adducts produced from the reaction of calf thymus DNA with 2-octenal, HNE, and DDE in the presence of H_2O_2 . Conditions are described in Experimental Procedures.

Table 3. Levels of Adducts Formed in the Reaction of DNA with Octenal, HNE, and DDE in the Presence of H_2O_2

	adduct level (adducts/ 10^3 dAdo)			
	I	II	III	IV
control	nd ^a	nd	nd	nd
octenal	nd	nd	114.1 ± 17.7	nd
HNE	nd	179.8 ± 2.9	nd	nd
DDE	6.5 ± 2.1	4.9 ± 0.5	26.4 ± 3.0	6.9 ± 0.4

^a nd, not detected.

coupling constants between protons 14 and 15 (1.7 Hz) suggest a trans structure for both diastereoisomers showing that the aldehyde stereochemistry is retained during epoxidation.

The ^{13}C NMR features of adducts IVa and IVb are very similar to those of adduct III. The main differences were found in the side chain carbons (Table 2). Besides the typical methyl signal at 13.7 ppm, five methylenic carbons were detected within the chemical shift range (13.7–30.9 ppm). The presence of the epoxide group on C-14 and C-15 was confirmed by the observation of the signals at 59.9 and 55.3 ppm (isomer a) and 59.0 and 56.4 ppm (isomer b). When these values are compared with those from typical aliphatic epoxides, the carbon at

Scheme 1. Mechanistic Pathways for the Formation of the Four DDE Adducts to dAdo

ca. 59 ppm presents a small shielding that might be attributable to the influence of the π -electron current in the etheno ring. A carbinol carbon was observed at 64.3 and 64.5 ppm (diastereoisomers **a** and **b**, respectively). Hence, these data are consistent with the epoxy-bearing structures depicted in Table 1.

Isolation and Characterization of the Adduct from the Reaction of *trans*-2-Octenal with 2'-Deoxyadenosine. For comparison purposes, attempts were made to isolate and characterize the main addition products of the reaction of oxidized *trans*-2-octenal, another breakdown product of lipid peroxidation, with dAdo. As for DDE, oxidation of *trans*-2-octenal was performed by preincubation with H_2O_2 . The HPLC elution profile of the reaction products of the oxidized aldehyde with dAdo showed the presence of only one main peak that coeluted with adduct **III** (data not shown). Unambiguous assignment of the modified nucleoside as adduct **III** was obtained from the comparison of the fluorescence, UV, mass spectroscopy, and NMR features (data not shown) with those of the authentic sample (vide supra).

Identification of Etheno Adducts to dAdo upon Incubation of DDE, *trans*-2-Octenal, or HNE with Calf Thymus DNA in the Presence of H_2O_2 . Calf thymus DNA was allowed to react with DDE, *trans*-2-octenal, and HNE in the presence of H_2O_2 under conditions similar to those described for dAdo reactions. Etheno adducts to dAdo which were enzymatically released from modified DNA were analyzed and quantified by HPLC/fluorescence. Typical chromatograms are displayed in Figure 3. The elution profiles of the reaction products of *trans*-2-octenal and HNE are quite simple, since in each case only one main fluorescent peak was observed. The modified nucleosides were assigned to adduct **III** for *trans*-2-octenal and adduct **II** for HNE. The DDE profile was more complex, indicating the formation of several products which were assigned as adducts **I–IV**. The identity of the fluorescent modified nucleosides was provided by co-elution with authentic standards and further confirmed by ESI-MS analysis. The corresponding mass spectra, each exhibiting a predominant pseudomolecular ion $[M + H]^+$, are shown in Figure 4. Information on the reactivity of the aldehydes may be inferred from

Scheme 2. Formation of Etheno Adducts to dAdo by DDE and Related Lipid Peroxidation Breakdown Products

the comparison of the yields of etheno adducts which are reported in Table 3. Higher yields of etheno adducts to dAdo in DNA are observed with HNE and *trans*-2-octenal, when compared with yields with DDE. However, the reactions mediated by oxidized DDE are more complex, leading to the formation of four main etheno adducts to dAdo.

Discussion

In a previous study, we reported the HPLC isolation and the characterization of three adducts generated through the reaction of DDE with dAdo (25). Besides 1,N⁶-etheno-2'-deoxyadenosine (εdAdo), two other products were characterized, namely, 1-[3-(2-deoxy-β-D-erythro-pentofuranosyl)-3H-imidazo[2,1-*b*]purin-7-yl]-1,2,3-octanetriol and 1-[3-(2-deoxy-β-D-erythro-pentofuranosyl)-3H-imidazo[2,1-*b*]purin-7-yl]-1,2-heptanediol, designated as adducts I and II, respectively. Initial epoxidation of DDE and the subsequent reaction of oxidized aldehyde with dAdo constitute the sequence of events giving rise to the etheno adducts. It was demonstrated elsewhere that epoxides formed by either microsomal activation or peroxide-mediated oxidation are the reactive species of several DNA alkylating carcinogens (21, 24).

In the work presented here, two new hydrophobic adducts were isolated by reverse-phase HPLC after oxidation of DDE by H₂O₂ and subsequent reaction with dAdo. Thus, 1-[3-(2-deoxy-β-D-erythro-pentofuranosyl)-3H-imidazo[2,1-*b*]purin-7-yl]-1-hexanol (adduct III) and 1-[3-(2-deoxy-β-D-erythro-pentofuranosyl)-3H-imidazo[2,1-*b*]purin-7-yl]-2,3-epoxy-1-octanol (adduct IV) were characterized on the basis of extensive spectroscopic measurements.

The formation of the five etheno adducts through the reaction of DDE with dAdo requires the oxidation of the aldehydes with the subsequent generation of a mixture

of oxidation products such as diepoxides, epoxides, and hydroperoxides. Reaction of the latter oxidation products with dAdo will produce, besides εdAdo, four other adducts. A mechanism for the formation of the adducts is proposed in Scheme 1. As discussed in a previous work, adduct I could be formed through the intermediary of 2,3-epoxy-4,5-dihydroxydecenal, whereas 2,3-epoxy-4-hydroxynonanal is involved in the generation of II. Formation of adduct III (Scheme 1) may be rationalized in terms of initial production of either 2-octenal or its corresponding epoxide. In this respect, formation of 2-octenal upon DDE oxidation has been previously reported (27) through a mechanism involving in the initial step α,β-double bond hydration giving rise to 3-hydroxy-4-decenal. This is followed by retro-aldol degradation of the latter aldehyde, leading to 2-octenal and ethanal. In the presence of peroxides, 2-octenal should form 2,3-epoxyoctenal, which, on reaction with dAdo, yields adduct III. As shown in Scheme 1, adduct IV can be produced directly through the reaction of the DDE double epoxide with dAdo.

Adduct IV is very stable, and it cannot be converted to adduct I. This leads to a refinement of the proposed mechanism for adduct I formation that was previously reported (25). Thus, it seems reasonable that the hydrolysis of the 4,5-epoxide occurs before the reaction with dAdo as described now in Scheme 1.

Considering that (i) adduct II is identical to the product of the reaction of 2,3-epoxy-4-hydroxynonanal with dAdo described by Sodem and Chung (30) and (ii) adduct III is generated by reaction of the corresponding 2,3-epoxyoctenal with dAdo, attempts were made to compare the reactivity of DDE, HNE, and 2-octenal toward dAdo in calf thymus DNA in the presence of H₂O₂. 2-Octenal and HNE were found to be more reactive than DDE; however, only DDE was able to generate the four etheno adducts (I–IV) that were tested.

Conclusions

Etheno adducts to DNA bases have deserved special attention due to their implication in the deleterious biological effects of several known carcinogens such as vinyl chloride, urethane, and acrylonitrile (reviewed in ref 26). Transfection studies involving shuttle vectors that contained 3,N⁶- ϵ dC and 1,N⁶- ϵ dA showed that the latter lesions are highly mutagenic. The associated mutation frequencies are 81 and 71%, respectively, in mammalian cells (29, 30). The presence of the etheno adducts in DNA from unexposed humans and rodents was recently reported (31). However, the origin of the adduct background is still open to debate. It has been proposed that lipid peroxidation through the breakdown products is a likely endogenous source of alkylating carcinogens. Among these products, malonaldehyde and HNE are the most extensively studied. However, only HNE was shown to form DNA etheno adducts. Due to the lack of information about other lipid peroxidation products, the generation of the DNA etheno adduct has mostly been attributed to HNE.

Evidence is now provided that DDE is a versatile alkylating agent (Scheme 2) being able to generate, after epoxidation, five different adducts in its reaction with dAdo. Interestingly, the five etheno adducts are also formed with calf thymus DNA. Indeed, DDE can produce the expected adducts which are generated by HNE, 2-octenal, and 4,5-dihydroxy-2-decenal, three other breakdown products of lipid peroxidation (32). Actually, 2-octenal and 4,5-hydroxy-2-decenal have been reported to be highly cytotoxic (19, 32). Even though DDE generates lower levels of adducts II and III than 2-octenal and HNE, the larger variety of etheno adducts produced by DDE reactions could account for the high magnitudes of the cytotoxic properties of the aldehyde. Moreover, the possible use of etheno adducts as biomarkers of carcinogen exposure should take into account the different mechanisms of adduct formation.

