UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

CAMILA CARRIÃO MACHADO GARCIA

**Quantificação de danos em DNA induzidos
por acetaldeído. Potencial biomarcador de
poluição ambiental**

São Paulo

Data do Depósito na SPG:

21/05/2010

CAMILA CARRIÃO MACHADO GARCIA

**Quantificação de danos em DNA induzidos por
acetaldeído. Potencial biomarcador de
poluição ambiental**

Tese apresentada ao Instituto de
Química da Universidade de São Paulo para
obtenção do Título de Doutor em Ciências
(Bioquímica)

Orientadora: Profa. Dra. Marisa Helena Gennari de Medeiros

São Paulo

2010

Camila Carrião Machado Garcia

**Quantificação de danos em DNA induzidos por acetaldeído.
Potencial biomarcador de poluição ambiental**

*Tese apresentada ao Instituto de
Química da Universidade de São Paulo para
obtenção do Título de Doutor em Ciências
(Bioquímica)*

Aprovado em: _____

Banca Examinadora

Prof. Dr(a). _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr(a). _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr(a). _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr(a). _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

*Ao Dr. Airton Carrião Machado, meu Tio e amigo,
que me fez despertar o amor pelos estudos.
Aos meus avôs, pais e irmãos pelo amor incondicional.
Ao Rui por TUDO...amor, dedicação, companheirismo...
À Profa. Dra. Marisa Medeiros, quem fez esta tese possível.*

AGRADECIMENTO(S)

À FAPESP pelo apoio financeiro e pela bolsa de doutorado. Ao CNPQ, Finep e INCT de processos redox em biomedicina - Redoxoma pelo apoio financeiro

À Profa. Dra. Marisa H. G. Medeiros que me aceitou como aluna de iniciação científica quando eu mal sabia o que era DNA e me formou doutora, meu agradecimento e gratidão eternos.

Ao Osmar F Gomes, pela amizade, companheirismo, paciência e colaboração de tantos anos.

À Profa. Dra. Ana Paula de Melo Loureiro, uma das pessoas mais doces do mundo, que me ensinou desde as primeiras pipetadas até como se portar em um laboratório.

À Dra. Sabrina de Almeida Marques, minha também orientadora de Iniciação Científica é uma das responsáveis por tudo que me tornei hoje, além de uma excelente amiga a qual sinto muita falta.

Ao Prof. Dr. Paolo Di Mascio, que me deu um livro Free Radicals Biology and Medicine assim que entrei para o grupo, com o intuito de me incentivar a seguir pelo mundo dos radicais, o que aparentemente deu certo. É com certeza uma das pessoas mais inteligentes que conheço e que vale a pena trabalhar.

A minha amiga e companheira de laboratório Dra. Livea Fujita, uma pessoa que se resume em uma palavra, brilhante. Muitas saudades!

Ao meu querido amigo Dr. Carlos Alexandre Sigolo, que além de fazer uma cerveja na qual sou fã, é uma pessoa das mais especiais na minha vida e de uma cultura invejável.

Ao amigo Ms. José Pedro F. Angeli, uma pessoa realmente maravilhosa, bondosa e dedicada, quem eu desejo ter como um verdadeiro amigo sempre. Um pesquisador de verdade!

Ao amigo Florêncio P. Freitas, a quem devo agradecer a companhia e ajuda em todos os momentos neste final de doutorado. Um amigo de verdade e a pessoa mais confiável do planeta.

À querida Angélica B. Sanchez que foi indispensável na reta final, a quem devo agradecer para sempre, pela ajuda em todos os sentidos...desde o cabelo até os resultados!

Ao Raul pela indispensável ajuda com as células, mas também pela amizade e bolachas.

Aos amigos dos Laboratórios Marisa, Paolo & Sayuri,.....Henrique, Maitê, Isaura, Kero, Alê, Agda,

Fernanda Sena, Emerson, Marilene, Graziela, Patricia, Priscilla, Tathi, Rafaella, Zilda, Thiago. Simone e Tereza (segmento Tridskin). Em especial à Flavia, por tantos chocolates, amizade, conversas, ajuda e empréstimos.

Aos amigos dos outros laboratórios do Instituto e da USP, por todas as coisas das mais diversas e também pela amizade.

Em especial, a Mariana, diversão garantida, pela amizade verdadeira e fiel.

A Fernandinha minha amiga mais maluca, verdadeira e um das poucas que vou levar comigo sempre.

Aos técnicos que me auxiliaram em muitos experimentos, Wilton, Adriana, Mirian, Marcio e Alessandra. E ao Edson que foi indispensável neste doutorado tanto pelas vidrarias, como pelas piadas e almoços.

Aos professores que cursei disciplinas na pós – graduação e os que me aprovaram no exame de qualificação, pela contribuição na minha formação.

Aos professores Walter Colli e Robert Schumacker pela orientação no PAE, conversas e aprendizagem.

Aos meus amigos, os quais não me referi ainda, pelo simples fato de serem amigos e tão importantes na minha vida, Carol, Tathi, Eduardo, Zani, Ale Sobral, Bruna, Alberto, Rani, Marcelo, Leila, Vlad, Rê...e a Gabizinha.

A minha Família, Mãe, Pai, Vô Pedro e Egidio, Vó Dolores e Sunção, Gabriela, Isabela e Cassiano, pela minha vida, minha formação, meu caráter, amor incondicional e eterno....Saudades e muita falta. Ao meu sobrinho que está chegando em boa hora e que será muito amado sempre, seja bem vindo! E também, claro, a Dedi a o Lique que entraram para família.

Aos meus tios Airton e Mônica, que sem dúvida são os responsáveis por quem eu me tornei, pelo incentivo em todos os aspectos, eu não tenho nem como retribuir...apenas com meu muito obrigada mais sincero.

A minha família adotada, pela aceitação, dedicação e amor, Dna Manoela, Sr. Mauro, Donizete, Regina, Damaris, Vólia, Lamara, Walter, Matheus, Dênis, Daiane, Lilian, Daniel, Carol, Daline. E ao segmento São Joanense, não sei nem como expressar meu carinho....Fernando, Fabiana, Biga e todos os muitos outros, sem esquecer de ninguém....eh que a família é grande....

E especialmente por fim, ao meu querido, amor, Rui. Tenho que agradecer por tantas coisas...mas, não teria espaço em uma pequenina folha de papel...**Eu te Amo**, e enquanto durar, quero ser feliz **pra sempre** ao seu lado.

MUIIIIIITTTTTOOOO OBRIGADA

Só depende de nós...

*"Hoje levantei cedo pensando no que tenho a fazer antes que o relógio marque meia noite.
É minha função escolher que tipo de dia vou ter hoje.*

*Posso reclamar porque está chovendo ou agradecer às águas por lavarem a poluição.
Posso ficar triste por não ter dinheiro ou me sentir encorajado para administrar minhas
finanças, evitando o desperdício.
Posso reclamar sobre minha saúde ou dar graças por estar vivo.*

*Posso me queixar dos meus pais por não terem me dado tudo o que eu queria ou posso ser
grato por ter nascido.
Posso reclamar por ter que ir trabalhar ou agradecer por ter trabalho.
Posso sentir tédio com o trabalho doméstico ou agradecer a Deus por ter um teto para
morar.*

*Posso lamentar decepções com amigos ou me entusiasmar com a possibilidade de fazer
novas amizades.
Se as coisas não saíram como planejei posso ficar feliz por ter hoje para recomeçar.*

*O dia está na minha frente esperando para ser o que eu quiser.
E aqui estou eu, o escultor que pode dar forma.*

Tudo depende só de mim."

(Charles Chaplin)

RESUMO

GARCIA, C.C.M. **Quantificação de danos em DNA induzidos por acetaldeído. Potencial biomarcador de poluição ambiental.** 2010. 239p. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

O acetaldeído é um comprovado agente mutagênico e carcinogênico, pode ser produzido endogenamente pela oxidação do álcool ingerido em bebidas alcoólicas e alimentos ou exogenamente, inalado como poluente, advindo da oxidação de combustíveis fósseis e etanol. O efeito do acetaldeído foi avaliado em modelos celulares e animais com o propósito de avaliarmos o aumento do estresse oxidativo, por lipoperoxidação, fragmentação do DNA, e a formação de adutos DNA, tais como 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina, além de, 1,N²-eteno-2'-desoxiguanosina e 1,N²-propano-2'-desoxiguanosina que foram analisados por HPLC acoplado a espectrometria de massa com a utilização de metodologia ultra-sensível e reprodutiva. O tratamento de fibroblastos pulmonares humanos normais (IMR-90) com diversas concentrações de acetaldeído (58 µM a 711 µM) resultou em aumentos de morte celular, lipoperoxidação, fragmentação do DNA, cálcio intracelular e adutos de DNA. O efeito protetor do licopeno (20 µM) foi comprovado minimizando todos os efeitos deletérios promovidos pelo acetaldeído. O tratamento dos ratos *Wistar* por 8 e 30 dias com 150 mg/kg e 60 mg/kg via intra-peritoneal ou gavagem, evidenciaram os efeitos tóxicos provocados pelo acetaldeído, como aumento significativo de lipoperoxidação, adutos e fragmentação de DNA no fígado e cérebro destes animais. A detecção dos adutos de DNA se mostrou uma ferramenta importante para a detecção dos efeitos provocados por exposição ao aldeído. No tratamento de animais por inalação com variadas concentrações de acetaldeído, que expôs os animais a quantidades do aldeído similares às encontradas em atmosferas poluídas, foi observado aumento de lipoperoxidação, sendo este dose dependente no fígado e pulmão. Já no cérebro, os níveis de MDA foram significativamente maiores em 10 ppb e 30 ppb em relação a 0 ppb e

controle, e diminuíram significativamente em 90 ppb. Em relação aos níveis de fragmentação do DNA, observamos no pulmão aumento foi dose dependente em relação à concentração de aldeído. A quantificação de 1,N²-εdGuo e 1,N²-propanodGuo mostrou aumentos de ambos os adutos no pulmão de todos animais expostos ao acetaldeído. No fígado, também, foram detectados aumentos nos níveis de 1,N²-propanodGuo. A formação de 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina, 1,N²-eteno-2'-desoxiguanosina e 1,N²-propano-2'-desoxiguanosina na urina de moradores da cidade de São Paulo, também foi investigada, com o desenvolvimento de metodologia ultra-sensível e reprodutiva por HPLC e espectrometria de massa, que indicou a presença dos três adutos nas urinas analisadas. A detecção do 1,N²-propanodGuo na urina é inédita. Nossos resultados comprovam que o acetaldeído é um forte agente citotóxico e genotóxico, mesmo em concentrações muito baixas, podendo contribuir para o esclarecimento dos mecanismos de desenvolvimento de doenças atribuídas ao aldeído, como o câncer. Além disso, o desenvolvimento de metodologias ultra-sensíveis para detecção e quantificação de adutos na urina e DNA isolado contribui para o emprego destes adutos, em especial o 1,N²-propano-2'-desoxiguanosina, como possível biomarcador de exposição ao acetaldeído presente em atmosferas poluídas e em patologias associadas ao estresse redox e abuso de bebidas alcoólicas.

Palavras-chave: Acetaldeído, lipoperoxidação, 1,N²-propano-2'-desoxiguanosina, 1,N²-eteno-2'-desoxiguanosina, 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina.

ABSTRACT

GARCIA, C.C.M. **Quantification of DNA damage induced by acetaldehyde. Potential biomarker for environmental pollution.** 2010. 239p. PhD Thesis - Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Acetaldehyde is a known mutagen and carcinogen that can be produced endogenously by ethanol oxidation or directly inhaled as an air pollutant produced by fuel oxidation. The toxicity of acetaldehyde was evaluated *in vitro* and *in vivo* models, by means of oxidative stress parameters such as lipid peroxidation (measured as malondialdehyde -MDA), DNA fragmentation and DNA adducts such as 8-oxo-7,8-dihydro-2'-desoxiguanosine, 1,*N*²-eteno-2'-desoxiguanosine and 1,*N*²-propano-2'-desoxiguanosine, this adducts were analyzed by an ultra-sensible and reproducible HPLC coupled to mass spectrometry assay. Treatment of human normal fibroblast (IMR-90) with a wide range of concentrations (58 μ M to 711 μ M) resulted in an increase in cytotoxicity, lipid peroxidation, DNA fragmentation, intracellular calcium release and DNA adducts. Furthermore, lycopene (20 μ M) presented a protective effect against the cellular deleterious properties of acetaldehyde. Treatment of *Wistar* rats for 8 and 30 days with 150 mg/kg and 60 mg/kg intra-peritonially or by gavage resulted in increased toxicity, measured by lipid peroxidation and DNA damage in liver and brain. The detection of DNA adducts was shown an important tool for the identification of deleterious effects induced by exposure to the aldehyde. Animals treated by inhalation, of amounts commonly found in polluted air samples, presented increased levels of lipid peroxidation in a dose dependent manner in liver and lungs. Nevertheless, in the brain of those animals the higher concentration was devoid of toxic effect measured as MDA levels. Lung tissue presented increased levels of DNA fragmentation. Furthermore, increased levels of 1,*N*²- ϵ dGuo and 1,*N*²-propanodGuo was also observed in lungs of all animals. In DNA from livers,

1,*N*²-propanodGuo presented increased levels.

Formation of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-desoxiguanosine, 1,*N*²-eteno-2'-desoxiguanosine and 1,*N*²-propano-2'-desoxiguanosine in urine samples of people living in the city of São Paulo were also investigated using a newly developed and ultra-sensible methodology base in HPLC coupled to mass spectrometry. This methodology enabled us to detect, for the first time, the presence of 1,*N*²-propanodGuo in urine samples. In summary, our results demonstrate the acetaldehyde is a strong cytotoxic and genotoxic agent even at low concentrations, being able to contribute to the development of pathology such as cancer. Furthermore, the development of a very ultra-sensitive methodology for the detection of these adducts, mainly ,*N*²-propano- 2'-desoxiguanosine, enables its use as a possible biomarker of acetaldehyde exposure in polluted air samples and in pathologies associated with redox unbalance and ethanol consumption

Keywords: Acetaldehyde, lipid peroxidation, 1,*N*²-propano-2'-deoxyguanosine, 1,*N*²-etheno-2'-deoxyguanosine, 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μs- Microsegundos

1,N²-propanodGuo- 1,N²-propano-2'-desoxiguanosina

1,N²-εdGuo- 1,N²-eteno-2'- desoxiguanosina

1,N⁶-εdAdo- 1,N⁶-eteno-2'-desoxiadenosina

3,N⁴-εdCyd- 3,N⁴-eteno-2'-desoxicitidina

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

AA- Acetaldeído

ACR- Acroleína

ALDH- Aldeído desidrogenase

CAT- Catalase

CRT- Crotonaldeído

dAdo- 2'-desoxiadenosina

dCyd- 2'-desoxicitidina

DC- Dicroísmo circular

DDE- *Trans, trans*-2,4-decadienal

dGuo- 2'-desoxiguanosina

DNPH- 2,4-dinitrofenilhidrazina

DODE- Ácido 9,12-dioxo-10(E)-dodecenóico

DOOE- Ácido 5,8-dioxo-6(E)-octenóico

EDE- *Trans*-4,5-epoxi-2(E)-decenal

EPR- Sigla em inglês para - Ressonância Paramagnética eletrônica

ERO- Espécies reativas de oxigênio

ESI- Sigla em inglês para – ionização por eletrospray

FS- Sigla em inglês para - dispersão frontal

GPX- Glutathione peroxidase

GSH- Gama-L-glutamil-L-cisteínil-L-glicina (glutathione reduzida)

GSSG- Glutathione dissulfeto

HE- *Trans*-2-hexenal

HNE- *Trans*-4-hidroxi-2(E)-nonenal

HO-PdGuo- 3-(2'-desoxi-β-D-eritropentofuranosil)-5,6,7,8-tetrahidro-8-hidroxipirimido[1,2-α]purin-10(3H)-ona

HPLC- Sigla em inglês para - Cromatografia Líquida de alta eficiência

HPLC / FD- Sigla em inglês para - Cromatografia Líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência

HPLC/ESI/MS-MS- Sigla em inglês para - Cromatografia Líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massa com ionização por eletrospray e análise de massa após fragmentação da molécula selecionada

HPNE- 4-hidroperóxi-2(E)-nonenal

i.p. - Intraperitoneal

M₁ G (dGuo)- 3-(2'-desoxi-(β-D-eritro-pentofuranosil)pirimido[1,2-α]purin-10(3H)-ona

MDA- Malondialdeído

MMS- Metilmetanosulfonato

MPO- Mieloperoxidase

MRM- Monitoramento de reações múltiplas

MS- Sigla em inglês para – espectrometria de massa

N²,3-εdGuo- N²,3-eteno-2'- desoxiguanosina

ONE- 4-oxo-2-nonenal

PI- Iodeto de propídeo

rpm- Rotações por minuto

SOD- Superóxido dismutase

SS- Sigla em inglês para - dispersão lateral

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	29
1.1. Espécies reativas e suas implicações	29
1.2. Lipoperoxidação.....	33
1.3. Lesões em DNA.....	37
1.4. Eteno Adutos	42
1.5. Adutos de DNA e exposição a poluentes	44
1.6. Acetaldeído.....	44
1.7. Lesões em DNA promovidas por acetaldeído	46
1.8. Níveis e métodos de detecção	51
1.9. Reparo de DNA.....	53
1.10. Apoptose.....	54
1.11. Ação antioxidante	57
1.11.1. Carotenóides: atividade pró e antioxidante	59
2. OBJETIVOS E METAS	62
3. MATERIAIS E MÉTODOS	63
3.1. Reagentes	63
3.2. Equipamentos	64
3.3. Síntese, purificação e caracterização de adutos de DNA.....	65
3.3.1. Síntese e purificação de 8-oxodGuo.....	65
3.3.2. Síntese e purificação de 1,N ² - ϵ dGuo	65
3.3.3. Síntese, purificação e caracterização de 1,N ² -propanodGuo.....	65
3.3.3.1. Determinação do coeficiente de extinção molar do 1,N ² -propanodGuo.....	66
3.3.3.2. Estudo da estabilidade do 1,N ² -propanodGuo	67
3.4. Desenvolvimento da metodologia para quantificação de 1,N ² -propanodGuo e 1,N ² - ϵ dGuo por HPLC/ESI/MS-MS em DNA.....	67
3.4.1. Estudo de formação do 1,N ² -propanodGuo em DNA de timo de bezerro	69

3.4.1.1. Precipitação do DNA.....	69
3.4.2. Quantificação dos níveis basais de $1,N^2$ - ϵ dGuo e $1,N^2$ -propanodGuo no DNA de células e tecidos de ratos <i>Wistar</i>	69
3.5. Estudos da citotoxicidade e genotoxicidade do acetaldeído em fibroblastos pulmonares humanos.....	70
3.5.1. Cultivo de células	70
3.5.2. Tratamento de células da linhagem IMR-90	71
3.5.2.1. Quantificação da concentração de acetaldeído nos tratamentos dos fibroblastos pulmonares humanos - reação com 2,4-dinitrofenilhidrazina	71
3.5.3. Estudo da viabilidade de células IMR-90 após tratamento com acetaldeído.....	72
3.5.4. Avaliação da atividade mitocondrial e quantidade de cálcio intracelular	73
3.5.5. Avaliação da fragmentação do DNA.....	73
3.5.6. Investigação da peroxidação lipídica	73
3.5.6.1. Tratamento de células para a quantificação do aduto de MDA-TBA	73
3.5.6.2. Detecção e quantificação do aduto de MDA-TBA	74
3.5.6.3. Dosagem de proteínas.....	75
3.5.7. Estudo de fragmentação do DNA (Ensaio Cometa).....	76
3.5.8. Extração do DNA.....	78
3.5.9. Hidrólise do DNA	80
3.5.10. Análise de 8-oxodGuo no DNA das células tratadas com acetaldeído e licopeno	80
3.5.11. Análise de $1,N^2$ -propanodGuo e $1,N^2$ - ϵ dGuo no DNA das células tratadas com acetaldeído e licopeno.....	80
3.6. Avaliação da fragmentação plasmídial induzida por acetaldeído e lisina.....	81
3.6.1. Purificação do plasmídeo pBlueScript de E.coli DH10B.....	81
3.6.2. Incubação de pBlueScript com acetaldeído	82
3.7. Tratamento de ratos Wistar com acetaldeído.....	83
3.7.1. Tratamento por 8 dias - intraperitoneal e gavagem.....	83
3.7.2. Tratamento por 30 dias- intraperitoneal e gavagem.....	83
3.7.3. Tratamento por 50 dias - via aérea.....	84
3.7.4. Avaliação dos efeitos do acetaldeído em ratos	86
3.7.4.1. Avaliação de lipoperoxidação.....	86
3.7.4.2. Fragmentação do DNA (ensaio cometa)	86

3.7.4.3. Formação de 1,N ² - ϵ dGuo e 1,N ² -propanodGuo.....	87
3.7.4.4. Comitê de ética em experimentação animal.....	87
3.8. Desenvolvimento da metodologia para quantificação de 1,N ² -propanodGuo e 1,N ² - ϵ dGuo por HPLC/ESI/MS-MS na urina de humanos	88
3.8.1 Padronização da extração de adutos de DNA na urina de humanos	88
3.8.2 Metodologia de quantificação de 8-oxodGuo, 1,N ² -propanodGuo e 1,N ² - ϵ dGuo em urina por HPLC/ESI/MS-MS	90
3.8.3. Comitê de ética em experimentação humana.....	91
4. RESULTADOS.....	92
4.1. Síntese, purificação e caracterização de adutos de DNA.....	92
4.1.1. Síntese e purificação de 8-oxodGuo.....	92
4.1.2. Síntese e purificação de 1,N ² - ϵ dGuo	92
4.1.3. Síntese, purificação e caracterização de 1,N ² -propanodGuo.....	92
4.1.3.1 Determinação do coeficiente de extinção molar (ϵ) do 1,N ² -propanodGuo..	102
4.1.3.2 Avaliação da estabilidade dos isômeros de 1,N ² -propanodGuo	103
4.2. Desenvolvimento de metodologia para quantificação de 1,N ² - ϵ dGuo e 1,N ² -propanodGuo em DNA pelo sistema HPLC/ESI/MS-MS	108
4.2.1 Quantificação de 1,N ² -propanodGuo no DNA de timo de bezerro após tratamento com acetaldeído	117
4.2.2 Quantificação dos níveis basais de 1,N ² -propanodGuo e 1,N ² - ϵ dGuo no DNA de fibroblastos e fígado, cérebro e pulmão de ratos <i>Wistar</i>	120
4.3. Estudos da citotoxicidade e genotoxicidade do acetaldeído em fibroblastos pulmonares humanos	123
4.3.1 Cálculo da concentração de acetaldeído nos tratamentos dos fibroblastos pulmonares humanos - reação com 2,4-dinitrofenilhidrazina	123
4.3.2. Viabilidade de células IMR-90 após tratamento com acetaldeído	129
4.3.3. Avaliação do tamanho e complexidade das células após tratamento com acetaldeído.....	131
4.3.4. Avaliação da atividade mitocondrial e quantidade de cálcio intracelular	132
4.3.5. Avaliação da fragmentação do DNA com iodeto de propídeo	136
4.3.6. Investigação da peroxidação lipídica	139
4.3.7. Estudo de fragmentação do DNA (Ensaio Cometa)	141

4.3.8. Dosagem de 8-oxodGuo no DNA de células da linhagem IMR-90 tratadas com acetaldeído.....	146
4.3.9. Dosagem de 1,N ² -propanodGuo e 1,N ² -εdGuo no DNA de células da linhagem IMR-90 tratadas com acetaldeído.....	147
4.4. Avaliação da quebra de DNA plasmídial após reação com acetaldeído.....	150
Tratamento de ratos <i>Wistar</i> com acetaldeído.....	152
4.5. Tratamento de ratos <i>Wistar</i> com acetaldeído intraperitoneal por 8 dias	152
4.5.1. Investigação de lipoperoxidação – Quantificação do aduto MDA-TBA.....	154
4.5.2. Estudo de fragmentação do DNA (ensaio cometa)	155
4.5.3. Análise de 1,N ² -propanodGuo e 1,N ² -εdGuo no fígado, pulmão e cérebro dos ratos tratados com acetaldeído	156
4.6. Tratamento de ratos <i>Wistar</i> com acetaldeído intraperitoneal por 30 dias	158
4.6.1. Investigação de lipoperoxidação – Quantificação do aduto MDA-TBA no fígado e cérebro dos ratos tratados com acetaldeído durante 30 dias	159
4.6.2 Estudo de fragmentação do DNA (ensaio cometa)	161
4.6.3 Análise de 1,N ² -propanodGuo e 1,N ² -εdGuo no fígado e cérebro dos ratos tratados com acetaldeído	163
4.7. Tratamento de ratos <i>Wistar</i> com acetaldeído por gavagem durante 8 dias	167
4.7.1. Investigação de lipoperoxidação – Quantificação do aduto MDA-TBA no fígado, pulmão e cérebro dos ratos tratados com acetaldeído durante 8 dias por gavagem	168
4.7.2 Estudo de fragmentação do DNA (ensaio cometa)	170
4.7.3 Análise de 1,N ² -propanodGuo e 1,N ² -εdGuo no fígado e cérebro dos ratos tratados com acetaldeído	172
4.8. Tratamento de ratos <i>Wistar</i> com acetaldeído por gavagem durante 30 dias	174
4.8.1. Investigação de lipoperoxidação – Quantificação do aduto MDA-TBA no fígado, pulmão e cérebro dos ratos tratados com acetaldeído durante 8 dias por gavagem	175
4.8.2 Estudo de fragmentação do DNA (ensaio cometa)	177
4.8.3 Análise de 1,N ² -propanodGuo e 1,N ² -εdGuo no fígado e cérebro dos ratos tratados com acetaldeído	179
4.9. Tratamento de ratos <i>Wistar</i> com acetaldeído via respiração por 50 dias	181
4.9.1. Investigação de lipoperoxidação – Quantificação do aduto MDA-TBA no pulmão fígado e cérebro dos ratos tratados com acetaldeído durante 50 dias por respiração	183

4.9.2 Estudo de fragmentação do DNA (ensaio cometa)	186
4.9.3 Análise de 1,N ² -propanodGuo e 1,N ² -εdGuo no fígado, pulmão e cérebro dos ratos tratados com acetaldeído	188
4.10. Desenvolvimento da metodologia para quantificação de 1,N ² -propanodGuo e 1,N ² -εdGuo por HPLC/ESI/MS-MS na urina de humanos	192
4.10.1 Quantificação de 1,N ² -propanodGuo e 1,N ² -εdGuo por HPLC/ESI/MS-MS na urina de humanos.....	196
7. DISCUSSÃO	200
7.1. Desenvolvimento da metodologia para detecção e quantificação de 1,N ² -εdGuo e 1,N ² -propanodGuo em DNA.....	200
7.2. Efeito citotóxico e genotóxico do acetaldeído em fibroblastos pulmonares normais humanos (IMR-90)	203
7.3. Efeito do acetaldeído ratos Wistar.....	206
7.4. Desenvolvimento da metodologia para detecção e quantificação de 8-oxodGuo, 1,N ² -εdGuo e 1,N ² -propanodGuo na urina	212
8. CONCLUSÕES	216
9. REFERÊNCIAS.....	218
SÚMULA CURRICULAR	236

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.1.** Esquema representativo da geração e algumas das reações com relevância biológica de $O_2^{\cdot -}$ e H_2O_2 adaptado de Winterbourn, 2008.
- Figura 1.2.** Esquema da formação de $ONOO^-$ na mitocôndria e algumas reações em que ele e o $NO^{\cdot}$ podem estar envolvidos. Adaptado de Ferrer-Sueta *et al.*, 2009; Winterbourn, 2008.
- Figura 1.3.** Representação esquemática do processo de lipoperoxidação e formação de hidroperóxido.
- Figura 1.4.** Estrutura de alguns dos principais aldeídos derivados da lipoperoxidação.
- Figura 1.5.** Formação de 8-oxodGuo a partir de oxigênio singlete e radical hidroxila.
- Figura 1.6.** Adutos de DNA formados pela reação entre a dGuo, dAdo e dCyd e alguns produtos de lipoperoxidação. Adaptado de Medeiros, 2009.
- Figura 1.7.** Mecanismo de formação do $1,N^2$ - ϵ dGuo a partir da reação entre DDE e dGuo. Adaptado de Loureiro *et al.*, 2000.
- Figura 1.8.** Principais adutos da reação de dGuo com acetaldeído.
- Figura 1.9.** Proposta de rota para a formação do câncer a partir da reação entre acetaldeído com dGuo, adaptado de Brooks e col. (Brooks *et al.*, 2005).
- Figura 1.10.** Esquema da morte celular por apoptose via ativação da proteína p53. Adaptado de Barbosa, 2008.
- Figura 1.11.** Formação de GSSG a partir da oxidação de GSH.
- Figura 1.12.** Estrutura do licopeno e β -caroteno.
- Figura 3.1.** Representação do experimento em que ratos *Wistar* foram expostos a acetaldeído por via respiratória.
- Figura 4.1.** Cromatograma de purificação do $1,N^2$ -propanodGuo.
- Figura 4.2.** Estrutura e esquema de fragmentação do $1,N^2$ -propanodGuo, * representa o carbono assimétrico.
- Figura 4.3.** Espectros de massa dos picos coletados em 45 e 47 min. Íon pai de massa 338.3 e íons filhos de massas 222.2, 204.2 e 178.2. Os picos 244.2, 360.3 e 376.3 correspondem a adutos de Na^+ e K^+ das moléculas não ionizadas. Os espectros A e B são idênticos e por isso indicam que são isômeros de $1,N^2$ -propanodGuo.

Figura 4.4. Estrutura numerada do 1,*N*²-propanodGuo para identificação dos hidrogênios nos espectros RMN apresentados nas figuras 4.5 e 4.6.

Figura 4.5. Espectro de ¹H RMN para o produto de 45 mim. Os átomos de hidrogênio estão atribuídos de acordo com a numeração da molécula representada na figura 4.4.

Figura 4.6. Espectro de ¹H RMN para o produto de 47 mim, com os picos ampliados, os quais foram utilizados para a atribuição dos deslocamentos químicos dos hidrogênios da molécula, apresentados da tabela 4.1.

Figura 4.7. Espectro de ¹H-¹H –COSY RMN para um dos isômeros de 1,*N*²-propanodGuo. A análise de RMN 2D, mostrou que os isômeros são realmente idênticos e se tratam de isômeros ópticos do aduto. (A) apresenta o espectro total, (B) Ampliação para melhor visualização dos acoplamentos entre 5,6 e 3,4 ppm e (C) Ampliação para melhor visualização dos acoplamentos entre 3,1 e 1,0 ppm.

Figura 4.8. Espectro de dicroísmo circular para identificação dos enantiômeros do 1,*N*²-propanodGuo. (B) representa o espectro de absorbância dos adutos adquirido durante a aquisição de CD.

Figura 4.9. Espectros de absorbância dos isômeros 1 e 2 de 1,*N*²-propanodGuo em pH 3 após 24 h de incubação.

Figura 4.10. Espectros de absorbância dos isômeros 1 e 2 de 1,*N*²-propanodGuo em pH 5,0, após 30 min de incubação.

Figura 4.11. Espectros de absorbância dos isômeros 1 e 2 de 1,*N*²-propanodGuo em pH 7, após 24 h de incubação.

Figura 4.12. Espectros de absorbância dos isômeros 1 e 2 de 1,*N*²-propanodGuo em pH 10, após 24 h de incubação.

Figura 4.13. Cromatogramas representativos de 500 amol de 1,*N*²-εdGuo (A), 1,*N*²-propanodGuo (C), e 33 fmol dos padrões isotopicamente marcados [¹⁵N₅]-1,*N*²-εdGuo (B) [¹⁵N₅]-1,*N*²-propanodGuo (D). E representa o cromatograma de 100 µg de DNA de timo de bezerro hidrolisado, sendo a dGuo eluída em 8,83 min. (F) representa as posições da válvula automática durante a análise em sistema HPLC/ESI/MS-MS.

Figura 4.14. Curva de calibração para dGuo, com concentrações que variam de 0,5 a 100 nmol.

Figura 4.15. Curva de calibração 1,*N*²-εdGuo (A) e 1,*N*²-propanodGuo (B). Concentrações dos adutos variam entre 100 amol e 100 fmol, com 14 pontos. Em cada uma das amostras foram adicionados 33 fmol de padrão isotopicamente marcado com ¹⁵N₅.

Figura 4.16. Cromatograma de 1 fmol de 1,*N*²-εdGuo (A) e de cada um dos isômeros de 1,*N*²-propanodGuo (C), 33 fmol dos padrões isotopicamente marcados (B e D) e 100 µg de DNA de timo de bezerro hidrolisado, em 260 nm (E).

Figura 4.17. Cromatograma representativo do limite de quantificação do método com 500 amol de 1,*N*²-εdGuo (A) e de cada um dos isômeros de 1,*N*²-propanodGuo (C), 33 fmol dos padrões isotopicamente marcados (B e D) e 100 µg de DNA de timo de bezerro hidrolisado, em 260 nm (E).

Figura 4.18. 1,*N*²-propanodGuo em DNA de timo após reação por 24 h com acetaldeído (0,5, 1 e 10 mM) a 37 °C e 18 °C, na presença ou não de lisina. *** p < 0,001 comparado com os mesmos tratamentos sem a adição de lisina. Barras pretas correspondem incubação com acetaldeído (1 mM e 10 mM), barras brancas correspondem incubação com acetaldeído na presença de lisina.

Figura 4.19. Mecanismo de formação do 1,*N*²-propanodGuo, a partir de acetaldeído na presença de agente nucleofílico (grupos amina e sulfidril). Adaptado de Sako *et al* (Sako et al., 2003).

Figura 4.20. Cromatograma representativo da análise de 1,*N*²-εdGuo e 1,*N*²-propanodGuo no DNA extraído do cérebro de ratos Wistar. 1,*N*²-εdGuo (A) e de cada um dos isômeros de 1,*N*²-propanodGuo (C), 33 fmol dos padrões isotopicamente marcados (B e D) e 100 µg de DNA hidrolisado, em 260 nm (E).

Figura 4.21. Esquema da reação entre acetaldeído e 2,4 dinitrofenilhidrazina

Figura 4.22. Curva de calibração da reação entre acetaldeído e 2,4 dinitrofenilhidrazina.

Figura 4.23. Concentrações de acetaldeído calculadas por derivatização com DNPH nos tratamentos dos fibroblastos em placas de 10 cm de diâmetro. O eixo y corresponde à concentração de acetaldeído calculada e o eixo x a adicionada.

Figura 4.24. Quantidade real de acetaldeído no meio de cultura, imediatamente após a adição e ao término de 3 h do tratamento das células da linhagem IMR-90 em garrafas de 75 cm², para dosagem de 8-oxodGuo. (***) p < 0,001 comparado com controle e 1 mM, (**) p < 0,01 comparado com controle), n = 4. O eixo y corresponde à concentração de acetaldeído calculada e o eixo x a adicionada.

Figura 4.25. Quantidade real de acetaldeído no meio de cultura, imediatamente após a adição e ao término de 3 h do tratamento das células da linhagem IMR-90 em garrafas de 25 cm² utilizadas em ensaios cometa e citometria de fluxo. (***) $p < 0,001$, comparado com controle e demais concentrações), $n = 4$. O eixo y corresponde à concentração de acetaldeído calculada e o eixo x a adicionada.

Figura 4.26. Viabilidade celular após tratamento com diversas concentrações de acetaldeído, que variaram entre 1 mM e 1 M adicionados.

Figura 4.27. Perfil de complexidade (SS) por tamanho de células (FS), após tratamento com acetaldeído (Controle (A), 155 μ M (B), 703 μ M (C), 953 μ M (D) e 1953 μ M (E)).

Figura 4.28. Porcentagem de células vivas após tratamentos com 155, 703, 953 e 1953 μ M de acetaldeído em comparação com células controle.

Figura 4.29. Intensidade de fluorescência para cálcio intracelular (FL1) e atividade da mitocôndria (FL4) em diversas concentrações de acetaldeído (Controle (A), 155 μ M (B), 703 μ M (C), 953 μ M (D) e 1953 μ M (E)).

Figura 4.30. Atividade mitocondrial (A) e cálcio intracelular (B) após tratamento de células IMR-90 em diferentes concentrações de acetaldeído (155, 703, 953 e 1953 μ M). *** $p < 0,001$ comparado com controle, # $p < 0,001$ comparado com 165 μ M, 703 μ M, 953 μ M de acetaldeído, § $p < 0,001$ comparado com 165 μ M de acetaldeído, ** $p < 0,01$ comparado com controle.

Figura 4.31. Histograma representativo da fluorescência do DNA em que o iodeto de propídeo se ligou.

Figura 4.32. Porcentagem de fragmentação do DNA celular marcado com iodeto de propídeo após tratamento com acetaldeído. Barras pretas representam células que receberam apenas acetaldeído, barras brancas células que foram anteriormente pré-tratadas com licopeno.

Figura 4.33. Porcentagem de células vivas tratadas com 155 e 703 μ M de acetaldeído na presença ou não de licopeno (20 μ M).

Figura 4.34. Níveis de MDA (pmol) / proteína (mg) nas células pré incubadas com 20 μ M de licopeno e tratadas com acetaldeído (58, 155 e 703 μ M). * $p < 0,05$ comparado com controle, THF e licopeno. ** $p < 0,01$ comparado com AA 20 μ M. *** $p < 0,001$ comparado com controle, THF e licopeno μ M. # $p < 0,001$ comparado com mesmo tratamento sem adição de licopeno. Barras pretas representam

células que receberam apenas acetaldeído, barras brancas células que foram anteriormente pré-tratadas com licopeno.

Figura 4.35. Ensaio cometa das células tratadas com 155 e 703 μM de acetaldeído. MMS controle positivo.

Figura 4.36. Ensaio cometa das células pré-incubadas com 20 μM de licopeno e tratadas com 58, 155 e 703 mM de acetaldeído. Resultados expressos pelo índice do dano (tamanho da cauda) nos cometas formados. * $p < 0,05$ comparado com o mesmo tratamento sem a adição de licopeno. ** $p < 0,01$ comparado com controle, THF e licopeno. *** $p < 0,001$ comparado com controle, THF e licopeno. # $p < 0,001$ comparado com mesmo tratamento sem adição de licopeno. Barras pretas representam células que receberam apenas acetaldeído, barras brancas células que foram anteriormente pré-tratadas com licopeno.

Figura 4.37. Ensaio cometa das células pré-incubadas com 20 μM de licopeno e tratadas com 58, 155 e 703 mM de acetaldeído. Resultados expressos pelo número de cometas formados. Barras pretas representam células que receberam apenas acetaldeído, barras brancas células que foram anteriormente pré-tratadas com licopeno.

Figura 4.38. Níveis de 8-oxodGuo em fibroblastos pulmonares humanos (IMR-90) expostos a acetaldeído durante 3 h. *** $p < 0,001$ comparado com controle e 165 μM , $n = 3$.

Figura 4.39. Quantificação de $1, N^2\text{-}\epsilon\text{dGuo} / 10^7 \text{ dGuo}$ (A) e $1, N^2\text{-propanodGuo} / 10^7 \text{ dGuo}$ (B) nos DNA das células tratadas com 20 μM de licopeno e acetaldeído (AA). *** $p < 0,001$ comparado com controle e 165 μM . Barras pretas representam células que receberam apenas acetaldeído, barras brancas células que foram anteriormente pré-tratadas com licopeno.

Figura 4.40. Fragmentação de DNA plasmídial após tratamento com acetaldeído.

SC – *superenovelado*, OC- *circular aberto*.

Figura 4.41. Gráfico ilustrativo da variação da massa dos animais inoculados ou não com acetaldeído.

Figura 4.42. Níveis de lipoperoxidação no fígado dos ratos *Wistar* tratados via intraperitoneal com 150 mg/Kg de acetaldeído em relação aos grupos controle. * $p < 0,005$, comparado acetaldeído em relação a controle e veículo, $n=5$.

Figura 4.43. Níveis de fragmentação do DNA no fígado de ratos *Wistar* tratados via intraperitoneal com 150 mg/Kg de acetaldeído. *** $p < 0,001$, comparado acetaldeído em relação a controle e veículo. $n=5$.

Figura 4.44. Quantificação de 1, N^2 -propanodGuo e 1, N^2 - ϵ dGuo no fígado de ratos tratados com 150 mg/Kg de acetaldeído durante 8 dias. $n = 5$, * $p < 0,05$ comparado com controle e veículo.

Figura 4.45. Porcentagem do aumento do peso dos animais tratados com 60 mg/kg acetaldeído durante 30 dias, $n = 6$.

Figura 4.46. Níveis de MDA-TBA no fígado (A) e cérebro (B) de ratos *Wistar* tratados com 60 mg/Kg de acetaldeído. (*** $p < 0,001$ comparado com controle e veículo, ** $p < 0,01$ comparado com controle e veículo), $n = 6$.

Figura 4.47. Níveis de fragmentação do DNA no fígado e cérebro de ratos *Wistar* tratados via intraperitoneal com 60 mg/Kg de acetaldeído. * $p < 0,005$ acetaldeído em relação ao controle e veículo, ** $p < 0,01$, acetaldeído em relação ao veículo, * $p < 0,05$ acetaldeído em relação ao controle.

Figura 4.48. Quantificação de 1, N^2 -propanodGuo e 1, N^2 - ϵ dGuo no fígado de ratos tratados com 60 mg/Kg de acetaldeído durante 30 dias. $n = 6$.

Figura 4.49. Quantificação de 1, N^2 -propanodGuo e 1, N^2 - ϵ dGuo no cérebro de ratos tratados com 60 mg/Kg de acetaldeído durante 30 dias. $N = 6$. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,005$ comparados com controle e veículo.

Figura 4.50. Tabela representativa do aumento da massa de cada animal e gráfico que demonstra a média das massas de todos os animais durante o tratamento com acetaldeído por gavagem de 150 mg /kg em 8 dias, $n = 7$.

Figura 4.51. Níveis de MDA-TBA no fígado pulmão e cérebro de ratos tratados com 150 mg/Kg de acetaldeído durante 8 dias. ** $p < 0,01$ comparado com controle e veículo, $n = 7$.

Figura 4.52. Formação de cometas no fígado cérebro e pulmão de ratos tratados com 150 mg/Kg de acetaldeído durante 8 dias. *** $p < 0,001$ comparado com controle e veículo, ** $p < 0,01$ comparado com controle, $n = 7$.

Figura 4.53. Quantificação de 1, N^2 -propanodGuo e 1, N^2 - ϵ dGuo no cérebro de ratos tratados com 150 mg/Kg de acetaldeído durante 8 dias por gavagem. $n = 7$. *** $p < 0,001$ comparado com controle e veículo.

Figura 4.54. Representação do aumento da massa média dos animais durante o tratamento com acetaldeído por gavagem de 60 mg/kg em 30 dias, n = 7.

Figura 4.55. Níveis de MDA-TBA no cérebro, fígado e pulmão de ratos tratados com 60 mg/Kg de acetaldeído durante 30 dias. *** p < 0,001 comparado com controle e ** p < 0,01 comparado com veículo, n = 7.

Figura 4.56. Formação de cometas no fígado e cérebro de ratos tratados com 60 mg/Kg de acetaldeído durante 30 dias, n = 7.

Figura 4.57. Quantificação de 1,N²-propanodGuo e 1,N²-εdGuo no fígado de ratos tratados com 60 mg/Kg de acetaldeído durante 30 dias por gavagem. n = 7. *** p < 0,001 comparado com controle e veículo.

Figura 4.58. Quantificação de 1,N²-propanodGuo e 1,N²-εdGuo no pulmão de ratos tratados com 60 mg/Kg de acetaldeído durante 30 dias por gavagem. n = 7. ** p < 0,05 comparado com controle e veículo.

Figura 4.59. Massa média de todos os animais durante o tratamento com acetaldeído por inalação (A) de acetaldeído em 50 dias, n = 5. (B) representa massa dos 5 animais que respiraram 90 ppb de acetaldeído e (C) representa massa dos 5 animais que respiraram 90 ppb de acetaldeído durante todo o experimento.

Figura 4.60. Diferença entre massa corpórea final e inicial (g) dos animais que respiraram variadas concentrações de acetaldeído. *** p < 0,001 comparado com ambiente, 0 ppb, 10 ppb e 30 ppb de acetaldeído.

Figura 4.61. Níveis de MDA-TBA no fígado de ratos tratados com acetaldeído durante 50 dias. *** p < 0,001 comparado com ambiente, 0 ppb e 10 ppb de acetaldeído.

Figura 4.62. Níveis de MDA-TBA no pulmão de ratos tratados com acetaldeído durante 50 dias. *** p < 0,001 comparado com ambiente, 0 ppb e 10 ppb de acetaldeído, ** p < 0,01 comparado com ambiente.

Figura 4.63. Níveis de MDA-TBA no cérebro de ratos tratados com acetaldeído durante 50 dias. *** p < 0,001 comparado com ambiente e 10 ppb de acetaldeído, *** p < 0,01 comparado com ambiente e 0 ppb de acetaldeído, * p < 0,05 comparado com 10 ppb de acetaldeído.

Figura 4.64. Formação de cometas no fígado, cérebro e pulmão de ratos tratados por inalação de acetaldeído durante 50 dias, n = 5. *** p < 0,01 comparado com ambiente e 0 ppb e 10 ppb de acetaldeído, # p < 0,001 comparado com 30 ppb de acetaldeído.

Figura 4.65. Quantificação de 1,N²-propanodGuo e 1,N²-εdGuo no pulmão de ratos tratados com acetaldeído por inalação durante 50 dias. n = 5.

Figura 4.66. Quantificação de 1,N²-propanodGuo e 1,N²-εdGuo no fígado de ratos tratados com acetaldeído por inalação durante 50 dias. n = 5.

Figura 4.67. Quantificação de 1,N²-propanodGuo e 1,N²-εdGuo cérebro de ratos tratados com acetaldeído por inalação durante 50 dias. n = 5.

Figura 4.68. Estruturas e transições de massa dos adutos analisados na urina.

Figura 4.69. Perfil de eluição da 8-oxodGuo (A), 1,N²-εdGuo (B), 1,N²-propanodGuo (D), seus padrões isotópicos (C e E).

Figura 4.70. Curvas de calibração 8-oxodGuo, 1,N²-εdGuo e 1,N²-propanodGuo para quantificação de adutos de DNA na urina de humanos.

Figura 4.71. Perfil de eluição da 8-oxodGuo (A), 1,N²-εdGuo (B) e 1,N²-εdGuo marcado com nitrogênio 15.

Figura 4.72. Perfil de eluição da 1,N²-propanodGuo (A), 1,N²-propanodGuo marcado com nitrogênio 15 (B) e o perfil cromatográfico da amostra total adquirido entre 200 a 350 nm (C).

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1. Gradiente de purificação de 1,*N*²-propanodGuo formado após reação entre dGuo e acetaldeído.

Tabela 3.2. Gradiente de H₂O e acetonitrila utilizado durante a análise em sistema HPLC/ESI/MS-MS para detecção do 1,*N*²-propanodGuo e 1,*N*²-εdGuo.

Tabela 3.3. Método gradiente de água e acetonitrila para análise do aduto 2,4 dinitrofenilhidrazina com acetaldeído.

Tabela 3.4. Imagens e pontuações de cada classe de cometas observados.

Tabela 3.5. Tipos de colunas SPE testadas para otimização de metodologia para eluição de urina.

Tabela 3.6. Diferentes metodologias de extração de urina em coluna SPE para quantificação de 8-oxodGuo, 1,*N*²-εdGuo e 1,*N*²-propanodGuo.

Tabela 3.7. Método gradiente de água e acetonitrila para eluição das frações de urina.

Tabela 4.1. Deslocamentos químicos no espectro de ¹H RMN dos isômeros de 1,*N*²-propanodGuo em D₂O.

Tabela 4.2. Valores do coeficiente de extinção molar (ε) dos isômeros de 1,*N*²-propanodGuo.

Tabela 4.3. Quantificações de 1 fmol de 1,*N*²-εdGuo e de cada um dos isômeros de 1,*N*²-propanodGuo em 100 µg de DNA de timo de bezerro. As análises foram repetidas 3 vezes em 3 dias subsequentes.

Tabela 4.4. Níveis basais de 1,*N*²-εdGuo e 1,*N*²-propanodGuo no DNA extraído do, fígado, pulmão e cérebro de ratos Wistar, n = 21.

Tabela 4.5. Níveis basais de 1,*N*²-εdGuo e 1,*N*²-propanodGuo no DNA extraído de fibroblastos da linhagem IMR-90, n = 7.

Tabela 4.6. Valores das concentrações de acetaldeído nos tratamentos dos fibroblastos da linhagem IMR-90 em placas de 10 cm de diâmetro. Valores estimados pela concentração do aduto AA-DNPH.

Tabela 4.7. Valores das concentrações de acetaldeído adicionados e calculados pela concentração do aduto AA-DNPH nos tratamentos de células com acetaldeído em placas de 10 cm de diâmetro.

Tabela 4.8. Porcentagens e desvio padrão de células viáveis após tratamento com acetaldeído.

Tabela 4.9. Níveis de 1,*N*²-εdGuo e 1,*N*²-propanodGuo no DNA das células tratadas com licopeno e acetaldeído.

Tabela 4.10. Média do aumento e perda de peso dos ratos controle, veículo (0,9 % NaCl) e tratados com 150 mg/Kg de acetaldeído. (***) $p < 0,001$, acetaldeído em relação a controle e veículo).

Tabela 4.11. Quantificação de 1, N^2 -propanodGuo e 1, N^2 - ϵ dGuo no fígado de ratos tratados com 150 mg/Kg de acetaldeído durante 8 dias por gavage. n = 5.

Tabla 4.12. Quantificação de 1, N^2 -propanodGuo e 1, N^2 - ϵ dGuo no pulmão de ratos tratados com 150 mg/Kg de acetaldeído durante 8 dias por gavage. n = 5

Tabela 4.13. Quantificação de 1, N^2 -propanodGuo e 1, N^2 - ϵ dGuo no cérebro de ratos tratados com 60 mg/Kg de acetaldeído durante 30 dias por gavage. n = 7.

Tabela 4.14. Níveis de 8-oxodGuo, 1, N^2 - ϵ dGuo e 1, N^2 -propanodGuo na urina de humanos.

Tabela 7.1. Resumo dos resultados obtidos nos tratamentos de ratos *Wistar* com acetaldeído.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Espécies reativas e suas implicações

As espécies reativas de oxigênio e nitrogênio radicalares ou não (ERO, ERN) são formadas por numerosos processos endógenos e exógenos. Em sistemas biológicos podem oxidar biomoléculas como DNA, lipídeos e proteínas, tais processos desencadeiam respostas celulares como morte, mutações genéticas, agregação de proteínas e estão associados ao aparecimento de diversas patologias relacionadas com estresse oxidativo como envelhecimento, neurodegeneração, arteriosclerose, diabetes, entre outras (Navarro *et al.*, 2009; Victor *et al.*, 2009; Wei *et al.*, 2009).

A geração e consequências de espécies reativas em sistemas biológicos são bastante complexas e muito estudadas, tanto em relação aos danos que elas causam quanto ao seu envolvimento nos processos de regulação e sinalização celular. Por isso, a associação destas moléculas como desencadeadores de processos patológicos deve ser cautelosa. Em sistemas biológicos, o papel que cada espécie reativa desempenha, independentemente, deve ser considerado, para a melhor compreensão de seus efeitos (Winterbourn, 2008).

Dentre os mecanismos mais importantes para a geração de ERO estão a clivagem homolítica da água que durante a radiólise gera radicais hidroxila ($\text{HO}^\bullet$) e vazamento de elétrons dos complexos mitocondriais I e III na cadeia de transporte de elétrons que forma ânion radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) a partir do O_2 que, embora essencial para a vida aeróbia pode, sob circunstâncias específicas, ser uma molécula altamente deletéria. Muitos radicais também podem ser formados por transferência de elétron, o que ocorre, por exemplo, na reação entre metais livres, como ferro e cobre, que reagem com peróxido de hidrogênio para formar radicais hidroxila (reação de Fenton) (Halliwell *et al.*, 2007).

Normalmente, o $\text{O}_2^{\bullet-}$ é dismutado enzimaticamente a H_2O_2 pela enzima superóxido dismutase (SOD), sendo em seguida convertido a O_2 e H_2O pela catalase, que participa de

uma das principais linhas de defesa antioxidante celular. No entanto, uma fração de H_2O_2 formado por ação da SOD pode escapar a este mecanismo de defesa e participar de uma série de reações gerando espécies mais reativas, como o $\text{HO}^\bullet$ (figura 1.1).

Figura 1.1. Esquema representativo da geração e algumas das reações com relevância biológica de $\text{O}_2^{\bullet -}$ e H_2O_2 , adaptado de Winterbourn, 2008.

O oxigênio, normalmente encontrado na forma triplete, também pode apresentar uma forma bastante reativa no estado excitado singlete. O oxigênio singlete pode ser formado de diversas maneiras em sistemas biológicos, possui tempo de vida razoavelmente alto (μs), sendo encontrado em duas formas o $^1\Delta_g$ e o $^1\Sigma_g^+$. O primeiro estado apresenta energia 22 kcal/mol acima do estado fundamental e vida-média alta (2-4 μs em H_2O), o segundo possui energia de 37,5 kcal/mol acima do estado fundamental e vida-média muito menor, decaindo rapidamente para o estado $^1\Delta_g$. Considerando estas características, a

forma de oxigênio singlete que apresenta maior importância em sistemas biológicos é a forma $^1\Delta_g$, sendo denotado por 1O_2 (Frimer, 1985). O 1O_2 apresenta alta reatividade frente a muitas funções orgânicas ricas em elétrons como, ácidos graxos insaturados, proteínas e DNA (Di Mascio, 1985; Sies, 1993).

Espécies reativas de nitrogênio também são formadas por diferentes processos endógenos e exógenos a partir da reação de óxido nítrico ($NO^\bullet$) (Augusto *et al.*, 2002), formado principalmente pela enzima $NO^\bullet$ sintase (constitutiva ou induzível) na reação entre L-arginina e O_2 (reação 1). O $NO^\bullet$ é uma molécula pouco reativa que se difunde com facilidade pelas células, e por isso, apresenta função importante na sinalização celular (Lancaster, 1997). Além disso, este radical está envolvido no aumento de tônus muscular, adesão celular, função renal, atividade antioxidante, danos ao DNA, lipoperoxidação, entre outras (Augusto, 2006).

O óxido nítrico ($NO^\bullet$) pode ainda reagir com $O_2^{\bullet-}$ e dar origem ao peroxinitrito ($ONOO^-$), que é capaz de provocar lesões em proteínas, sobretudo em resíduos de tirosina (Cassina *et al.*, 2000), além de, gerar ânion radical carbonato, nitrito e nitrato (Ferrer-Sueta *et al.*, 2009). O $ONOO^-$ pode, também, ser detoxificado por peroxiredoxinas presentes na mitocôndria, por exemplo. A figura 1.2 apresenta uma representação da geração de $ONOO^-$ na mitocôndria e algumas reações em que ele e o $NO^\bullet$ podem estar envolvidos.

Figura 1.2. Esquema da formação de ONOO⁻ na mitocôndria e algumas reações em que ele e o NO• podem estar envolvidos. Adaptado de Ferrer-Sueta et al., 2009; Winterbourn, 2008.

A detecção direta de radicais livres é bastante complexa, pois a maioria destas espécies é muito reativa e possui tempo de vida muito pequeno. A técnica mais empregada para a detecção de espécies reativas em sistemas biológicos é a ressonância paramagnética nuclear (EPR), a única utilizada para detecção direta de espécies radicalares. No entanto, devido à sua baixa sensibilidade, o uso de sequestradores (DMSO, dimetiluréia) e trapeadores de spin tornaram-se ferramentas importantes (Augusto *et al.*, 2007). Estes compostos apresentam maior estabilidade frente às espécies reativas de nitrogênio e oxigênio sendo capazes de acumularem-se e atingirem concentrações detectáveis por EPR.

A detecção indireta de espécies radicalares, pode ser realizada através do produto de reação destas espécies com uma variedade de substâncias denominadas sondas, as quais podem ser detectadas por técnicas espectrofotométricas ou por fluorescência. As

sondas fluorescentes são sensíveis e podem ser utilizadas em conjunto com técnicas também sensíveis, como, por exemplo, microscopia de fluorescência, citometria de fluxo e fluorimetria (Bartosz, 2006). No entanto, muito se discute quanto à especificidade destas sondas, que em muitos casos mostram-se inespecíficas (Wardman, 2007; Zielonka *et al.*, 2008).

Além disso, outras estratégias como o uso de enzimas antioxidantes e a quantificação de moléculas formadas pela ação destes radicais como produtos da oxidação de lipídeos da membrana plasmática, pela reação destes produtos com ácido tiobarbitúrico (TBA) ou por quimiluminescência, tem sido muito empregadas.

1.2. Lipoperoxidação

As membranas das células contém um grande número de ácidos graxos poli-insaturados e por isso, são muito susceptíveis a ataques por EROs e ERNs. A abstração inicial de um átomo de hidrogênio bis-alílico, que pode ocorrer em diferentes pontos da cadeia do ácido graxo poli-insaturado, gera radicais centrado no carbono, que são estabilizados por rearranjo molecular. A adição rápida de uma molécula de oxigênio ao radical lipídico forma o radical peroxila, o qual pode abstrair hidrogênio de outro ácido graxo para formar hidroperóxidos (revisado por Augusto 2006). Além disso, os radicais peroxila podem reagir de modo a formar peróxidos cíclicos e endoperóxidos (Porter, 1984) (Figura 1.3). Esta cascata autocatalítica apenas termina quando dois radicais reagem entre si e se desativam.

Figura 1.3. Representação esquemática do processo de lipoperoxidação e formação de hidroperóxido.

A decomposição dos hidroperóxidos lipídicos é importante, pois, além de gerar radicais que propagam a peroxidação lipídica, gera produtos não radicalares (aldeídos, cetonas, epóxidos, entre outros) que são mais estáveis do que os radicais livres que iniciaram o processo e por esse motivo podem difundir pela célula para reagir com outras biomoléculas (DNA e proteínas). Os hidroperóxidos são instáveis na presença de metais de transição, como ferro e cobre podendo desencadear a formação de novas espécies radicalares, peroxila e alcoxila ($\text{LO}^\bullet$) (reações 2 e 3).

O mecanismo no qual hidroperóxidos geram outras moléculas reativas, se dá por cisão- β , que após clivagem homolítica entre o carbono do radical alcoxila e uma ligação C-C adjacente, origina um aldeído e um hidrocarboneto radicalar, que é estabilizado pela abstração de um hidrogênio de outra molécula, como um ácido graxo, por exemplo. O radical alcoxila também pode ser estabilizado a ácido oxodienóico ou atacar uma dupla ligação adjacente e formar epóxidos. As biomembranas possuem um grande número ácidos graxos com insaturações diferentes, o que resulta em uma grande variedade de produtos secundários, sendo os aldeídos os mais estudados. Dentre esses produtos destacam-se quatro classes distintas 4-hidroalcenais (p.e. 4-hidroxi-2-nonenal, HNE), 2-alcenais (acroleína - ACR), n-alcenais (propenal) entre outros, como malondialdeído (MDA) e 2,4 decadienal (DDE) (Kawai *et al.*, 2007; Loidl-Stahlhofen *et al.*, 1994; Porter, 1984; Vaca *et al.*, 1988). A figura 1.4 apresenta alguns dos principais produtos de lipoperoxidação e suas estruturas.

Figura 1.4. Estrutura de alguns dos principais aldeídos derivados da lipoperoxidação.

Aldeídos α,β -insaturados e seus isômeros, tais como 4-hidroxiacetaldeídos, epoxialdeídos e malondialdeído, são agentes alquilantes com capacidade de se ligarem covalentemente a grupos nucleofílicos presentes em DNA, peptídeos e proteínas, alterando estruturas e, conseqüentemente, suas funções. Muitos trabalhos também demonstraram a formação de adutos de DNA e proteínas a partir de CRT, ACR, DDE, HNE e MDA, assim como suas implicações para atividade celular, como por exemplo, desacoplamento mitocondrial, alteração na transcrição gênica e modulação da apoptose (Blair, 2008; Sigolo *et al.*, 2008; Stevens *et al.*, 2008).

A peroxidação lipídica tem sido associada ao desenvolvimento de uma série de patologias induzidas por exposição a agentes externos ou desbalanço redox endógeno. Alguns exemplos são injúria devida à isquemia e reperfusão, hepatotoxicidade devida ao tetracloreto de carbono, carcinogênese, aterogênese, formação de pigmentos de lipofusina

associados ao envelhecimento, diabetes, arteriosclerose e Alzheimer (Custovic *et al.*, 2010; Gago-Dominguez *et al.*, 2008; Schulze *et al.*, 2005; Spiteller, 2010; Voss *et al.*, 2006; Weber *et al.*, 2003).

1.3. Lesões em DNA

Acredita-se que danos oxidativos em proteínas e em DNA sejam um importante mediador de carcinogênese e outras patologias. Este tipo de dano pode ocorrer a partir de uma interação direta entre as espécies reativas de oxigênio ou pela reação de um eletrófilo bifuncional gerado como resultado da peroxidação lipídica.

Um dos biomarcadores de estresse oxidativo mais estudados, a 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina (8-oxodGuo), pode ser formado pela reação direta da 2'-desoxiguanosina (dGuo) com radicais hidroxila e oxigênio singlete (Cadet *et al.*, 2002; Cadet *et al.*, 2008; Ravanat *et al.*, 2004). A figura 1.5 resume o mecanismo de formação da 8-oxodGuo a partir destas espécies.

Figura 1.5. Formação de 8-oxodGuo a partir de oxigênio singlete e radical hidroxila.

O mecanismo apresentado na figura acima mostra que o oxigênio singlete adiciona-se entre as ligações 4-8 gerando um endoperóxido instável, que se decompõe em outros produtos, incluindo a 8-oxodGuo. Já o HO[•] adiciona ao carbono 8 da guanina gerando a 8-hidroxiguanona radical que é reduzido a 8-oxodGuo.

A 8-oxodGuo se tornou o dano oxidativo em DNA mais extensivamente estudado, devido a facilidade com que pode ser detectado (Collins *et al.*, 2004). Suas propriedades biológicas foram amplamente investigadas, como mutagenicidade em bactérias e células de mamífero, levando principalmente a transversões G→T (Cheng *et al.*, 1992; Le Page *et al.*, 1995; Shibutani *et al.*, 1991). Transversões G→T são muito encontradas em genes supressores de tumor e proto-oncogenes mutados (Hussain *et al.*, 1998). Fortes evidências apontam no sentido de que a ocorrência de bases oxidadas no DNA leva ao surgimento de mutações espontâneas ao longo da vida de um indivíduo, podendo contribuir para o desenvolvimento de tumores.

A 8-oxodGuo, por apresentar um potencial de oxidação maior que qualquer outro nucleosídeo natural, torna-se alvo preferencial de outros oxidantes cujo mecanismo envolva oxidação por 1 ou 2 elétrons (Burrows *et al.*, 1998). Essa propriedade é particularmente relevante considerando que desde sua descoberta essa lesão tem sido utilizada como um marcador de estresse oxidativo, em urina, plasma ou DNA isolado (Hu *et al.*, 2010; Peddi *et al.*, 2010; Seet *et al.*, 2010). Eventos relacionados com a oxidação da 8-oxodGuo são, portanto, fundamentais para a utilização dessa lesão como marcadora em sistemas biológicos.

Um grande número de dados sobre modificações em DNA promovidas por produtos da peroxidação lipídica estão sendo acumulados nos últimos anos. Geralmente, as modificações estruturais resultantes incluem a formação de propano tricíclicos e de eteno adutos, produtos de reações de alquilação e muitas vezes por mecanismos de adição nucleofílica. A reação entre aldeídos α,β -insaturados, como HNE, ACR e CRT, leva à

formação de propanos cíclico substituídos (Blair, 2008; Medeiros, 2009). No entanto, aldeídos epoxidados insaturados geram eteno ou etano cíclico substituídos. A caracterização estrutural desses diversos adutos vem sendo realizada pela análise de produtos de reações entre eletrófilos bifuncionais, aldeídos α,β -insaturados, provenientes da decomposição de peróxidos lipídicos e bases do DNA ou mesmo com o DNA intacto (Blair, 2008; Carvalho *et al.*, 1998; Chung *et al.*, 1996; Loureiro *et al.*, 2000; Nair *et al.*, 2007). A figura 1.6 apresenta adutos de DNA que são formados pela reação de alguns produtos de lipoperoxidação e as bases 2'-desoxiguanosina (dGuo), 2'-desoxiadenosina (dAdo) e 2'-desoxicitidina (dCyd).

Figura 1.6. Adutos de DNA formados pela reação entre a dGuo, dAdo e dCyd e alguns produtos de lipoperoxidação. Adaptado de Medeiros, 2009.

O *trans, trans*-2,4-decadienal (DDE) é um aldeído amplamente distribuído no ambiente. Ele é encontrado como contaminante em água e comidas, como carnes, peixes e pães, é um dos aromatizantes mais importantes em molhos preparados com carne/vegetais (Christlbauer et al., 2009). O DDE é citotóxico em diversos modelos celulares, afetando a viabilidade e crescimento celulares, além dos níveis de glutathione intracelular e formação de 8-oxodGuo (Kaneko *et al.*, 1987; Kaneko *et al.*, 1988; Nappez *et al.*, 1996; Wu *et al.*, 2004). Este aldeído também promove desacoplamento mitocondrial, diminuição da taxa de respiração, lipoperoxidação e diminuição no potencial de membrana interna de mitocôndrias isoladas de fígado de rato (Sigolo et al., 2008).

Nosso laboratório contribuiu na área, verificando que o DDE é um agente alquilante versátil, sendo capaz de gerar, após epoxidação, cinco adutos na reação com a dAdo e pelo menos três adutos na reação com a dGuo. A caracterização da estrutura química completa desses adutos foi realizada e sua possível rota de formação proposta. Observamos, também, que estes mesmos adutos são formados na reação com DNA *in vitro*. Na verdade, o DDE produz os mesmos adutos esperados como produtos de reação com o HNE, 2-octenal e o 4,5-dihidroxi-2-decenal, três conhecidos produtos da peroxidação lipídica (figura 1.7) (Carvalho et al., 2000; Carvalho et al., 1998; Loureiro et al., 2000).

Figura 1.7. Mecanismo de formação do 1,N²-εdGuo a partir da reação entre DDE e dGuo.

Adaptado de Loureiro et al., 2000.

1.4. Eteno Adutos

Dentre os adutos exocíclicos de DNA, os eteno adutos têm sido amplamente estudados nos últimos 30 anos, já que fazem parte de uma classe de lesão em DNA formada a partir de diversos carcinógenos genotóxicos, como revisado por Nair (Nair *et al.*, 1999; Nair *et al.*, 2007). Estes adutos foram descritos pela primeira vez por Kochetkov (Kochetkov *et al.*, 1971), que os identificou como análogos fluorescentes em estudos bioquímicos e sondas estruturais de ácidos nucleicos (Leonard, 1992). O interesse neste tipo de lesão também se deve ao fato de sua formação *in vitro* ter sido verificada por metabólitos do cloreto de vinila, tais como: óxido de cloroetileno e 2-cloroacetaldeído e pelo carcinógeno uretano, via seus intermediários epóxidos (Awada *et al.*, 2001; Petrova *et al.*, 2007).

Diversos adutos exocíclicos de DNA reconhecidamente pró-mutagênicos, como ϵ dAdo, ϵ dCyd e $N^2,3$ - ϵ dG foram detectados em níveis basais em tecidos de roedores e humanos não expostos a nenhum composto carcinogênico (Chung *et al.*, 1996; Maciejewska *et al.*, 2010; Meerang *et al.*, 2008; Nair *et al.*, 2007). Estudos em sistemas *in vitro* também demonstraram que os adutos 1, N^6 -etenoadenina (ϵ A) e 3, N^4 -etenocitosina (ϵ C) são formados durante a lipoperoxidação induzida por ferro em misturas de incubação de microssomas de fígado de rato na presença de nucleosídeos ou nucleotídeos (el Ghissassi *et al.*, 1995). Níveis aumentados dos adutos ϵ dAdo e ϵ dCyd, provavelmente devido à excessiva geração de produtos da lipoperoxidação, foram detectados em DNA de fígado de ratos da linhagem *Long-Evans-Cinnamon* conhecidos por acumularem cobre no fígado (Nair *et al.*, 1995). Estes adutos também foram encontrados em níveis aumentados em ratos tratados com ácido linoléico, oléico e óleo de coco (Fang *et al.*, 2007).

Os primeiros estudos que mostraram propriedades pró-mutagênicas dos adutos foram reportados em 1981, trabalhos revisados por Nair e Barbin (Barbin, 2000; Nair *et al.*, 1999). Hoje, as propriedades pró-mutagênicas das eteno bases estão bem estabelecidas.