Acknowledgment. This work was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP (Brazil), the Conselho Nacional para o Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq (Brazil), Programa de Apoio aos Núcleos de Excelência, PRONEX/FINEP (Brazil), Pró-Reitoria de Pesquisa da Universidade de São Paulo (Brazil), and Comité Français d'Évaluation de la Coopération Universitaire avec le Brésil (USP-COFECUB/UC-23/96). V.M.C. and F.A. are recipients of FAPESP and CNPq fellowships, respectively.

References

- Bao, M. L., Barbieri, K., Burrini, D., Griffini, O., and Pantani, F. (1997) Determination of trace levels of taste and odor compounds in water by microextraction and gas chromatography ion trap detection mass spectrometry. *Water Res.* **31**, 1719–1727.
- Boosfeld, J., and Vitzthum, O. G. (1995) Unsaturated aldehydes: Identification from green coffee. *J. Food Sci.* **60**, 1092–1096.
- Moshonas, M. G., and Shaw, P. E. (1979) Isolation of *trans,trans*-2,4-decadienal and intermediate from cold-pressed citrus oils. *J. Agric. Food Chem.* **27**, 210–211.
- Cha, Y. J., and Cadwallader, K. R. (1998) Aroma-active compounds in skipjack tuna sauce. *J. Agric. Food Chem.* **46**, 1123–1128.
- Yoshiwa, T., Morimoto, K., Sakamoto, K., Ishikawa, Y., Tokita, M., and Morita, M. (1997) Volatile compounds of fishy odor in sardine by simultaneous distillation and extraction under reduced pressure. *Nippon Suisan Gakk.* **63**, 222–230.
- Milo, C., and Grosch, W. (1996) Changes in the odorants of boiled salmon and cod as affected by the storage of the raw material. *J. Agric. Food Chem.* **44**, 2366–2371.
- Farkas, P., Sadecka, J., Kovac, M., Siegmund, B., Leitner, E., and Pfannhauser, W. (1997) Key odorants of pressure-cooked hen meat. *Food Chem.* **60**, 617–621.
- Kerler, J., and Grosch, W. (1997) Character impact odorants of boiled chicken: changes during refrigerated storage and reheating. *Z. Lebensm.-Unters.-Forsch.* **205**, 232–238.
- Brewer, M. S., and Vega, J. D. (1995) Detectable odor thresholds of selected lipid oxidation compounds in a meat model system. *J. Food Sci.* **60**, 592–595.
- Konopka, U. C., Guth, H., and Grosch, W. (1995) Potent odorants formed by lipid peroxidation as indicators of the warmed-over flavor (WOF) of cooked meat. *Z. Lebensm.-Unters.-Forsch.* **201**, 339–343.
- Schieberle, P., and Grosch, W. (1991) Potent odorants of the wheat bread crumb: differences to the crust and effect of a longer dough fermentation. *Z. Lebensm.-Unters.-Forsch.* **192**, 130–135.
- Boeve, J. L., Gfeller, H., Schlunegger, U. P., and Francke, W. (1997) The secretion of the ventral glands in *Hoplocampa sawfly* larvae. *Biochem. Syst. Ecol.* **25**, 195–201.
- Almosnino, A. M., and Belin, J. M. (1991) Apple pomace: An enzyme system for producing aroma compounds from polyunsaturated fatty acids. *Biotechnol. Lett.* **13**, 893–898.
- Andrianarison, R.-H., Rabinovitch-Chable, H., and Beneytout, J. L. (1991) Oxidation formation during the *Vicia sativa* lipoxygenase-catalyzed reaction: occurrence of dioxygenase and fatty acid lyase activities associated in a single protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **180**, 1002–1009.
- Thomas, C. E., Jackson, R. L., Ohlweiler, D. F., and Ku, G. (1994) Multiple lipid oxidation products in low-density lipoproteins induce interleukin-1 beta release from human blood mononuclear cells. *J. Lipid Res.* **35**, 417–427.
- Girona, J., La Ville, A. E., Heras, M., Olivé, S., and Masana, L. (1997) Oxidized lipoproteins including HDL and their lipid peroxidation products inhibit TNF- α secretion by THP-1 human macrophages. *Free Radical Biol. Med.* **23**, 658–667.
- Buffinton, G. D., Hunt, N. H., Cowden, W. B., and Clark, A. (1988) Detection of short-chain carbonyl products of lipid peroxidation from malaria-parasite (*Plasmodium vinckei*)-infected red blood cells exposed to oxidative stress. *Biochem. J.* **249**, 63–68.
- Kaneko, T., Kaji, K., and Matsuo, M. (1988) Cytotoxicities of a linoleic acid hydroperoxide and its related aliphatic aldehydes toward cultured human umbilical vein endothelial cells. *Chem.-Biol. Interact.* **67**, 295–304.
- Nappe, C., Battu, S., and Beneytout, J. L. (1996) *trans,trans*-2,4-Decadienal: cytotoxicity and effect on glutathione level in human erythroleukemia (HEL) cells. *Cancer Lett.* **99**, 115–119.
- Chung, F.-L., Nath, R. G., Nagao, M., Nishikawa, A., Zhou, G.-D., and Randerath, K. (1999) Endogenous formation and significance of 1,N⁶-propanodeoxyguanosine adducts. *Mutat. Res.* **424**, 71–81.
- Nair, J., Barbin, A., Velic, I., and Bartsch, H. (1999) Etheno DNA-base adducts from endogenous reactive species. *Mutat. Res.* **424**, 59–69.
- Golding, B. T., Slaich, P. K., Kennedy, G., Bleasdale, C., and Watson, W. P. (1996) Mechanisms of formation of adducts from reactions of glycidaldehyde with 2'-deoxyguanosine and/or guanosine. *Chem. Res. Toxicol.* **9**, 147–157.
- Nair, V., and Offerman, R. J. (1985) Ring-extended products from the reaction of epoxy carbonyl compounds and nucleic acid bases. *J. Org. Chem.* **50**, 5627–5631.
- Sodum, R. S., and Chung, F.-C. (1988) 1,N⁶-Ethenodeoxyguanosine as a potential marker for DNA adduct formation by *trans*-4-hydroxy-2-nonenal. *Cancer Res.* **48**, 320–323.
- Carvalho, V. M., Di Mascio, P., Campos, I. P. A., Douki, T., Cadet, J., and Medeiros, M. H. G. (1998) Formation of 1,N⁶-etheno-2'-deoxyadenosine adducts by *trans,trans*-2,4-decadienal. *Chem. Res. Toxicol.* **11**, 1042–1047.
- Bartsch, H., Barbin, A., Marion, M.-J., Nair, J., and Guichard, Y. (1994) Formation, detection and role in carcinogenesis of ethenobases in DNA. *Drug Metab. Rev.* **26**, 349–371.
- Josephson, D. B., and Lindsay, R. C. (1987) Retro-aldol related degradation of 2,4-decadienal in the development of staling flavors in fried foods. *J. Food Sci.* **52**, 1186–1190.
- Sodum, R. S., and Chung, F. L. (1991) Stereoselective formation of in vitro nucleic-acid adducts by 2,3-epoxy-4-hydroxynonenal. *Cancer Res.* **51**, 137–143.
- Moriya, A. M., Zhang, W., Johnson, F., and Grollman, A. P. (1994) Mutagenic potency of exocyclic DNA-adducts: Marked differences between *Escherichia coli* and simian kidney-cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**, 11899–11903.

- (30) Pandya, G. A., and Moriya, M. (1996) 1,N⁶-Ethenodeoxyadenosine, a DNA adduct highly mutagenic in mammalian cells. *Biochemistry* **35**, 11487–11492.
- (31) Nair, J., Barbin, A., Guichard, Y., and Bartsch, H. (1995) 1,N⁶-Ethenodeoxyadenosine and 3,N⁶-ethenodeoxycytidine in liver DNA from humans and untreated rodents detected by immunoaffinity P³² postlabeling. *Carcinogenesis* **16**, 613–617.
- (32) Benedetti, A., Comporti, M., Fulceri, R., and Esterbauer, H. (1984) Cytotoxic aldehydes originating from the peroxidation of liver microsomal lipids. Identification of 4,5-dihydroxydecenal. *Biochim. Biophys. Acta* **792**, 172–181.