As quatro eteno bases induzem principalmente substituições em pares de bases. Nos primeiros estudos de mutagenicidade foram utilizados oligonucleotídeos modificados por cloroacetaldeído, ou óxido de cloroetileno. Dentre os adutos formados, a 1,*N*⁶-etenodesoxiadenosina (ϵ dAdo) direcionou a incorporação de dGuo, resultando em transversões AT $\rightarrow$ CG e AT $\rightarrow$ TA e transições AT $\rightarrow$ GC (Basu *et al.*, 1993; Pandya *et al.*, 1996). A mutagenicidade da 3,*N*⁴-etenodesoxicitosina (ϵ dCyd) também foi estudada e verificou-se que este aduto induz transições CG $\rightarrow$ TA e transversões CG $\rightarrow$ AT (Palejwala *et al.*, 1993), e que estas incorporações erradas são catalisadas pela polimerase alfa (Shibutani *et al.*, 1996). *N*²,3-Etenodesoxiguanosina (*N*²,3 ϵ dGuo) difere dos outros eteno derivados por ser uma espécie mutagênica muito eficiente e induzir transições GC $\rightarrow$ AT (Cheng *et al.*, 1991). O 1,*N*²-etenodesoxiguanosina (1,*N*²- ϵ dGuo) induziu transversões GC $\rightarrow$ TA e GC $\rightarrow$ CG (Langouet *et al.*, 1998; Langouet *et al.*, 1997). Recentemente, foi discutido que a DNA polimerase κ produz deleções do tipo “frame shift” quando copia uma fita de DNA não modificada e mais frequentemente, ultrapassa (“bypass”) uma molécula de 1,*N*²- ϵ dGuo (Zhang *et al.*, 2009).

A extensão e o tipo de mutações induzidas *in vitro* não são, necessariamente, as mesmas encontradas *in vivo*. Em um sistema bacteriano, foi reportado uma pequena porcentagem (0,14%) de transições A $\rightarrow$ G por ϵ dAdo (Basu *et al.*, 1999). Já Pandya & Moriya usando células de rim, verificaram uma alta frequência de transições A $\rightarrow$ G, além de mutações A $\rightarrow$ T e A $\rightarrow$ C (Pandya *et al.*, 1996). Para ϵ Cyd, outro estudo verificou que T, A e C foram inseridas em oposição a ϵ Cyd, levando a um alto nível de transições e transversões (Moriya *et al.*, 1994). Basu e col. verificaram em células de camundongo que as mutações ϵ dAdo e ϵ Cyd ocorrem com 70 e 81 % de frequência, respectivamente. No entanto, neste mesmo trabalho foi verificado que as transições A $\rightarrow$ G e as transversões C $\rightarrow$ A são mais abundantes do que as demais. Além disso, experimentos de RMN

demonstraram que todas as mutações envolvendo ϵ Cyd são estabilizadas por pontes de hidrogênio (Basu *et al.*, 1999). O 1, N^2 - ϵ dGuo apresentou cerca de 2% de mutações em células COS-7 tratadas com cloreto de vinila, sendo transvesões G $\rightarrow$ T as mais intensas (Fernandes *et al.*, 2005).

1.5. Adutos de DNA e exposição a poluentes

O desenvolvimento e uso de biomarcadores específicos para correlacionar níveis ambientais de determinada substância com risco a saúde tem recebido interesse crescente (Paoletti, 1995). Sato e col. investigaram a produção de adutos de DNA em ratos expostos ao ar poluído na cidade de Kawasaki no Japão (Sato *et al.*, 2003). Os níveis de adutos em DNA mostraram-se significativamente mais elevados no pulmão dos animais expostos quando comparados com animais que receberam ar sem poluentes, indicando que medidas de lesão em DNA podem ser úteis para investigar o efeito de poluentes presentes no ar e riscos para a saúde humana.

O crotonaldeído, por exemplo, um aldeído α,β -insaturado e produto da lipoperoxidação, é um conhecido agente genotóxico, mutagênico e carcinogênico, está presente na fumaça de cigarro e poluição do ar, produz propano adutos com DNA em humanos que estão expostos a este composto em seus ambientes de trabalho (Eder *et al.*, 2001; Eder *et al.*, 1996; Eder *et al.*, 1999; IARC, 1995; Minko *et al.*, 2009).

Peluso e col. verificaram em estudos no Centro Europeu de Investigação Prospectiva de Nutrição e Câncer (EPIC), que o nível de adutos de DNA está aumentado em humanos expostos a grandes quantidades de ozônio (O_3), sugerindo que a presença destes adutos em leucócitos, podem estar associados ao desenvolvimento de câncer de fígado em não fumantes (Peluso *et al.*, 2005).

Dentre os adutos de DNA mais estudados como biomarcadores de exposição a poluentes estão os derivados de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. Esta classe de

compostos é comprovadamente mutagênica e pode formar diversos adutos de DNA característicos por possuírem grandes inserções nas bases nitrogenadas, dentre eles destacam-se, os adutos formados com adenina e guanina (Kelvin *et al.*, 2009; Obolenskaya *et al.*, 2010).

1.6. Acetaldeído

Especialmente nas últimas décadas diversos estudos têm apontado um aumento da concentração de poluentes na atmosfera, em grande parte, as causas deste fenômeno estão associadas à atividade humana, tendo destaque o aumento exponencial da aplicação de energia na transformação de bens, da atividade industrial, e do crescente número de veículos movidos a combustíveis fósseis. Uma preocupação que tem chamado atenção é a possibilidade de alterações que tais atividades provocam na Terra. O aumento das concentrações destas substâncias na atmosfera, sua deposição no solo, vegetais e materiais são responsáveis por danos à saúde, principalmente respiratórios (Finlayson-Pits *et al.*, 2000).

É interessante notar que De Martins e col. analisando a genotoxicidade de extratos orgânicos coletados do ar da cidade de São Paulo observaram que a fração que continha cetonas, aldeídos e ácidos carboxílicos foi a que apresentou maior mutagenicidade (De Martins *et al.*, 1999).

No Brasil, o Programa de Controle da Poluição do Ar por Veículos Automotores (Proconve) estabeleceu um cronograma de redução gradual da emissão de poluentes para veículos leves (automóveis) e para veículos pesados (ônibus e caminhões) a partir de 1998. Os níveis foram diminuídos de 150 mg/Km para 30 mg/Km nos veículos de até 1700 Kg, e 60 mg/Km nos acima deste peso.

Estudos realizados por Abrantes nos laboratórios da Cetesb (Abrantes *et al.*, 2005) demonstraram altas emissões de aldeídos, principalmente formaldeído e acetaldeído, em níveis acima dos valores regulamentados pelo Proconve nos carros movidos a óleo diesel.

Recentemente, níveis elevados de acetaldeído foram detectados nas áreas de pouso e decolagem do aeroporto nacional do Rio Janeiro Santos-Dumont (Guimarães *et al.*, 2010).

O acetaldeído é um composto comprovadamente mutagênico e carcinogênico, pode ser formado endogenamente como principal produto da oxidação do etanol, alcançando no fígado concentrações maiores que 143 μM , 40 minutos após a ingestão de etanol (Visapaa *et al.*, 2004; Yokoyama *et al.*, 2008). Além disso, quantidades pequenas do aldeído são produzidas durante o catabolismo da treonina (Ogawa *et al.*, 2000). Exogenamente, o aldeído é absorvido por inalação e também pelo trato gastrointestinal, por estar presente em diversos alimentos, bebidas alcoólicas (Lachenmeier *et al.*, 2008), fumaça do cigarro (920 μg por cigarro) (Chepiga *et al.*, 2000), e como produto da combustão de álcool e diesel.

A fonte mais importante de acetaldeído no corpo humano é via o metabolismo do etanol, que é convertido a acetaldeído pela aldeído desidrogenase (ALDH), principalmente pela ALDH2 hepática. Aproximadamente, 50% da população sul asiática possui esta enzima inativada devido à substituição de um aminoácido. Estes indivíduos possuem maior risco de câncer de esôfago, quando ingerem grandes quantidades de álcool (Baan *et al.*, 2007; Crabb *et al.*, 2004).

1.7. Lesões em DNA promovidas por acetaldeído

Está demonstrado que o acetaldeído, induz mutações (transições G→A e transversões G→T), quebra de cromátides irmãs nas células da medula espinhal de roedores e em cultura de linfócitos humanos (IARC, 1985; IARC, 1995). O acetaldeído é carcinogênico em ratos e hamsters, induzindo tumores do trato respiratório após inalação. Tais efeitos, mutagênico e carcinogênico do acetaldeído, são devido à alta reatividade, já que por ser um forte agente eletrofílico reage com grupos nucleofílicos, como por exemplo,

amino e sulfidril de proteínas para formar adutos. (De Benedetto *et al.*, 2009; Gapstur *et al.*, 1992; Nicholls *et al.*, 1992; Niemela, 1993; Warnakulasuriya *et al.*, 2008; Worrall *et al.*, 1993). Além disso, o acetaldeído também é capaz de reagir covalentemente com bases nitrogenadas formando adutos de DNA. Tais lesões têm sido detectadas em humanos e podem estar envolvidas em possíveis mecanismos associados a ingestão de álcool e risco de câncer (Brooks *et al.*, 2005; Fang *et al.*, 1997; Matsuda *et al.*, 2006).

A formação de adutos de DNA se dá pela adição de uma, duas ou três moléculas de acetaldeído que reagem em condições fisiológicas de forma quimio e régio seletiva com o amino grupo exocíclico da 2'-desoxiguanosina, levando a um produto majoritário facilmente hidrolisado (base de Schiff), N^2 -etildeoxiguanosina (N^2 -etildGuo) (Wang *et al.*, 2000).

A presença de 1, N^2 -etildGuo, já foi demonstrada em granulócitos e linfócitos de pacientes alcoólatras e em cultura de células humanas bucais após tratamento com agente redutor, NaBH_4 , (Balbo *et al.*, 2008; Fang *et al.*, 1997). Além disso, também tem sido apontado como um possível gerador de transversões $\text{G} \rightarrow \text{C}$ *in vivo* (Matsuda *et al.*, 1999; Terashima *et al.*, 2001).

Minoritariamente, também foram reportados como produtos de reação de acetaldeído com dGuo, a formação de N^2 -(6-metil-1,3-dioxan-4-il) deoxiguanosina e dois isômeros óticos de 1, N^2 -propanodeoxiguanosina (6S,8S e 6R,8R - 1, N^2 -propanodGuo), os mesmos adutos formados pela reação do crotonaldeído com dG (Hecht *et al.*, 2001). O 1, N^2 -propanodGuo é formado no DNA em equilíbrio nas formas aberta e fechada, a primeira é mais favorável no DNA fita simples e a segunda na dupla hélice (Cho *et al.*, 2006). A figura 1.8 apresenta um esquema da formação de 1, N^2 -propanodGuo, pela reação entre a dGuo com acetaldeído ou crotonaldeído.

Figura 1.8. Principais adutos da reação de dGuo com acetaldeído.

Porém, o interesse no 1,*N*²-propanodGuo, vem aumentando desde que Wang e col. (Wang et al., 2000) apresentaram a formação deste aduto como um segundo produto que se formava juntamente com *N*²-etilidGuo na reação de acetaldeído com dGuo e DNA. Posteriormente, Sako e col. (Sako et al., 2003; Sako et al., 2002) demonstraram que a formação de propano adutos se dá em presença de aminoácidos, como lisina e arginina, em reação com dGuo e *in vivo* nas histonas dos nucleossomos que são ricas em L-arginina e L-lisina. Este fato impulsionou muitos pesquisadores a procurar melhores resultados com metodologias mais sensíveis, como Zhang e col. (Zhang et al., 2006), que mostraram utilizando técnicas de separação por HPLC acoplado a espectrometria de massas, a formação endógena dos isômeros de 1,*N*²-propanodGuo em órgãos normais (pulmão e fígado) de humanos.

Brooks e col. (Brooks et al., 2005) propuseram um mecanismo simplificado que relaciona desde a reação do acetaldeído com DNA até a formação de câncer, passando pela formação de 1, *N*²-etilidGuo, 1,*N*²-propanodGuo de cadeia fechada que pode levar a mutagênese, pois afeta o pareamento entre dG e dC (de los Santos et al., 2001) e 1,*N*²-propanodGuo de cadeia aberta que favorece a formação de ligações cruzadas entre DNA-DNA e DNA-proteína (de los Santos et al., 2001; Kuykendall et al., 1992; Mao et al., 1999; Speit et al., 2008). Este mecanismo propõe, baseado em dados da literatura, que sistemas de reparo (incluindo NER e proteína de recombinação homóloga (Yang et al., 2002; Yang et al., 2001), troca de cromátides irmãs (Obe *et al.*, 1987), aumento de polimerases como TLS (Minko et al., 2003) e aberrações cromossômicas levam formação de câncer (Obe et al., 1979). A proposta de como o 1,*N*²-propanodGuo desencadearia o aparecimento de câncer, adaptado de Brooks e col., está esquematizado na figura 1.9.

Figura 1.9. Proposta de rota para a formação do câncer a partir da reação de acetaldeído com dGuo, adaptado de Brooks e col. (Brooks et al., 2005).

1.8. Níveis e métodos de detecção

Muitos métodos de detecção de adutos de DNA vêm sendo desenvolvidos. Dentre estes métodos destacam-se ^{32}P - *postlabeling*, imunoenaios utilizando anticorpos monoclonais, HPLC acoplada a detecção por espectrometria de massa, fluorescência ou eletroquímica. Métodos como o *postlabeling*, possuem alta sensibilidade, mas baixa especificidade. Já os imunoenaios são altamente específicos, entretanto, pouco sensíveis (Blair, 2008; Koc *et al.*, 2002; Medeiros, 2009).

As técnicas que utilizam a espectrometria de massas são altamente específicas devido à capacidade em fornecer informação estrutural e inequívoca na quantificação do aduto através do uso de padrões internos isotopicamente marcados. Além disso, são muito sensíveis detectando em torno de ato mol (amol) nos equipamentos mais modernos. Esta técnica está em constante desenvolvimento, a cada ano são lançados instrumentos que variam em *design* e nos métodos de injeção e ionização de amostras. Com este desenvolvimento contínuo esta técnica atualmente é a mais utilizada na quantificação de moléculas como adutos de DNA (Koc *et al.*, 2002; Medeiros, 2009; Taghizadeh *et al.*, 2008).

Muitos artigos publicados até o momento apresentam diferentes métodos de quantificação de adutos de DNA, formados nas diferentes bases nitrogenadas. Vale ressaltar que nosso laboratório foi o primeiro a detectar por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa (LC-MS/MS) níveis basais de eteno adutos de dGuo, $1,7 \text{ } 1, N^2\text{-}\epsilon\text{dGuo} / 10^7 \text{ dGuo}$ em DNA de timo de bezerro, $5,22 \text{ } 1, N^2\text{-}\epsilon\text{dGuo} / 10^7 \text{ dGuo}$ em fígado de ratos não tratados e $4,5 \text{ } 1, N^2\text{-}\epsilon\text{dGuo} / 10^7 \text{ dGuo}$ em células CV1-P (Loureiro *et al.*, 2002).

Metodologias para a detecção de adutos de DNA formados pela reação com acetaldeído, também estão sendo amplamente estudadas. Wang e colaboradores desenvolveram metodologias baseadas em HPLC e espectrometria de massas, na quais são detectados níveis muito baixos de $N^2\text{-etildGuo}$, $534 \pm 245 \text{ fmol}/\mu\text{g dGuo}$ em DNA do fígado de humanos, após a adição de NaBH_3CN , no momento da hidrólise (Wang *et al.*,

2006). Inagashi e colaboradores também desenvolveram um método baseado em espectrometria de massas, para a detecção tanto de N^2 -etilidGuo quanto 1, N^2 -propanodGuo, na qual os limites de detecção foram estabelecidos em $3,0 \times 10^{-10}$ e $1,0 \times 10^{-9}$ M, de cada um destes adutos respectivamente (Inagaki et al., 2003).

A detecção de adutos de DNA em amostras de sangue ou tecidos de humanos e animais é bastante empregada na literatura. Recentemente, estão sendo desenvolvidas metodologias não invasivas que detectam estes adutos após excreção na urina, que torna a análise mais simples tanto pela disponibilidade de amostras quanto pela extração do aduto da matriz (Meerang et al., 2008; Mikes et al., 2008; Sun et al., 2006).

Estão reportadas diferentes metodologias baseadas em HPLC acoplado a espectrometria de massas triplo quadrupolo, que analisam diferentes adutos de DNA como 8-oxodGuo, 1, N^2 -eteno-2'-desoxiguanosina, 3, N^4 -eteno-2'-desoxicitidina e 1, N^6 -eteno-2'-desoxiadenosina, (Arab et al., 2008; Caliskan-Can et al., 2008; Chen et al., 2005; Chen et al., 2009; Chen et al., 2004; Hillestrom et al., 2004; Hillestrom et al., 2006; Sun et al., 2006; Taghizadeh et al., 2008; Wu et al., 2004).

No entanto, a detecção de adutos de DNA deve ser bastante criteriosa, uma vez que estes compostos podem decompor durante a manipulação da amostra, como, durante a extração do DNA, armazenamento da amostra e hidrólise. A 8-oxodGuo, por exemplo, possui um potencial de redução menor que a sua precursora dGuo e pode ser facilmente oxidada a outros produtos (Burrows et al., 1998), além de poder ser formada artefactualmente, durante a extração do DNA e subsequentes manipulações (Badouard et al., 2008; Ravanat et al., 2002). Recentemente, Blair e col. demonstraram experimentalmente que os níveis de 8-oxodGuo apresentados na literatura são em muitos casos maiores dos que os níveis formados no DNA e que, a adição de antioxidantes é crucial durante todo o processo de manipulação da amostra, minimizando a formação artefactual do aduto (Mangal et al., 2009).

1.9. Reparo de DNA

Enzimas com função específica de reparar o DNA monitoram continuamente os cromossomos corrigindo os danos causados aos nucleotídeos por agentes carcinogênicos e citotóxicos de origem endógena e exógena. Tais agentes induzem diferentes tipos de lesões em DNA, que são geralmente reparados especificamente. Os mecanismos de reparo de DNA podem ser por excisão de base nitrogenada (BER), excisão de nucleotídeo (NER), por mau emparelhamento (MMR), ligação de terminações não homólogas (NHEJ), recombinação homóloga (HRR), anelamento de fita simples (SSA), reparo de ligações cruzadas (FANC), etc. O mau funcionamento do sistema de reparo induz uma série de respostas celulares como morte, aberrações cromossômicas, mutações, etc.

Lesões oxidativas, como a 8-oxodGuo e eteno adutos são reparadas preferencialmente por BER ou NER. O reparo por BER envolve a retirada da base modificada pela ação de glicosilase específica, por exemplo, FPG (formamido pirimidina DNA glicosilase) e alquil-N-purina-DNA-N-glicosilase (APNG), respectivamente (Boiteux *et al.*, 2002; Dosanjh *et al.*, 1994; Saparbaev *et al.*, 2002; Velez-Cruz *et al.*, 2005). O sítio abásico formado é aberto através da quebra da ligação ribose-fosfato, para a inserção de um novo nucleotídeo pela polimerase β ou δ/ϵ , que em seguida é ligado pela ação da DNA ligase (Wilson *et al.*, 2007; Wood *et al.*, 2001).

O reparo de eteno bases também pode ser mediado pela ação de outras glicosilases como uracila-DNA-glicosilase - MUC (específica de reparo por mis-match expressa em *E.Coli*), a 3-metiladenina-DNA-glicosilases (AlkA e AlkB), também de *E.Coli*, e a timina-DNA glicosilase humana (TDG) (Hang *et al.*, 2007; Maciejewska *et al.*, 2010; Matijasevic *et al.*, 1992; Singer *et al.*, 1992). O reparo de 1, N^2 - ϵ dGuo, também, já foi apresentado como sendo específico de APNG e MUC em oligonucleotídeos que continham a modificação. No entanto, MUC é a enzima que remove a lesão mais eficientemente, pois apresenta relação entre K_{cat}/K_m cerca de 9 vezes maior (Saparbaev *et al.*, 2002).

Já, o 1, N^2 -propanodGuo é reparado por diversos mecanismos como NER, HRR e por reparo acoplado a replicação (do inglês – replication-coupled repair RCR), pois este aduto, como discutido anteriormente, forma ligações cruzadas e aberrações cromossômicas (Andersson *et al.*, 1996; De Silva *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2006; Moynahan *et al.*, 2001). Estudos em células de ovários de hamsters deficientes em reparo de DNA mostraram que HRR é o mais importante sistema de defesa frente aos danos causados pelo acetaldeído (Mechilli *et al.*, 2008).

Pacientes com anemia de Fancomi, patologia caracterizada por possuir deficiência no sistema de reparo de ligações cruzadas, apresentam maior suscetibilidade à exposição ao acetaldeído, avaliado pela frequência de aberrações cromossômicas nos linfócitos destes pacientes. De fato, o sistema de reparo do tipo anemia de Fancomi foi o segundo mais importante em células de ovários de hamsters deficientes em diversos tipos de reparo durante exposição ao acetaldeído (Mechilli *et al.*, 2008; Natarajan *et al.*, 2008; Obe *et al.*, 1979).

1.10. Apoptose

Apoptose e necrose são dois mecanismos de morte celular com características morfológicas e fisiológicas distintas. Apoptose é caracterizada por fragmentação da cromatina, condensação nuclear e citoplasmática, encolhimento e fagocitose da célula. Em contraste, a necrose é uma forma passiva de morte associada com inflamação e algumas formas de injúria, além de inchamento da célula e algumas organelas, o que acarreta fragmentação da membrana plasmática e liberação dos componentes celulares para o meio externo (Gogvadze *et al.*, 2006).

Diferentes agentes tóxicos podem ativar a morte por apoptose ou necrose, dependendo do tipo de célula e da severidade da injúria causada. No entanto, para a ativação da morte por apoptose é necessário que sejam mantidos níveis de energia

suficientes e estado redox compatível para a ativação das vias celulares pró- apoptóticas, como as caspases (família de cisteína endopeptidases intracelulares que clivam proteínas em resíduos de aspartato específicos) (Salvesen et al., 1997). Dentre os mecanismos conhecidos de ativação da morte, pelas caspases 2, 8 e 10, via “receptor mediador de morte”, e também pela ativação da caspase-9 via liberação do citocromo C e Apaf-1 da mitocôndria para a formação do apoptossomos, as duas convergem para ativação das caspases-3, 6 e 7 que ativarão a DNase responsável pela fragmentação do DNA (Krantic et al., 2005).

A p53 também é uma proteína importante no mecanismo de apoptose, pois leva à morte de células que possuem alto nível de lesões no DNA causadas por espécies reativas de oxigênio (EROs) ou agentes genotóxicos (Levine, 1997). O mecanismo de reconhecimento do DNA fragmentado se dá em três etapas, em que a célula reconhece a lesão, recruta proteínas que interrompem o ciclo celular e então, repara o DNA lesionado ou ativa a morte celular por apoptose. A ativação da morte por apoptose inicia quando duas quinases que se ligam a extremidade do DNA fragmentado (ATM - ataxia telangiectasia mutada e DNA-PK) fosfoliram outras proteínas, como a p53, que transmitem a informação de quebra da dupla fita. A partir do momento em que houve a fosforilação, a p53 forma um tetrâmero estável capaz de se ligar a regiões promotoras do DNA ativando a transcrição de genes pró-apoptóticos, como Bax e Bcl-2 (responsáveis pela formação do póro mitocondrial) (Rich et al., 2000) e reprimindo o gene antiapoptótico Bcl-2 que interage com Bax impedindo sua oligomerização (Danial et al., 2004).

A mitocôndria é uma organela muito importante na regulação das primeiras atividades de ativação da apoptose (Orrenius, 2004), pois o citocromo C presente no espaço intermembrana, é liberado nos primeiros estágios da morte celular pelos póros formados por proteínas Bax e Bcl-2 (Cai et al., 1998; Green et al., 1998), para se complexar com a proteína Apaf-1. O resultado deste complexo é o apoptossomo, que tem por objetivo recrutar, processar e ativar a caspase 9, dependentemente de ATP (Zou et al., 1999).

Subseqüentemente, a caspase 9 cliva e ativa pró-caspases 3 e 7, que são responsáveis por clivar várias proteínas responsáveis por fornecer à célula características bioquímicas e fisiológicas da apoptose (Robertson et al., 2000).

Está demonstrado que alguns tipos de tumores apresentam níveis elevados de p53 mutado, o que pode acarretar mau funcionamento desta proteína resultando em aumento da proliferação celular, diminuição da apoptose e possível desenvolvimento do tumor. Entretanto, alguns autores reportaram que o licopeno está envolvido na proteção da morte por apoptose, pois atua diretamente na fosforilação e expressão da p53, diminuindo sua quantidade, assim como de outros fatores pró-apoptóticos (Bax e caspase 3) na mucosa gástrica de ratos expostos a fumaça de cigarro, prevenindo assim a morte celular por apoptose e o desenvolvimento do tumor (Liu et al., 2006). Todos os mecanismos descritos acima estão esquematizados na figura 1.10.

Figura 1.10. Esquema da morte celular por apoptose via ativação da proteína p53.

Adaptado de (Barbosa, 2008).

Outro parâmetro estudado na morte por apoptose é o aumento da quantidade de cálcio intracelular. Para explicar este fenômeno existem duas teorias bastante discutidas na literatura, a primeira propõe que uma possível depleção dos estoques de Ca^{2+} intracelular ativariam um influxo do metal pela membrana plasmática para dentro da célula, promovendo o aumento da concentração no citoplasma, o que por ativar enzimas catabólicas que compõe a maquinaria efetora, funcionaria como um sinal de início da apoptose. Entretanto, a segunda teoria discute que não é o aumento, mas sim o remanejamento do estoque de Ca^{2+} intracelular, que sai da mitocôndria e do retículo endoplasmático em direção ao citossol, que ativam a apoptose (Zhang et al., 2001). Todavia é consenso que na ativação da apoptose independente do mecanismo ocorrido, existe a diminuição das concentrações do metal na mitocôndria e no retículo acompanhado de um acúmulo no citossol (Roderick et al., 2008).

1.11. Ação antioxidante

É denominado antioxidante qualquer molécula que inibe ou minimiza um processo de oxidação. Do ponto de vista biológico, um antioxidante protege biomoléculas ou estruturas celulares contra os efeitos deletérios de substâncias que promovem a oxidação.

O sistema de defesa endógeno compreende uma série de substâncias que atuam de diferentes formas, para minimizar a geração e a reação de espécies reativas. Os antioxidantes celulares incluem enzimas, substâncias não enzimáticas (ascorbato, tocoferóis, carotenóides, albumina e bilirrubina, por exemplo), proteínas, quelantes, compostos fenólicos e amino aromáticos.

Enzimas antioxidantes, como catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) e superóxido dismutase (SOD), tem por objetivo manter controladas as concentrações intracelulares de $\text{O}_2^{\cdot-}$ e hidroperóxidos orgânicos, como H_2O_2 . A catalase, uma

hemeproteína, está associada aos peroxissomos e tem alta atividade no fígado (Marklund *et al.*, 1982). CAT, assim a SOD, realiza uma reação de dismutação reduzindo o H_2O_2 em H_2O e oxidando em O_2 (Lardinois, 1995). A GPx catalisa a redução de hidroperóxidos via oxidação da gama-L-glutamil-L-cisteinil-L-glicina (glutathiona reduzida - GSH), formando GSSG e H_2O . Este processo é reciclado pela glutathiona redutase que converte GSSG em GSH, com gasto de NADPH proveniente da via das pentoses (Brigelius-Flohe, 1999; Toppo *et al.*, 2009).

Outra classe de antioxidantes presentes *in vivo* são proteínas e quelantes, como transferrina e ceruloplasmina que transportam ferro e cobre impedindo que eles estejam livres e catalisem reações, como a de Fenton, quando em contato com H_2O_2 formando $\text{HO}^\bullet$ (Hentze *et al.*, 2004). Outro antioxidante bastante importante é a GSH, um tripeptídeo de glicina, cisteína e ácido glutâmico (Figura 1.11), reage diretamente com espécies reativas como ONOO^- , $\text{RO}^\bullet$, $\text{RO}_2^\bullet$, $\text{HO}^\bullet$ e $^1\text{O}_2$. GSH também desempenha papel importante como cofator de enzimas como GPx, glioxilase, prostaglandina endoperóxido isomerase, participa do metabolismo de ascorbato e desempenha função importante na comunicação entre as células ("gap junctions") (Barhoumi *et al.*, 1993; Schafer *et al.*, 2001). Participam, também, no processo de detoxificação de diversas substâncias, como xenobióticos e peróxidos, pela ação de enzimas como glutathiona-S-transferase e glutathiona peroxidase. GSH também pode autooxidar em presença de íon cobre e ferro, dando origem a radical tiila ($\text{GS}^\bullet$ e $\text{GSS}^\bullet\text{G}$), que são intermediários na geração de glutathiona oxidada e espécies reativas de oxigênio (H_2O_2 , $\text{O}_2^{\bullet-}$, $\text{HO}^\bullet$) (Wu *et al.*, 2004).

Figura 1.11. Formação de GSSG a partir da oxidação de GSH

1.11.1. Carotenóides: atividade pró e antioxidante

Carotenóides são pigmentos fotossintéticos encontrados no tecido de vegetais, e por isso, são adquiridos pelos humanos pela dieta, principalmente na ingestão de frutas e verduras. Esses compostos têm sido apontados como agentes protetores em algumas formas de câncer, como de esôfago, cervical e gástrico, além de algumas formas de doenças degenerativas como catarata e doenças do coração (Burri, 1997; Mayne, 1996; Tebbe, 2001; Zadak *et al.*, 2009).

A maior função de aproximadamente 50 dos 600 carotenóides na natureza é sua conversão à vitamina A (Sies *et al.*, 1995). Nos humanos o principal carotenóide com esta função é o β -caroteno (Halliwell *et al.*, 2007). A disponibilidade dos carotenóides das matrizes dos alimentos, sua solubilização no intestino, que requer a presença de gorduras e ácidos conjugados da bile, e sua absorção nas mucosas intestinais são processos biológicos importantes. Uma vez nas células, os carotenóides são metabolizados pela clivagem oxidativa por uma ou mais rotas para formarem retinal, ácido retinóico (vitamina A) e pequenas quantidades de produtos de clivagem, os β -apocarotenais (Sies *et al.*, 1995).

Carotenóides são transportados por lipoproteínas no plasma, estando associados, principalmente, a lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e as xantofilas, carotenóides que contêm átomos de oxigênio, estão distribuídas entre as LDL e lipoproteínas de alta densidade (HDL) (Olson et al., 1995).

Muitos estudos epidemiológicos foram realizados para se verificar a possível relação entre a concentração dos carotenóides nos tecidos ou plasma e a incidência de doenças (Haseen *et al.*, 2009; Musa-Veloso *et al.*, 2009; Riccioni, 2009). Grande parte destes estudos em que se suplementavam carotenóides à dieta, foi realizada utilizando-se o β -caroteno. Uma das razões para isto, é que ele é um dos mais disponíveis em forma de suplementos comerciais e porque até então, já existiam dados mostrando a baixa toxicidade de suas doses farmacológicas em humanos. As indicações são que carotenóides, provavelmente em associação com uma variedade de outros componentes das frutas e vegetais, parecem possuir efeitos protetores contra pelo menos algumas doenças crônicas e condições pré-carcinogênicas (Sies et al., 1995). Estudos realizados na China com β -caroteno mostraram uma diminuição nos casos de câncer gástrico e de esôfago (Mayne, 1996).

Resultados do "Alpha-Tocopherol, Beta-Carotene (ATBC) Cancer Prevention Study" também apontaram para uma atividade pró-oxidante do β -caroteno em uma triagem de intervenção clínica que indicou uma tendência de aumento na incidência de câncer no pulmão de fumantes finlandeses para os quais foram dados β -caroteno como agente preventivo (Heinonen *et al.*, 1994). Outros estudos demonstraram que concentração excessiva, retinol e retinal (metabólitos do β -caroteno) induzem danos oxidativos em DNA via geração de superóxido ($O_2^{\bullet-}$) (Murata et al., 2000). No entanto, também foi apresentado nenhum efeito deste carotenóide na formação de tumores de pulmão (Gallicchio *et al.*, 2008). Além disso, foi reportado que tanto β -caroteno quanto o licopeno quando oxidados

levam ao aumento de 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OH-dGuo) em fibroblastos humanos de prepúcio e em DNA de timo de bezerro (Yeh *et al.*, 2001).

O licopeno (figura 1.12), um carotenóide presente no tomate, está associado à proteção contra algumas patologias. Demonstrou-se, por exemplo, que o risco de desenvolvimento de câncer de próstata é tanto menor quanto maior o nível de licopeno no sangue e nos tecidos de humanos (Clinton *et al.*, 1995; Kristal *et al.*, 2000). Um dos mecanismos de ação do licopeno é a atividade antioxidante sendo que dentre os 50 tipos de carotenóides, ele é o que apresenta maior efeito protetor contra reações de oxidação (Di Mascio *et al.*, 1989). Outros mecanismos de proteção também já apresentados na literatura como a diminuição da proliferação celular, efeito hipocolesterolêmico, modulação da via da ciclo-oxigenase além de também estar envolvido nos processos inflamatórios (Heber *et al.*, 2002). Mais recentemente, foi demonstrado o efeito protetor gastrointestinal do carotenóide em ratos *Wistar* submetidos a radioterapia (Andic *et al.*, 2009). Entretanto, também foram reportados alguns estudos mostrando a atividade pró-oxidante *in vitro* (Lowe *et al.*, 1999; Yeh *et al.*, 2000) e pró-apoptótica em linfócitos T malignos e em fibroblastos expostos a fumaça de cigarro após exposição ao licopeno (Muller *et al.*, 2002; Palozza *et al.*, 2005).

Figura 1.12. Estrutura do licopeno e β -caroteno

2. OBJETIVOS E METAS

Este projeto teve como objetivo avaliar efeitos deletérios de acetaldeído, endógeno e exógeno, através da quantificação de adutos de DNA para a possível utilização como biomarcadores de estresse redox e exposição ao aldeído.

Para isso, teve como metas desenvolver metodologias sensíveis baseadas em HPLC acoplado a espectrometria de massa para avaliar e quantificar a formação deste adutos no DNA de células e animais experimentais expostos ao acetaldeído (via intraperitoneal, oral e respiratória) e também, na urina de humanos.

Para contribuir na compreensão dos mecanismos moleculares de toxicidade do acetaldeído, os níveis destas lesões no DNA de células e em animais expostos foram comparados a outros biomarcadores de estresse oxidativo como lipoperoxidação e fragmentação do DNA. Além disso, o efeito protetor promovido pelo licopeno foi avaliado frente aos danos gerados pelo acetaldeído em células em cultura.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Reagentes

Todos os reagentes utilizados foram da mais alta pureza comercialmente disponíveis.