TX9901682

Purine DNA adducts of 4,5-dioxo-valeric acid and 2,4-decadienal

J. Cadet, V.M. Carvalho, J. Onuki, T. Douki, M.H.G. Medeiros & P. Di Mascio

The present overview describes recent findings on the formation of cyclic adducts of purine DNA bases after reaction with two aldehyde compounds, 4,5-dioxovaleric acid (DOVA) and 2,4-decadienal (DDE), which are involved in 5-aminolaevulinic acid (ALA) accumulation and lipid peroxidation, respectively. ALA accumulates under pathological conditions and is associated with an increased incidence of liver cancer. The final oxidation product of ALA, DOVA, is an efficient alkylating agent of the guanine moieties in both nucleoside and isolated DNA. Adducts were produced through the formation of a Schiff base involving the N^2 -amino group of 2'-deoxyguanosine and the ketone function of DOVA, respectively. DDE is an important breakdown product of lipid peroxidation. It is cytotoxic to mammalian cells and is known to be implicated in DNA damage. It can bind to 2'-deoxyadenosine, yielding highly fluorescent products, including 1, N^6 -etheno-2'-deoxyadenosine and two other, related adducts. The reaction mechanism for the formation of DDE-2'-deoxyadenosine adducts involves epoxidation of DDE and subsequent addition of the resulting reactive intermediates to the N^6 amino group of 2'-deoxyadenosine, followed by cyclization at the N1 site. Formation of endogenous DNA adducts may contribute to the genotoxic potential of ALA and DDE.

Introduction

A series of chemicals can alkylate DNA bases, some by addition to the N7-position of guanine residues or by involvement of the exocyclic amino groups of cytosine, adenine and guanine. Malondialdehyde (Basu *et al.*, 1988), glyoxal (Shapiro & Hachmann, 1966; Shapiro *et al.*, 1968) and α,β -unsaturated aldehydes (Chung *et al.*, 1984; Winter *et al.*, 1986; Eder & Hoffman, 1992, 1993; Nath & Chung, 1994; Douki & Ames, 1994) can be involved in the formation of modified bases with an additional ring. The latter structure can be either five-membered, as in the malondialdehyde-guanine adduct, or six-membered as in 1, N^2 -propano adducts of α,β -unsaturated aldehydes. In addition, etheno bases can be generated after reaction of DNA bases with vinyl chloride, ethyl carbamate, α -halogenated aldehydes, α -haloketones (Bartsch *et al.*, 1994) and epoxidized α,β -unsaturated aldehydes (Sodum & Chung, 1988, 1991). Most of these lesions have been characterized at the level of nucleosides and isolated DNA. Some of them have also been detected in cellular DNA, including that of rodent and human liver (Vaca

et al., 1992; Chaudhary *et al.*, 1994; Nath & Chung, 1994; Nair *et al.*, 1995). Emphasis is placed in this chapter on the identification of the main DNA bases produced by two aldehydic compounds, 4,5-dioxovaleric acid (DOVA; Douki *et al.*, 1998a) and 2,4-decadienal (DDE; Carvalho *et al.*, 1998). In both cases, the initial steps in adduct formation are similar to those identified for other reactive aldehydes (glyoxal and 2,3-epoxy-4-hydroxynonanal, respectively); however, additional rearrangements lead to the formation of unusual substituted rings.

DNA alkylation by 4,5-dioxovaleric acid

5-Aminolaevulinic acid (ALA), a precursor of porphyrin IX in the biosynthesis of haem, can accumulate in liver, brain and other organs under pathological conditions such as acute intermittent porphyria, tyrosinosis (Kappas *et al.*, 1983; Hindmarsh, 1986) and lead poisoning (Chisolm, 1971). A high incidence of primary liver cancer has been reported in patients with acute intermittent porphyria and has been associated with the frequency of acute attacks when the ALA plasma concentration rises about 100-

fold (Lithner & Wetterberg, 1984; Gubler *et al.*, 1990; Thunnissen *et al.*, 1991). This observation is an indication of possible mutagenic properties of ALA. Moreover, it has recently been observed that ALA can induce chromosomal aberrations in rat hepatocytes (Fiedler *et al.*, 1996). The determination of the carcinogenic potential of ALA has received additional attention as the result of the increasing use of ALA in cancer phototherapy (Kennedy & Pottier, 1992; Ortel *et al.*, 1993; Peng *et al.*, 1997). Nevertheless, little is known about the possible side-effects of ALA and the chemical mechanisms associated with its DNA damaging properties. The involvement of reactive oxygen species produced during the metal-catalysed oxidation of ALA by oxygen has been demonstrated by Bechara and coworkers (1993). In addition, ALA may catalyse its own oxidation, since it can release iron from ferritin (Oteiza *et al.*, 1995). Moreover, iron mobilization in the brain and liver of rat is triggered by long-term treatment with ALA (Demasi *et al.*, 1996). Induction of DNA damage by ALA is also indicated by the observation that DNA strand breaks are formed in plasmids in the presence of ferrous ions (Onuki *et al.*, 1994), copper ions (Hiraku & Kawanishi, 1996) or ferritin (Di Mascio *et al.*, unpublished data). In addition, increases in the levels of several radical-induced modified bases have been observed in isolated DNA after treatment with ALA (Fraga *et al.*, 1994; Hiraku & Kawanishi, 1996; Douki *et al.*, 1998b). Interestingly, the relative yield of the latter lesions was similar to those obtained by gamma irradiation of isolated DNA in aerated aqueous solution (Douki *et al.*, 1998b), which strongly suggests the involvement of hydroxyl radicals in ALA-mediated DNA damage. Formation of oxidized bases, including 8-oxo-7,8-dihydroguanine and 5-hydroxycytosine, has also been found in liver DNA of rats treated with ALA (Fraga *et al.*, 1994; Douki *et al.*, 1998b). Taken together, these data provide evidence for the biological relevance of ALA metal-catalysed oxidation. In that respect, the final oxidation product of ALA, DOVA, is an interesting compound, and its dicarbonyl structure makes it a good candidate for alkylating the exocyclic amino group of DNA bases, as already reported for acetaldehyde (Vaca *et al.*, 1995) and glyoxal derivatives (Shapiro &

Hachmann, 1966; Shapiro *et al.*, 1968). Therefore, we investigated the reactivity of DOVA towards 2'-deoxyguanosine (dG) and identified two diastereoisomeric adducts. Their formation involves addition of the ketone function of DOVA to the N^2 -amino group of dG, leading to formation of a Schiff base. The reaction was also shown to take place within isolated double-stranded DNA.

Addition of 4,5-dioxovaleric acid to 2'-deoxyguanosine and reduction of the reaction products

The reaction between DOVA and dG led to the formation of two major products (Figure 1), which were separated by reversed-phase high-performance liquid chromatography (HPLC). The UV absorption features of 1 and 2 were very similar to those of dG, except for a slight red shift of approximately 5 nm (Figure 2). Attempts to isolate compounds 1 and 2 were unsuccessful because the adducts rapidly reverted to dG with a half-life of 25 min in neutral aqueous solution at room temperature. Another interesting feature of the reaction between dG and DOVA is the dependence of the efficiency of adduct formation on the concentration of the reagents. The yield of products 1 and 2 was near 90% at high concentration of reagents (13 mmol/L dG, 130 mmol/L DOVA), but limited to 40% under more dilute conditions (9 mmol/L dG, 20 mmol/L DOVA). Altogether, these results strongly suggest that the formation of DOVA-dG adducts was reversible in water. Adducts 1 and 2 are likely to be Schiff bases resulting from the initial addition of a carbonyl group of DOVA to the exocyclic amino group of dG. The similarity of the chromatographic behaviour and UV spectra of adducts 1 and 2 suggests that they are diastereoisomers. The reaction mixture of dG with DOVA was treated with NaBH_4 in order to convert the labile Schiff base linkage of adducts 1 and 2 into a stable secondary amine function, and two new compounds, 3 and 4, were isolated. These two products were clearly generated at the expense of adducts 1 and 2. Compounds 3 and 4 exhibited UV absorption spectra similar to those of adducts 1 and 2, but a major difference between the compounds and their reduction products was the high stability of adducts 3 and 4, with no detectable degradation after more than three days in aqueous solution at room temperature.

Figure 1. Structure and formation of 4,5-dioxovaleric acid (DOVA)-2'-deoxyguanosine (dG) adducts and their reduction products

The nomenclature used for the labelling of the atom is shown by the bold numbers on the structures of 3 and 4.

Figure 2. UV absorption spectra of 2'-deoxyguanosine (dG) and 4,5-dioxovaleric acid (DOVA)-dG adducts 1 and 2

The UV spectra were obtained by high-performance liquid chromatography with a diode array detector. The mobile phase was a pH 7, 25-mmol/L ammonium formate solution containing 5% methanol.

Characterization of the reduced 4,5-dioxovaleric acid-2'-deoxyguanosine adducts

Nucleosides 3 and 4 were characterized as the two diastereoisomers of the reduction products of the Schiff base generated by addition of DOVA to the N^2 -amino group of the guanine moiety. The molecular mass of 3 and 4 was shown to be 383, as inferred from electrospray ionization mass spectrometry. This can be rationalized in terms of a [1:1] DOVA adduct to dG that had a reduced Schiff base and a reduced carbonyl group. Indeed, the data from infrared spectroscopy unambiguously showed that a carboxylate group ($\nu = 1604 \text{ cm}^{-1}$) was still present in the molecule. The nucleosidic structure of 3 and 4 was confirmed by the observation in the electrospray ionization-mass spectrometry spectrum of a $[\text{MH}^+ - 116]$ peak which arose from loss of the 2'-deoxyribose ring (Figure 3). The presence of an unmodified 2-deoxyribose ring was also shown by ^1H - and ^{13}C -nuclear magnetic resonance (NMR). All of the signals of the sugar moiety of 3 and 4 were similar to those of unmodified dG. In addition, the multiplicity of the signals was

Figure 3. Electrospray ionization tandem mass spectrum in the positive mode of an equimolar mixture of the reduced 4,5-dioxo-ovaleric acid-2'-deoxyguanosine adducts 3 and 4

dR, 2-deoxyribose; Gua, guanine. The spectrum represents the daughter ions of the parent ion at $m/z = 384$ ($[MH^+]$).

identical for both adducts. The chemical shifts of H8 and the carbon atoms of the guanine moiety of 3 and 4 were similar to those of dG. The latter observations, and the strong similarity between the UV spectra of 3 and 4 on the one hand and dG on the other hand, suggest that the purine ring was not modified by the addition reaction.

Evidence for alkylation of the exocyclic amino group of the guanine moiety was provided by the observation of the loss of the corresponding signal (6.47 ppm for dG) in the 1H -NMR spectrum recorded in dimethyl sulfoxide- d_6 . Interestingly, an exchangeable proton which resonated at $\delta = 6.85$ ppm was assigned to a NH group. This amino proton underwent scalar coupling with the vicinal H-C4* methinic proton of the DOVA moiety. It can thus be concluded that the initial addition of the amino group of guanine occurred on the ketone function of DOVA. The NH would have been linked to a methylene group and should resonate as a triplet in the case of an addition to the aldehyde function. The chemical shift of the H4* proton (4.21 ppm) is also in agreement with the presence of a vicinal secondary amine (atoms labelled with

an asterisk represents those of the aldehyde moiety, numbered as in the free aldehyde). In adducts 3 and 4, the aldehyde function was converted into a hydroxymethyl group after reduction by $NaBH_4$. This is in agreement with the observation in the 1H -NMR spectrum of two signals around 3.8 ppm which were assigned to the two H5* atoms. The 1H -NMR signals observed in the low field region ($2.5 > \delta > 1.9$ ppm) were assigned to the C2* and C3* methylene groups of the DOVA moiety. The ^{13}C -NMR chemical shifts of C2* and C3* in the high field region are in agreement with the latter assignments. The higher values of the chemical shifts of C5* and C4* can be accounted for by the attachment of a heteroatom to both carbons. The presence of the C1* signal in the very low field region (177.1 ppm) of the spectrum confirmed that the $NaBH_4$ reduction step had not modified the carboxylic acid function of the DOVA moiety.

Detection of 4,5-dioxo-ovaleric acid-2'-deoxyguanosine adducts in DNA

Reduced DOVA-dG adducts 3 and 4 were found to be hydrolysed quantitatively into their corre-

sponding base after treatment with 0.1 N HCl at 50 °C for 2 h. The UV absorption spectrum of the hydrolysis product 5 was similar to those of the modified nucleosides 3 and 4. In addition, the ^1H -NMR features of 5 were very similar to that of the base moiety of 3 and 4. Interestingly, hydrolysis of reduced adduct 3 or 4 led to the formation of the same compound. This provides an additional indication that the nucleosides were diastereoisomers. The hydrolysed reduced DOVA-dG adduct 5 was detected by taking advantage of its electroactivity with the detection potential of the HPLC-electron capture system set at 850 mV with respect to a AgO/AgCl reference electrode. The detection limit was close to 10 pmol, and the assay could be used to search for 5 in isolated DNA after incubation with DOVA and subsequent reduction by NaBH_4 . DNA was first hydrolysed into nucleosides by successive incubation with nuclease P1 and alkaline phosphatase. The resulting mixture was injected onto a first HPLC system, and the fractions corresponding to the retention time of the reduced DOVA-dG adducts were collected. The purified fraction containing the mixture of adducts 3 and 4 was then hydrolysed under acidic conditions and analysed by HPLC with electrochemical and UV detection. Both HPLC elution profiles exhibited a peak corresponding to hydrolysed reduced adduct 5. The level of modification was determined to be 1300 adducts per 10^6 normal nucleotides, although this value might be an underestimate since no evidence could be obtained for completion of the NaBH_4 reduction step.

Mechanism of formation of 4,5-dioxovaleric acid-2'-deoxyguanosine adducts and biological significance

Identification of reduction products 3 and 4 provided evidence for the formation of a covalent link between the exocyclic N^2 atom of guanine and the C4^* atom of the DOVA moiety. This showed that the Schiff base expected to be present in adducts 1 and 2 involves the ketone function of DOVA and the exocyclic amino group of dG. It is likely that a subsequent attack on the N1 imine group of the guanine moiety occurs at the aldehyde function of DOVA (Figure 1). This would lead to the formation of a five-membered ring carrying an asymmetric carbon, namely the former C5^* atom of DOVA. Unfortunately, the

instability of adducts 1 and 2 prevented the extensive spectroscopic studies that would be required for more complete characterization. It was also not possible to determine whether dehydration of the -NH-CHOH- link leading to the formation of a Schiff base occurred before or after cyclization of the adduct. In the latter case, a compound with a structure similar to that of the products obtained by addition of either glyoxal or its derivatives to 2'-deoxyguanosine (Shapiro & Hachmann, 1966; Shapiro *et al.*, 1968) could be an intermediate in the formation of 1 and 2.

The structure of the DOVA-dG adducts is interesting since, in contrast to glyoxal adducts which exhibit a diol function, they carry a Schiff base and a hydroxyl group on vicinal carbons. The detection of the DOVA-dG adducts in isolated DNA showed that the involvement of the N^2 amino group of guanine in the hydrogen bonding with cytosine does not decrease its ability to react with DOVA. It is likely that the double-helical structure of DNA increases the stability of the adducts over that of isolated dG, as observed for other hydrolytic processes such as deamination. Other aldehydes that can induce formation of Schiff bases in DNA are known to be mutagenic (Marnett *et al.*, 1985; Dellarco, 1993). Interestingly, glyoxal and other α -dicarbonyl compounds are both mutagens (Bjeldanes & Chew, 1979) and efficient alkylating agents of the N^2 exocyclic amino group of guanine (Shapiro & Hachmann, 1966; Shapiro *et al.*, 1968). Acetaldehyde adducts to guanine with a Schiff base structure have recently been detected in human leukocytes (Fang & Vaca, 1997). Altogether, these data suggest that the formation of adducts between DOVA and guanine moieties of DNA might be biologically relevant in the mutagenicity of ALA.

Etheno-2'-deoxyadenosine adducts with 2,4-decadienal

DDE has been reported to be one of the most cytotoxic of the α,β -unsaturated aldehydes arising from the breakdown of lipid peroxides. This was inferred from the lethal effects exerted by DDE on human diploid fibroblasts and umbilical vein endothelial cells (Kaneko *et al.*, 1987, 1988). DDE is also highly cytotoxic to human erythroleukaemia cells (Nappep *et al.*, 1996): it inhibits cell growth, affects cell viability, changes the cellular glutathione concentration and is

involved in DNA fragmentation. Furthermore, similar amounts of DDE and 4-hydroxynonenal were formed after oxidation of low-density lipoproteins (Thomas *et al.*, 1994). As it is a substituted α,β -unsaturated aldehyde, DDE was expected to react with DNA bases. Therefore, attempts were made to characterize the products of the reaction of DDE with 2'-deoxyadenosine (dA), which was used as a model for DNA. Identification of the nucleoside adducts produced by such reactions is of fundamental importance in order to unveil the structural features that govern the ability of α,β -unsaturated aldehydes to alkylate DNA.

Isolation and characterization of the main adducts between 2,4-decadienal and 2'-deoxyadenosine and isolated DNA

Reversed-phase HPLC analysis of the reaction mixture of DDE and dA showed the presence of two major well-retained adducts, 7 and 8 (Figure

4), with other minor products, including 1,*N*⁶-etheno-2'-deoxyadenosine (ϵ dA) (Barrio *et al.*, 1972) on the basis of a comparison of its UV and HPLC features with those of an authentic standard. Adducts 7 and 8 had UV absorption features similar to those of ϵ dA, strongly suggesting an etheno structure similar to that of the adducts reported by Sodem and Chung (1991). The bathochromic shift ($\Delta = 3$ nm) is consistent with the presence of an alkyl side-chain on the etheno ring. Moreover, 7 and 8 show strong fluorescence, with maxima of excitation and emission at 320 and 410 nm, respectively. The latter feature is also characteristic of ϵ dA derivatives (Kochetkov *et al.*, 1971; Secrist *et al.*, 1972).

The electrospray ionization-mass spectrum of adduct 7 in the positive mode shows a pseudo-molecular ion $[MH^+]$ at $m/z = 436$. This may be due to a [1:1] adduct between dA and DDE with a gain of two oxygen atoms. The H8 and H2 res-

Figure 4. Proposed mechanism for the formation of the 2,4-decadienal (DDE)-2'-deoxyadenosine (dA) adduct

HNE, *trans*-4-hydroxy-2-nonenal. The nomenclature used for the labelling of the atom is shown by the bold numbers on the structures of 7 and 8.

ances of the adenine moiety of adduct 7 were observed at $\delta = 8.27$ and 9.22 ppm, respectively (Figure 5). The high values for the chemical shift suggest that the aromaticity of the purine ring was retained during adduct formation. The five characteristic signals of the DDE moiety, comprising four vinyl and one aldehyde protons, were not observed in the ^1H -NMR spectrum of adduct 7. This ruled out either a direct reaction of the aldehyde carbonyl group with the exocyclic NH_2 of the adenine ring or a Michael addition mechanism for the formation of adduct 7.