Soro fetal bovino (SFB) e penicilina potássica foram provenientes da Atena Biotecnologia (Campinas, SP, Brasil). Ácido fórmico, metanol, ácido clorídrico, ácido fosfórico, ácido perclórico, acetonitrila, isobutanol, 2-propanol e 2-cloroacetaldeído foram obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha). [$^{15}\text{N}_5$]-2'-Desoxiguanosina foi fornecida por Cambridge Isotope Laboratories (Andover, MA). Filtros Ultrafree-Mc (poro: 0,22 μm) pela Millipore (Bedford, MA). Bio-Rad protein assay fornecido pela Bio-Rad Laboratories (Herculas, CA). Acetaldeído, 2'-desoxiguanosina, bicarbonato de sódio, cloreto de sódio, sulfato de estreptomicina, cloreto de potássio, fosfato de sódio dibásico e monobásico, tripsina, ácido etilenodiaminatetraacético (EDTA), dodecil sulfato de sódio (SDS), triton X-100, tris(hidroximetil)aminometano (TRIS), butilato de hidroxitolueno (BHT), ácido 2-tiobarbitúrico, brilhante blue G, dimetil formamida, azul de tiazolil (MTT), dimetil sulfóxido (DMSO), fosfatase alcalina, nuclease P1, clorofórmio, carbonato de sódio, ribonuclease A e T1, proteinase K, meio eagle modificado por dulbecco (DMEM), e os demais reagentes não citados foram fornecidos pela Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO).

A água foi deionizada em um sistema Milli-Q (Millipore, Billerica, MA).

3.2. Equipamentos

Os espectros de absorbância foram adquiridos em um detector de fotodiodos modelo SPD-M10AV ou SPD-M10A/VP da Shimadzu (Shimadzu, Kyoto, Japão). As centrifugações realizadas em modelos 5403 e 5408 R da Eppendorf (Hamburg, Alemanha), Himac CR21E da Hitachi, além da centrífuga para frascos Eppendorfs, não refrigerada. As incubações que necessitavam de agitação foram feitas em um Orbital Incubator Shaker, Gyromax TM 703 (Amerex Instruments, Lafayette, CA) e Termomixer R da Eppendorf. As observações microscópicas foram feitas em um microscópio invertido Diaphot 300 da Nikon (Tokyo, Japão). As soluções foram autoclavadas em autoclave vertical modelo 415 da Fanem (São Paulo, Brasil). As medidas de pH foram feitas em um pHmetro da Corning modelo 320 (Sigma) e PB-11 da Sartorius (Goettingen, Alemanha). As incubações em banho-maria foram feitas em banho modelo 144 da Fanem (São Paulo, Brasil) e 510 DI Delta (Belo Horizonte, Brasil). As células foram incubadas em uma estufa de CO₂ Napco®, modelo 5100 da Precision Scientific (Chicago, Illinois). Foram utilizados, balança analítica da A&D Company (Tokyo, Japan) e balança APX 602 da Denver Instrument (Göttingen, Alemanha) e um módulo para esterilização do ar, equipado com luz UV (EACI/ENVIRCO Environmental Air Control (Albuquerque, NM)).

Os outros equipamentos utilizados serão descritos nas técnicas específicas.

3.3. Síntese, purificação e caracterização de adutos de DNA

Os adutos foram sintetizados baseando-se em metodologias apresentadas nos itens abaixo:

3.3.1. Síntese e purificação de 8-oxodGuo

A síntese foi realizada em três etapas, sendo a 8-bromo-2'-desoxiguanosina (8-BrdGuo) produto intermediário para a síntese da 8-(benziloxi)-2'-desoxiguanosina que por sua vez é convertida em 8-oxodGuo. O aduto foi purificado por HPLC em gradiente de MeOH e H₂O, como descrito por Lin e col. (Lin et al., 1985).

3.3.2. Síntese e purificação de 1,N²- ϵ dGuo

À uma solução 0,04 nmol de dGuo em tampão fosfato 50 mM, pH 6,4, foram adicionados 0,6 mmol de solução de cloroacetaldeído 2 M. Posteriormente a mistura foi incubada por 96 h, e o produto purificado por cromatografia líquida (Loureiro et al., 2000).

3.3.3. Síntese, purificação e caracterização de 1,N²-propanodGuo

A síntese de 1,N²-propanodGuo foi baseada na metodologia apresentada por Sako e col. (Sako et al., 2002). À 25 μ mol de 2'-desoxiguanosina, dissolvidos em 2 ml de tampão fosfato 100 mM, pH 8, foram adicionados 50 μ l de acetaldeído e 0,05 mmol de lisina, a qual atua como catalisador para esta reação. A incubação foi agitada a 500 rpm, 37 °C, por 24 h. Em seguida o aduto formado foi purificado por cromatografia líquida, segundo a metodologia descrita abaixo.

Os produtos foram eluídos em um sistema de HPLC Shimadzu (Shimadzu, Kyoto, Japan) sendo usado para separação da amostra coluna analítica Luna C18(2) 250 mm x 4.6 mm i.d., 5 μ m (Phenomenex, Torrance, CA), e um método gradiente de água e acetonitrila, descrito na tabela 3.1.

Tabela 3.1. Gradiente de purificação de 1,*N*²-propanodGuo formado após reação entre dGuo e acetaldeído.

<i>Intervalo de tempo (min)</i>	<i>% de acetonitrila</i>	<i>Fluxo (mL/min)</i>
0 – 30	0 - 8,0	0,8 - 0,5
30 – 50	8,0 - 15,0	0,5 - 0,6
50 – 60	15,0 - 50,0	0,6
60 – 65	50,0 - 0	0,6 – 0,8
65 – 70	50,0 - 0	0,8

Para a caracterização molecular dos picos coletados por HPLC, foram realizadas análises de espectrometria de massas, em um espectrômetro com analisador Ion Trap, LC – MS/MS (n) – Bruker Daltonics Esquire 300 Plus, e também, análises de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ¹H e ¹H–¹H COSY, em D₂O, em um espectrômetro Bruker DRX500, o qual operou em 500 MHz a uma temperatura média de 300 K. Os isômeros foram identificados por dicroísmo circular com a utilização de um espectro-polarímetro Jasco J-720 em cela de caminho óptico de 1 cm.

3.3.3.1. Determinação do coeficiente de extinção molar do 1,*N*²-propanodGuo

Depois de liofilizados, massas diferentes dos dois isômeros de 1,*N*²-propanodGuo foram resuspendidas em 1 ml de água a fim de que se obtivessem diferentes concentrações. Posteriormente, a absorbância de cada uma destas soluções foi aferida para a construção de uma curva em função da absorbância em 254 nm (na região de máxima absorção para os isômeros) em relação à concentração teórica de cada amostra.

3.3.3.2. Estudo da estabilidade do 1,N²-propanodGuo

A estabilidade dos adutos foi determinada através da avaliação do decaimento da absorbância durante 24 h a partir do tempo inicial de incubação a 37 °C, 300 rpm, nos pHs 3; 5; 7,4 e 10 em água deionizada.

3.4. Desenvolvimento da metodologia para quantificação de 1,N²-propanodGuo e 1,N²- ϵ dGuo por HPLC/ESI/MS-MS em DNA

Foi utilizado um sistema de HPLC Agilent constituído por um autoinjeter Agilent 1200 High performance resfriado a 4 °C, Bomba Agilent 1200 Binary Pump SL, detector Agilent 1200 DAD G1315C, forno de coluna Agilent 1200 G1216B a 18 °C e um software Analyst 1.4.2. As amostras foram, inicialmente, separadas em coluna analítica Luna C18(2) 250 mm x 4.6 mm i.d., 5 μ m (Phenomenex, Torrance, CA), de acordo com o método gradiente de água e acetonitrila, descrito na tabela a seguir:

Tabela 3.2. Gradiente de H₂O e acetonitrila utilizado durante a análise em sistema HPLC/ESI/MS-MS para detecção do 1,N²-propanodGuo e 1,N²- ϵ dGuo.

<i>Tempo (min)</i>	<i>% de acetonitrila</i>	<i>Fluxo (μL/min)</i>
0	10	650
10	40	200
16	30	200
20	60	200
21	40	200
22	90	650
26	90	650
27	10	650
32	10	650

Uma segunda bomba Agilent (1200 Isocratic pump SL) foi usada para alimentar uma segunda coluna Agilent C18(2) 150 mm x 2 mm i.d., 3 μ m com fluxo isocrático (0,2 mL/min) de uma solução (60:40) água e acetonitrila contendo 0.1% ácido fórmico, que estava sendo usada para manter um fluxo constante para o espectrômetro de massa durante a análise. Uma válvula para direcionar o fluxo troca duas vezes de posição: aos 13 min, permitindo que o eluente da primeira coluna, que até o momento era descartado, entre na segunda coluna e em seguida no espectrômetro de massa, e aos 23 min, permitindo a lavagem e o equilíbrio da primeira coluna. O tempo total desta análise é de 37 min.

Os adutos foram analisados com ionização por *electrospray* (ESI) no modo positivo e detecção por monitoramento de reação múltipla (MRM) em um espectrômetro de massa triplo quadrupolo sendo o terceiro quadrupolo uma câmara híbrida íon trap linear (API 4000 Q-TRAP, Applied Biosystems).

Todas as amostras injetadas continham [$^{15}\text{N}_5$]-1, N^2 - ϵ dGuo e [$^{15}\text{N}_5$]-1, N^2 -propanodGuo como padrões internos. As transições m/z escolhidas para os íons 1, N^2 - ϵ dGuo e [$^{15}\text{N}_5$]-1, N^2 - ϵ dGuo $[\text{M}+\text{H}]^+$ foram $292 \rightarrow 176$ e $297 \rightarrow 181$, respectivamente, e para os íons 1, N^2 -propanodGuo e [$^{15}\text{N}_5$]-1, N^2 -propanodGuo $[\text{M}+\text{H}]^+$ foram $338 \rightarrow 222$ e $343 \rightarrow 227$, respectivamente.

Todos os parâmetros do espectrômetro de massa foram ajustados para aquisição da melhor transição $[\text{M}+\text{H}]^+ / [\text{M}+\text{H}-2\text{-D-erythro-pentose}]^+$. Sendo que, *curtain gas* (fluxo de gás que impede a entrada de gotículas de solvente) foi de 25 psi, temperatura 450 °C, gás de nebulização e gás auxiliar 60 psi, voltagem aplicada no spray de íons na Fonte Turbo Ion Spray 5500 V, gás de colisão alto, aquecimento da *interface heater* ativado em 100 °C e o potencial de entrada fixado em 10 V. Para as transições 338-222 e 343-227, foram selecionados 19 V de energia de colisão, o potencial de colisão na saída de Q2 foi de 20 V e a diferença de potencial entre Q0 e a *orifice plate (declustering potential)* em 51 V. Já,

para as transições 222-176 e 227-181 os parâmetros acima foram de 17, 16 e 41 V, respectivamente.

3.4.1. Estudo de formação do 1,N²-propanodGuo em DNA de timo de bezerro

Foram incubados 1 mg de DNA de timo de bezerro por 24 h com acetaldeído em concentrações de 0,5, 1 e 10 mM em tampão fosfato 100 mM, pH 7,4 a 37 °C e 18 °C, na presença ou não de 0,5 mmol de lisina.

3.4.1.1. Precipitação do DNA

Após as incubações, o DNA foi removido do meio reacional por precipitação. Para a precipitação de 1 mg de DNA, adicionou-se 5 µL de acetato de sódio 3 M e 500 µL de isopropanol 100%. A solução foi agitada e centrifugada por 5 min a 10.000 rpm. Por duas vezes, descartou-se o sobrenadante, adicionou-se 500 µL de álcool e fez-se outra centrifugação. Na primeira o álcool utilizado foi isopropanol 60% e na segunda, etanol 70%. Descartou-se o sobrenadante e 500 µL de solução 0,1 mM de mesilato de desferroxamina foram acrescentados para ressuspender o DNA. O DNA foi em seguida hidrolisado como descrito em 3.5.7 e analisado pela metodologia descrita acima (3.4).

3.4.2. Quantificação dos níveis basais de 1,N²-εdGuo e 1,N²-propanodGuo no DNA de células e tecidos de ratos *Wistar*

O DNA de 7 garrafas de 175 cm² com 90% de confluência de fibroblastos normais pulmonares humanos da linhagem IMR-90 foram extraídos sem nenhum tipo de tratamento, conforme descrito em 3.5.6. 100 µg deste DNA foram hidrolisados, como descrito em 3.5.7, para posterior análise por espectrometria de massa na metodologia acima (3.4).

O DNA dos fígados, cérebros e pulmões de 21 ratos *Wistar*, machos com 2 meses de idade, foram extraídos sem nenhum tipo de tratamento, conforme descrito em 3.5.6. 100

µg deste DNA foram hidrolisados, como descrito em 3.5.7, para posterior análise por espectrometria de massa como descrito segundo metodologia descrita acima (3.4).

3.5. Estudos da citotoxicidade e genotoxicidade do acetaldeído em fibroblastos pulmonares humanos

3.5.1. Cultivo de células

Fibroblastos normais pulmonares humanos, linhagem IMR-90 foram cultivados em meio de cultura suplementado, atmosfera com 5% de CO₂, a 37°C, no escuro. As células cresceram aderidas à superfície de garrafas plásticas e foram repicadas em períodos de 4 a 5 dias, conforme atingissem confluência.

Para que as células fossem repicadas, após a retirada do meio, foram lavadas 2 vezes com PBS. A seguir, foram incubadas com volume mínimo (2 ml) de solução de tripsina até que se desprendessem ($\pm$ 2 min). As células foram, então, ressuspensas no meio de cultura suplementado e a suspensão distribuída para novas garrafas ou placas na diluição desejada.

Soluções:

Meio de cultura: Meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado com NaHCO₃ (3.7 g/L), 100 µg/mL de penicilina, 94 µg/mL de sulfato de estreptomicina e 10% de soro fetal bovino (SFB). O meio de cultura sem suplementação com SFB foi esterilizado por filtração através de membrana de 0,22 µm diretamente para o interior de frascos estéreis. Foram utilizados filtros estéreis descartáveis. O SFB estéril foi adicionado a alíquotas do meio também estéril de acordo com a necessidade de uso.

PBS: NaCl 137 mM, KCl 1,68 mM, Na₂HPO₄ 1,47 mM, pH 7,0. Solução autoclavada, volume final 1 L.

Tripsina: 0,05% (p/v) de tripsina em PBS (pH 7,0) contendo EDTA 1 mM. Solução esterilizada por filtração através de membrana de 0,22 μ m diretamente para o interior de frascos estéreis. Volume final 100 mL.

3.5.2. Tratamento de células da linhagem IMR-90

Após as células atingirem a confluência (aproximadamente 90% da placa ou garrafa utilizada), o meio de cultura com soro foi substituído por outro e foram realizados pré-tratamentos com solução de licopeno (20 μ M) por 2 h. Em seguida, o meio foi substituído e as células tratadas com solução de acetaldeído em diferentes concentrações, isoladamente, as quais variaram de 0,5 a 500 mM por 3 h na estufa, em presença de CO₂, a 37°C.

3.5.2.1. Quantificação da concentração de acetaldeído nos tratamentos dos fibroblastos pulmonares humanos - reação com 2,4-dinitrofenilhidrazina

Ao meio de cultura em que as células da linhagem IMR-90 foram tratadas com acetaldeído adicionou-se 1:1 (% v/v) de solução de 2,4-dinitrofenilhidrazina 20 mM em HCl 10M. Após incubação de 2 h a 37 °C, o precipitado foi extraído com clorofórmio 1:1 (% v/v), e este secado com N₂.

O produto formado, após a secagem com N₂, foi ressuspendido em acetonitrila e analisado por HPLC com detecção por fluorescência ($\lambda_{\text{excitação}}$ = 300 nm; $\lambda_{\text{emissão}}$ = 410 nm) em método gradiente de água e acetonitrila, coluna C18 (250 x 4,6 mm, 5 μ m), fluxo 1 mL/min, como demonstrado na tabela abaixo (3.3). Para a quantificação do produto formado foi feita uma curva de calibração do produto da reação de acetaldeído e 2,4-dinitrofenilhidrazina em HCL 10 M, 1:1 (% v:v).

Tabela 3.3. Método gradiente de água e acetonitrila para análise do aduto 2,4-dinitrofenilhidrazina com acetaldeído.

Tempo (min)	% ACN
0	10
50	100
60	100
65	10
75	10

3.5.3. Estudo da viabilidade de células IMR-90 após tratamento com acetaldeído

Inicialmente, as células da linhagem IMR-90 foram desprendidas das garrafas em que estavam com solução tripsina e foram ressuspensas em 20 mL de meio de cultura, dessa solução retirou-se 100 µl onde foram adicionados mais 400 µl de azul de tripan, o qual colore apenas as células mortas, devido a perda permeabilidade seletiva. Em seguida uma parte desta solução foi transferida para uma placa de Neubauer (0,0025 mm²) e então as células foram contadas e diluídas até a concentração necessária de células por mL com meio de cultura suplementado.

Foram adicionadas $5,0 \times 10^5$ células em cada poço de uma placa de 24 poços para a realização da viabilidade celular. As células foram plaqueadas 24 h antes do tratamento com acetaldeído nas concentrações: 1 mM, 5 mM, 10 mM, 25 mM, 50 mM, 100 mM, 500 mM e 1 M por 3 h. Após o tratamento, as células foram lavadas duas vezes com PBS, e foram adicionados 700 µl de meio de cultura e 300 µl de solução de brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT) (5 mg/ml em PBS). Após 2 h, o meio foi retirado com cuidado para não perder o precipitado formado (formazan), ao qual adicionou-se 1 ml de solução 50% SDS (10%) e 50% dimetilformamida (pH 4,8) a fim de solubilizar o precipitado. Mediu-se a concentração a 595 nm (Hansen e col., 1989).

3.5.4. Avaliação da atividade mitocondrial e quantidade de cálcio intracelular

Os fibroblastos foram cultivados como descrito em 3.6.1 e posteriormente tratados com acetaldeído em concentrações que variavam de 1 a 100 mM, por 3 h.

Após este período, as células foram lavadas com PBS-A, tripsinizadas, centrifugadas a 100 rpm por 3 min e resuspendidas em meio de cultura DMEM com 10 % de SFB. Em seguida, foram adicionados 1 μ L de fluo3-AM e 1 μ L mito red (1000 x concentrado) e as células incubadas por 30 min, 37 °C para posterior análise por citometria de fluxo, em um citômetro Beckman Coulter, utilizando-se filtro FL-1 (menor que 550 nm) para Fluo3-AM e FL-4 (645-710 nm) para mito-red. Os dados foram computados pelo programa WinMDI 2.8.

3.5.5. Avaliação da fragmentação do DNA

As células foram tratadas como descrito em 5.9.1 e em seguida o meio de cultura foi recolhido, as células lavadas duas vezes com PBS, tripsinizadas, somadas às células em suspensão do meio de cultura para serem centrifugadas a 1200 rpm por 5 min. As células foram então resuspendidas em 400 μ L da solução hipotônica fluorescente (citrato de sódio 0,1 % p/v, Triton-X100 0,1 % v/v e iodeto de propídio 50 μ g/mL) (Nicoletti et al., 1991).

Após 10 min de incubação com solução hipotônica fluorescente, as células foram analisadas por citometria de fluxo utilizando-se o filtro para emissão vermelha FL-3 (585-542 nm). Os dados foram computados pelo programa WinMDI 2.8.

3.5.6. Investigação da peroxidação lipídica

3.5.6.1. Tratamento de células para a quantificação do aduto de MDA-TBA

As células foram cultivadas, como descrito em 3.5.1 e após adquirirem confluência aproximada de 90% nas placas (6 cm de diâmetro) foram submetidas ao tratamento com concentrações variadas de acetaldeído na presença ou não de antioxidantes, como descrito

em 3.5.2. Porém, o meio de cultura foi substituído por solução balanceada de Hanks, já que o grupo fenol presente no DMEM confere ao meio de cultura coloração avermelhada podendo interferir na detecção do aduto ($\lambda_{\text{excitação}} = 515 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{emissão}} = 550 \text{ nm}$).

Após o tratamento, o meio de cultura foi separado das células, as quais foram reservadas para a realização de experimento de dosagem de proteínas descrito no item 3.5.6.3. Ao meio de cultura reservado foram posteriormente adicionados 500 μL de solução BHT 0,2 % em etanol 95 % e 3 mL de solução de TBA 0,4 % em HCl 0,2N : H_2O (2:1) (preparada imediatamente antes do uso). Em seguida, os tubos foram incubados em banho-maria por 45 min a 90 °C. Após esse período, os tubos foram resfriados em gelo e o aduto TBA-MDA (produto rosa) extraído com 2,5 mL de isobutanol. A fase isobutanólica foi coletada para posterior detecção e quantificação por HPLC com detector de fluorescência.

3.5.6.2. Detecção e quantificação do aduto de MDA-TBA

Os níveis da peroxidação lipídica na membrana das células da linhagem IMR-90, foram estudados pelo método descrito por Tatum (Tatum et al., 1990). O método baseia-se na reação do MDA (malonaldeído), produzido durante o processo de lipoperoxidação, com TBA (ácido tio-barbitúrico) o que leva a formação do aduto TBA-MDA que é fluorescente e por este motivo, facilmente detectado após separação por HPLC com detector de fluorescência.

O aduto de MDA-TBA foi analisado por HPLC com detector de fluorescência em coluna Lichrosorb 10 RP-18 (250 mm x 4,6 mm, 10 μm) da Phenomenex, a fase móvel foi de (4:6) metanol e tampão KH_2PO_4 25 mM pH 7,0, 1 mL / min.

Para a quantificação do aduto MDA-TBA foi feita uma curva de calibração a partir de uma solução estoque de MDA, como descrito a seguir (Esterbauer et al., 1984).

Bisdietilacetil de malondialdeído destilado (220 mg, 1 mM) foi dissolvido em 100 mL de H_2SO_4 1 % (v/v). A solução foi deixada em repouso por 2 h a temperatura ambiente. Em

seguida, avolumou-se 1 mL dessa solução a 100 mL com H_2SO_4 1 % (v/v). A concentração de MDA foi determinada medindo-se a absorbância em 245 nm ($\varepsilon = 13700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) em cubetas de 1 cm, contra branco de 1 mL de H_2SO_4 1 %. A curva padrão foi construída preparando-se 1 mL das soluções 0,5 μM ; 1 μM ; 10 μM ; 20 μM ; 40 μM e 60 μM a partir do estoque de MDA em H_2SO_4 1%. Posteriormente, adicionou-se 1 mL de solução 0,4 % de TBA em HCl 0,2N : H_2O (2:1), e as soluções foram incubadas a 90 °C por 45 min. Em seguida, o aduto (produto rosa) foi extraído com isobutanol (v/v). Por fim, a fase isobutanólica analisada por HPLC, conforme metodologia descrita acima.

3.5.6.3. Dosagem de proteínas

A dosagem de proteínas segundo Bradford (Bradford, 1976), pode ser realizada através da ligação do azul de coomassie à proteína, que absorve luz fortemente em 595 nm.

Após as células terem o tratamento concluído e o meio de cultura removido para a quantificação do aduto de MDA-TBA, as células foram removidas das placas, lavadas com PBS-A e centrifugadas por 5 min a 1500 g a 4 °C. O precipitado foi então ressuspensionado em 250 μl de PBS-A, 250 μl de solução de HClO_4 2 M e 4 mM de EDTA, e novamente centrifugada a 8000 g por 5 min, a 10 °C. Em seguida, o novo precipitado foi ressuspensionado em 1200 μl de NaOH 300 mM.

Posteriormente, preparou-se uma solução para leitura da absorbância (595 nm) que continha 20 μl de amostra preparada como descrito acima, 80 μl de solução salina 0,15 M, e 5 ml de reagente de dosagem. O branco foi preparado com 100 μl de solução salina 0,15 M e 5 ml de reagente de dosagem.

Para a quantificação da massa de proteína em cada placa foi preparada uma curva de calibração com albumina bovina a partir de uma solução estoque 1 mg/ml. As amostras

da curva foram preparadas com 5 ml de reagente de dosagem e 100 μ l de volume final de solução entre estoque de albumina e solução salina, de acordo com a concentração esperada de proteína.

Soluções:

Reagente para dosagem: 100 mg de azul brilhante de coomassie G-250 dissolvidos em 50 mL de etanol 95 %. A essa solução foram adicionados 100 mL de ácido fosfórico 85 % (p/v). A solução resultante foi diluída para o volume de 1 L.

3.5.7. Estudo de fragmentação do DNA (Ensaio Cometa)

As células foram cultivadas como descrito em 3.5.1 e após adquirirem confluência aproximada de 90% nas placas (6 cm de diâmetro) foram submetidas ao tratamento com 1 e 10 mM de acetaldeído na presença ou não de antioxidantes. Para o controle positivo da quebra do DNA foi realizado um tratamento com 80 μ M de metil metano sulfonato (MMS), um conhecido agente alquilante de bases. Após os tratamentos, o meio de cultura foi removido das placas, as células foram lavadas com 2 mL de PBS – A, tripsinizadas e centrifugadas por 4 min a 1000 rpm e 4 °C. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 500 μ L de PBS-A. Uma alíquota de 20 μ L desta suspensão (aproximadamente 10.000 células) foi misturada a 100 μ L de agarose LMP (aquecida a 37 °C). Depositou-se a mistura sobre uma lâmina contendo uma fina camada de agarose NMP (previamente preparada) e cobriu-se a lâmina com uma lamínula (24x60 mm). Após 5 min na geladeira, a lamínula foi retirada e a lâmina mergulhada em solução de lise para outra incubação na geladeira por 90 min.

Ao fim da incubação, as lâminas foram retiradas da solução de lise (no escuro) e transferidas para a cuba de eletroforese (dentro de um banho de gelo), onde ficaram

descansando por 20 min mergulhadas no tampão gelado para eletroforese. Em seguida, a cuba foi submetida a 25 V / 300 mA por 20 min.

Ao fim da corrida, as lâminas lavadas por três vezes em tampão de neutralização por 5 min, foram mergulhadas em etanol 100 % e coradas com 50 µL de solução de brometo de etídio (20 µg/mL) imediatamente antes da leitura em microscópio óptico de fluorescência com filtro de 510-560 nm e barreira de 590 nm.

Uma célula cujo DNA sofreu muitas quebras tem a aparência de um cometa vista ao microscópio, ou seja, apresenta uma cauda de DNA fragmentado (desenovelado), com migração mais rápida do que o DNA intacto (superenovelado). As células com DNA intacto apresentam forma circular no microscópio.

O índice de dano ao DNA foi determinado pela contagem e classificação de 50 cometas observados em uma lâmina, sendo que cada amostra foi montada em duplicata. Os cometas foram classificados em uma escala de 1 a 4 (como mostrado na tabela 3.4). O índice do dano foi calculado de acordo com a equação abaixo.

$$\text{Índice de dano ao DNA} = [(\text{n}^\circ \text{ de cometas classe 1} \times 0) + (\text{n}^\circ \text{ de cometas classe 2} \times 1) + (\text{n}^\circ \text{ de cometas classe 3} \times 2) + (\text{n}^\circ \text{ de cometas classe 4} \times 3)].$$

Tabela 3.4. Imagens e pontuações de cada classe de cometas observados.

	<i>Classe 1</i>	<i>Classe 2</i>	<i>Classe 3</i>	<i>Classe 4</i>
Pontuação	0	1	2	3
Imagem do Cometa

Soluções:

Solução de lise (estoque): 800 mL de água destilada, 146,1 g de NaCl, 37,2 g de EDTA, 1,2 g de Tris, pH 10,0.

Solução de lise: 89 mL de solução estoque de lise, 10 mL de DMSO e 1 mL de Triton X-100.

Tampão para eletroforese pH 13,0 (estoque): A= NaOH 10 M (200 g/ 500 mL H₂O)

B= EDTA 200 mM (14,89 g /200 mL H₂O), pH 10,0. Guardar ao abrigo da luz em temperatura ambiente.

Tampão para eletroforese pH 13,0: 30 mL de solução A e 5 mL de solução B. Volume final 1 L.

Tampão neutralizador: Tris 0,4 M – 48,5 g de Tris em 900 mL de água destilada (pH 7,5). Volume final 1 L.

Agarose NMP 1,5%: 300 mg de agarose de ponto de fusão normal em 20 mL de PBS-A. Manter a 60 °C.

Agarose LMP 0,5 %: 100 mg de agarose de baixo ponto de fusão em 20 mL de PBS-A. Manter a 37 °C.

3.5.8. Extração do DNA

Os experimentos foram feitos utilizando-se garrafas de 175 cm² de células confluentes para obtenção de cada amostra de DNA de células controle ou submetidas a algum tipo de tratamento.

Inicialmente, após as incubações, o meio de cultura foi removido, as células foram lavadas com 10 mL de PBS e ressuspensas por raspagem em 10 mL desse tampão. As suspensões foram transferidas para tubos plásticos de 50 mL e centrifugadas a 1500 g por 5 min a 10°C. Os sobrenadantes foram removidos. A esse precipitado foram adicionados 30 mL de tampão A e novamente centrifugados. Após centrifugação a 1500 g por 10 min, o precipitado foi coletado e ressuspendido em mais 12 mL de tampão A. Após nova centrifugação a 1500 g por 10 min, o precipitado foi ressuspendido em 2,4 mL de tampão B

e 140 μL de uma solução de SDS 10%. A esta solução foram adicionados 12 μL de uma solução 10 mg/mL de RNase A (preparada em tampão acetato de sódio 10 mM e fervida por 15 min) e 3,2 μL de uma solução 20 U/ μL de RNase T1 (preparada em tampão C).

A amostra foi incubada a 37°C por 1 h e, em seguida, foram adicionados 120 μL de uma solução de proteinase K 20 mg/mL. Após incubação a 37°C por 1 h e centrifugação a 5000 g por 15 min, o sobrenadante foi coletado, ao qual foram adicionados 4 mL de solução de NaI e 8 mL de isopropanol. O tubo foi mantido no freezer (-20°C) por uma noite para precipitação do DNA. Em seguida foi feita uma centrifugação a 5000 g por 15 min, o precipitado foi coletado e lavado com 5 mL de isopropanol 60% e centrifugado (5000 g, 15 min). Em seguida os precipitados foram novamente lavados com 5 mL de etanol 70% e centrifugados a 5000 g, 15 min. O DNA, depois de secado sob fluxo de N_2 , foi então ressuspensionado em 500 μL de mesilato de desferroxamina e sua concentração e pureza foram determinadas, respectivamente, pela leitura da absorbância a 260 nm e pela relação A_{260}/A_{280} , maior que 1,7.

Soluções

Tampão A: Sacarose 320 mM, MgCl_2 5 mM, Tris-HCl 10 mM, desferroxamina 0,1 mM, 1% de triton X-100 (pH 7,5).

Tampão B: Tris-HCl 10 mM, EDTA- Na_2 5 mM, desferroxamina 0,15 mM (pH 8,0).

Tampão C: (para diluição da RNase): Tris-HCl 10 mM, EDTA- Na_2 1 mM, desferroxamina 2,5 mM (pH 7,4).

Solução de NaI: NaI 7,6 M, Tris-HCl 40 mM, EDTA- Na_2 20 mM, desferroxamina 0,3 mM (pH 8,0).

3.5.9. Hidrólise do DNA

À 100 µg de DNA (comercial ou extraído de fibroblastos ou dos tecidos dos ratos tratados com acetaldeído) foram adicionados 2 µL de uma solução 1,0 M de tampão acetato de sódio (pH 5), 1 unidade de nuclease P1. A mistura foi incubada por 30 min a 37 °C no escuro e, em seguida, adicionou-se 6 µL de tampão Tris-HCl 1 M, pH 7,4, 6 µL de tampão para fosfatase alcalina e 3 U de fosfatase alcalina. Seguiu-se a incubação a 37°C por 1 h. As amostras foram avolumadas para 100 µl (Fiala et al., 1989).

3.5.10. Análise de 8-oxodGuo no DNA das células tratadas com acetaldeído e licopeno

As células foram pré-tratadas com licopeno 20 µM e em seguida tratadas com acetaldeído (1 mM e 100 mM). Após o tratamento o DNA foi extraído e hidrolisado. Amostras de DNA, 100 µg, foram analisadas por detecção eletroquímica num sistema de HPLC acoplado a um detector coulométrico, Coulochem II ESA. O potencial usado na “guard – cell” foi de 900 mV e na cela analítica foram selecionados os potenciais 130 mV e 280 mV, potencial de oxidação da 8-oxodGuo. A separação foi obtida segundo um método isocrático com tampão fosfato de potássio monobásico 25 mM, pH 5,5 e 8 % de metanol, fluxo 1 mL/min, coluna Luna C18 18 (250 x 4,6 mm, 5µm).

Para a obtenção dos resultados foi feita uma curva de calibração de 8-oxodGuo e 2'-desoxiguanosina. Os resultados foram expressos pela relação entre as quantidades de 8-oxodGuo e dGuo em mols.

3.5.11. Análise de 1,N²-propanodGuo e 1,N²-εdGuo no DNA das células tratadas com acetaldeído e licopeno

As células foram pré-tratadas com 20 µM de licopeno e em seguida tratadas com acetaldeído (1 mM e 10 mM). Após o tratamento o DNA foi extraído e hidrolisado. Amostras

de DNA, 100 µg, foram analisadas por HPLC acoplado a espectrometria de massa, como descrito no item 3.4

3.6. Avaliação da fragmentação plasmídial induzida por acetaldeído e lisina

3.6.1. Purificação do plasmídeo pBlueScript de E.coli DH10B

Uma alíquota da suspensão de E. coli DH10B foi plaqueada em meio LB-Ágar contendo 0,1 mg/mL de ampicilina (Amp) e a placa foi deixada em estufa a 37 °C overnight. Uma colônia da placa foi transferida para um tubo contendo 3 mL de meio LB com Amp (0,1 mg/mL), o qual foi incubado a 37 °C e 300 rpm “overnight”. O pré-inóculo foi diluído para 100 mL com meio LB contendo Amp e incubado “overnight” a 37 °C e 300 rpm. Ao fim da incubação, as bactérias foram recuperadas por centrifugação a 6000 g por 15 min a 4 °C. O pellet foi ressuscitado em 4 mL de tampão P1, gentilmente misturado por inversão a 4 mL de tampão P2 e incubado a temperatura ambiente por 5 min. Após adição de 4 mL de tampão P3 gelado e leve inversão, incubou-se em gelo por 15 min. Centrifugou-se por duas vezes a 20000 g por 30 e 15 min a 4 °C, recolhendo-se o sobrenadante contendo os plasmídios. O sobrenadante foi aplicado em coluna QIAGEN-tip previamente equilibrada com tampão QBT. Os contaminantes foram eluídos com duas lavagens de 10 mL de tampão QC e o plasmídeo foi eluído com 5 mL de tampão QF. Para precipitação do DNA, 3,5 mL de isopropanol foram adicionados à fração eluída com tampão QF, a qual foi em seguida centrifugada a 15000 g por 30 min a 4 °C. O pellet foi lavado com 2 mL de etanol 70 % e, após centrifugação a 15000 g por 10 min, o sobrenadante foi descartado com cuidado. O DNA, seco ao ar por 5 min, foi ressuscitado em 200 µL de H₂O. A concentração do DNA foi determinada por espectrofotometria a 260 nm.

Soluções:

Tampão P1 (ressuspensão): 50 mM Tris, pH 8; 10 mM EDTA; 100 µg/mL RNase A

Tampão P2 (lise): 200 mM NaOH; 1 % SDS (p/v)

Tampão P3 (neutralização): 3 M acetato de potássio, pH 5

Tampão QBT (equilíbrio): 750 mM NaCl; 50 mM MOPS ácido, pH 7; 15 % isopropanol (v/v);
0,15 % Triton X-100 (v/v)

Tampão QC (lavagem): 1 M NaCl; 50 mM Tris, pH 8,5; 15 % isopropanol (v/v)

Tampão QF (eluição): 1,25 M NaCl; 50 mM MOPS ácido, pH 7; 15 % isopropanol (v/v)

3.6.2. Incubação de pBlueScript com acetaldeído

Uma alíquota de 0,5 µg de plasmídeo foi incubada em tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 8 ($v_f = 50 \mu\text{L}$) com concentrações variadas de acetaldeído (0,5 a 100 mM), na presença ou não de lisina (0,5 ou 20 µg), por 3 h a 37°C e 300 rpm. Ao fim da incubação, 5 µL de corante foram adicionados a 30 µL de amostra para aplicação em gel de agarose 0,8 % com 30 µL de brometo de etídio 1 mg/mL. O gel foi mergulhado em tampão de corrida TAE e posteriormente submetido a um potencial de 100 V. As bandas foram visualizadas pela irradiação do gel com luz UV no aparelho Image Master VDS (Pharmacia Biotech, USA).

Soluções:

Tampão TAE pH 7,65 (50 vezes concentrado = 50 X): 242 g Tris, 57,1 mL ácido acético; 100 mL Na₂EDTA (0,5 M, pH 8)

Corante da amostra (10 vezes concentrado): 20 % Ficoll 400; 0,1 M Na₂EDTA pH 8; 1 % SDS; 0,25 % azul de bromofenol; 0,25 % xileno cianol.

3.7. Tratamento de ratos *Wistar* com acetaldeído

3.7.1. Tratamento por 8 dias - intraperitoneal e gavage

Ratos *Wistar* machos e adultos com 18 semanas foram divididos em 3 grupos, grupo controle, sem nenhum tratamento; veículo que recebeu injeções intraperitoneal (i.p.) ou gavage diárias de 1 mL de solução salina (NaCl) 0,9%; grupo acetaldeído que recebeu doses de 150 mg/Kg de solução de acetaldeído por via oral (gavage) ou intra-peritoneal (máximo de 0,8%). Os animais foram pesados diariamente. Os grupos que receberam inoculação intraperitoneal possuía 5 animais cada e os que receberam por gavage possuía 7 animais cada.

Ao final dos 8 dias de tratamento, total de 8 inoculações, os ratos foram sacrificados com guilhotina e seus órgãos imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados em freezer -80°C .

3.7.2. Tratamento por 30 dias- intraperitoneal e gavage

Ratos *Wistar* machos adultos com 18 semanas, foram divididos em 3 grupos, sendo eles: grupo controle sem nenhum tratamento; veículo que recebeu doses intraperitoneal (i.p.) ou gavage diárias de 1 mL de solução salina (NaCl) 0,9%; grupo acetaldeído que recebeu doses intraperitoneal ou gavage de 60 mg/Kg de solução de acetaldeído (máximo de 0,8%). Os animais foram pesados diariamente. Os grupos que receberam inoculação intraperitoneal possuíam 6 animais cada e os que receberam por gavage possuía 7 animais cada.

Ao final dos 30 dias de tratamento, total de 20 inoculações, os ratos foram sacrificados com guilhotina e seus órgãos imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados em freezer -80°C .

3.7.3. Tratamento por 50 dias - via aérea

Vinte e oito ratos *Wistar* machos adultos com 18 semanas, foram divididos em 5 grupos, com 5 animais cada, sendo eles: grupos controle sem nenhum tratamento, grupos 0 ppb, 10 ppb, 30 ppb, e 90 ppb de acetaldeído. Os animais foram pré-condicionados durante 10 dias em caixas especialmente adaptadas em colaboração com o laboratório do Prof. Dr. Ivano G. R. Gutz do Departamento de Química Fundamental, desta instituição.

As caixas foram inteiramente vedadas com borracha especial inerte e tampadas com uma placa de vidro para permitir a entrada de luz e garantir o ciclo claro e escuro. Cada caixa possuía uma entrada de gás constante de 12 litros/min com a presença ou não de acetaldeído, na concentração requerida para cada experimento (0, 10, 30 ou 90 ppb). As trocas de ar foram garantidas por uma saída de ar com pressão parcial levemente negativa. O sistema era adaptado com uma entrada de gás de segurança, ar sintético, e um sistema de alarme, que eram ativados em caso de falta de energia elétrica a um fluxo de 2 L/min.

O fluxo de ar era controlado por uma bomba Ferrari (compressor Mega Jet CMJ-130) e um manômetro. O ar retirado do ambiente e totalmente filtrado em um sistema de filtros industriais de carvão ativado era adicionado a um fluxo de acetaldeído controlado por uma segunda bomba.

Ao final dos 50 dias de tratamento, os ratos controle e tratados com 0,10, 30 e 90 ppb de acetaldeído foram anestesiados com 0,9 mL/Kg Xilazina (10 %) e 0,56 mL/Kg Quetamina (2 %) para retirada do sangue, urina e órgãos (fígado, pulmão, cérebro). Em seguida os órgãos foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido e estocados em freezer -80 °C. A figura 3.1 resume o perfil do desenho experimental de exposição dos animais.

Figura 3.1. Representação do experimento em que ratos *Wistar* foram expostos a acetaldeído por via respiratória.

3.7.4. Avaliação dos efeitos do acetaldeído em ratos

Alguns dos efeitos promovidos pelos diferentes tratamentos com acetaldeído nos ratos *Wistar* foram avaliados por medidas associadas ao aumento do estresse oxidativo, sendo estas: lipoperoxidação, fragmentação do DNA, aumento de glutathione oxidada, diminuição de glutathione reduzida, formação de 8-oxodGuo, 1,N²-εdGuo e 1,N²-propanodGuo.

3.7.4.1. Avaliação de lipoperoxidação

100 mg de tecido foram homogeneizados em 500 µL de tampão TKM (Tris-HCl 50 mM, KCl 25 mM e MgCl₂ 5 mM, pH 7,5), 75 µL de solução 0,2 % de BHT em etanol 95 %, 50 µL de SDS 10%. Desta solução foram aliqüotados 100 µL para posterior dosagem de proteínas. Em seguida, foram adicionados nos 400 µL restantes, 500 µL de solução 0,4 % de TBA em HCl 0,2N : H₂O (2:1) (preparada imediatamente antes do uso). Os tubos foram incubados por 45 min a 90 °C. Após esse período, as amostras foram resfriados em gelo e o aduto TBA-MDA (produto rosa) foi extraído com 500 µL de isobutanol. A fase isobutanólica foi coletada para posterior detecção e quantificação por HPLC com detector de fluorescência. A detecção e quantificação do aduto MDA-TBA foi realizada como descrito em 3.5.6.2.

3.7.4.2. Fragmentação do DNA (ensaio cometa)

100 mg de tecido foram picotados em pedaços muito pequenos e incubados por 10 min em solução de Hank's e 10 % de DMSO. Em seguida, uma alíquota de 20 µL desta suspensão foi misturada a 100 µL de agarose LMP (aquecida a 37 °C). Depositou-se a mistura sobre uma lâmina contendo uma fina camada de agarose NMP (previamente preparada) e cobriu-se a lâmina com uma lamínula (24 x 60 mm). Após 5 min na geladeira,

a lamínula foi retirada e a lâmina mergulhada em solução de lise para outra incubação na geladeira por 90 min.

Ao fim da incubação, as lâminas foram retiradas da solução de lise (no escuro) e transferidas para a cuba de eletroforese (dentro de um banho de gelo) onde ficaram descansando por 20 min mergulhadas no tampão gelado para eletroforese. Em seguida, a cuba foi submetida a 25 V / 300 mA por 20 min.

Após a eletroforese, as lâminas lavadas por três vezes em tampão de neutralização por 5 min, foram mergulhadas em etanol 100 % e coradas com 50 µL de solução de brometo de etídio (20 µg/mL) imediatamente antes da leitura em microscópio óptico de fluorescência Diaphot 300 (Nikon, Tóquio, Japão), com filtros 510-560 nm e barreira de 590 nm. Foram visualizados 50 cometas em cada lâmina, preparada em duplicata, usando o software Komet 6.0. Os resultados foram plotados pelo momento da cauda (do inglês “Olive tail moment”).

As receitas das soluções utilizadas neste ensaio estão descritas em 3.5.7.

3.7.4.3. Formação de 1,N²-εdGuo e 1,N²-propanodGuo

O DNA foi extraído de 500 mg de tecido, conforme descrito em 3.5.6, e deste 200 µg foi hidrolisado conforme 3.5.7. Em seguida, as amostras foram analisadas por HPLC acoplado a espectrometria de massa, como descrito no item 3.4.

3.7.4.4. Comitê de ética em experimentação animal

Todos os experimentos em ratos *Wistar* foram aprovados pelo comitê de ética em experimentação animal do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (CECUA), e estão de acordo com os princípios éticos na experimentação animal adotado pelo colégio Brasileiro (COBEA).

3.8. Desenvolvimento da metodologia para quantificação de 1,N²-propanodGuo e 1,N²- ϵ dGuo por HPLC/ESI/MS-MS na urina de humanos

3.8.1 Padronização da extração de adutos de DNA na urina de humanos

À 1,5 mL de urina de humanos resfriada a 4 °C, foi acrescentado 1,5 mL de tampão acetato de amônio 5 mM e de mesilato de desferroxamina 0,1 mM, pH 5, e 1 pmol de 8-oxodGuo, 1,N²- ϵ dGuo e 1,N²-propanodGuo. Esta solução foi aquecida a 37°C e centrifugada por 15 min em 400 rpm, modificado de (Hillestrom *et al.*, 2004).

A solução de urina foi extraída em coluna de extração de fase sólida (SPE), pré-condicionada com 2 mL de metanol e 2 mL de água. Foram testados colunas com diferentes tipos de fase estacionária, sendo elas C18 (Varian), Strata C18E, Strata X (Phenomenex), e Oásis (Waters) (tabela 3.5). Para a eluição também foram utilizados diferentes métodos que variavam entre frações de 500 μ L a 1 mL de água, metanol, acetonitrila e a combinação destes solventes (tabela 3.6).

Após a eluição as frações individualmente coletadas foram liofilizadas e ressuspensas em água previamente tratada com Chelex[®], para posterior análise em HPLC acoplado a espectrometria de massa.

Tabela 3.5.Tipos de colunas SPE testadas para otimização de metodologia para eluição de urina.

Coluna	Fase estacionária
C18	Apolar, trifuncional 500m ² /g, 40 nm 1g/6 mL
Strata C18 E	50mm, Tri-funcional, 500m ² /g, end-capped, 1000mg/6mL
Strata X	Polimérica de fase reversa Recheio de póímero adsorvente 500 mg/ 6 mL
Oasis HLB	Polimérica de fase reversa copolímero adsorvente 60 mg/ 30 nm

Tabela 3.6. Diferentes metodologias de extração de urina em coluna SPE para quantificação de 8-oxodGuo, 1,*N*²-εdGuo e 1,*N*²-propanodGuo.

Método de eluição	
A	2 x 1 mL de Água
	2 x 0,75 mL de solução 10 % de metanol
	2 x 0,75 mL de solução 40 % de metanol
	2 x 0,75 mL de solução 60 % de metanol
	2 x 0,75 mL de solução 80 % de metanol
	2 x 0,75 mL de metanol
B	2 x 1 mL de Água
	2 x 0,75 mL de solução 10 % de metanol
	2 x 0,75 mL de solução 40 % de metanol
	2 x 0,75 mL de solução 60 % de metanol
	2 x 0,75 mL de solução 80 % de metanol
	2 x 0,75 mL de metanol
C	2 x 0,75 mL de solução 50 % metanol/50% Acetonitrila
	2 x 0,75 mL de acetonitrila
	2 x 1 mL de Água
	2 x 0,75 mL de solução 10 % de metanol
	2 x 0,75 mL de solução 60 % de metanol
	2 x 0,75 mL de solução 80 % de metanol
D	2 x 0,75 mL de metanol
	2 x 1 mL de Água
	2 x 0,75 mL de solução 10 % de metanol
	2 x 0,75 mL de solução 70 % de metanol
	2 x 0,75 mL de metanol
	2 x 0,75 mL de metanol
E	2 x 1 mL de Água
	2 x 0,75 mL de solução 15 % de metanol
	2 x 0,75 mL de solução 65 % de metanol
	2 x 0,75 mL de metanol

3.8.2. Metodologia de quantificação de 8-oxodGuo, 1,N²-propanodGuo e 1,N²-εdGuo em urina por HPLC/ESI/MS-MS

Depois de extraídas e secadas as amostras foram ressuspendidas para análise em um sistema de HPLC Agilent constituído por um autoinjeter Agilent 1200 High performance resfriado a 4 °C, bomba Agilent 1200 Binary pump SL, detector Agilent 1200 DAD G1315C, forno de coluna Agilent 1200 G1216B a 18 °C e um software Analyst 1.4.2. Foi usado para separação uma coluna analítica Agilent C18(2) 250mm x 4.6 mm i.d., 3 µm e um método gradiente de água e acetonitrila, descrito na tabela 3.7.

Tabela 3.7. Método gradiente de água e acetonitrila para eluição das frações de urina

<i>Tempo (min)</i>	<i>% de acetonitrila</i>	<i>Fluxo (µL/min)</i>
0	3	400
25	25	200
26	100	400
30	100	400
31	3	400
35	3	400

Uma segunda bomba Agilent (1200 Isocratic pump SL) foi usada para alimentar, quando necessário, o espectrômetro de massa com fluxo isocrático (0,1 mL/min) de uma solução (40:60) água e acetonitrila contendo 0.1% ácido fórmico. Uma válvula para direcionar o fluxo troca duas vezes de posição: a 12 min, permitindo que o eluente que até o momento era descartado, entre no espectrômetro de massa, e a 25 min, permitindo a lavagem e o equilíbrio da coluna. O tempo total desta análise é de 35 min.

Os adutos foram analisados com ionização por *eletrospray* no modo positivo e detecção por monitoramento de reação múltipla (MRM), em um espectrômetro de massa

triplo quadrupolo, sendo o terceiro quadrupolo uma câmara híbrida íon trap linear (API 4000 Q-TRAP, Applied Biosystems).

Todas as amostras injetadas continham $[^{15}\text{N}_5]\text{-1,N}^2\text{-}\epsilon\text{dGuo}$ e $[^{15}\text{N}_5]\text{-1,N}^2\text{-propanodGuo}$ como padrões internos. As transições m/z escolhidas para os íons $1,\text{N}^2\text{-}\epsilon\text{dGuo}$ e $[^{15}\text{N}_5]\text{-1,N}^2\text{-}\epsilon\text{dGuo}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ foram $292 \rightarrow 176$ e $297 \rightarrow 181$, respectivamente, para os íons $1,\text{N}^2\text{-propanodGuo}$ e $[^{15}\text{N}_5]\text{-1,N}^2\text{-propanodGuo}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ foram $338 \rightarrow 222$ e $343 \rightarrow 227$, respectivamente e para 8-oxodGuo $284 \rightarrow 168$.

Todos os parâmetros do espectrômetro de massa foram ajustados para aquisição da melhor transição $[\text{M}+\text{H}]^+ / [\text{M}+\text{H}]^+-2\text{-D-erythro-pentose}$. Sendo que, *curtain gas* foi de 20 psi, temperatura 400 °C, Gás de nebulização 45 psi e gás auxiliar 40 psi, voltagem aplicada no spray de íons na Fonte Turbo Ion Spray 4500 V, gás de colisão alto, aquecimento da *interface heater* ativado em 100 °C e o potencial de entrada fixado em 10 V. Para as transições 338-222 e 343-227, foram selecionados 19 V de energia de colisão, o potencial de colisão na saída de Q2 foi de 20 V e a diferença de potencial entre Q0 e a *orifice plate* (*declustering potential*) em 51 V. Já, para as transições 222-176 e 227-181 os parâmetros acima foram de 17, 16 e 40 V, e para a transição 284-168 de 17, 16 e 46 V respectivamente.

3.8.3. Comitê de ética em experimentação humana

A doação de urinas para a análise de adutos de DNA, descrita metodologia acima (3.8.1 e 3.8.2) foi aprovada pela comissão de ética em pesquisa com seres humanos do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, parecer 891/CEP. Projeto intitulado, Estudo de biomarcadores de estresse redox em urina e sangue humano.

4. RESULTADOS

4.1. Síntese, purificação e caracterização de adutos de DNA

4.1.1. Síntese e purificação de 8-oxodGuo

A síntese e purificação da 8-oxodGuo foi realizada como descrito em materiais e métodos (3.3.1). O aduto foi caracterizado por espectrometria de massas, RMN e sua concentração calculada espectrofotometricamente em 293 nm ($\epsilon = 9600$). Os espectros obtidos foram comparados com os descritos por Liu e col. (Lin *et al.*, 1985), para confirmação estrutural.

4.1.2. Síntese e purificação de 1, N^2 - ϵ dGuo

A síntese e purificação da 1, N^2 - ϵ dGuo foi realizada como descrito em materiais e métodos (3.3.2). O aduto foi caracterizado por espectrometria de massas, RMN e sua concentração calculada espectrofotometricamente em 226 nm. Os espectros obtidos foram comparados com os descritos por Loureiro *et al* (Loureiro *et al.*, 2000), para confirmação estrutural.

4.1.3. Síntese, purificação e caracterização de 1, N^2 -propanodGuo

O 1, N^2 -propanodGuo foi sintetizado e purificado como descrito em materiais e métodos (3.3.3). O cromatograma obtido a partir da análise do produto total da reação está apresentado na figura 4.1

Figura 4.1. Cromatograma de purificação do 1, N^2 -propanodGuo.

O 1, N^2 -propanodGuo, é caracterizado por possuir comprimento de onda de máxima absorção em torno de 254 nm. A partir do cromatograma acima apresentado podemos observar a presença de três picos majoritários neste comprimento de onda, 23, 45 e 47 mim.

Os picos foram coletados individualmente e suas massas foram confirmadas por espectrometria de massa. A figura 4.2 apresenta a estrutura do íon molecular 1, N^2 -propanodGuo e o íon filho mais intenso após fragmentação e perda da 2'-desoxiribose.

Figura 4.2. Estrutura e esquema de fragmentação do 1,N²-propanodGuo, * representa o carbono assimétrico.

A análise por espectrometria de massas foi realizada em modo positivo e ionização por eletrospray. Por isso, todas as massas apresentadas no espectro da figura 4.3 estão representadas, em sua maioria, pela massa da molécula com a adição de 1 unidade, correspondente a um átomo de hidrogênio que se adiciona após a ionização.

As análises por espectrometria de massa mostraram que o pico coletado em 23 min apresentava massa $[M+H]^+$ - 268, referente a 2'-desoxiguanosina, que não era totalmente consumida na reação de síntese (espectro não apresentado). Já os picos eluídos em 45 e 47 min, respectivamente, apresentaram espectros de massas idênticos sendo que as massas dos íons pais nos dois espectros, $m/z - 338,3$, correspondem à do aduto investigado, que possui um carbono assimétrico na posição 6, como pode ser observado, por um asterisco, nas estruturas da figura 4.2. A figura 4.3 apresenta os espectros de massa dos picos de 45 e 47 min, que, possivelmente, são os isômeros ópticos do 1,N²-propanodGuo.

Figura 4.3. Espectros de massa dos picos coletados em 45 e 47 min. Íon pai de massa 338,3 e seus íons filho de massas 222,2, 204,2 e 178,2. Os picos 244,2, 360,3 e 376,3 correspondem a adutos de Na^+ e K^+ das moléculas não ionizadas. Os espectros A e B são idênticos e por isso indicam que são isômeros de 1, N^2 -propanodGuo.

Nos espectros apresentados acima, além das massas 338 e 222 correspondentes aos íons molecular e filho mais intenso do 1, N^2 -PropanodGuo, também são observadas as massas 244,3 e 360,3, que correspondem a adutos de íons sódio das massas 222,3 e 338,3 respectivamente. Já a massa de 376,4 corresponde ao aduto de potássio da molécula de massa 338,3. A formação destes adutos é bastante comum nas análises de espectrometria de massas no modo positivo devido à abundância destes íons na atmosfera.

A partir da identificação dos picos, os produtos de 45 e 47 min que possuem mesma massa molecular, foram coletados e liofilizados até atingirem massa de aproximadamente 2 mg. Estes produtos foram ressuspensos em D₂O para análises de Ressonância Magnética Nuclear em 500 MHz, como descrito em 3.3.3.

A figura 4.4 apresenta a estrutura do 1,*N*²-propanodGuo numerada para a atribuição dos picos dos RMNs de hidrogênio apresentados nas figuras 4.5 e 4.6.

Podemos observar (figuras 4.5 e 4.6) que os espectros de ¹H dos adutos são idênticos, o que confirma a presença da possível isomeria óptica. Para nos certificarmos da estrutura foi realizado um espectro ¹H-¹H –COSY (figura 4.7) e que também resultou em espectros idênticos. Portanto, podemos concluir que os produtos são realmente isômeros ópticos e pela atribuição dos deslocamentos (tabela 4.1) confirmar a estrutura do 1,*N*²-PropanodGuo.

Figura 4.4. Estrutura numerada do 1,*N*²-propanodGuo para identificação dos hidrogênios nos espectros RMN apresentados nas figuras 4.5 e 4.6.

Figura 4.5. Espectro de ^1H RMN para o produto de 45 mim. Os átomos de hidrogênio estão atribuídos de acordo com a numeração da molécula representada na figura 4.4.

Figura 4.6. Espectro de ^1H RMN para o produto de 47 mim, com os picos ampliados, os quais foram utilizados para a atribuição dos deslocamentos químicos dos hidrogênios da molécula, apresentados da tabela 4.1

Figura 4.7. Espectro de ^1H - ^1H –COSY RMN para um dos isômeros de 1, N^2 -propanodGuo.

A análise de RMN 2D, mostrou que os isômeros são realmente idênticos e se tratam de isômeros ópticos do aduto. (A) apresenta o espectro total, (B) Ampliação para melhor visualização dos acoplamentos entre 5,6 e 3,4 ppm e (C) Ampliação para melhor visualização dos acoplamentos entre 3,1 e 1,0 ppm.

Tabela 4.1. Deslocamentos químicos no espectro de ^1H RMN dos isômeros de 1, N^2 -propanodGuo em D_2O .

Posição	δ (ppm)	Multiplicidade	Tipo	J (Hz)
H-11	1,40862	D	CH_3	6,403
H-6	3,808535	duplo d	$\text{C}-\text{CH}-\text{N}$	17,34
H-7 ^a	1,74257	t largo	$\text{C}-\text{CH}_2-\text{C}$	Nf
H-7b	2,3151	duplo t	$\text{C}-\text{CH}_2-\text{C}$	20,425
H-8	6,362855	T	$\text{N}-\text{CHOH}-\text{C}$	11,965
H-2	7,98336	S	$\text{C}-\text{NH}-\text{C}$	
H-1'	6,31221	T	$\text{O}-\text{CH}-\text{N}$	13,74
H-2'	2,55487	M	$\text{C}-\text{CH}_2-\text{C}$	24,17
H-2''	2,81503	m (dddd)	$\text{C}-\text{CH}_2-\text{C}$	14,83
H-3'	4,67187	m (dddd)	$\text{C}-\text{CH}-\text{C}$	13,2
H-4'	4,166085	M	$\text{O}-\text{CH}-\text{C}$	11,965
H-5'	3,8601	M	$\text{HO}-\text{CH}_2-\text{C}$	15,152
H-5''	3,891955	M	$\text{HO}-\text{CH}_2-\text{C}$	11,71

m, multiplete; t, tripleto; d, duplete; s, singlete; nf, não fornecido.

A confirmação da isomeria S e R dos isômeros do 1, N^2 -propanodGuo foi realizada pela análise de dicroísmo circular (DC) em meio ácido, apresentado na figura 4.8 (A).

Pela análise de DC podemos observar que um dos adutos tem espectro positivo e outro negativo, mostrando a diferença de isomeria das moléculas, e provando que são os enantiômeros SS e RR, nos carbonos 6 e 8 do 1, N^2 -propanoguanina. O pico de máxima

absorção em aproximadamente 280 nm está de acordo com os dados apresentados Chung e col., que mostraram pela primeira vez que os isômeros do propanodGuo possuem atividade óptica diferente (Chung *et al.*, 1983).

A figura 4.8 (B) apresenta o espectro de absorbância dos adutos, que apresentam máxima absorção em 260 nm. O isômero 6R,8R apresentava maior concentração para a possível comparação entre os dois espectros, que são idênticos.

Figura 4.8. Espectro de dicroísmo circular para identificação dos enantiômeros do 1,N²-propanodGuo. (B) representa o espectro de absorbância dos adutos adquirido durante a aquisição de CD.

4.1.3.1 Determinação do coeficiente de extinção molar (ϵ) do 1,N²-propanodGuo

Após a confirmação estrutural e elevado grau de pureza apresentado nas análises de espectrometria de massa e RMN, os isômeros secos, foram pesados e ressuspensos em água tratada com Chelex[®]. A partir dos valores de absorbância para diferentes amostras com concentrações conhecidas foram plotados curvas e, a partir das equações determinados os coeficientes de extinção molar dos isômeros do aduto. As curvas possuíam grande linearidade entre os valores de absorbância e concentração ($R > 0,99$).

A determinação do coeficiente de extinção molar foi realizada com a utilização da fórmula de Lambert Beer ($A = \epsilon \cdot b \cdot c$), com a utilização dos valores de concentração e absorbância de cada ponto. A tabela 4.2 apresenta os coeficientes de extinção molar calculados para cada um dos adutos analisados e também o desvio padrão.

Tabela 4.2. Valores do coeficiente de extinção molar (ϵ) dos isômeros de 1,N²-propanodGuo.

1,N ² -propanodGuo	ϵ	Desvio Padrão
Isômero 1	15443	5,11 %
Isômero 2	15234	4,58 %

4.1.3.2 Avaliação da estabilidade dos isômeros de 1,N²-propanodGuo

Durante as análises por espectrometria de massas observamos que as áreas dos adutos de 1,N²-propanodGuo diminuía após ficarem algum tempo sob temperatura ambiente ou após passarem pelo processo de hidrólise, em pH ácido. Por esse motivo, realizamos a avaliação da estabilidade dos mesmos.

Os padrões foram monitorados durante 24 h por medidas do espectro de absorbância, nos pHs ácidos 3 e 5 (o mesmo que os adutos são submetidos durante o processo de hidrólise), neutro (7) e básico (10). Para avaliação da estabilidade, monitoramos os valores de absorbância em 254 nm. A concentração inicial dos isômeros RR e SS foram propositalmente diferente para avaliarmos se a quantidade de adutos interferia na instabilidade, ou seja, na taxa de decaimento da absorbância.

Podemos observar nos espectros de absorbância da figura 4.9, que em pH 3,0 o isômero 2 apresentou decaimento médio de 27% nos valores de absorbância enquanto o isômero 1 apresentou decaimento médio de 15%, durante as 24 horas de monitoramento. É interessante notar que o isômero 2 apresentou maior taxa de degradação que o isômero 1, isto ocorreu, provavelmente, porque o isômero 2 também apresentava maior concentração inicial que o 1.

Figura 4.9. Espectros de absorvância dos isômeros 1 e 2 de 1, N^2 -propanodGuo em pH 3 após 24 h de incubação.

Também avaliamos o perfil de degradação em pH 5. Em apenas 30 mim de incubação observamos decomposição média de 17 % em relação à concentração inicial dos adutos (figura 4.10). Vale ressaltar que durante o processo de hidrólise (descrito em 3.5.7) o

DNA é submetido às mesmas condições do experimento acima descrito, ou seja, pH 5 durante 30 min, e que quando os adutos RR e SS estão na mesma concentração inicial o perfil de decaimento na absorbância é semelhante.

Figura 4.10. Espectros de absorbância dos isômeros 1 e 2 de $1,N^2$ -propanodGuo em pH 5,0, após 30 min de incubação.

Nos experimentos com pH neutro (7,0), observamos que a degradação dos isômeros não é significativa quando comparada com a ocorrida durante a hidrólise, ou seja, em pHs

ácidos, observados nas figuras 4.9 e 4.10. A figura 4.11, apresenta os espectros de absorvância em pH neutro, com decaimento médio de 2 % para os dois isômeros.

Figura 4.11. Espectros de absorvância dos isômeros 1 e 2 de 1, N^2 -propanodGuo em pH 7, após 24 h de incubação.

Em pH básico (10), podemos observar que o decaimento médio também não é significativo, apenas 1 %. Porém, constatamos na figura 4.12 que nas primeiras 4 horas de incubação a absorbância decai mais significativamente.

Figura 4.12. Espectros de absorbância dos isômeros 1 e 2 de 1, N^2 -propanodGuo em pH 10, após 24 h de incubação.

Os experimentos de avaliação da estabilidade dos isômeros de 1,*N*²-propanodGuo, demonstraram os isômeros apresentam estabilidade semelhante e esta é maior pHs neutros a básicos, diferentemente de pHs ácidos no qual a decomposição pode chegar a 30 % em pH 3 durante 24 horas e 17 % em pH 5 durante 30 min de incubação a 37 °C, sob agitação. No processo de hidrólise do DNA, são realizadas incubações de 30 min e 1 h em pH 3 e 5 respectivamente. Por este motivo, para corrigirmos o efeito da instabilidade dos padrões em pHs baixos, o padrão interno ([¹⁵N]-1,*N*²-propanodGuo) é adicionado nas análises por espectrometria de massas antes da hidrólise, pois desta forma a relação entre os adutos não marcado e marcado permanece constante (adotamos que o perfil de degradação de ambos é semelhante).

4.2. Desenvolvimento de metodologia para quantificação de 1,*N*²-εdGuo e

1,*N*²-propanodGuo em DNA pelo sistema HPLC/ESI/MS-MS

O desenvolvimento da metodologia sensível para a detecção e quantificação de 1,*N*²-εdGuo e 1,*N*²-propanodGuo, se tornou possível após a síntese e purificação de todos os padrões necessários. Nosso laboratório já possuía domínio de como sintetizar e purificar o eteno aduto, e por isso não enfrentamos dificuldades.

Para o propano aduto tivemos que padronizar uma metodologia de síntese com maiores rendimentos e um método de purificação por HPLC, para que fossem utilizados em análises de RMN e como padrões no desenvolvimento da metodologia por espectrometria de massas.

No desenvolvimento da metodologia foram testados inicialmente os melhores valores de voltagem do cone, temperaturas, pressões dos gases de nebulização e colisão, a fim de garantirmos uma melhor ionização das moléculas.

Posteriormente, após todos os parâmetros estabelecidos, iniciou-se a padronização das condições cromatográficas para melhor separação dos adutos em relação às bases do

DNA não modificadas. Para isso, foi utilizado um sistema de válvula que separa o último nucleotídeo não modificado (dT) do primeiro aduto a ser analisado. Sendo assim, os nucleotídeos não modificados são direcionados após a separação na primeira coluna para o descarte e os adutos para uma segunda coluna e posteriormente para o espectrômetro.

Todos os nucleotídeos modificados ou não são eluídos inicialmente por uma primeira coluna com gradiente de ácido fórmico (0.1% em água) e acetonitrila. A válvula usada para direcionar o fluxo troca duas vezes de posição: aos 13 min (tempo de limpeza), permitindo ao eluente da primeira coluna entrar na segunda coluna, e aos 24 min (período de análise), permitindo a lavagem da primeira coluna enquanto o aduto é eluído da segunda coluna para o espectrômetro de massa. O tempo total desta análise é de 35 min. A figura 4.13 apresenta um cromatograma representativo dos adutos analisados, 1,*N*²-εdGuo e 1,*N*²-propanodGuo.

A figura 4.13 apresenta o perfil de eluição de 500 amol dos adutos 1,*N*²-εdGuo e 1,*N*²-propanodGuo e 33 fmol dos seus respectivos padrões isotopicamente marcados, que apresentam acréscimo de 5 unidades de massa em relação aos padrões não marcados. Os adutos de 1,*N*²-εdGuo são eluídos em aproximadamente 22,08 min e os adutos de 1,*N*²-propanodGuo em 23,01, sendo que, os isômeros 6S-8S e 6R-8R, do propano aduto, são detectados simultaneamente no mesmo cromatograma pela transição 338-222 [M+H]⁺, onde podemos observar que não há separação completa dos picos.

Figura 4.13. Cromatogramas representativos de 500 amol de 1,*N*²-εdGuo (A), 1,*N*²-propanodGuo (C), e 33 fmol dos padrões isotopicamente marcados [¹⁵N₅]-1,*N*²-εdGuo (B) [¹⁵N₅]-1,*N*²-propanodGuo (D). (E) representa o cromatograma de 100 μg de DNA de timo de bezerro hidrolisado, sendo a dGuo eluída em 8,83 min. (F) representa as posições da válvula automática durante a análise em sistema HPLC/ESI/MS-MS.

Na figura 4.13 (E) está representado o cromatograma de 100 μg de DNA de timo de bezerro hidrolisado. Neste cromatograma observamos a separação completa das bases do DNA, sendo a dGuo eluída em 8,83 min. Este fato nos permite a detecção e quantificação das bases nitrogenadas não modificadas na mesma metodologia em que os adutos serão analisados, excluindo a necessidade de outras técnicas e uma segunda análise.

Para validação do método foram construídas curvas de calibração para dGuo, com concentrações que variaram entre 0,5 e 100 nmol da base, e também para 1, N^2 - ϵ dGuo e 1, N^2 -propanodGuo em relação aos seus padrões isotopicamente marcados. As concentrações dos padrões variaram entre 100 amol e 100 fmol, sendo que em cada amostra foi adicionado 33 fmol do padrão interno. A curva foi construída pela relação entre as áreas de cada aduto e seu respectivo padrão marcado versus a quantidade de padrão não marcado adicionado.