The presence of an alkyl chain in adduct 7 was inferred from the observation of signals in the high field region of the ^1H -NMR spectrum ($0.64 < \delta < 1.50$ ppm). Integration of the related signals indicated that these 11 protons involve one methyl and four methylene groups. Three other signals that overlapped with the bulk of the sugar resonances over the range 3.30 – 5.32 ppm were assigned to H3^* , H4^* and H5^* protons. A last signal which resonated as a singlet was observed at $\delta = 7.44$ ppm. This is typical of an etheno proton (H1^*) which does not exhibit scalar couplings due to lack of vicinal hydrogen atoms. Altogether, the above data are consistent with an etheno structure exhibiting an octyl substituent at C2^* . The chemical shifts of H3^* ($\delta = 5.32$), H4^* ($\delta = 3.86$) and H5^* ($\delta = 3.30$) of the side-chain are consistent with those of carbinol groups. This is in agreement with the molecular mass inferred from electrospray ionization-mass spectrometry only if the oxygen of the aldehyde function of DDE was lost during the addition to dA. Therefore, it is likely that the $\text{C1}^*-\text{C2}^*$ double bond arises from a dehydration reaction involving the former C1 position of DDE, subsequent to its covalent binding to the adenine exocyclic amino group. This is in agreement with the mechanism proposed for the formation of etheno bases.

The electrospray ionization-mass spectrometry spectrum in the positive mode of adduct 8 showed a significant pseudomolecular ion $[\text{MH}^+]$ at m/z 406 and a predominant fragment at m/z 290 $[\text{MH}^+ - 2\text{-deoxy-D-erythro-pentose}]$. These two pieces of information are indicative of the loss of 30 amu in the molecular mass of adduct 8 with respect to that of 7. This may be explained in terms of a difference of one carbinol group in the structures of adducts 7 and 8. This conclusion received confirmation

Figure 5. 400-MHz ^1H -nuclear magnetic resonance spectrum of 2,4-decadienal-2'-deoxyadenosine adduct 7 in D_2O

Only the protons of the purine ring and the 2,4-decadienal moiety are labelled.

from careful consideration of the ^1H -NMR features. The signals of the H2 and H8 protons of adenine were observed at $\delta = 9.29$ and $\delta = 8.39$ ppm, with an etheno proton ($\delta = 7.52$ ppm) in the low field region of the spectrum (Figure 5). The presence of a heptyl chain was inferred from the observation of pentane signals ($0.74 < \delta < 1.44$ ppm) and two carbinol protons assigned as H3^* and H4^* at $\delta = 5.09$ and $\delta = 4.13$ ppm, respectively. These data indicate that adduct 8 is identical to the substituted etheno base adduct generated by incubation of dA with 2,3-epoxy-4-hydroxynonanal (Sodum & Chung, 1991).

Isolated calf thymus DNA was allowed to react with DDE under conditions similar to those described for dA. After enzymatic hydrolysis, the resulting mixture of nucleosides was analysed by reversed-phase-HPLC with fluorescence detection (Figure 6). Three main altered nucleosides were formed, which had retention times identical to those of ϵA and adducts 7 and 8, as inferred from co-elution with authentic standards.

Mechanistic considerations

The reaction of adenine nucleosides with 2,3-epoxy-4-hydroxynonanal yields adducts with an extended $1, \text{N}^6$ -etheno ring (Sodum & Chung, 1991). Interestingly, DDE could react with 2'-deoxyadenosine to yield cyclic adducts by a similar mechanism. Preliminary experiments on the reaction of calf thymus DNA with DDE showed generation of ϵdA , adduct 7, adduct 8 and other

Figure 6. High-performance liquid chromatography elution profile of enzymatically digested 2,4-decadienal-treated DNA obtained by fluorescence detection

edA, etheno-2'-deoxyadenosine

The excitation and emission wavelengths of the spectrofluorimeter were set at 310 and 420 nm, respectively. The sample was injected onto a C18 reverse column and eluted by a gradient of an aqueous 25-mmol/L ammonium formate solution and acetonitrile.

fluorescent products that are not yet characterized. The observation that adducts 7 and 8 were produced only in the presence of peroxides suggests the following mechanism. The formation of adduct 7 is likely to involve the initial epoxidation of two ethylenic bonds of DDE. Then, subsequent hydrolysis of the C4-C5 epoxide would give rise to a diol. The formation of adduct 8 may require initial generation of 4-hydroxynonanal from DDE, as reported by Grein *et al.* (1993). This reaction is expected to be followed by epoxidation of the C2-C3 double bond. In a subsequent step, the formation of adducts 7 and 8 requires nucleophilic addition of the N⁶ exocyclic amino group of dA to the C2 position of 2,3-epoxidized DDE and *trans*-4-hydroxy-2-nonenal, respectively. Then, the N1 amino proton of the purine ring adds to the aldehyde function. Ring closure followed by dehydration of the C1*-C2* bond gives rise to adducts 7 and 8, respectively. Interestingly, both reactions were found to be dependent on the kind of peroxide present in the reaction mixture, and the reactions of DDE with dA and calf thymus DNA were carried out with peroxidized tetrahydrofuran, H₂O₂ or *tert*-butylhydroperoxide. Of these peroxides, H₂O₂ gave the highest yield of adduct formation.

Biological relevance

There is evidence in the literature for the formation of fluorescent products from the reaction between adenine nucleosides and oxidative degradation products of fatty acids (Frankel *et al.*, 1983; Fujimoto *et al.*, 1984; Frankel *et al.*, 1987; Grein *et al.*, 1993). DDE and 2-octenal were found to be the most active products in the formation of fluorescent products with dA (Hasegawa *et al.*, 1988, 1989); however, the adducts obtained were not successfully characterized. The present results provide further insight. The formation of substituted etheno bases after reaction of DDE with DNA bases further emphasizes the importance of this class of cyclic DNA adduct. Several carcinogenic and mutagenic compounds, including vinyl monomers, α -halogenated aldehydes and α -haloketones were shown to form etheno adducts with DNA (Bartsch *et al.*, 1994). Etheno nucleotides appear to accumulate and persist in the livers of rodents exposed to vinyl chloride and ethyl carbamate. The detection of low levels of etheno bases in tissues of untreated animals and humans (Nair *et al.*, 1995) suggests the existence of endogenous sources of reactive aldehyde intermediates, possibly from lipid peroxidation processes. Formation of 1,N⁶-etheno adducts from the reaction of purine nucleosides with 2,3-epoxy-4-hydroxynonanal was reported by Sodum and Chung (1991). α,β -Unsaturated aldehydes are converted *in vitro* into the corresponding epoxides by either microsomal enzymes or reaction with endogenously generated peroxides (Chen & Chung, 1996). The latter process was considered to be a possible endogenous route for the formation of DNA etheno adducts *in vivo*. Furthermore, edA has been reported to be highly mutagenic in mammalian cells (Pandya & Moriya, 1996).

Acknowledgments

This work was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Brazil, the Conselho Nacional para o Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brazil, the Programa de Apoio aos Núcleos de Excelência, Brazil, and the Universidade de São Paulo, Comité Français d'Evaluation de la Coopération Universitaire avec le Brésil. V.M.C. and J.O. are recipients of fellowships from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo.