Nas figuras 4.14 e 4.15 estão representadas cada uma das curvas de calibração descritas acima. Todas as curvas apresentam coeficiente de linearidade acima de 0,99.

Figura 4.14. Curva de calibração para dGuo, com concentrações que variam de 0,5 a 100 nmol.

Figura 4.15. Curva de calibração 1, N^2 - ϵ dGuo (A) e 1, N^2 -propanodGuo (B). Concentrações dos adutos variam entre 100 amol e 100 fmol, com 14 pontos. Em cada uma das amostras foram adicionados 33 fmol de padrão isotopicamente marcado com $^{15}\text{N}_5$.

Para demonstrar a reprodutibilidade e repetitibilidade do método, foram injetadas três amostras de 1 mg de DNA de timo de bezerro hidrolisado contaminado com 1 fmol de cada um dos padrões e 33 fmol dos padrões isotopicamente marcados. As amostras foram injetadas três vezes no mesmo dia e durante três dias subsequentes. A tabela 4.3 e a figura 4.16, apresentam as quantificação de dGuo, 1,*N*²-εdGuo e 1,*N*²-propanodGuo além de um cromatograma representativo de uma das amostras analisadas.

Tabela 4.3. Quantificações de 1 fmol de 1,*N*²-εdGuo e de cada um dos isômeros de 1,*N*²-propanodGuo em 100 µg de DNA de timo de bezerro. As análises foram repetidas 3 vezes em 3 dias subsequentes.

		1, <i>N</i> ² -propanodGuo - fmol	1, <i>N</i> ² -propanodGuo/10 ⁷ dGuo	1, <i>N</i> ² -εdGuo - fmol	1, <i>N</i> ² -εdGuo/10 ⁷ dGuo
Dia 1	DNA A	2,16	1,20	0,93	0,49
	DNA B	1,98	1,10	1,02	0,56
	DNA C	2,04	1,13	0,94	0,52
	<i>Média</i>	2,06	1,14	0,95	0,52
	<i>DP</i>	0,1	0,05	0,07	0,03
Dia 2	DNA A	2,17	1,01	1,01	0,56
	DNA B	1,95	1,08	1,03	0,48
	DNA C	2,09	1,16	0,95	0,53
	<i>Média</i>	2,07	1,08	0,10	0,52
	<i>DP</i>	0,11	0,07	0,04	0,04
Dia 3	DNA A	2,20	1,18	1,02	0,58
	DNA B	2,02	1,12	1,07	0,59
	DNA C	2,03	1,13	1,05	0,58
	<i>Média</i>	2,08	1,14	1,04	0,58
	<i>DP</i>	0,10	0,03	0,02	0,01
DNA A	<i>Média</i>	2,17	1,13	0,96	0,54
	<i>DP</i>	0,02	0,10	0,05	0,05
DNA B	<i>Média</i>	1,98	1,10	1,04	0,54
	<i>DP</i>	0,03	0,02	0,03	0,07
DNA C	<i>Média</i>	2,05	1,14	0,98	0,54
	<i>DP</i>	0,03	0,02	0,06	0,03
Total	<i>Média</i>	2,11	1,15	1,00	0,55
	<i>DP</i>	0,17	0,11	0,06	0,05

Figura 4.16. Cromatograma de 1 fmol de 1, *N*²-εdGuo (A) e de cada um dos isômeros de 1, *N*²-propanodGuo (C), 33 fmol dos padrões isotopicamente marcados (B e D) e 100 μg de DNA de timo de bezerro hidrolisado, em 260 nm (E).

Na tabela 4.3 observamos que em todas as análises independente do dia em que tenha ocorrido, a quantidade de 1,N²- ϵ dGuo e 1,N²-propanodGuo é muito semelhante (desvio padrão de 8% e 6% respectivamente). Além disso, quantidade de propano quantificada em cada análise foi o dobro da de etenos, já que foram adicionados em cada amostra 1 fmol de 1,N²- ϵ dGuo e 2 fmol de 1,N²-propanodGuo, o que comprova que o método é reprodutivo. Por fim, comprovamos a repetitibilidade com a injeção das amostras de DNA descritas acima por 3 vezes consecutivas, o que resultou em aproximadamente a mesma quantidade de dGuo e adutos nas três restrições (desvio menor que 10%).

O limite de detecção e quantificação foram determinados como sendo, respectivamente, 3 e 10 vezes a relação entre o sinal dos adutos e o ruído, o que corresponde nesta metodologia a 100 e 500 amol dos adutos. O cromatograma da figura 4.17 apresenta uma amostra de DNA comercial hidrolisado e contaminado com 500 amol dos adutos não marcados. Neste cromatograma podemos observar a relação sinal/ruído 9,5 para 1,N²- ϵ dGuo e 11,2 para o 1,N²-propanodGuo.

Figura 4.17. Cromatograma representativo do limite de quantificação do método com 500 amol de $1,N^2\text{-}\epsilon\text{dGuo}$ (A) e de cada um dos isômeros de $1,N^2\text{-propanodGuo}$ (C), 33 fmol dos padrões isotopicamente marcados (B e D) e 100 μg de DNA de timo de bezerro hidrolisado, em 260 nm (E).

4.2.1 Quantificação de 1,N²-propanodGuo no DNA de timo de bezerro após tratamento com acetaldeído

Estudos demonstraram que a formação de propano adutos derivados da reação de acetaldeído com a dGuo é catalisada por aminoácidos como lisina e arginina, tanto *in vitro* como *in vivo*, pois histonas são ricas em L-arginina e L-lisina (Sako et al., 2003; Sako et al., 2002). De fato, níveis basais dos isômeros de 1,N²-propanodGuo foram detectados em órgãos normais (pulmão e fígado) de humanos (Zhang et al., 2006).

Por este motivo investigamos a formação de 1,N²-propanodGuo no DNA de timo de bezerro variando-se a presença de lisina, temperatura e concentração de acetaldeído. A figura 4.18 apresenta os níveis do aduto quantificados em 100 µg de DNA de timo hidrolisado. A formação do aduto foi verificada após a incubação em três concentrações de acetaldeído, 0,5 mM, 1 mM e 10 mM a 18 e 37 °C.

A avaliação da temperatura mostrou que a 37 °C, apesar do acetaldeído estar no estado vapor (p.e = 21,0), a formação do aduto é em média 15 vezes maior quando comparado com a mesma concentração do aldeído a 18 °C. Este fato pode estar associado à maior reatividade da 2'-desoxiguanosina em temperaturas maiores. Nos tratamentos com 10 mM de acetaldeído na presença de lisina observamos a formação de 3,2 moléculas de 1,N²-propanodGuo/10⁶dGuo a 18 °C e 48 moléculas de 1,N²-propanodGuo/10⁶dGuo a 37 °C. Além disso, na temperatura mais baixa a formação do aduto não foi detectada nas incubações com 0,5 mM de aldeído.

Quanto à variação da concentração de acetaldeído, podemos observar na figura 4.18, que a quantidade de aduto não aumenta proporcionalmente de acordo com a quantidade de aldeído adicionado, pois como este se apresenta no estado vapor a 37°C. a quantidade que efetivamente está em solução depende da solubilidade e do equilíbrio entre fase líquida e fase vapor no sistema fechado. Por estes motivos a 37 °C o coeficiente entre a quantidade de aduto formado entre 10 e 1 mM de acetaldeído não é 10 vezes e sim 2,5

vezes. Este fato é menos pronunciado a 18 °C, pois há um aumento de 8 vezes na quantidade de aduto formado entre os tratamentos de 1 e 10 mM de acetaldeído.

Figura 4.18. 1,N²-propanodGuo em DNA de timo após reação por 24 h com acetaldeído (0,5, 1 e 10 mM) a 37 °C e 18 °C, na presença ou não de lisina. *** p < 0,001 comparado com os mesmos tratamentos sem a adição de lisina. Barras pretas correspondem incubação com acetaldeído (1 mM e 10 mM), barras brancas correspondem incubação com acetaldeído na presença de lisina.

O grande aumento observado na formação de adutos em presença de lisina pode estar associado ao fato de que aminoácidos que podem atuar como agente nucleofílico, por exemplo, lisina e arginina, aumentam enormemente a formação do 1,*N*²-propanodGuo (Sako et al., 2003), pois reagem com o acetaldeído (um forte agente eletrofílico) resultando em crotonaldeído, que após reação com a dG forma os adutos, como demonstrado no mecanismo da figura 4.19.

Figura 4.19. Mecanismo de formação do 1,*N*²-propanodGuo, a partir de acetaldeído na presença de agente nucleofílico (grupos amina e sulfidríla) Adaptado de Sako *et al* (Sako et al., 2003).

4.2.2 Quantificação dos níveis basais de 1,*N*²-propanodGuo e 1,*N*²- ϵ dGuo no DNA de fibroblastos e fígado, cérebro e pulmão de ratos *Wistar*

O DNA dos cérebros, fígado e pulmão de 21 ratos *Wistar* machos (3 meses de idade), foram extraídos para quantificação dos níveis basais de 1,*N*²- ϵ dGuo e 1,*N*²-propanodGuo. O DNA (100 μ g) contaminado com 33 fmol de padrões isotopicamente marcados foi analisado pela metodologia descrita em 4.2. Na figura 4.20 está representado o cromatograma dos adutos 1,*N*²- ϵ dGuo (A) e 1,*N*²-propanodGuo (B), os padrões isotopicamente marcados (B e D) e também, os nucleotídeos não modificados em uma das amostras de cérebro analisadas (E).

A quantificação dos níveis basais de adutos presentes nos tecidos dos animais foi realizada com a utilização das curvas de calibração das figuras 4.14 e 4.15, indicando que os níveis de adutos presentes em 100 μ g de DNA de todos os tecidos e animais analisados estão acima do limite de detecção da metodologia. Os níveis médios dos adutos plotados em relação à quantidade de dGuo (10^8) estão apresentados na tabela 4.4, que também apresenta os valores mínimos e máximos de cada aduto nos tecidos avaliados.

Figura 4.20. Cromatograma representativo da análise de 1,N²-εdGuo e 1,N²-propanodGuo no DNA extraído do cérebro de ratos Wistar. 1,N²-εdGuo (A) e de cada um dos isômeros de 1,N²-propanodGuo (C), 33 fmol dos padrões isotopicamente marcados (B e D) e 100 µg de DNA hidrolisado, em 260 nm (E).

Tabela 4.4. Níveis basais de 1,N²-εdGuo e 1,N²-propanodGuo no DNA extraído do, fígado, pulmão e cérebro de ratos Wistar, n = 21.

1,N²-ε dGuo / 10⁸ dGuo				
	min. valor	max. valor	Média	Desvio
Fígado	1,77	3,41	2,47	0,61
Pulmão	0,39	2,14	0,87	0,34
Cérebro	1,83	4,19	2,96	1,43

1,N²-propanodGuo / 10⁸ dGuo				
	min. valor	max. valor	Média	Desvio
Fígado	3,02	6,93	4,61	0,69
Pulmão	1,47	3,42	2,25	1,72
Cérebro	1,86	10,19	5,66	3,70

Os níveis basais de 1,N²-εdGuo e 1,N²-propanodGuo também foram quantificados em células em cultura da linhagem IMR-90 (fibroblastos normais de pulmão humano). Os adutos foram analisados à partir de 100 µg de DNA isolado em setuplicata (tabela 4.5).

Tabela 4.5. Níveis basais de 1,N²-εdGuo e 1,N²-propanodGuo no DNA extraído de fibroblastos da linhagem IMR-90, n = 7.

1,N²-εdGuo/10⁸ dGuo	1,N²-propanodGuo/10⁸ dGuo
4.01 ± 0.32	3.43 ± 0.33

4.3. Estudos da citotoxicidade e genotoxicidade do acetaldeído em fibroblastos pulmonares humanos

4.3.1 Cálculo da concentração de acetaldeído nos tratamentos dos fibroblastos pulmonares humanos - reação com 2,4-dinitrofenilhidrazina

O acetaldeído é um composto bastante volátil, apresenta temperatura de ebulição 21 °C a 1 atm, por esta razão em todos os tratamentos de células, os valores de concentração apresentados sempre correspondiam à quantidade adicionada no início da incubação de 3 h. No entanto, é extremamente importante para melhor exatidão dos resultados que a concentração em que as células foram submetidas ao aldeído seja conhecida.

Para isso, inicialmente, desenvolvemos uma metodologia baseada em cromatografia gasosa e head-space, em que o acetaldeído depois de adicionado no meio de cultura celular seria evaporado dentro de um frasco hermeticamente fechado e então monitorado por CG.

No entanto, esta metodologia não foi bem sucedida, pois o aldeído tem estrutura pequena e apresenta baixa retenção pela coluna cromatográfica. Além disso, após um grande período de otimização dos parâmetros cromatográficos a metodologia não foi reprodutiva para concentrações abaixo de 1 mM e por isso partimos para a utilização de outro método e técnica.

A 2,4-dinitrofenilhidrazina é um composto conhecido por reagir com aldeídos e cetonas formando hidrazonas insolúveis, amarelas e estáveis. O esquema da figura 4.21 apresenta a reação entre o acetaldeído e a 2,4 dinitrofenilhidrazona.

Figura 4.21. Esquema da reação entre acetaldeído e 2,4 dinitrofenilhidrazina

O produto da reação entre acetaldeído e 2,4 dinitrofenilhidrazina, AA-DNPH, foi monitorado por HPLC como descrito em 3.5.3.1. Inicialmente, construímos uma curva de calibração para testarmos a reprodutibilidade e o limite de detecção do método. O limite de detecção (relação 3 vezes sinal ruído) é de 1 nM e a curva de calibração está apresentada na figura 4.22.

Figura 4.22. Curva de calibração da reação entre acetaldeído e 2,4 dinitrofenilhidrazina.

A avaliação da interferência do meio de cultura, na detecção do AA-DNPH, onde a hidrazina é adicionada para reagir com o aldeído mostrou que o meio não interfere na detecção do aduto. No entanto, para minimizarmos o efeito de reações secundárias, a curva de calibração também foi preparada em DMEM com 10% de SFB.

Inicialmente, foram realizados experimentos para determinar as concentrações com as quais as células da linhagem IMR-90 foram expostas nos experimentos de viabilidade celular em placas de 10 cm de diâmetro. Para cada procedimento são usadas garrafas ou placas diferenciadas, de acordo com a quantidade de células necessárias. Por este motivo, foram realizados experimentos para determinar a quantidade de acetaldeído em todos os frascos usados no desenvolvimento deste trabalho.

Na tabela 4.6 apresentamos os valores de concentração de aldeído encontrados após a reação entre 2,4 dinitrofenilhidrazina (2 h) e alíquotas de meio de cultura retiradas imediatamente após a adição do aldeído e após 3 h de incubação das células com o aldeído.

Todas as incubações foram realizadas na presença ou não de células na placa, a fim de tentarmos calcular a concentração de aldeído captado. Porém, não encontramos diferenças significativas entre os valores adicionados na placa com e sem a presença de células, o que impossibilitou afirmar a concentração que cada célula absorveu.

Entretanto, podemos afirmar pela análise da figura 4.6 e tabela 4.23, que as concentrações descritas até o momento para os tratamentos de células IMR-90 com acetaldeído eram muito maiores do que os valores em que as células foram realmente expostas, pois grande quantidade do aldeído adicionado evapora assim que adicionado no meio de cultura a 37 ° C.

Tabela 4.6. Valores das concentrações de acetaldeído nos tratamentos dos fibroblastos da linhagem IMR-90 em placas de 10 cm de diâmetro. Valores estimados pela concentração do aduto AA-DNPH.

ND = não detectado, C = contém células. 0h e 3h, tempo em que foram retirados alíquotas do meio de cultura para reação com 2,4-dinitrofenilhidrazina.

	[Acetaldeído] μM			
	0h		3h	
	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão
Controle C	ND		ND	
Controle	ND		ND	
500 μM C	50,23	33,33	35,30	2,94
500 μM	48,74	12,14	37,27	0,96
1 mM C	54,39	6,46	42,24	3,10
1 mM	57,66	23,91	43,09	3,14
10 mM C	366,49	185,59	223,41	2,99
10 mM	209,29	151,85	233,92	11,49
50 mM C	1040,81	193,02	973,52	112,86
50 mM	908,35	154,29	909,79	110,10
100 mM C	1423,20	42,56	1221,78	57,61
100 mM	1252,49	151,92	1267,32	68,67

Figura 4.23. Concentrações de acetaldeído calculadas por derivatização com DNPH nos tratamentos dos fibroblastos em placas de 10 cm de diâmetro. O eixo y corresponde à concentração de acetaldeído calculada e o eixo x a adicionada.

A tabela 4.7 resume as concentrações adicionadas e as calculadas de acetaldeído no meio de cultura das células de 10 cm de diâmetro que são utilizadas na quantificação da viabilidade celular.

Tabela 4.7. Valores das concentrações de acetaldeído adicionados e calculados pela concentração do aduto AA-DNPH nos tratamentos de células com acetaldeído em placas de 10 cm de diâmetro.

Acetaldeído	
Adicionado	Calculado (AA-DNPH)
500 µM	49 µM
1000 µM	56 µM
10000 µM	288 µM
50000 µM	975 µM
100000 µM	1338 µM

A análise da tabela 4.7 permite-nos observar que tivemos uma diminuição de aproximadamente 10 vezes na concentração do aldeído nos tratamentos de 500 μM , 18 vezes para 1 mM, 34 vezes em 10 mM, 51 vezes para 50 mM e 74 vezes em 100 mM. Estes resultados demonstram que quanto maior a quantidade de aldeído adicionado maior a taxa de evaporação, o que pode estar relacionado, além da alta volatilidade, com a solubilidade do composto no meio de cultura.

As figuras 4.24 e 4.25 apresentam os resultados da concentração calculada de acetaldeído, após a derivatização com DNPH em garrafas de 75 cm^2 e 25 cm^2 , utilizadas, respectivamente, para dosagem de adutos de DNA, como por exemplo, 8-oxodGuo e em experimentos de citometria de fluxo, ensaio cometa e nos ensaios de lipoperoxidação.

	[Acetaldeído] μM - 0h		[Acetaldeído] μM - 3h	
	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão
Controle	ND		51,5	4,7
1 mM	164,9 **	15,4	110,1	7,5
10 mM	710,7 ***	7,0	643,7 ***	99,9

Figura 4.24. Quantidade real de acetaldeído no meio de cultura, imediatamente após a adição e ao término de 3 h do tratamento das células da linhagem IMR-90 em garrafas de 75 cm^2 , para dosagem de 8-oxodGuo. (***) $p < 0,001$ comparado com controle e 1 mM, ** $p < 0,01$ comparado com controle), $n = 4$. O eixo y corresponde à concentração de acetaldeído calculada e o eixo x a adicionada.

	[Acetaldeído] μM 0h		[Acetaldeído] μM 30h	
	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão
Controle	nd	nd	27,1	0,6
500 μM	57,5	13,6	31,6	0,6
1 mM	155,1	37,3	42,7	1,0
10 mM	703,2 ***	62,8	336,9	61,0
50 mM	953,0 ***	38,4	932,7	18,3
100 mM	1953,3 ***	250,3	884,0	52,1

Figura 4.25. Quantidade real de acetaldeído no meio de cultura, imediatamente após a adição e ao término de 3 h do tratamento das células da linhagem IMR-90 em garrafas de 25 cm² utilizadas em ensaios cometa e citometria de fluxo. (***) $p < 0,001$, comparado com controle e demais concentrações), $n = 4$. O eixo y corresponde à concentração de acetaldeído calculada e o eixo x a adicionada.

Podemos observar nas figuras 4.24 e 4.25, que nas alíquotas retiradas das células controle em 0h, não houve formação de nenhum produto de derivatização com DNPH, uma vez que não houve adição do aldeído, o que comprova a precisão do método, sem interferentes. Após 3 h de tratamento, podemos observar a detecção de um produto de derivatização com DNPH das células controle, que pode ser produto de reação do derivatizante com algum composto resultante do tratamento, como aldeídos da lipoperoxidação, e por este motivo, só podemos quantificar a concentração inicial de acetaldeído, e não a concentração que as células absorveram.

A partir destes resultados, podemos verificar que os tratamentos foram realizados com concentrações muito menores do que a quantidade de acetaldeído adicionada no meio de cultura dos tratamentos celulares. Todos os resultados que se referem aos tratamentos de fibroblastos pulmonares humanos com acetaldeído, serão reportados com as concentrações calculadas nesta seção.

4.3.2. Viabilidade de células IMR-90 após tratamento com acetaldeído

Visando experimentos em que pretendíamos estudar os efeitos genotóxicos do acetaldeído em sistemas celulares, verificamos a citotoxicidade deste produto em culturas de fibroblastos pulmonares humanos da linhagem IMR-90.

As células foram tratadas com acetaldeído, nas concentrações 1 mM, 5 mM, 10 mM, 25 mM, 50 mM, 100 mM, 500 mM e 1 M, durante 3 h, como descrito em 3.5.2. Estas concentrações correspondem respectivamente a 64 μ M, 140 μ M, 278 μ M, 573 μ M, 945 μ M, 1356 μ M, 2749 μ M e 3907 μ M de acetaldeído calculado pela reação com DNPH (descrito em 4.3.1).

Na tabela 4.6 e na figura 4.26 observamos que apenas nos tratamentos com 64 μ M, 140 μ M e 278 μ M, as células foram coradas em mais de 70% pelo MTT, apresentando baixa citotoxicidade do aldeído. O cálculo do IC 50, onde 50 % das células apresentaram-se

mortas resultou em 21 mM de actaldeído adicionado. Por este motivo, todos os experimentos em que as células foram tratadas com acetaldéido se deram com no máximo 10 mM de aldeído adicionado.

Tabela 4.8. Porcentagens e desvio padrão de células viáveis após tratamento com acetaldéido.

<i>Acetaldeído</i>		<i>Viabilidade celular (%)</i>	<i>Desvio Padrão</i>
<i>Adicionado</i>	<i>Calculado</i>		
Controle	Controle	100,0	5,4
1 mM	64 μM	90,9	10,8
5 mM	140 μM	90,5	9,0
10 mM	278 μM	68,2	5,2
25 mM	573 μM	37,7	4,3
50 mM	945 μM	32,7	1,6
100 mM	1356 μM	27,4	9,2
500 mM	2749 μM	25,0	12,0
1 M	3907 μM	31,9	9,4

Figura 4.26. Porcentagem de células coradas por MTT após tratamento com diversas concentrações de acetaldéido, que variaram entre 1 mM e 1 M adicionados por 3 h.

4.3.3. Avaliação do tamanho e complexidade das células após tratamento com acetaldeído

Frente aos diversos resultados encontrados nos tratamentos dos fibroblastos com acetaldeído, resolvemos comparar por citometria de fluxo, o perfil de complexidade e tamanho das células, avaliados pelos parâmetros de dispersão lateral-SS e dispersão frontal-FS, que são parâmetros importantes para avaliar a morte celular.

Podemos observar no histograma representado na figura 4.27 que nos tratamentos com acetaldeído, o aumento da concentração favorece a morte celular, e esta se torna mais acentuada em 953 e 1953 μM , onde podemos observar a presença de duas populações distintas, uma com volume menor (FS), e por isso, atribuídas a células mortas, e outra população de células ainda vivas.

Figura 4.27. Perfil de complexidade (SS) por tamanho de células (FS), após tratamento com acetaldeído (Controle (A), 155 μM (B), 703 μM (C), 953 μM (D) e 1953 μM (E)).

A partir do histograma apresentado na figura acima, plotamos um gráfico de viabilidade celular em função da concentração de acetaldeído testada.

Podemos observar na figura 4.28, onde foram calculadas as porcentagens de células vivas nos diversos tratamentos com acetaldeído, que estes resultados comprovam os experimentos de viabilidade celular apresentados no item 4.3.2.

Figura 4.28. Porcentagem de células vivas após tratamentos com 155, 703, 953 e 1953 μM de acetaldeído em comparação com células controle.

4.3.4. Avaliação da atividade mitocondrial e quantidade de cálcio intracelular

A quantidade de cálcio intracelular e a atividade mitocondrial são parâmetros muito estudados para avaliação da morte celular via apoptose, uma vez que uma das formas de sinalização celular para apoptose é o aumento da quantidade de cálcio dentro do retículo endoplasmático e a diminuição da atividade mitocondrial.

Com o propósito de marcarmos cálcio intracelular e atividade da mitocôndria foram utilizados dois fluoróforos bastante conhecidos, Fluo3-AM e mito tracker red, para posterior

análise por citometria de fluxo. O Fluo3-AM é permeável às células viáveis, sofrendo ação enzimática de esterases, convertendo-se em um composto intensamente fluorescente. Já mito tracker red é um fluoróforo a base de rodamina que permeia a membrana da mitocôndria dependendo do seu potencial.

Nos resultados obtidos para a intensidade de fluorescência era esperada uma diminuição da atividade mitocondrial (FL4), acompanhado por um aumento da quantidade de cálcio intracelular (FL1) nas células possivelmente apoptóticas.

Nas figuras 4.29 e 4.30 nos tratamentos com 155 μM de acetaldeído (97% de viabilidade celular), apesar de ocorrer um aumento na quantidade de cálcio, como descrito, anteriormente, por Holownia e col. (Holownia et al., 1999) a atividade mitocondrial não diminuiu, ao contrário, aumentou. Este fato pode estar ligado a um efeito de compensação da mitocôndria para diminuir o estresse gerado pelo tratamento, ou então, a um desacoplamento mitocondrial que aumentaria a sua atividade. Este efeito provocado por pequenas quantidades de aldeído já foi observado em outros trabalhos do grupo com 2,4-decadienal (Sigolo et al., 2008).

Nos tratamentos com 703 μM de acetaldeído, verificamos diminuição da atividade mitocondrial e aumento da quantidade de cálcio intracelular, estes resultados estão de acordo com a alta citotoxicidade do acetaldeído que resultou em 75% de viabilidade celular e, portanto possível morte por apoptose de 25% das células tratadas (figura 4.28).

Já, nos tratamentos com 953 μM de acetaldeído foi observada a diminuição na atividade mitocondrial e quantidade de cálcio intracelular. Este último pode estar associado ao alto número de células mortas (figura 4.28) resultando em aumento de poros da membrana, o que promoveria a saída do metal e a diminuição da fluorescência.

Também, nos tratamentos com 1953 μM de acetaldeído notamos diminuição da quantidade de cálcio intracelular provavelmente pelo mesmo motivo apresentado nos tratamentos com 953 μM do aldeído, além de aumento da atividade mitocondrial que não é

relevante já que com apenas 40% de células vivas, mais fluoróforo pode ter entrado pela membrana e a fluorescência medida superestimada.

Figura 4.29. Intensidade de fluorescência para cálcio intracelular (FL1) e atividade da mitocôndria (FL4) em diversas concentrações de acetaldeído (Controle (A), 155 μ M (B), 703 μ M (C), 953 μ M (D) e 1953 μ M (E).

Figura 4.30. Atividade mitocondrial (A) e cálcio intracelular (B) após tratamento de células IMR-90 em diferentes concentrações de acetaldeído (155, 703, 953 e 1953 μM). *** $p < 0,001$ comparado com controle, # $p < 0,001$ comparado com 165 μM, 703 μM, 953 μM de acetaldeído, § $p < 0,001$ comparado com 165 μM de acetaldeído, ** $p < 0,01$ comparado com controle.

4.3.5. Avaliação da fragmentação do DNA com iodeto de propídeo

A análise do conteúdo de DNA presente no núcleo celular é um marcador para apoptose bastante utilizado, uma vez que células apoptóticas apresentam um padrão de fragmentação (Oancea et al., 2006). Dependendo da fase do ciclo celular em que se encontram, células normais deverão apresentar conteúdo de DNA igual a $2n$ ou $4n$, enquanto células em apoptose apresentarão DNA menor que $2n$, geralmente múltiplos de 200 pares de bases, que representa o tamanho do DNA enovelado em torno de um nucleossomo.

Nestes experimentos utilizamos tampão de lise à base de triton e citrato de sódio que permeabiliza a membrana plasmática, garantindo a entrada do iodeto de propídio em todas as células sem que estas se rompam por completo, permitindo assim a detecção por citometria de fluxo.

A fluorescência do iodeto de propídio (FL3) é determinada pelo conteúdo do DNA ao qual se ligou, segundo as proporções referentes às regiões das células não apoptóticas (DNA íntegro) e das células apoptóticas (DNA fragmentado). Como mostrado na figura 4.31.

Figura 4.31. Histograma representativo da fluorescência do DNA em que o iodeto de propídeo se ligou.

Na figura 4.32, demonstramos os resultados obtidos nos tratamentos de fibroblastos com acetaldeído e posterior marcação com PI. Nos tratamentos com 155 μM e 703 μM do aldeído, observamos aumento na fragmentação do DNA dose dependente em relação à quantidade de acetaldeído adicionado. Estes resultados juntamente com os mostrados no item 4.3.4 (aumento da quantidade de cálcio intracelular e diminuição da atividade mitocondrial) sugerem que a morte celular resultante da exposição dos fibroblastos normais pulmonares humanos ao acetaldeído pode ser promovida por apoptose. Estes dados estão de acordo com o trabalho reportado por Holownia e col. (Holownia et al., 1999), que aponta para um aumento de cálcio intracelular e fragmentação do DNA marcado com PI em astrócitos de rato após tratamento com acetaldeído.

Podemos observar na figura 4.32 que o efeito protetor do acetaldeído sobre os efeitos deletérios promovidos pelo aldeído foi maior no tratamento com 703 μM de acetaldeído em relação ao tratamento com 155 μM .

Além disso, na figura 4.33, avaliamos, assim como descrito em 4.3.3, a porcentagem de células vivas em função de FS e SS. Observamos, também, que o tratamento com licopeno diminuiu a morte celular de maneira mais significativa em 703 μM do que em 155 μM de acetaldeído confirmando que nos tratamentos com esta concentração do aldeído o licopeno pode estar protegendo contra morte celular, e em 155 μM , como o número de células mortas é menor seu efeito é menos pronunciado.

Figura 4.32. Porcentagem de fragmentação do DNA celular marcado com iodeto de propídio após tratamento com acetaldeído. Barras pretas representam células que receberam apenas acetaldeído, barras brancas células que foram anteriormente pré-tratadas com licopeno.

Figura 4.33. Porcentagem de células vivas tratadas com 155 e 703 µM de acetaldeído na presença ou não de licopeno (20µM).

De fato, o efeito antiapoptótico promovido pelo licopeno já foi demonstrado por Liu e col. em experimentos com furões (Liu et al., 2006), onde foi observado que o efeito se dava diretamente na prevenção da ativação da p53.

Um dos principais mecanismos estudados de morte celular por apoptose é via ativação do promotor p53 que é fosforilado pela proteína ATM a qual se liga ao DNA fragmentado, como descrito na introdução (1.10). Portanto, o mecanismo de proteção exercido pelo licopeno nos tratamentos dos fibroblastos com acetaldeído pode estar acontecendo de duas formas, a primeira seria pela proteção direta contra reações de oxidação promovidas indiretamente pelo acetaldeído no DNA. A segunda hipótese não envolve a proteção do DNA, mas apenas o efeito direto na ativação do p53, que poderia não ser fosforilado pela proteína ATM, como discutido por Liu e col. anteriormente (Liu et al., 2006).

4.3.6. Investigação da peroxidação lipídica

A oxidação dos lipídios da membrana plasmática é um importante marcador de estresse oxidativo, pois além de provocar danos na membrana permitindo a entrada e saída de compostos com menor seletividade também levam à formação de aldeídos altamente reativos (p.e MDA, HNE e DDE).

O tratamento dos fibroblastos com acetaldeído resultou em aumento significativo de lipoperoxidação, em relação às células controle, nos tratamentos 58 μ M, 155 μ M e 703 μ M, que correspondem a 0,5 mM, 1 mM e 10 mM de aldeído adicionado (como apresentado em 4.3.1).

Quando comparados os níveis de lipoperoxidação, entre as diversas concentrações de acetaldeído utilizadas, observamos aumentos dose dependente nos níveis de MDA em resposta ao aumento da concentração de aldeído.

Os possíveis efeitos antioxidantes promovidos pelo licopeno foram analisados a fim de minimizar os níveis de lipoperoxidação acarretados pelo tratamento com acetaldeído em fibroblastos viáveis.

O efeito antioxidante promovido pela pré-incubação das células com licopeno leva a diminuição dos níveis de lipoperoxidação nos tratamentos com acetaldeído. Esta proteção é de 75 % nos tratamentos com 58 μM , 37 % com 155 μM e 27 % com 703 μM de acetaldeído, como podemos observar na figura 4.34.

Figura 4.34. Níveis de MDA (pmol) / proteína (mg) nas células pré incubadas com 20 μM de licopeno e tratadas com acetaldeído (58, 155 e 703 μM). * $p < 0,05$ comparado com controle, THF e licopeno. ** $p < 0,01$ comparado com AA 20 μM . *** $p < 0,001$ comparado com controle, THF e licopeno μM . # $p < 0,001$ comparado com mesmo tratamento sem adição de licopeno. Barras pretas representam células que receberam apenas acetaldeído, barras brancas células que foram anteriormente pré-tratadas com licopeno.

4.3.7. Estudo de fragmentação do DNA (Ensaio Cometa)

O Ensaio Cometa (EC) ou “Single Cell Gel electrophoresis” (SCGE) é uma técnica rápida e sensível na quantificação de lesões e detecção de efeitos de reparo no DNA em células individuais de qualquer organismo eucarioto, independente das células estarem em proliferação. Estas características conferem ao teste uma ampla aplicabilidade para ensaios de genotoxicidade *in vitro* e *in vivo*, incluindo estudos de biomonitoramento humano e ambiental.

Este ensaio é capaz de detectar danos no DNA induzidos por agentes alquilantes, intercalantes e oxidantes. Para alguns autores, o tamanho da cauda é proporcional ao dano que foi causado, porém é consenso apenas que a visualização do “cometa”, significa dano ao nível do DNA, podendo ser quebra simples, duplas, *crosslinks*, sítios de reparo por excisão e/ou lesões álcali-lábeis.

Nos resultados apresentados anteriormente, mostramos que o acetaldeído é capaz de induzir a oxidação de lipídeos da membrana plasmática e formar compostos reativos. Estes compostos podem, por sua vez, desencadear uma série de reações com outras biomoléculas, como proteínas e DNA, podendo gerar quebras.

O acetaldeído é um comprovado agente genotóxico (Brooks *et al.*, 2005), podendo assim causar quebras no DNA e, portanto, formar cometas. A possível indução de quebras formadas diretamente ou indiretamente pela ação do acetaldeído no DNA de fibroblastos pulmonares humanos expostos a acetaldeído foi avaliado por ensaio cometa na versão alcalina, onde são reconhecidas apenas quebras de fita e sítios álcali-lábeis. Estes resultados estão apresentados nas figuras 4.35, 4.36 e 4.37.

Figura 4.35. Ensaio cometa das células tratadas com 155 e 703 μM de acetaldeído. MMS controle positivo.

A figura 4.35 apresenta imagens de células aderidas no filme de agarose e coradas com brometo de etídio, após eletroforese. Podemos observar quatro imagens que representam tratamentos com 155 μM e 703 μM de acetaldeído (que correspondem a 1 mM e 10 mM do aldeído adicionado), além de células controle e tratadas com MMS, um forte agente alquilante e usado como controle positivo.

O tratamento com acetaldeído nas duas concentrações exemplificadas (155 μM e 703 μM) leva a um aumento visível no número de cometas formados, em relação às células controle. Quando comparamos apenas os tratamentos com 155 μM e 703 μM de acetaldeído o número de cometas aparentemente é o mesmo.

Para uma melhor análise dos resultados, foram contadas 100 células, em duplicata, para todos os experimentos realizados, sendo que os cometas foram classificados de acordo com o tamanho de suas caudas, como descrito em materiais e métodos (3.5.7). O número de cometas assim como o índice dos cometas formados e seus respectivos desvios padrão estão listados nas figuras 4.36 e 4.37.

Figura 4.36. Ensaio cometa das células pré-incubadas com 20 µM de licopeno e tratadas com 58, 155 e 703 mM de acetaldeído. Resultados expressos pelo índice do dano (tamanho da cauda) nos cometas formados. * $p < 0,05$ comparado com o mesmo tratamento sem a adição de licopeno. ** $p < 0,01$ comparado com controle, THF e licopeno. *** $p < 0,001$ comparado com controle, THF e licopeno. # $p < 0,001$ comparado com mesmo tratamento sem adição de licopeno. Barras pretas representam células que receberam apenas acetaldeído, barras brancas células que foram anteriormente pré-tratadas com licopeno.

Figura 4.37. Ensaio cometa das células pré-incubadas com 20 µM de licopeno e tratadas com 58, 155 e 703 mM de acetaldeído. Resultados expressos pelo número de cometas formados. Barras pretas representam células que receberam apenas acetaldeído, barras brancas células que foram anteriormente pré-tratadas com licopeno.

A partir da análise das figuras 4.36 podemos observar aumento significativo do índice de cometas formados nos três tratamentos com acetaldeído em relação às células controle. No entanto, não encontramos aumentos significativos, quando comparamos as três concentrações analisadas, apesar de notarmos uma tendência de aumento no índice dos formados, dose dependente em relação à concentração de acetaldeído adicionado.

Em relação ao controle positivo, nos tratamentos com MMS, observamos que os aumentos apresentados nos índices dos danos ao DNA foi muito semelhante aos provocados pelo acetaldeído (703 µM), evidenciando o elevado efeito genotóxico deste aldeído.

Na figura 4.36, também, foram apresentados os resultados em que os pré-tratamentos com licopeno diminuíram os efeitos gerados pelo acetaldeído em todas as concentrações testadas. Nos tratamentos com 58 e 155 μM o pré-tratamento com licopeno fez com que os índices dos cometas formados ficassem próximos aos níveis basais.

Na figura 4.36 estão reportados os resultados em função do número de cometas formados nos tratamentos com 58, 155 e 703 μM de acetaldeído em relação às células controle. Apesar de não apresentarem aumentos significativos, os resultados mostram a tendência de aumento de células com DNA fragmentado em relação ao aumento da concentração do aldeído. Nesta figura podemos observar, mais uma vez, que os danos gerados por 703 μM de acetaldeído apresentam a mesma amplitude que o tratamento com o controle positivo (MMS 80 μM).

O efeito da atividade antioxidante do licopeno foi avaliada também em relação ao número de cometas. Podemos observar na figura 4.37 que em todas as concentrações de acetaldeído testadas (58, 155 e 703 μM), houve uma diminuição no número de células com DNA fragmentado em presença de 20 μM de licopeno, quando comparado ao tratamento de mesma concentração de aldeído sem adição do antioxidante.

O licopeno se mostrou um agente antioxidante bastante eficaz aos danos provocados pelo acetaldeído na membrana plasmática e no DNA dos fibroblastos, diminuindo os níveis de lipoperoxidação e consequentemente fragmentação. Este fato é relevante, pois ainda não existem relatos na literatura que correlacionem sua ação antioxidante frente aos efeitos citotóxicos e genotóxicos acarretados pelo acetaldeído.

4.3.8. Dosagem de 8-oxodGuo no DNA de células da linhagem IMR-90 tratadas com acetaldeído

A 8-oxodGuo é biomarcador de danos oxidativos no DNA mais estudado até o momento, a presença desta modificação do DNA configura desbalanço redox, já que seu mecanismo de formação envolve espécies reativas de oxigênio ($\text{HO}^\bullet$ e $^1\text{O}_2$).

A formação de 8-oxodGuo foi avaliada nos fibroblastos da linhagem IMR-90 tratados com acetaldeído, e apresentaram aumentos significativos nos níveis 8-oxodGuo em relação às células controle. A figura 4.38 apresenta os resultados dos tratamentos dos fibroblastos com concentrações 165 e 711 μM de acetaldeído (que correspondem a 1 mM e 10 mM do aldeído adicionado).

Podemos observar na figura 4.38, que há uma tendência de aumento nos níveis de 8-oxodGuo nos tratamentos com 165 μM de acetaldeído em relação às células controle. Quando a concentração aumenta cerca de 4 vezes, observamos um aumento de mesma amplitude nos níveis de 8-oxodGuo, ou seja a quantidade de bases oxidadas também aumenta 4 vezes quando comparamos os tratamentos de 165 μM com os de 711 μM do aldeído. Já, os níveis de bases oxidadas apresentaram-se cerca de 25 vezes maiores nos tratamentos com 711 μM de acetaldeído do que nas células controle.

Figura 4.38. Níveis de 8-oxodGuo em fibroblastos pulmonares humanos (IMR-90) expostos a acetaldeído durante 3 h. *** $p < 0,001$ comparado com controle e 165 μM , $n = 3$.

4.3.9. Dosagem de 1,*N*²-propanodGuo e 1,*N*²- ϵ dGuo no DNA de células da linhagem IMR-90 tratadas com acetaldeído

Os fibroblastos normais pulmonares humanos da linhagem IMR-90, tratados com acetaldeído, apresentaram aumentos significativos nos níveis de 1,*N*²- ϵ dGuo e 1,*N*²-propanodGuo em relação às células controle. Estes aumentos foram observados principalmente nas células tratadas com 711 μM de acetaldeído. Já, nos tratamentos com 165 μM do aldeído, observamos acréscimo apenas no número de eteno adutos por base não modificada (figura 4.39 e tabela 4.9).

No entanto, quando comparamos os aumentos entre as duas concentrações do aldeído testadas, observamos que este aumento é muito maior nos níveis de 1,*N*²-

propanodGuo do que de 1,*N*²- ϵ dGuo. Além disso, observamos que o número de propano adutos é maior do que as de eteno adutos formados.

A figura 4.39 apresenta, também, os valores de 1,*N*²- ϵ dGuo e 1,*N*²-propanodGuo quantificados por HPLC/ESI-MS/MS no DNA das células pré-incubadas com 20 μ M de licopeno por 2 h e posteriormente tratadas com 165 e 711 μ M do aldeído. Nestes resultados, podemos observar que houve uma diminuição do dano em todas as concentrações de acetaldeído testadas, e que este decréscimo ocorreu nos dois adutos analisados.

Os níveis de adutos encontrados nas células controle, tratadas com THF e licopeno foram aproximadamente os mesmos, evidenciando que o pré-tratamento com licopeno, e que seu solvente THF, não são genotóxicos para as células. Além disso, podemos observar que os níveis basais entre os dois adutos nas células controle são, aproximadamente, iguais, cerca de 3 adutos a cada 10⁸ bases não modificadas, como apresentado em 4.2.2.

Tabela 4.9. Níveis de 1,*N*²- ϵ dGuo e 1,*N*²-propanodGuo no DNA das células tratadas com licopeno e acetaldeído.

	1, <i>N</i> ² - ϵ dGuo/10 ⁷ dGuo		1, <i>N</i> ² -propanodGuo/10 ⁷ dGuo	
	Media	Desvio Padrão	Media	Desvio Padrão
Cont	0,40	0,03	0,34	0,03
Lic	0,62	0,17	0,76	0,33
THF	0,94	0,25	0,26	0,02
165 mM	1,54	0,38	1,27	0,28
165 mM + Lic	0,5	0,3	0,6	0,3
711 mM	1,8	0,4	10,9	2,0
711 mM + Lic	0,6	0,1	2,3	1,3

Figura 4.39. Quantificação de 1,N²-εdGuo / 10⁷ dGuo (A) e 1,N²-propanodGuo/ 10⁷ dGuo (B) nos DNA das células tratadas com 20 μM de licopeno e acetaldeído (AA). *** p<0,001 comparado com controle e 165 μM. Barras pretas representam células que receberam apenas acetaldeído, barras brancas células que foram anteriormente pré-tratadas com licopeno.

4.4. Avaliação da quebra de DNA plasmídial após reação com acetaldeído

A reação do acetaldeído com DNA resulta na formação de adutos (figura 1.5), porém ainda não é conhecido se a formação dos mesmos leva a fragmentação da cadeia. Além disso, como observamos que a incubação das células com o aldeído leva a fragmentação do DNA (ensaio cometa 4.3.4 e marcação com iodeto de propídeo 4.3.9) e este mecanismo ainda precisa ser elucidado.

Mediante os efeitos provocados pelo acetaldeído no DNA, resolvemos expor DNA plasmídial ao aldeído na presença de lisina, a fim de verificarmos se a fragmentação da cadeia é resultado da interação direta do acetaldeído com as bases nitrogenadas na formação dos adutos ou se esta quebra é causada por um produto de reação do aldeído com algum componente celular.

Na figura 4.40 onde representamos a porcentagem de DNA intacto e na forma circular aberta, após incubação com diferentes concentrações de acetaldeído, podemos observar que a reação com DNA não acarretou nenhuma fragmentação significativa do plasmídio, o que comprova que o mecanismo de quebra da cadeia não é resultado da reação direta do aldeído com o DNA, ou seja, pode ser provocado por mecanismos de reparo, reações de produtos secundários ou apoptose, e por isso mereceria ser investigado.

Figura 4.40. Fragmentação de DNA plasmídial após tratamento com acetaldeído.

SC – superenovelado, OC- circular aberto.

Tratamento de ratos *Wistar* com acetaldeído

4.5. Tratamento de ratos *Wistar* com acetaldeído intraperitoneal por 8 dias

Ratos *Wistar* tratados i.p. com 150 mg/Kg de acetaldeído diluído em solução salina 0,9%, pH 5, apresentaram durante o período de tratamento (8 dias) uma perda significativa de peso em contraposição com ratos que receberam apenas injeções de solução salina 0,9% e os ratos controle. Além disso, durante o tratamento ocorreu o óbito de um dos animais do grupo inoculado com acetaldeído.

É importante ressaltar que os valores de concentração utilizados foram baseados em dados da literatura, que variam de 10 a 400 mg/Kg de aldeído e obtiveram resultados bastante interessantes de diminuição de locomoção, depressão, aversão, entre outros. No entanto, em nenhum destes trabalhos foi reportado morte ou que os animais apresentavam-se debilitados (Quertemont et al., 2005).

A tabela 4.10 apresenta as médias e o desvio padrão da variação do peso para cada um dos animais.

Tabela 4.10. Média do aumento e perda de peso dos ratos controle, veículo (0,9 % NaCl) e tratados com 150 mg/Kg de acetaldeído. (***) $p < 0,001$, acetaldeído em relação a controle e veículo).

<i>Diferença de massa corpórea final e inicial (g)</i>			
Rato	Controle	Veículo	Acetaldeído ***
1	25	14	-9
2	36	29	-17
3	16	37	-9
4	20	3	-58
5	36	16	-71
6	26	22	
Desvio Padrão	8,2	11,9	29,5

A figura 4.41 apresenta o gráfico que ilustra a média do decremento de peso destes animais em contraposição ao aumento contínuo dos animais que não receberam injeções de acetaldeído (veículo e controle).

Figura 4.41. Gráfico ilustrativo da variação da massa dos animais inoculados ou não com acetaldeído.

Esta diminuição de massa dos animais tratados com acetaldeído, apesar de preliminar é bastante interessante uma vez que pode indicar uma mudança no padrão fisiológico ou uma disfunção metabólica provocados pelo aldeído. No entanto, uma grande diminuição de massa durante o tratamento, como nos animais 4 e 5 que emagreceram cerca de 20 % da inicial, não era o objetivo inicial, pois é mais tóxico do que o esperado. Além de, estar contra os princípios permitidos pelo comitê de ética.

Porém, vale ressaltar que apenas dois animais dos cinco que ficaram no final do experimento apresentaram grande diminuição de massa, os outros três perderam menos de 10 % do peso inicial. O animal que veio a óbito no decorrer do experimento não apresentava grande emagrecimento como os animais 4 e 5, a causa morte não foi identificada.

4.5.1. Investigação de lipoperoxidação – Quantificação do aduto MDA-TBA

O efeito provocado pelo acetaldeído na lipoperoxidação foi monitorado pela quantificação do aduto fluorescente formado pelo MDA com o ácido tiobarbitúrico por HPLC/FD.

Observamos um aumento significativo de 70% nos níveis de MDA-TBA nos fígados dos ratos que receberam 150 mg/Kg de acetaldeído i.p. quando comparado aos animais que receberam solução salina 0,9% i.p., ou aos que não receberam nenhum tipo de tratamento (figura 4.42).

As análises de lipoperoxidação nos pulmões e cérebro destes animais não apresentou aumento significativo em relação ao controle e veículo, apesar de no cérebro ter havido uma tendência bastante pronunciada de indução de formação de MDA nos ratos tratados com acetaldeído (dados não apresentados).

Figura 4.42. Níveis de lipoperoxidação no fígado dos ratos tratados via intraperitoneal com 150 mg/Kg de acetaldeído em relação aos grupos controle. * $p < 0,005$, comparado acetaldeído em relação ao controle e veículo, $n=5$.

4.5.2. Estudo de fragmentação do DNA (ensaio cometa)

Nos experimentos com animais tratados que receberam 150 mg/kg de acetaldeído i.p. durante 8 dias, observamos que os níveis de fragmentação do DNA no fígado dos ratos que receberam acetaldeído foram duas vezes e meia maiores que os níveis de fragmentação apresentados nos ratos controle e cerca de duas vezes nos ratos que receberam injeções de solução salina 0.9%. Não houve variação nos níveis de fragmentação do DNA nos pulmões e cérebro destes animais.

A figura 4.43 apresenta os resultados de fragmentação do DNA do fígado dos animais tratados com acetaldeído.

Figura 4.43. Níveis de fragmentação do DNA no fígado de ratos tratados via intraperitoneal com 150 mg/Kg de acetaldeído. *** $p < 0,001$, comparado acetaldeído em relação ao controle e veículo, $n=5$.

4.5.3. Análise de 1,N²-propanodGuo e 1,N²- ϵ dGuo no fígado, pulmão e cérebro dos ratos tratados com acetaldeído

A análise de 1,N²-propanodGuo e 1,N²- ϵ dGuo por HPLC acoplado a espectrometria de massa, com a utilização da metodologia descrita em 3.4, no fígado, pulmão e cérebro dos animais tratados por 8 dias com acetaldeído, resultou em aumento significativo dos dois adutos apenas no fígado. Assim, como nos demais experimentos apresentados acima (MDA e ensaio cometa), o tratamento veículo não induz qualquer efeito genotóxico tanto no fígado como no pulmão e cérebro dos animais. A figura 4.44 apresenta a quantificação de 1,N²-propanodGuo e 1,N²- ϵ dGuo respectivamente, no fígado dos animais expostos a doses de 150 mg/kg de acetaldeído durante 8 dias.

Figura 4.44. Quantificação de 1,N²-propanodGuo e 1,N²-εdGuo no fígado de ratos tratados com 150 mg/Kg de acetaldeído durante 8 dias. n = 5, * p<0,05 comparado com controle e veículo.

4.6. Tratamento de ratos *Wistar* com acetaldeído intraperitoneal por 30 dias

Ratos *Wistar*, tratados via intraperitoneal com 60 mg/kg de acetaldeído, tiveram seu peso acompanhado durante 30 dias de tratamento. Podemos observar (figura 4.45) que todos os grupos, acetaldeído, veículo e controle aumentaram de peso de forma semelhante. Diferente do experimento em que animais tratados por 8 dias com 150 mg/Kg de acetaldeído perderam peso de maneira significativa frente a animais controle e veículo que igualmente engordaram durante o experimento.

Figura 4.45. Porcentagem do aumento do peso dos animais tratados com 60 mg/kg acetaldeído durante 30 dias, n = 6.

O perfil de aumento de peso dos animais foi o mesmo, ou seja, tanto acetaldeído como controle e veículo apresentaram aumento similar de massa corpórea durante o período, o que evidencia que o tratamento de maior duração, com concentração diária menor de acetaldeído, não resulta em alterações fisiológicas, como foi observado nos tratamentos com 150 mg/Kg de acetaldeído i.p. durante 8 dias.

Em ambos experimentos com injeções de 150 mg/kg durante 8 dias, ou 60 mg/Kg durante 30 dias a concentração final de acetaldeído ao qual os ratos foram expostos foi a

mesma, ou seja, cada um recebeu 1200 mg/Kg do aldeído total ao final dos experimentos. Além disso, o tratamento de 60 mg/Kg foi estipulado baseando-se em medidas da concentração de acetaldeído na atmosfera da cidade de São Paulo, que alcança valores próximos a 50 ppb, e na taxa de respiração média dos animais (De Martins *et al.*, 1999).

4.6.1. Investigação de lipoperoxidação – Quantificação do aduto MDA-TBA no fígado e cérebro dos ratos tratados com acetaldeído durante 30 dias

Nos experimentos em que os ratos foram tratados por 30 dias com 60 mg/Kg de acetaldeído intraperitoneal, observamos um aumento significativo da lipoperoxidação, cerca de 5 vezes no fígado e 3,5 vezes no cérebro frente aos ratos controle e veículo, figura 4.46. Além disso, destacamos que os valores do aduto MDA-TBA são maiores no cérebro do que no fígado, isso pode ser um reflexo deste tecido que apresenta grande concentração de lipídeos, constituintes principais da bainha de mielina dos neurônios (Adibhatla *et al.*, 2007). Destacamos também, que os pulmões destes animais tratados com acetaldeído não apresentaram nenhum efeito frente aos controles e veículos

Figura 4.46. Níveis de MDA-TBA no fígado (A) e cérebro (B) de ratos tratados com 60mg/Kg de acetaldeído. (***) $p < 0,001$ comparado com controle e veículo, ** $p < 0,01$ comparado com controle e veículo), $n = 6$.

4.6.2 Estudo de fragmentação do DNA (ensaio cometa)

Ratos tratados com acetaldeído por 30 dias com doses de 60 mg / kg tiveram aumentos nos níveis de fragmentação do DNA de, aproximadamente, 2 vezes no cérebro e 1,5 vezes no fígado. Os pulmões dos animais que receberam acetaldeído, assim como em todos os experimentos apresentados até o momento com ratos tratados via intra-peritoneal, não apresentaram aumentos de fragmentação do DNA em relação aos controles.

A figura 4.47 apresenta os resultados de fragmentação do DNA do fígado e cérebro dos animais tratados com acetaldeído. A porcentagem de cometas em relação às células intactas nos cérebros dos animais tratados com acetaldeído é maior que nos fígados, cerca de 2 vezes (18,4 contra 9,5), mesmo que os níveis basais dos controles também sejam maiores no cérebro, podemos observar que a porcentagem de aumento de um tecido em relação ao outro foi o dobro. Este fato pode indicar um possível reparo de DNA e detoxificação mais eficientes no fígado do que no cérebro e também uma maior fragilidade do último em relação ao acetaldeído.

Figura 4.47. Níveis de fragmentação do DNA no fígado e cérebro de ratos tratados via intraperitoneal com 60 mg/Kg de acetaldeído. * $p < 0,005$ acetaldeído em relação ao controle e veículo, ** $p < 0,01$, acetaldeído em relação ao veículo, * $p < 0,05$ acetaldeído em relação ao controle.

4.6.3 Análise de 1,N²-propanodGuo e 1,N²- ϵ dGuo no fígado e cérebro dos ratos tratados com acetaldeído

Os animais que receberam tratamento com injeções de 60 mg/Kg de acetaldeído durante 30 dias, apresentaram aumento significativo apenas no cérebro dos adutos analisados. As figuras 4.48 e 4.49, mostram a quantificação de 1,N²-propanodGuo e 1,N²- ϵ dGuo no fígado e cérebro de 6 destes animais.

Na figura 4.48, observamos que tanto 1,N²-propanodGuo como 1,N²- ϵ dGuo não encontram-se aumentados no fígado, isto sugere que o tratamento com menor quantidade de acetaldeído, porém durante maior tempo, pode permitir que o sistema de reparo ou maior detoxificação sejam ativados e estas lesões, provavelmente, reparadas. De fato, estes adutos são reparados por excisão de bases e nucleotídeos ou também por recombinação homóloga (Brooks et al., 2005; Gros et al., 2003; Liu et al., 2006).

Na figura 4.49 observamos que, ao contrário do fígado, o cérebro dos animais tratados apresentou aumento significativo dos adutos analisados, em comparação aos animais controle e veículo.

Está demonstrado que o acetaldeído, quando é formado pela oxidação do etanol, penetra com dificuldade dos tecidos periféricos para o sangue e cérebro devido à barreira metabólica imposta pela aldeído desidrogenase presente no endotélio capilar e astrócitos (Shultz et al., 1980; Sippel, 1974; Zimatkin, 1991).

No entanto, nossos resultados, mostram que apesar de ter sido injetado via intraperitoneal o acetaldeído penetrou pelos tecidos alcançando o cérebro. O que pode também ser demonstrado pelo aumento de 1,N²- ϵ dGuo formado por um mecanismo de ação indireta do aldeído e aumento de estresse oxidativo.

Estes dados reforçam que o DNA do cérebro dos animais tratados com acetaldeído por 30 dias i.p. apresenta mais lesões do que o dos outros tecidos analisados, fígado e pulmão, apesar de termos encontrado aumento de lipoperoxidação maiores no fígado dos

animais tratados com acetaldeído em relação aos controles. No entanto, a quantidade de MDA formada no cérebro é sempre maior do que nos demais tecidos devido à quantidade de lipídeos que este tecido apresenta (Adibhatla *et al.*, 2007).

Também, podemos observar nestes resultados uma tendência de aumento dos níveis de $1,N^2$ - ϵ dGuo no fígado dos ratos controle em comparação com os animais que receberam acetaldeído por 8 dias. Esta tendência pode ter ocorrido pois em tratamentos mais longos em que os animais são sacrificados mais velhos pode ocorrer aumento da produção endógena de radicais livres, que por sua vez desencadeiam uma série de reações intracelulares como lipoperoxidação, danos ao DNA e proteínas (Jones, 2008; Pamplona, 2008).

Figura 4.48. Quantificação de 1,N²-prpanodGuo e 1,N²-εdGuo no fígado de ratos tratados com 60 mg/Kg de acetaldeído durante 30 dias, n = 6.

Figura 4.49. Quantificação de 1,N²-propanodGuo e 1,N²-εdGuo no cérebro de ratos tratados com 60 mg/Kg de acetaldeído durante 30 dias, n = 6. ** p < 0,01 e *** p < 0,005 comparados com controle e veículo.

4.7. Tratamento de ratos *Wistar* com acetaldeído por gavagem durante 8 dias

Ratos *Wistar*, tratados por gavagem com 150 mg/kg de acetaldeído, tiveram seu peso acompanhado nos 8 dias de tratamento. Durante este período todos os grupos, acetaldeído, veículo e controle aumentaram de peso de forma semelhante. Diferente do experimento em que animais tratados por 8 dias com 150 mg/Kg de acetaldeído injetado intra-peritoneal, que perderam peso de maneira significativa frente a animais controle e veículo que igualmente engordaram durante o experimento.

Figura 4.50. Tabela representativa do aumento da massa de cada animal em relação à inicial e gráfico que demonstra a média das massas de todos os animais durante o tratamento com acetaldeído por gavagem de 150 mg/kg em 8 dias, $n = 7$.

Podemos observar que o perfil de aumento de peso dos animais foi o mesmo, ou seja, tanto acetaldeído como controle e veículo apresentaram aumento similar médio de massa durante o período (7,4 g para controle, 8,6 g para veículos e 10,2 g para acetaldeído), o que evidencia que o tratamento com esta concentração de aldeído não causa mudanças aparentes nos animais tratados, diferente do que observamos nos animais que receberam a mesma dose durante o mesmo período, porém, via intraperitoneal (item 4.5).

4.7.1. Investigação de lipoperoxidação – Quantificação do aduto MDA-TBA no fígado, pulmão e cérebro dos ratos tratados com acetaldeído durante 8 dias por gavagem

Ratos *Wistar* tratados com acetaldeído por gavagem diária de 150 mg /Kg de acetaldeído não apresentaram níveis aumentados de lipoperoxidação nos pulmões e no fígados. Os cérebros destes animais apresentaram aumento de, aproximadamente, 1,3 vezes nos níveis de MDA nos animais tratados com acetaldeído em relação aos veículos e controles.

A figura 4.51 apresenta as tabelas com os valores das médias de MDA (nmol) / massa de tecido (g) para os fígados, cérebros e pulmões. Além disso, também apresenta o gráfico do aumento representativo da lipoperoxidação no cérebro dos animais tratados com acetaldeído em relação aos controles.

Pulmão	MDA (nmol)/ massa de tecido (g)	Desvio Padrão
Controle	218,26	51,55
Veículo	506,57	81,52
Acetaldeído	409,46	51,57

Fígado	MDA (nmol)/ massa de tecido (g)	Desvio Padrão
Controle	82,20	8,92
Veículo	74,44	6,22
Acetaldeído	93,99	8,05

Cérebro	MDA (nmol)/ massa de tecido (g)	Desvio Padrão
Controle	487,76	9,05
Veículo	468,24	15,75
Acetaldeído	633,22	17,55

Figura 4.51. Níveis de MDA-TBA no fígado pulmão e cérebro de ratos tratados com 150 mg/Kg de acetaldeído durante 8 dias. ** $p < 0,01$ comparado com controle e veículo, $n = 7$.

4.7.2 Estudo de fragmentação do DNA (ensaio cometa)

Os tecidos dos ratos tratados com acetaldeído, apresentaram no fígado, cérebro e pulmão, aumentos significativos de cometas em relação ao controle (figura 4.52). Estes resultados foram expressos por momento da cauda (do inglês – Olive Tail Moment), que relaciona a intensidade da cauda em relação ao seu comprimento.

É interessante notar que em todos os tratamentos, também observamos aumentos de cometas nos grupos tratados com solução salina 0,9 %, o que até o momento não havia sido acontecido em nenhum dos experimentos apresentados, tanto em ratos 8 dias como nos 30 dias tratados via intra-peritoneal com acetaldeído.

Figura 4.52. Formação de cometas no fígado cérebro e pulmão de ratos Wistar tratados com 150 mg/Kg de acetaldeído por gavagem durante 8 dias. *** $p < 0,001$ comparado com controle e veículo, ** $p < 0,01$ comparado com controle, $n = 7$.

4.7.3 Análise de 1,N²-propanodGuo e 1,N²-εdGuo no fígado e cérebro dos ratos tratados com acetaldeído

Os animais que receberam tratamento com injeções de 150 mg/Kg de acetaldeído durante 8 dias por gavagem apresentaram aumento significativo dos adutos analisados apenas no cérebro. As tabelas 4.11 a 4.12, apresentam a quantificação de 1,N²-propanodGuo e 1,N²-εdGuo no fígado e pulmão destes animais.

Tabela 4.11. Quantificação de 1,N²-propanodGuo e 1,N²-εdGuo no fígado de ratos tratados com 150 mg/Kg de acetaldeído durante 8 dias por gavagem. n = 7.

Fígado	1,N ² -εdGuo/10 ⁸ dGuo		1,N ² -PropanodGuo/10 ⁸ dGuo	
	Media	Desvio Padrao	Media	Desvio Padrao
Controle	4,7	0,7	10,6	4,1
Veículo	3,2	1,7	10,0	2,9
Acetaldeído	3,8	0,7	10,8	1,6

Tabla 4.12. Quantificação de 1,N²-propanodGuo e 1,N²-εdGuo no pulmão de ratos tratados com 150 mg/Kg de acetaldeído durante 8 dias por gavagem. n = 7

Pulmão	1,N ² -εdGuo/10 ⁸ dGuo		1,N ² -PropanodGuo/10 ⁸ dGuo	
	Media	Desvio Padrao	Media	Desvio Padrao
Controle	8,8	2,3	4,8	1,1
Veículo	7,1	3,7	5,4	7,9
Acetaldeído	6,3	2,7	4,8	1,6

É interessante notar, que estes animais também apresentaram aumento de lipoperoxidação apenas no cérebro, apesar de termos observado aumento de fragmentação do DNA em todos os tecidos analisados. Mesmo que os níveis de lipídeos oxidados estejam maiores no cérebro, o aumento da formação $1,N^2$ - ϵ dGuo não foi observado. Os níveis de $1,N^2$ -propanodGuo, que apresentaram-se cerca de 5 vezes maiores no cérebro em relação ao controle e veículo. A figura 5.53 apresenta a quantificação de $1,N^2$ -propanodGuo e $1,N^2$ - ϵ dGuo no DNA do cérebro dos animais que receberam 150 mg/Kg acetaldeído por gavagem durante 8 dias.

Cérebro	$1,N^2$ - ϵ dGuo/ 10^8 dGuo		$1,N^2$ -PropanodGuo/ 10^8 dGuo	
	Media	Desvio Padrão	Media	Desvio Padrão
Controle	10,2	1,8	2,0	0,6
Veículo	10,1	1,8	2,3	0,8
Acetaldeído	10,6	2,8	10,2	0,4

Figura 4.53. Quantificação de $1,N^2$ -propanodGuo e $1,N^2$ - ϵ dGuo no cérebro de ratos tratados com 150 mg/Kg de acetaldeído durante 8 dias por gavagem. $n = 7$. *** $p < 0,001$ comparado com controle e veículo.

4.8. Tratamento de ratos *Wistar* com acetaldeído por gavagem durante 30 dias

Ratos *Wistar*, tratados por gavagem com 60 mg/kg de acetaldeído, tiveram seu peso acompanhado nos 30 dias de tratamento. Durante este período, todos os grupos, acetaldeído, veículo e controle aumentaram de peso de forma semelhante.

Figura 4.54. Representação do aumento da massa média dos animais durante o tratamento com acetaldeído por gavagem de 60 mg/kg em 30 dias, $n = 7$.

Podemos observar que o perfil de aumento de peso dos animais foi o mesmo, apesar de o grupo que recebeu acetaldeído ter apresentado aumento médio de massa um pouco menor que os demais (58,4 g para controle, 58,9 g para veículos e 45,7 g para acetaldeído). Estes resultados evidenciam que o tratamento com esta concentração de aldeído não apresentou toxicidade aparente nos animais tratados, igualmente apresentado pelos ratos que receberam esta mesma dose via intra-peritoneal.

4.8.1. Investigação de lipoperoxidação – Quantificação do aduto MDA-TBA no fígado, pulmão e cérebro dos ratos tratados com acetaldeído durante 8 dias por gavagem

Ratos *Wistar* tratados com acetaldeído por gavagem diária de 60 mg /Kg de acetaldeído não apresentaram níveis aumentados de lipoperoxidação nos cérebros e no fígados. Os pulmões dos animais tratados com acetaldeído apresentaram aumento de cerca de 2,1 vezes nos níveis de MDA em relação ao controle e 1,5 vezes em relação ao veículo.

A figura 4.55 apresenta os valores das médias de MDA (nmol) / massa de tecido (g) para os fígados, cérebros e pulmões. Além disso, também apresenta o gráfico do aumento representativo da lipoperoxidação no pulmão dos animais tratados com acetaldeído em relação aos controles.

Cérebro	MDA (nmol)/ massa de tecido (g)	Desvio Padrão
Controle	552,84	134,55
Veículo	553,04	126,40
Acetaldeído	461,37	61,64

Fígado	MDA (nmol)/ massa de tecido (g)	Desvio Padrão
Controle	118,60	14,75
Veículo	99,46	23,73
Acetaldeído	94,17	18,90

Pulmão	MDA (nmol)/ massa de tecido (g)	Desvio Padrão
Controle	314,63	74,56
Veículo	492,75	62,82
Acetaldeído	680,54	36,31

Figura 4.55. Níveis de MDA-TBA no cérebro, fígado e pulmão de ratos Wistar tratados com 60 mg/Kg de acetaldeído durante 30 dias. *** $p < 0,001$ comparado com controle e ** $p < 0,01$ comparado com veículo, $n = 7$.

4.8.2 Estudo de fragmentação do DNA (ensaio cometa)

Os tecidos dos ratos tratados com acetaldeído não apresentaram aumentos significativos de cometas em relação ao controle. Estes resultados foram expressos por momento da cauda (do inglês – Olive Tail Moment) que relaciona a intensidade da cauda em relação ao seu comprimento.

Na figura 4.56 apresentamos o gráfico representativo em que os fígados, pulmões e cérebros dos animais tratados com acetaldeído não apresentaram aumentos significativos de cometas em relação aos controles e veículos.

Figura 4.56. Formação de cometas no fígado e cérebro de ratos tratados com 60 mg/Kg de acetaldeído durante 30 dias, n = 7.

4.8.3 Análise de 1,N²-propanodGuo e 1,N²-εdGuo no fígado e cérebro dos ratos tratados com acetaldeído

Os animais que receberam tratamento com injeções de 60 mg/Kg de acetaldeído durante 30 dias por gavagem apresentaram aumento significativo dos adutos analisados no fígado e pulmão. As figuras 4.57 e 4.58 e a tabela 4.13 apresentam a quantificação de 1,N²-propanodGuo e 1,N²-εdGuo no fígado e pulmão e cérebro de 7 destes animais.