References

- Barrio, J.R., Secrist, J.A. & Leonard, N.J. (1972) Fluorescent adenosine and cytidine derivatives. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 46, 597–604.
- Bartsch, H., Barbin, A., Marion, M.-J., Nair, J. & Guichard, Y. (1994) Formation, detection, and role in carcinogenesis of ethenobases in DNA. *Drug Metab. Rev.* 26, 349–371.
- Basu, A.K., O'Hara, S.M., Valladir, P., Stone, K., Mols, O. & Marnett, L.J. (1988) Identification of adducts formed by reaction of guanine nucleosides with malondialdehyde and structurally related aldehydes. *Chem. Res. Toxicol.* 1, 53–59.
- Bechara, E.J.H., Medeiros, M.H.G., Monteiro, H.P., Hermes-Lima, M., Pereira, B., Demasi, M., Costa, C.A., Abdalla, D.S.P., Onuki, J., Wendel, C.M.A. & Di Mascio, P. (1993) A free radical hypothesis of lead poisoning and inborn porphyrias associated with 5-aminolevulinic acid overload. *Quim. Nova* 16, 385–392.
- Bjeldanes, L.F. & Chew, H. (1979) Mutagenicity of 1,2-dicarbonyl compounds: Maltol, kojic acid, diacetyl and related substances. *Mutat. Res.* 67, 367–371.
- Carvalho, V.M., Di Mascio, P., de Arruda Campos, I.P., Douki, T., Cadet, J. & Medeiros, M.H.G. (1998) Formation of 1,N⁶-etheno-2'-deoxyadenosine adducts by *trans,trans*-2,4-decadienal. *Chem. Res. Toxicol.* 11, 1042–1047.
- Chaudhary, A.K., Nokubo, N., Ramachandra Reddy, G., Yeola, S.N., Morrow, J.D., Blair, I.A. & Marnett, L.J. (1994) Detection of endogenous malondialdehyde-deoxyguanosine adducts in human liver. *Science* 265, 1580–1582.
- Chen, H.-J.C. & Chung, F.-L. (1996) Epoxidation of *trans*-4-hydroxy-2-nonenal by fatty acid hydroperoxides and hydrogen peroxide. *Chem. Res. Toxicol.* 9, 306–312.
- Chisolm, J.J., Jr (1971) Lead poisoning. *Sci. Am.* 224, 15–23.
- Chung, F.-L., Young, R. & Hecht, S.S. (1984) Formation of cyclic 1,N²-propanodeoxyguanosine adducts in DNA upon reaction with acrolein or crotonaldehyde. *Cancer Res.* 44, 990–995.
- Dellarco, V.L. (1993) A mutagenicity assessment of acetaldehyde. *Mutat. Res.* 195, 1–20.
- Demasi, M., Penatti, C.A.A., DeLucia, R. & Bechara, E.J.H. (1996) The prooxidant effect of 5-aminolevulinic in the brain tissue of rats: Implications in neuropsychiatric manifestations in porphyrias. *Free Radicals Biol. Med.* 20, 291–299.
- Douki, T. & Ames, B.N. (1994) An HPLC-EC assay for 1,N²-propano adducts of 2'-deoxyguanosine with 4-hydroxynonenal and other α,β -unsaturated aldehydes. *Chem. Res. Toxicol.* 7, 511–518.
- Douki, T., Onuki, J., Medeiros, M.H.G., Bechara, E.J.H., Cadet, J. & Di Mascio, P. (1998a) DNA alkylation by 4,5-dioxovaleric acid, the final oxidation product of 5-aminolevulinic acid. *Chem. Res. Toxicol.* 11, 150–157.
- Douki, T., Onuki, J., Medeiros, M.H.G., Bechara, E.J.H., Cadet, J. & Di Mascio, P. (1998b) Hydroxyl radicals are involved in the oxidation of isolated and cellular DNA bases by 5-aminolevulinic acid. *FEBS Lett.* 428, 93–96.
- Eder, E. & Hoffman, C. (1992) Identification and characterization of deoxyguanosine-crotonaldehyde adducts. Formation of 7,8-cyclic adducts and 1,N², 7,8 bis-cyclic adducts. *Chem. Res. Toxicol.* 5, 802–808.
- Eder, E. & Hoffman, C. (1993) Identification and characterization of deoxyguanosine adducts of mutagenic β -alkyl-substituted acrolein congeners. *Chem. Res. Toxicol.* 6, 486–494.
- Fang, F.L. & Vaca, C.E. (1997) Detection of DNA adducts of acetaldehyde in peripheral white blood cells of alcohol abusers. *Carcinogenesis* 18, 627–632.
- Fiedler, D.M., Eckl, P.M. & Krammer, B. (1996) Does δ -aminolaevulinic acid induce genotoxic effects? *J. Photochem. Photobiol. B: Photobiol.* 33, 39–44.
- Fraga, C.G., Onuki, J., Lucasoli, F., Bechara E.J.H. & Di Mascio, P. (1994) 5-Aminolevulinic acid mediates the *in vivo* and *in vitro* formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in DNA. *Carcinogenesis* 15, 2241–2244.

- Frankel, E.N., Neff, W.E. & Selke, E. (1983) Analysis of autoxidized fats by gas chromatography-mass spectrometry: VIII. Volatile thermal decomposition products of hydroperoxy cyclic peroxides. *Lipids* 18, 353-357.
- Frankel, E.N., Neff, W.E., Brooks, D.D. & Fujimoto, K. (1987) Fluorescence formation from the interaction of DNA with lipid oxidation degradation products. *Biochim. Biophys. Acta* 919, 239-244.
- Fujimoto, K., Neff, W.E. & Frankel, E.N. (1984) The reaction of DNA with lipid oxidation products, metals and reducing agents. *Biochim. Biophys. Acta* 795, 100-107.
- Grein, B., Huffer, M., Scheller, G. & Schreier, P. (1993) 4-Hydroxy-2-nonenal and other products formed by water-mediated oxidative decomposition of α,β -unsaturated aldehydes. *J. Agric. Food Chem.* 41, 2385-2390.
- Gubler, J.G., Bergetzi, M.J. & Meyer, U.A. (1990) Primary liver carcinoma in two sisters with acute intermittent porphyria. *Am. J. Med.* 89, 540-541.
- Hasegawa, K., Fujimoto, K., Kaneda, T. & Frankel, E.N. (1988) Characterization of fluorescent products from reaction of methyl linoleate hydroperoxides with adenine in the presence of Fe^{2+} and ascorbic acid. *Biochim. Biophys. Acta* 962, 371-376.
- Hasegawa, K., Fujimoto, K., Kaneda, T., Neff, W.E. & Frankel, E.N. (1989) Formation of fluorescent products in the reaction of adenine and other bases with secondary oxidation products of methyl linoleate hydroperoxides. *Agric. Biol. Chem.* 53, 1575-1581.
- Hindmarsh, J. T. (1986) The porphyrias: Recent advances. *Clin. Chem.* 32, 1255-1263.
- Hiraku, Y. & Kawanishi, S. (1996) Mechanism of oxidative DNA damage induced by δ -aminolevulinic acid in the presence of copper ion. *Cancer Res.* 56, 1786-1793.
- Kaneko, T., Honda, S., Nakano, S. & Matsuo, M. (1987) Lethal effects of a linoleic acid hydroperoxide and its autoxidation products, unsaturated aliphatic aldehydes, on human diploid fibroblasts. *Chem.-Biol. Interactions* 63, 127-137.
- Kaneko, T., Kaji, K. & Matsuo, M. (1988) Cytotoxicities of a linoleic acid hydroperoxide and its related aliphatic aldehydes toward cultured human umbilical vein endothelial cells. *Chem.-Biol. Interactions* 67, 295-304.
- Kappas, A., Sassa, S. & Anderson, K.E. (1983) The porphyrias. In: *The Metabolic Basis of Inherited Diseases* (Stanbury, J.B., Wyngaarden, J.B., Fredrickson, D.S., Goldstein, J.L. & Brown, M.S., eds). New York, McGraw-Hill, pp. 1301-1384.
- Kennedy, J.C. & Pottier, R.H. (1992) Endogenous protoporphyrin IX, a clinically useful photosensitizer for photodynamic therapy. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 14, 275-292.
- Kochetkov, N.K., Shibaev, V.N., Kost, A.A. & Zelinsky, N.D. (1971) New reaction of adenine and cytosine derivatives, potentially useful for nucleic acids modification. *Tetrahedron Lett.* 22, 1993-1996.
- Lithner, F. & Wetterberg, L. (1984) Hepatocellular carcinoma in patients with acute intermittent porphyria. *Acta Med. Scand.* 215, 271-274.
- Marnett, L.J., Hurd, H.K., Hollstein, M.C., Levin, D.E., Esterbauer, H. & Ames, B.N. (1985) Naturally occurring carbonyl compounds are mutagens in *Salmonella* tester strain TA104. *Mutat. Res.* 148, 25-34.
- Nair, J., Barbin, A. & Bartsch, H. (1995) 1, N^6 -Ethenodeoxyadenosine and 3, N^4 -ethenodeoxycytidine in liver DNA from humans and untreated rodents detected by immunoaffinity/ ^{32}P -postlabelling. *Carcinogenesis* 16, 613-617.
- Nappep, C., Battu, S. & Beneytout, J.L. (1996) *trans*, *trans*-2,4-Decadienal: Cytotoxicity and effect on glutathione level in human erythroleukemia (HEL) cells. *Cancer Lett.* 99, 115-119.
- Nath, R.G. & Chung, F.-L. (1994) Detection of exocyclic 1, N^2 -propanodeoxyguanosine adducts as common DNA lesions in rodents and humans. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 91, 7491-7495.
- Onuki, J., Medeiros, M.H.G., Bechara, E. J.H. & Di Mascio, P. (1994) 5-Aminolevulinic acid induces single strand breaks in plasmid DNA in the presence of Fe^{2+} ions. *Biochim. Biophys. Acta* 1225, 259-263.

- Ortel, B., Tanew, A. & Hnigsmann, H. (1993) Lethal photosensitization by endogenous porphyrins of PAM cells modification by desferrioxamine. *J. Photochem. Photobiol. B: Photobiol.* 17, 273–278.
- Oteiza, P.I., Kleinman, C.G., Demasi, M. & Bechara, E.J.H. (1995) 5-Aminolevulinic acid induces iron release from ferritin. *Arch. Biochem. Biophys.* 316, 607–611.
- Pandya, G.A. & Moriya, M. (1996) 1,N6-Ethenodeoxyadenosine, a DNA adduct highly mutagenic in mammalian cells. *Biochemistry* 35, 11487–11492.
- Peng, Q., Berg, K., Moan, J., Kongshaug, M., Giercksky, K.E. & Nesland, J.M. (1997) 5-Aminolevulinic acid-based photodynamic therapy: Principles and experimental research. *Photochem. Photobiol.* 65, 235–251.
- Secrist, J.A., Barrio, J.R., Leonard, N.J. & Weber, G. (1972) Fluorescent modification of adenosine-containing coenzymes. Biological activities and spectroscopic properties. *Biochemistry* 11, 3499–3506.
- Shapiro, R. & Hachmann, J. (1966) The reaction of guanine derivatives with 1,2-dicarbonyl compounds. *Biochemistry* 5, 2799–2807.
- Shapiro, R., Cohen, B.I., Shiuey, S.-J. & Mauer, H. (1968) On the reaction of guanine with glyoxal, pyruvaldehyde and kethoxal and the structure of the acylguanines. A new synthesis of N^2 -alkylguanines. *Biochemistry* 8, 238–245.
- Sodum, R.M. & Chung, F.-L. (1988) 1, N^2 -Ethenodeoxyguanosine as a potential marker for DNA adduct formation by *trans*-4-hydroxy-2-nonenal. *Cancer Res.* 48, 320–323.
- Sodum, R.M. & Chung, F.-L. (1991) Stereoselective formation of *in vitro* nucleic acid adducts by 2,3-epoxy-4-hydroxynonanal. *Cancer Res.* 51, 137–143.
- Thomas, C.E., Jackson, R.L., Ohlweiler, D.L. & Ku, G. (1994) Multiple lipid oxidation products in low-density lipoproteins induce interleukin-1 beta release from human blood mononuclear cell. *J. Lipid Res.* 35, 853–856.
- Thunnissen, P.L., Meyer, J. & de Koning, R.W. (1991) Acute intermittent porphyria and primary liver cancer. *Neth. J. Med.* 38, 171–174.
- Vaca, C.E., Vodicka, P. & Hemminki, K. (1992) Determination of malondialdehyde modified 2-deoxyguanosine 3'-monophosphate and DNA by 32 P-postlabelling. *Carcinogenesis* 13, 593–599.
- Vaca, C.E., Fang, J.-L. & Schweda, E.K.H. (1995) Studies of the reaction of acetaldehyde with deoxynucleosides. *Chem.-Biol. Interactions* 98, 51–67.
- Winter, C.K., Segall, H.J. & Haddon, W.F. (1986) Formation of cyclic adducts of deoxyguanosine with the aldehydes *trans*-4-hydroxy-2-hexenal and *trans*-4-hydroxy-2-nonenal *in vitro*. *Cancer Res.* 46, 5682–5686.

DNA damage induced by secondary lipid oxidation products

MARISA H.G. MEDEIROS, VALDEMIR M. CARVALHO, LEONARDO P. FARIAS,
ANA P.M. LOUREIRO

Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP 05599-970, Brasil

Lipid peroxidation in cell membranes has been associated with a wide variety of deleterious processes leading to cellular damage, cancer, inflammation and aging. Aldehydes formed as secondary lipid oxidation products have been suggested to be more toxic than lipid hydroperoxides. Here we summarize data on DNA damage induced by reactive aldehydes. While the ultimate mechanisms responsible for the aging process and tumorigenesis are obscure, there is growing evidence that aldehydes produced as secondary lipid peroxidation products play a key role in the chromosomal damage associated with these processes.

A lipoperoxidação tem sido associada a diversos mecanismos celulares deletérios que podem acarretar câncer, inflamação e envelhecimento. Diversas evidências indicam que aldeídos oriundos de lipoperoxidação, são mais tóxicos do que os produtos principais deste processo, os mono-hidroperóxidos. Aqui apresentamos um sumário dos principais resultados obtidos sobre danos em DNA produzidos por aldeídos reativos. Apesar de os mecanismos de envelhecimento e formação de tumores ainda serem obscuros, a literatura recente indica a participação de produtos secundários de lipoperoxidação na lesão cromossômica associada a estes processos.

Free radicals are usually very reactive species and therefore are potentially harmful when generated in cells. The intracellular free radical concentration is controlled by radical scavengers, antioxidant enzymes and "oxidant repair" systems (1). However, excess generation of free radicals in vivo may result in damage to biomolecules and has been closely associated to diverse pathophysiological processes such as inflammation, carcinogenesis, aging, radiation damage, phototoxicity etc (2).

Correspondence to: Marisa H.G. Medeiros, Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, Caixa Postal 26077, São Paulo, SP 05599-970, Brasil

The unsaturated chain of membrane fatty acids can readily react with free radicals and undergo peroxidation (2,3,4). This process can become autocatalytic after initiation and yields lipid peroxides, lipid alcohols and aldehydic by-products (Scheme 1) (5). Reactive aldehydes generated by this process have been suggested to be more toxic to animals than monohydroperoxides and may be considered as "second toxic messengers" that augment the initial free radical events (5,6).

The reaction of lipid oxidation products with amino

Scheme 1 - Free radical damage to membranes. Free radicals can affect lipids by initiating peroxidation. Variety of cross-linking reactions can be mediated by secondary oxidation products (scheme modified from Reference 4).

compounds, including amino acids and proteins (7) and DNA, forms fluorescent pigments that have been related to aging (8). Lipid oxidation products are capable of damaging functional proteins, inhibiting protein and DNA synthesis, as well as causing cell lysis and loss of cellular reproductive integrity (9,10,11,12).

Chemical alterations and damage to DNA can be produced during the lipid peroxidation process as illustrated by Scheme 2. Oxygen radicals, necessary for initiate lipid peroxidation, and the lipid radicals formed during the propagation step can react with DNA (13). Another possibility of damage results from DNA reaction with secondary lipid oxidation products. The latter process is one of the mechanisms used to explain the genotoxicity of these secondary species. The literature on the occurrence of lipid peroxidation adducts with DNA has been reviewed recently (13,14) and among the different aldehydes formed during this process, malonaldehyde (MDA) and 4-hydroxynonenal (HNE) are the most extensively studied. We summarize here data on DNA damage induced by reactive aldehydes.

DNA damage by 2,4-alkadienals

The incubation of DNA with secondary oxidation products of methyl linoleate hydroperoxides gave products with fluorescence spectra different from those obtained by the reaction of DNA with MDA, and no correlation was found between fluorescence intensity and MDA adduct formation (15). Therefore, some other secondary lipid oxidation products such as 2,4-alkadienals and 2,4,7-decatrienal have been suggested to be involved in the formation of fluorescent DNA pigments (14).

In fact, we (16) and others (17) have previously shown that 2,4-decadienal reacts with calf-thymus DNA at 37°C forming a fluorescent adduct with maximum excitation at 335 nm and maximum emission at 420 nm (Fig. 1).

In model studies, Hasegawa et al (15) isolated a fluorescent product that could be regarded as having been formed by direct chemical reaction of adenine with 2,4-decadienal. Spectroscopic data suggest a structure with α,β -unsaturated carbonyl groups between the amino group at the 6-position and the nitrogen at the 1-position of adenine (Scheme 3). Our studies confirmed that adenine-2,4-decadienal adduct is the main species responsible for the observed DNA fluorescence (17).

Figure 1. Fluorescence spectra ($\epsilon_{\text{exc}} = 335 \text{ nm}$; $\epsilon_{\text{em}} = 420 \text{ nm}$) of calf thymus DNA (---) and calf thymus DNA-2,4-decadienal adduct (—). DNA-2,4-decadienal reaction: A solution of 1 mM 2,4-decadienal was prepared in 1% DMSO and was incubated with 0.5 mg/ml DNA (calf thymus) in 10 mM acetate buffer containing 15 mM NaCl (pH = 4.6). The reaction was stopped after 72 h at 37°C, by precipitating DNA with 2 vol 95% ethanol. DNA was washed twice with 95% ethanol and dissolved in 0.1 M phosphate buffer pH = 7.4.

Damage to DNA by malonaldehyde

Brooks and Klammerth (18) showed that malonaldehyde reacts with DNA in vivo and in vitro, probably by cross-linking with DNA base pairs carrying amino groups. Thus, Reiss et al (19) showed that the reaction between malonaldehyde and DNA results in the formation of fluorescent products. A linear correlation between the formation of the fluorescent products and the decrease in DNA template activity was demonstrated by the authors.

Malonaldehyde is also mutagenic as has been observed by several investigators in studies with *Salmonella typhimurium* (20,21,22), and *Escherichia coli* (23). The

suggested mutagenesis mechanism involves addition of a nucleic acid base to the β -carbon of malonaldehyde (24). Cyclic MDA-nucleobase adducts seem to be the compounds responsible for the chemical mutagenesis of MDA.

Recently, adducts of malonaldehyde with guanine were identified in rat and human urine (25). The endogenous origin of the guanine-MDA adduct was indicated by its presence in the urine of rats during consumption of a MDA-free diet, and by increases in its excretion following administration of iron or CCl_4 , which are known as catalysts of lipid peroxidation *in vivo*. The isolated product confirmed the chemical structure of the guanine-MDA adduct (Scheme 4) as proposed by Seto et al (26).

In 1992, Agarwal and Draper (27) reported the isolation of a malonaldehyde-deoxyguanosine adduct from rat liver DNA. Analysis of the DNA hydrolysates gave a steady state dG-MDA level in rat liver DNA of $3.25 \pm 0.58 \times 10^5$ residues per cell. The detection of endogenous malonaldehyde-deoxyguanosine adducts in human liver provided final evidence of the biological importance of this type of DNA damage (28). DNA from disease-free human liver was found to contain 5400 adducts per cell, a frequency comparable to that of adducts formed by exogenous carcinogens (28).

The genotoxicity of 4-hydroxynonenal

Among the variety of aldehydic products generated during the lipid peroxidation process, 4-hydroxy-2-nonenal (HNE) has been extensively studied due to its high reactivity with a large range of biomolecules (14). HNE exhibits many cytotoxic effects such as enzyme inhibition, inhibition of protein synthesis, inhibition of DNA and RNA synthesis and induction of heat shock proteins. HNE also shows genotoxic and mutagenic effects in cells (14).

In immunohistochemical studies, HNE-modified proteins were detected in atherosclerotic lesions (29). Using the renal carcinogen, ferric nitrilotriacetate (Fe-NTA), Toyokuni et al (30) showed that HNE-modified proteins are also formed in the target cells of this carcinogenesis model. The intensity of the immunochemical reaction with HNE-modified proteins increased parallel with an increase in the amounts of thiobarbituric acid-reactive substances. This study shows a correlation between this aldehyde and Fe-NTA-induced renal carcinogenesis.

Conclusions

From the literature discussed here, it may be concluded that the lipid peroxidation process generates highly reactive products that may act as second toxic messengers (14). Several studies provided evidence of the genotoxic and mutagenic effects of these compounds. Moreover, aldehyde lipid peroxidation products have been shown to interact directly with DNA leading to fluorescent adducts that have been associated with aging and cancer. Recently, the detection of malonaldehyde-deoxyguanosine adducts in human liver (28) provided strong evidence that lipid peroxidation occurs continuously in healthy individuals resulting in DNA modifications.

In spite of the importance of the new findings indicating DNA damage by secondary lipid peroxidation products, the mechanisms of such damage remain to be clarified. Additional studies on lipid peroxidation-induced DNA damage and the relationship of this process with carcinogenesis and mutagenesis demands further experimental work.

References and notes

1. Davies KJA 1991 Oxidative damage and repair: Introduction and overview, p xvii-xxvii. In *Oxidative damage and repair: Chemical, biological and medical aspects*. KJA Davies ed, Pergamon Press, NY
2. Halliwell B, JMC Gutteridge 1989 *Free radicals in biology and medicine*. Clarendon Press, Oxford
3. Simic MG, KA Taylor, JF Ward, C von Sonntag 1988 *Oxygen radical in biology and medicine*. Plenum Press, London
4. Freeman BA, JD Crapo 1982 Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Lab Invest* 47: 412-426
5. Esterbauer H 1982 Aldehydic products of lipid peroxidation, p 101-128. In *Free radicals, lipid peroxidation and cancer*. DHC McBrien, TF Slater eds, Academic Press, NY
6. Kaneko T, K Kaji, M Matsuo 1988 Cytotoxicities of a linoleic acid hydroperoxide and its related aliphatic aldehydes toward cultured umbilical vein endothelial cells. *Chem Biol Interact* 67: 295-304
7. Benedetti A, L Barbieri, M Ferrali, AF Casini, R Fulceri, M Comporti 1981 Inhibition of protein synthesis by carbonyl compounds (4-hydroxyalkenals) originating from the peroxidation of liver microsomal lipids. *Chem Biol Interact* 35: 331-340
8. Fujimoto K, WE Neff, EN Frankel 1984 The reaction of DNA with lipid oxidation products, metals and reducing agents. *Biochem Biophys Acta* 795: 100-107
9. Benedetti A, AF Casini, M Ferrali, M Comporti 1979 Effects of diffusible products of peroxidation of rat liver microsomal lipids. *Biochem J* 180: 303-312
10. Poot M, A Verkerk, JF Koster, H Esterbauer, JF Jongkind 1988 Reverse inhibition of DNA and protein synthesis by cumene hydroperoxide and 4-hydroxynonenal. *Mech Age Develop* 43: 1-9
11. Brambilla G, L Sciaba, P Faggini, A Maura, UM Marinari, M Ferro, H Esterbauer 1986 Cytotoxicity, fragmentation and sister-chromatid exchange in Chinese hamster ovary cells exposed to the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal and homologous aldehydes. *Mutat Res* 171: 169-176
12. Benedetti A, AF Casini, M Ferrali, M Comporti 1979 Extration and partial characterization of dialysable products originating from the peroxidation of liver microsomal lipids and inhibiting microsomal glucose 6-phosphatase activity. *Biochem Pharmacol* 28: 2909-2918
13. Vaca CE, J Wilhelm, M Harms-Ringdahl 1988 Interaction of lipid peroxidation products with DNA. A review. *Mutat Res* 195: 137-149
14. Esterbauer H, RJ Schaur, H Zollner 1991 Chemistry and biochem-

- istry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Rad Biol Med* 11: 81-128
15. Hasegawa K, K Fujimoto, T Kaneda, EN Frankel 1988 Characterization of fluorescent products from reaction of methyl linoleate hydroperoxides with adenine in the presence of Fe²⁺ and ascorbic acid. *Biochim Biophys Acta* 962: 371-376
16. Medeiros MHG, EE Palkow, AS Lima 1992 Chemiluminescence and DNA strand breakage during horseradish peroxidase catalyzed oxidation of DNA adducts with 2,4-decadienal. *Free Rad Res Comm* 16(Suppl): 19.13
17. Frankel EN, WE Neff, DD Brooks, K Fujimoto 1987 Fluorescence formation from the interaction of DNA with lipid oxidation degradation products. *Biochem Biophys Acta* 919: 239-244
18. Brooks BR, OL Klamerth 1968 Interaction of DNA with bifunctional aldehydes. *Eur J Biochem* 5: 178-182
19. Reiss U, AL Tappel, KS Chio 1972 DNA-malonaldehyde reaction: Formation of fluorescent products. *Biochem Biophys Res Comm* 48: 921-926
20. Schamberg RJ, CL Corlett, KD Beaman, BL Kasten 1979 Antioxidants reduce the mutagenic effect of malonaldehyde and beta-propiolactone. IX. Antioxidants and cancer. *Mutat Res* 66: 349-355
21. Marnett LJ, MA Tuttle 1980 Comparison of the mutagenicities of malonaldehyde and the side products formed during its chemical synthesis. *Cancer Res* 40: 276-282
22. Marnett LJ, HK Hurd, MC Hollstein, DE Levin, H Esterbauer, BN Ames 1985 Naturally occurring carbonyl compounds are mutagens in *Salmonella* tester strain TA104. *Mutat Res* 148: 25-34
23. Yonei S, H Furui 1981 Lethal and mutagenic effects of malonaldehyde, a decomposition product of peroxidised lipids on *Escherichia coli* with different DNA repair capacities. *Mutat Res* 88: 23-32
24. Basu AK, LJ Marnett 1984 Molecular requirements for the mutagenicity of malonaldehyde and related acroleins. *Cancer Res* 44: 2848-2854
25. Hadley H, HH Draper 1990 Isolation of a guanine-malondialdehyde adduct from rat and human urine. *Lipids* 25: 82-85
26. Seto H, T Takesue, T Ikemura 1985 Reaction of malonaldehyde with nucleic acid. II. Formation of fluorescent pyrimido [1,2- α]purin-10(3H)-one mononucleotide. *Bull Chem Soc Jpn* 58: 3431-3435
27. Agarwal S, HH Draper 1992 Isolation of a malondialdehyde-deoxyguanosine adduct from rat liver DNA. *Free Rad Biol Med* 13: 695-699
28. Chaudhary AK, M Nokubo, G Ramachandra Reddy, SN Yeola, JD Morrow, IA Blair, LJ Marnett 1994 Detection of endogenous malondialdehyde-deoxyguanosine adducts in human liver. *Science* 265: 1580-1582
29. Palinsky W, ME Rosenfeld, S Yla-Herttuala, GC Gurtner, SS Socher, SW Butler, S Parthasarathy, TE Carew, D Steinberg, JL Witztum 1989 Low density lipoprotein undergoes oxidative modification in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 1372-1376
30. Toyokuni S, K Uchida, K Okamoto, Y Hattori-Nakakuki, H Hiai, ER Stadman 1994 Formation of 4-hydroxy-2-nonenal-modified proteins in the renal proximal tubules of rats treated with a renal carcinogen, ferric nitrilotriacetate. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 2616-2620
31. Acknowledgements: This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, Conselho Nacional para o Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq and Programa de Apoio ao Desenvolvimento Científico, PADCT.