Fígado	1,N ² -εdGuo/10 ⁸ dGuo		1,N ² -PropanodGuo/10 ⁸ dGuo	
	Media	Desvio Padrão	Media	Desvio Padrão
Controle	1,6	0,25	0,8	0,2
Veículo	1,2	0,21	1,6	0,3
Acetaldeído	3,5	0,04	2,8	0,2

Figura 4.57. Quantificação de 1,N²-propanodGuo e 1,N²-εdGuo no fígado de ratos tratados com 60 mg/Kg de acetaldeído durante 30 dias por gavagem. n = 7. *** p < 0,001 comparado com controle e veículo.

Pulmão	1,N ² -εdGuo/10 ⁸ dGuo		1,N ² -PropanodGuo/10 ⁸ dGuo	
	Media	Desvio Padrão	Media	Desvio Padrão
Controle	5,2	1,0	4,6	1,5
Veículo	4,4	0,6	3,1	2,1
Acetaldeído	9,6	1,9	3,3	1,7

Figura 4.58. Quantificação de 1,N²-propanodGuo e 1,N²-εdGuo no pulmão de ratos tratados com 60 mg/Kg de acetaldeído durante 30 dias por gavage, n = 7. ** p < 0,05 comparado com controle e veículo.

Tabela 4.13. Quantificação de 1,N²-propanodGuo e 1,N²-εdGuo no cérebro de ratos tratados com 60 mg/Kg de acetaldeído durante 30 dias por gavage. n = 7.

Cérebro	1,N ² -εdGuo/10 ⁸ dGuo		1,N ² -PropanodGuo/10 ⁸ dGuo	
	Media	Desvio Padrão	Media	Desvio Padrão
Controle	5,0	1,7	4,1	1,7
Veículo	4,8	1,5	5,8	1,3
Acetaldeído	4,7	2,0	5,2	2,0

Os animais tratados com 60 mg/Kg de acetaldeído durante 30 dias por gavagem não apresentaram níveis aumentados de peroxidação lipídica no fígado, apesar de termos encontrado uma tendência de aumento de cometas formados e aumento significativo dos dois adutos de DNA analisados. No pulmão dos animais ocorreu aumento significativo de lipoperoxidação e de 1,*N*²- ϵ dGuo. E, no cérebro não foi observada nenhuma mudança dos parâmetros analisados.

4.9. Tratamento de ratos *Wistar* com acetaldeído via respiração por 50 dias

Ratos *Wistar*, tratados por inalação com concentrações de acetaldeído que variavam de 0 a 90 ppb, tiveram seu peso acompanhado nos 50 dias de tratamento. Durante este período, todos os grupos, acetaldeído, veículo e controle aumentaram de peso de forma semelhante.

Figura 4.59. Massa média de todos os animais durante o tratamento com acetaldeído por inalação (A) de acetaldeído em 50 dias, $n = 5$. (B) representa massa dos 5 animais que respiraram 90 ppb de acetaldeído e (C) representa massa dos 5 animais que respiraram 30 ppb de acetaldeído durante todo o experimento.

Podemos observar que o perfil de aumento de peso dos animais foi o mesmo para todos os grupos com exceção dos animais que receberam 90 ppb de acetaldeído, que aumentaram de peso mais expressivamente nos últimos 15 dias de experimento comparado com demais grupos, como pode ser observado na figura 4.59, que apresenta as pesagens dos animais de 90 ppb (B) em comparação com os de 30 ppb (C).

Analisando a diferença de massa corpórea final e inicial de cada grupo, constatamos que realmente, animais 90 ppb engordaram significativamente mais que os demais grupos, figura 4.60. Animais tratados com 0 ppb e 10 ppb ganharam cerca de 35 g durante os 50

dias de tratamento, enquanto os que respiraram 30 ppb ganharam 45 g e os de 90 ppb, aproximadamente 98 g. É interessante notar que, quanto maior a concentração de acetaldeído inalada, maior também o ganho de massa corpórea. Este aumento pode ter ocorrido por muitas razões, como maior consumo de ração, acúmulo de líquido ou metabolização do aldeído, porém, este efeito precisa ser melhor investigado.

Figura 4.60. Diferença entre massa corpórea final e inicial (g) dos animais que respiraram variadas concentrações de acetaldeído. *** $p < 0,001$ comparado com ambiente, 0 ppb, 10 ppb e 30 ppb de acetaldeído.

4.9.1. Investigação de lipoperoxidação – Quantificação do aduto MDA-TBA no pulmão fígado e cérebro dos ratos tratados com acetaldeído durante 50 dias por respiração

Ratos Wistar tratados com acetaldeído por inalação constante de variadas concentrações de acetaldeído apresentaram níveis de aumentados de lipoperoxidação no cérebro, pulmão e fígado.

Os fígados dos animais que receberam 30 ppb e 90 ppb de acetaldeído apresentaram aumento médio de 4 e 6 vezes nos níveis de lipoperoxidação em relação aos

animais que respiraram 10 ppb de acetaldeído e aos controles, ambiente e 0 ppb. Quando comparados os animais que respiraram 30 ppb e 90 ppb de acetaldeído, observamos aumento de 2 vezes nos níveis de lipoperoxidação (figura 4.61).

Figura 4.61. Níveis de MDA-TBA no fígado de ratos Wistar tratados com acetaldeído durante 50 dias. *** $p < 0,001$ comparado com ambiente, 0 ppb e 10 ppb de acetaldeído.

Os pulmões dos animais tratados com acetaldeído apresentaram aumentos de lipoperoxidação dose dependente com o aumento da dose de acetaldeído inalado. No entanto, também observamos aumentos de MDA no pulmão dos animais que estavam confinados e respiraram ar sem acetaldeído (figura 4.62). Os níveis de MDA nos ratos que respiraram 30 e 90 ppb foram praticamente os mesmos.

Figura 4.62. Níveis de MDA-TBA no pulmão de ratos tratados com acetaldeído durante 50 dias. *** $p < 0,001$ comparado com ambiente, 0 ppb e 10 ppb de acetaldeído, ** $p < 0,01$ comparado com ambiente.

O cérebro dos ratos que respiraram ar com 0 ppb de acetaldeído e que inalaram 10 ppb de acetaldeído apresentou aumentos significativos de lipoperoxidação em relação aos animais ambiente, assim como observado nos pulmões. Surpreendentemente, os animais que respiraram 30 ppb e 90 ppb apresentaram um decaimento significativo nos níveis de MDA em relação aos animais que respiraram 10 ppb (figura 4.63).

Figura 4.63. Níveis de MDA-TBA no cérebro de ratos tratados com acetaldéido durante 50 dias. *** $p < 0,001$ comparado com ambiente e 10 ppb de acetaldéido, ** $p < 0,01$ comparado com ambiente e 0 ppb de acetaldéido, * $p < 0,05$ comparado com 10 ppb de acetaldéido.

4.9.2 Estudo de fragmentação do DNA (ensaio cometa)

A análise de cometas nos ratos que respiraram acetaldéido não resultou em aumentos significativos de quebra no DNA do fígado e cérebro, apesar de termos observado uma tendência de aumento no momento da cauda dos cometas formados nos ratos que respiraram 10 ppb e 30 ppb de acetaldéido. (figura 4.64). Já, no pulmão destes animais encontramos cometas com momento de cauda, aproximadamente 2 vezes maiores do que os apresentados pelos ratos ambiente, 0 ppb e 10 ppb.

O pulmão e cérebro apresentaram diminuição significativa de fragmentação no DNA dos animais que respiraram 90 ppb de acetaldéido em comparação com os ratos que respiraram 30 ppb (figura 4.64).

Figura 4.64. Formação de cometas no fígado, cérebro e pulmão de ratos tratados por inalação de acetaldeído durante 50 dias, $n = 5$. *** $p < 0,01$ comparado com ambiente e 0 ppb e 10 ppb de acetaldeído, # $p < 0,001$ comparado com 30 ppb de acetaldeído.

4.9.3 Análise de 1,N²-propanodGuo e 1,N²- ϵ dGuo no fígado, pulmão e cérebro dos ratos tratados com acetaldeído

Os animais que receberam tratamento por inalação com diversas concentrações de acetaldeído durante 50 dias apresentaram aumento significativo dos adutos analisados. As figuras 4.65 a 4.67, mostram a quantificação de 1,N²-propanodGuo e 1,N²- ϵ dGuo no fígado, pulmão e cérebro destes animais.

O pulmão dos animais apresentou aumento de 1,N²-propanodGuo e 1,N²- ϵ dGuo em relação aos controles. A figura 4.65 apresenta que os níveis de 1,N²- ϵ dGuo foram significativamente maiores nos animais que inalaram 90 ppb de acetaldeído em relação aos demais tratamentos. Os animais tratados com 10 ppb e 30 ppb possuíam os mesmos níveis de eteno aduto e estes são 1,5 vezes maiores que os apresentados pelos animais 0 ppb. Os níveis de 1,N²-propanodGuo nos animais que respiraram 10 ppb, 30 ppb e 90 ppb de acetaldeído são significativamente maiores que os animais ambiente e 0 ppb. Além disso, podemos observar que o aumento nos níveis do propano aduto é dose dependente em relação ao aumento da concentração de acetaldeído inalada, como pode ser observado na curva da figura 4.65 ($R = 0,9782$).

No fígado, como apresentado na figura 4.66 apresentamos resultados que demonstram que os níveis de 1,N²-propanodGuo aumentaram dose dependente com o aumento da concentração de acetaldeído administrada. No entanto, apesar de, também termos encontrado aumentos dose dependente de lipoperoxidação nestes tecidos (4.9.1), estes aumentos não se refletiram na formação de eteno adutos e de fragmentação de DNA (4.9.2), sugerindo que o próprio acetaldeído está promovendo o aumento nos níveis do propano aduto.

Por fim, nos cérebros dos animais tratados observamos apenas tendência de aumento de 1,N²-propanodGuo e 1,N²- ϵ dGuo dose dependente em relação à quantidade de acetaldeído inalada, como pode ser observado na figura 4.67.

Figura 4.65. Quantificação de 1,N²-propanodGuo e 1,N²-εdGuo no pulmão de ratos tratados com acetaldeído por inalação durante 50 dias. n = 5.

Fígado	1,N ² -εdGuo/10 ⁸ dGuo		1,N ² -PropanodGuo/10 ⁸ dGuo	
	Media	Desvio Padrao	Media	Desvio Padrao
Ambiente	1,6	0,4	3,9	0,8
0 ppb	2,1	0,1	4,8	0,9
10 ppb	1,7	0,4	4,1	0,5
30 ppb	2,3	0,6	7,9	1,0
90 ppb	2,1	0,2	9,6	0,8

Figura 4.66. Quantificação de 1,N²-propanodGuo e 1,N²-εdGuo no fígado de ratos tratados com acetaldeído por inalação durante 50 dias. n = 5.

Cérebro	1,N ² - ϵ dGuo/10 ⁸ dGuo		1,N ² -PropanodGuo/10 ⁸ dGuo	
	Media	Desvio Padrão	Media	Desvio Padrão
Ambiente	2,5	0,5	5,0	0,7
0 ppb	4,8	0,3	5,5	0,2
10 ppb	4,3	0,3	7,1	0,9
30 ppb	4,7	0,2	8,3	1,1
90 ppb	6,3	0,2	9,1	1,1

Figura 4.67. Quantificação de 1,N²-propanodGuo e 1,N²- ϵ dGuo cérebro de ratos tratados com acetaldeído por inalação durante 50 dias. n = 5.

4.10. Desenvolvimento da metodologia para quantificação de 1,N²-propanodGuo e 1,N²- ϵ dGuo por HPLC/ESI/MS-MS na urina de humanos

Alíquotas de urina de diferentes doadores foram preparadas para extração como descritos em materiais e métodos (3.5.1). As amostras foram extraídas em diferentes colunas e métodos de eluição a fim de determinamos a metodologia com maior porcentagem de recuperação dos adutos. Após analisarmos todas as frações das diferentes metodologias por HPLC acoplado a espectrometria de massa observamos que não houve variação significativa no perfil de eluição dos adutos. No entanto, a coluna C18 E, que possui fase estacionária de sílica com ramificação de cadeia com 18 carbonos e presença de grupos polares, retêm maior quantidade de propanodGuo, o aduto mais apolar.

A coluna C18 convencional apresentou baixa retenção para 8-oxodGuo, que era eluída nas frações que continham apenas água independente da metodologia de extração usada, o que inviabilizou a utilização desta coluna na extração da urina.

Entre as três colunas restantes, foi escolhida a C18 E que apresentava a menor quantidade de adutos nas frações iniciais de água, 5 ou 10 % de metanol, ou seja, a que apresentava a maior taxa de recuperação dos adutos.

As cinco metodologias de eluição desenvolvidas tinham como objetivo maximizar a recuperação, além de, obter a fração de saída dos adutos limpa de outros componentes, como sais que podem interferir nas análises de espectrometria de massa.

Em todos os métodos testados, há fração inicial de água, para retirada dos sais abundantes na urina. Em seguida, a segunda lavagem é feita em todos os métodos com solução de 5 a 15 % de metanol que elui compostos muito polares e é importante para que a fração que contenha os adutos tenha menor quantidade de moléculas que interfiram na detecção por espectrometria de massas. No entanto, 8-oxodGuo e 1,N²- ϵ dGuo são mais polares que 1,N²-propanodGuo e em todos os métodos começam a eluir nestas frações de 5 e 10 %, diferente do propano adulto que inicia a eluição apenas nas frações acima de

50% de metanol. Por este motivo, a fração intermediária com 40 % de metanol foi descartada.

O método escolhido foi o E, que emprega após a lavagem com água, a fração de 15 % de metanol. Em seguida, é aplicada a fração de 65 % de metanol em que os adutos são coletados. O rendimento final é de aproximadamente 70 % do aduto adicionado. É importante ressaltar, que pontos de perdas dos adutos podem ter ocorrido durante vários pontos do processo de extração, sendo eles nas frações de 15 %, antes da eluição majoritária e na de 100 %, onde ficam resquícios das moléculas não eluídas. Além disso, podem ocorrer perdas na liofilização e com reações secundárias durante o tempo de extração. No entanto, todos estes processos são minimizados com a adição de padrões isotopicamente marcados, cinco unidades de massa acima em relação às moléculas não marcadas.

A figura 4.68, apresenta as estruturas e massas das moléculas analisadas na metodologia de extração de urina.

Figura 4.68. Estruturas e transições de massa dos adutos analisados na urina.

A figura 4.69, apresenta o cromatograma da fração de eluição dos adutos (65 %) com a utilização da metodologia E e coluna Strata C1E. Nesta figura estão representados

os cromatogramas da 8-oxodGuo (A), 1, N^2 - ϵ dGuo e seu padrão interno (B e C), 1, N^2 -propanodGuo e seu padrão interno (E e F).

Figura 4.69. Perfil de eluição da 8-oxodGuo (A), 1, N^2 - ϵ dGuo (B), 1, N^2 -propanodGuo (D), seus padrões isotópicos (C e E).

Para validação do método foram construídas curvas de calibração 8-oxodGuo, 1, N^2 - ϵ dGuo e 1, N^2 -propanodGuo com seus padrões isotopicamente marcados. As concentrações dos padrões variaram entre 100 amol e 100 fmol, sendo que em cada amostra foi adicionado 100 fmol do padrão interno. A curva foi construída pela relação entre as áreas de cada aduto e seu respectivo padrão marcado versus a quantidade de padrão não marcado adicionado. A figura 4.70 apresenta as curvas de calibração dos três adutos

descritos acima, sendo que as curvas apresentadas possuem alto índice de linearidade (R maiores que 0.98).

Figura 4.70. Curvas de calibração 8-oxodGuo, 1,N²-εdGuo e 1,N²-propanodGuo para quantificação de adutos de DNA na urina de humanos.

4.10.1 Quantificação de 1,*N*²-propanodGuo e 1,*N*²- ϵ dGuo por HPLC/ESI/MS-MS na urina de humanos

As quantificações dos níveis basais de 8-oxodGuo, 1,*N*²- ϵ dGuo e 1,*N*²-propanodGuo na urina de humanos foram realizadas por HPLC acoplado a espectrometria de massa em 20 doadores homens que moram na cidade de São Paulo. Todos os doadores declararam-se não fumantes, além de não terem ingerido bebida alcoólicas dois dias antes da doação e também não tomarem remédios controlados para doenças crônicas.

A quantificação dos adutos se deu a partir da extração de 1,5 mL de urina em SPE, sendo que todos os valores foram normalizados pela quantidade de creatinina total analisado por HPLC. As figuras 4.71 e 4.72 apresentam um cromatograma representativo da fração de eluição dos adutos. Na figura 4.71 estão representados os cromatogramas da 8-oxodGuo (A), 1,*N*²- ϵ dGuo e seu padrão interno (B e C), e na figura 4.72 1,*N*²-propanodGuo e seu padrão interno (A e B) e também, o perfil de eluição da amostra por UV (adquirido entre 200 a 350 nm) (C). Os níveis dos adutos em todas as urinas analisadas, assim como o valor médio e o desvio padrão estão apresentados na tabela 4.14.

Dentre as 20 amostras de urinas analisadas, todas apresentaram 8-oxodGuo e 1,*N*²- ϵ dGuo e 1,*N*²-propanodGuo, sendo que a quantidade de 8-oxodGuo detectada é cerca de 1000 vezes maior que a de 1,*N*²- ϵ dGuo e 1,*N*²-propanodGuo. Os níveis médios de bases oxidadas foram 33 nmol de adutos por mg de creatinina e dos adutos de alquilação 50 pmol por mg de creatinina.

Figura 4.71. Perfil de eluição da 8-oxodGuo (A), 1,N²-εdGuo (B) e 1,N²-εdGuo marcado com nitrogênio 15.

Figura 4.72. Perfil de eluição da $1,N^2\text{-propanodGuo}$ (A), $1,N^2\text{-propanodGuo}$ marcado com nitrogênio 15 (B) e o perfil cromatográfico da amostra total adquirido entre 200 a 350 nm (C).

Tabela 4.14. Níveis de 8-oxodGuo, 1,*N*²-εdGuo e 1,*N*²-propanodGuo na urina de humanos

	8-oxodGuo (nmol) / Creatinina (g)	1, <i>N</i> ² -εdGuo (pmol) / Creatinina (g)	1, <i>N</i> ² -propanodGuo (pmol) / Creatinina (g)
1	24.0	105.5	ND
2	31.9	52.3	52.2
3	50.3	43.1	129.9
4	38.7	61.7	39.2
5	69.7	44.1	ND
6	44.3	20.9	75.8
7	23.0	55.5	19.6
8	51.7	76.1	17.5
9	42.5	50.2	ND
10	24.5	30.8	ND
11	33.1	44.5	54.3
12	41.3	21.9	68.7
13	21.3	70.4	5.9
14	37.3	43.4	37.6
15	23.0	47.4	37.5
16	35.4	6.3	142.2
17	17.2	42.2	26.4
18	8.8	37.4	ND
19	41.8	48.6	ND
20	14.3	13.7	ND
Mínimo	8,8	6,3	ND
Máximo	69,7	105,5	129,9
Média	33,7	45,8	54.5
Desvio	14.7	22,5	41,4

(ND- não detectado)

7. DISCUSSÃO

7.1. Desenvolvimento da metodologia para detecção e quantificação de 1,N²- ϵ dGuo e 1,N²-propanodGuo em DNA

O desenvolvimento da metodologia ultra-sensível para detecção dos adutos de DNA, 1,N²- ϵ dGuo e 1,N²-propanodGuo, baseada em HPLC acoplado a espectrometria de massa permite avaliar e comparar os efeitos deletérios provocados por aldeídos, como por exemplo acetaldeído e crotonaldeído, provenientes de fontes endógenas e exógenas. Uma das vantagens do método é a quantificação e detecção on-line da dGuo não modificada. A metodologia exclui a necessidade de uma segunda análise para a quantificação da dGuo, aumentando sua precisão e eficiência. Outra vantagem é a adição de padrões isotopicamente marcados, antes da hidrólise do DNA conferindo, alta especificidade na detecção dos adutos, além de minimizar as perdas durante o preparo, injeção e ionização das amostras.

Com a utilização da metodologia os níveis basais de 1,N²- ϵ dGuo (4.01 ± 0.32 adutos/ 10^8 dGuo) e 1,N²-propanodGuo (3.43 ± 0.33 adutos/ 10^8 dGuo) foram determinados no DNA de fibroblastos pulmonares humanos da linhagem IMR-90.

Adicionalmente, nós quantificamos os níveis basais deste adutos em diferentes tecidos de ratos *Wistar*, (fígado 2.47 ± 0.61 1,N²- ϵ dGuo/ 10^8 dGuo e 4.61 ± 0.69 1,N²-propanodGuo/ 10^8 dGuo, cérebro 2.96 ± 1.43 1,N²- ϵ dGuo/ 10^8 dGuo e 5.66 ± 3.70 1,N²-propanodGuo/ 10^8 dGuo e pulmão 0.87 ± 0.34 1,N²- ϵ dGuo/ 10^8 dGuo e 2.25 ± 1.72 1,N²-propanodGuo/ 10^8 dGuo).

A formação endógena do 1,N²-propanodGuo e sua quantificação em tecidos de animais modelo ainda é controversa na literatura. A presença de 1,N²-propanodGuo foi investigada em estudos preliminares, que utilizavam ³²P-postlabeling acoplado com TLC como método de detecção. Estes estudos, realizados por Schuler e Eder em ratos *Fisher*

344 não tratados ou tratados com crotonaldeído em diversas doses, não detectaram a formação endógena em níveis basais deste aduto (Budiawan et al., 2000; Schuler et al., 2000). Entretanto, Nath e Chung quantificaram, previamente, 0,18-0,94 adutos por 10^6 dGuo de 1, N^2 -propanodGuo no fígado destes animais com a utilização de metodologia semelhante (Nath et al., 1994). Em outro trabalho, este mesmo grupo detectou este aduto no cérebro (0.397-0.691 adutos/ 10^6 dGuo), pulmão (0.117-0.469 adutos/ 10^6 dGuo) e outros tecidos dos mesmos animais modelo (*Fisher 344*) (Nath et al., 1996).

Mais recentemente, Pan e col. desenvolveram uma metodologia baseada em ^{32}P -postlabeling para análise de vários propano adutos de DNA, entre eles, o 1, N^2 -propanodGuo. Este método, que também associa HPLC a extração em fase sólida, detecta o produto da conversão do aduto no seu derivado de cadeia aberta, e por isso é mais específico que os métodos ^{32}P -postlabeling convencionais, sendo capaz de detectar a formação endógena do aduto em ratos *Long Evans* (Pan et al., 2006). Estes resultados reportados por Pan e colaboradores estão de acordo com os aqui apresentados em fígado de ratos (4.61 ± 0.69 1, N^2 -propanodGuo/ 10^8 dGuo).

A presença do 1, N^2 -propanodGuo já foi descrita em fígado, pulmão e sangue humanos, com a utilização de metodologias diferentes, baseadas em ^{32}P -postlabeling combinada com HPLC e HPLC/MS/MS. Níveis diferentes destes adutos foram reportados até o momento, provavelmente, estão associadas a diferentes níveis de exposição e na eficiência do sistema de reparo de cada indivíduo (Nath et al., 1996; Nath et al., 1998; Zhang et al., 2006).

Eteno adutos, 1, N^6 -eten-2'-desoxiadenosina (1, N^6 - ϵ dAdo), 3, N^4 -eten-2'-desoxicitidina (3, N^4 - ϵ dCyd), 3, N^2 -eten-2'-desoxiguanosina (3, N^2 - ϵ dGuo) e 1, N^2 -eten-2'-desoxiguanosina (1, N^2 - ϵ dGuo), são biomarcadores de danos em DNA bem estabelecidos, sendo formados, principalmente, pela reação das bases nitrogenadas com produtos da lipoperoxidação (Arab et al., 2009). Os níveis basais do 1, N^2 - ϵ dGuo foram reportados pela

primeira vez *in vivo* pelo nosso grupo, com a utilização de metodologia baseada em HPLC/MS-MS. Este aduto foi quantificado no DNA do fígado de ratas *Wistar* (5.22 ± 1.37 adutos/ 10^7 dGuo) (Loureiro et al., 2002). Estes níveis são dez vezes maiores que os aqui reportados. Este fato pode estar associado com a melhoria da metodologia, quantificação simultânea da dGuo e também, o sexo e idade dos animais. Recentemente, 1,*N*²-εdGuo foi quantificado por Pang e colaboradores (Pang et al., 2007) no DNA de tecidos de ratos *SJL*. Os níveis basais foram reportados no fígado ($39 \pm 38 / 10^9$ dGuo), rim ($20 \pm 7 / 10^9$ dGuo) e baço ($24 \pm 9 / 10^9$ dGuo) e são semelhantes aos níveis encontrados por nós no fígado dos ratos *Wistar* machos.

O 1,*N*²-εdGuo é um aduto que pode ser formado por diferentes mecanismos e moléculas precursoras, como por exemplo, a oxidação direta da desoxiribose via formação de fosfoglicolaldeído que ataca a dGuo (Awada et al., 2001) ou reação de DDE, aldeído formado pela lipoperoxidação, com a base (Loureiro et al., 2000). Estes mecanismos evidenciam e suportam nossos dados de que o acetaldeído promove lipoperoxidação formando aldeídos que desencadeiam uma série de reações com proteínas e DNA, potencializando seu efeito citotóxico e genotóxico, no entanto, estes mecanismos precisam ser melhor investigados.

Além disso, a relevância biológica da ocorrência do 1,*N*²-εdGuo no DNA foi revelada por estudos que evidenciaram a mutagenicidade do aduto. Estudos de incorporação errada de bases, mostraram que o aduto tende a bloquear a replicação, levando também a adição errada de dATP e GTP no DNA (Langouet et al., 1997). Experimentos em *Escherichia coli* / M13MB19, demonstraram que o aduto leva a mutações, resultando em transições e transversões G→A e G→T (Langouet et al., 1998).

Este aduto também foi apontado como sendo causador de outros danos avaliados por ensaios de mutagênese intra cromossomal sitio específica no DNA de células, próximos a sua formação, como por exemplo, rearranjo, deleção, duplo mutante e

substituição de pares de bases (Akasaka et al., 1999). Saporbaev et al., descreveram que este aduto é substrato preferencial das enzimas glicosilase específica de mal pareamento de uracila em *E.coli* e da *N*-glicosilase alquilpurina-DNA de humanos (Saporbaev et al., 2002). Recentemente, como colocado na introdução deste trabalho, foi reportado que a DNA polimerase humana κ produz deleções do tipo “frameshift” quando encontra 1,*N*²- ϵ dGuo no DNA (Zhang et al., 2009).

O desenvolvimento da técnica ultra-sensível e altamente específica que acopla HPLC a espectrometria de massa permite a investigação da possível utilização do 1,*N*²-propanodGuo como biomarcador de exposição à acetaldeído, presente como poluente em atmosferas urbanas e produzido em pessoas sob abuso de álcool. Além disso, com a detecção simultânea do 1,*N*²- ϵ dGuo, é também possível avaliar, de maneira inequívoca, situações que envolvam estresse oxidativo e desbalanço redox associados ao efeito do aldeído.

7.2. Efeito citotóxico e genotóxico do acetaldeído em fibroblastos pulmonares normais humanos (IMR-90)

O tratamento de fibroblastos normais pulmonares humanos com diversas concentrações de acetaldeído resultou em aumento de estresse oxidativo, avaliado através da quantificação da morte celular, lipoperoxidação, fragmentação do DNA, atividade mitocondrial, cálcio intracelular e quantificação de adutos de DNA.

O estabelecimento da concentração real de acetaldeído a que os fibroblastos foram expostos, medidas pela reação com DNPH, não foi avaliado em alguns trabalhos recentemente publicados (Duryee et al., 2008; Pereira et al., 2010; Speit et al., 2008).

Os tratamentos das células com acetaldeído em concentrações menores que 200 μ M, resultaram em mais de 90 % de viabilidade celular e aumentos na lipoperoxidação e cálcio intracelular. Nos tratamentos com 711 μ M de acetaldeído a viabilidade celular e a

atividade mitocondrial diminuíram significativamente, em contraste com os aumentos dos níveis de lipoperoxidação, fragmentação do DNA e cálcio intracelular, indicando que as células começam a morrer possivelmente, por apoptose. Este possível efeito indutor de apoptose promovido pelo acetaldeído já foi descrito por outros grupos em sistemas celulares diferentes, por exemplo, em embriões de ratos tratados com concentrações que variavam entre 30-60 $\mu\text{g/mL}$ de acetaldeído corados com laranja de acridina (Menegola *et al.*, 2001).

A formação de 8-oxodGuo, gerada pela reação específica de radical hidroxila e oxigênio singlete gerados *in situ* com a dGuo (Cadet *et al.*, 2002; Martinez *et al.*, 2005; Ravanat *et al.*, 2004), no DNA das células expostas a acetaldeído (165 μM e 711 μM) acrescenta mais uma evidência do estresse redox induzido pelo aldeído, já demonstrado com os experimentos de fragmentação do DNA por ensaio cometa e FACS.

A geração de radicais livres derivados de acetaldeído foi comprovada tanto *in vitro* como *in vivo*. Estes radicais, hidroxila, acetila, formila, metila e ânion superóxido são formados por ação enzimática (xantina oxidase e aldeído oxidase), ou por reação do acetaldeído com compostos presentes em compartimentos celulares (mitocôndria e microssomos) (Albano *et al.*, 1994; Boh *et al.*, 1982; Fridovich, 1989; Gonthier *et al.*, 1991; Nakao *et al.*, 1999; Puntarulo *et al.*, 1989; Rajasinghe *et al.*, 1990; Rao *et al.*, 1996). De fato, a reação do acetaldeído com outros compostos como o H_2O_2 ou peroxinitrito, gera radicais formila, acetila e metila. O mecanismo de formação com H_2O_2 é dependente de Fe^{2+} e se dá por duas vias principais, já a reação do acetaldeído com peroxinitrito é independente de metal, mas pode reciclar o radical formado pela reação com o nitrato originado pelo decaimento do peroxinitrito (Nakao *et al.*, 1999).

A quantificação dos adutos 1, N^2 -propanodGuo e 1, N^2 - ϵ dGuo, tanto *in vitro* como *in vivo*, permite, assim como observado nos ensaios de fragmentação do DNA e na quantificação de 8-oxodGuo, comprovar a toxicidade do aldeído, que mesmo volátil e muito

reativo, penetra na célula alcançando o DNA. Lembramos que o 1, N^2 -propanodGuo é formado pela reação de duas moléculas de aldeído com a dGuo (Hecht et al., 2001). Este aduto foi caracterizado como sendo mutagênico e carcinogênico e está associado ao aumento de risco de câncer hepático provocado pela ingestão de etanol (Brooks et al., 2005).

Devido à habilidade deste aduto em formar ligações cruzadas, discute-se na literatura que o ensaio cometa de pH básico, o que realizamos em nossos experimentos, não seria uma ferramenta apropriada para detectar danos causados pelo acetaldeído (Speit et al., 2008). No entanto, todos os nossos resultados apontam que, mesmo com a presença de ligações cruzadas, promovidas pela presença do 1, N^2 -propanodGuo em níveis aumentados, os ensaios cometas apontaram para um aumento da fragmentação do DNA. A formação de propano adutos não é o único efeito promovido pelo acetaldeído nas células, produtos secundários ou mesmo outras reações do acetaldeído com o DNA poderiam acarretar fragmentação das cadeias detectáveis pelo ensaio.

Em resumo, o tratamento dos fibroblastos com acetaldeído desencadeia mecanismos complexos de estresse oxidativo, que podem ser iniciados por vias independentes. Nossos resultados demonstram que aumentos de lipoperoxidação, adutos e fragmentação do DNA e morte celular são alguns dos resultados da ação direta e indireta do aldeído. A quantificação de 1, N^2 - ϵ dGuo e 1, N^2 -propanodGuo no DNA das células expostas ao aldeído fornece um marcador bastante confiável de modificação em biomoléculas induzíveis por tratamento com acetaldeído.

Por fim, investigamos, também, se a administração de um antioxidante como o licopeno poderia minimizar os efeitos provocados pelo acetaldeído. Nossos experimentos resultaram em diminuição dos níveis de lipoperoxidação, adutos e fragmentação do DNA, além de aumentar a de viabilidade celular protegendo a célula da morte. Esta redução nos níveis de morte celular, promovida pelo licopeno pode estar associada a uma proteção

frente à ação indireta do acetaldeído na fragmentação do DNA (Rich et al., 2000). No entanto, estes mecanismos de proteção exercido pelo licopeno frente ao acetaldeído precisam ser melhor investigados.

7.3. Efeito do acetaldeído ratos *Wistar*

Foram realizados três tipos de experimentos em ratos Wistar machos e com três meses de idade expostos a diferentes concentrações de acetaldeído por injeção intraperitoneal, gavage e respiração.

Em relação ao ganho de massa corpórea, os tratamentos por 8 dias intra-peritoneal e respiração apresentaram variações em relação aos demais (que resultaram em aumento constante e similar em todos os grupos). Ratos que receberam tratamentos por 8 dias intra-peritoneal diminuíram de peso em relação aos controles e veículos. Animais que respiraram 90 ppb de aldeído ganharam mais peso significativamente aos demais grupos (ambiente, 0 ppb, 10 ppb e 90 ppb). É interessante destacar que Nishikawa e col. observaram que animais que receberam HNE em concentrações que variaram de 10 a 1000 mg/kg por gavage apresentaram aumento significativo de massa corpórea na menor concentração (Nishikawa *et al.*, 1992)

O tratamento com 150 mg/kg de acetaldeído via intraperitoneal resultou em aumento de 1,6 vezes na lipoperoxidação, 2,4 vezes de fragmentação do DNA, 1,8 vezes de 1,N²-propanodGuo e 4 vezes de 1,N²- ϵ dGuo no fígado dos animais. O cérebro e o pulmão não apresentaram variação nos níveis basais em resposta aos tratamentos.

O tratamento de 60 mg/kg, mesmo a dose final injetada sendo a mesma que no tratamento de 8 dias (1200 mg/kg de aldeído), o aumento de lipoperoxidação no fígado dos animais foi maior, cerca de 5 vezes em comparação com controle e veículo, enquanto os níveis de fragmentação aumentaram em 1,5 vezes e os níveis de adutos de DNA não sofreram alteração. Neste tratamento, também observamos aumentos de estresse oxidativo

no cérebro, refletido por aumento de 3,3 vezes de lipoperoxidação, 1,9 vezes de fragmentação do DNA e, principalmente, aumentos significativos de 1,*N*²-propanodGuo (5,6 vezes) e de 1,*N*²- ϵ dGuo (7 vezes).

Os efeitos observados nos ratos que receberam acetaldeído por gavagem foram menos pronunciados em comparação aos animais tratados intraperitonealmente. Animais tratados por gavagem com 150 mg/kg durante 8 dias apresentaram aumentos de lipoperoxidação, sendo significativo apenas no cérebro (1,3 vezes). Em relação à fragmentação do DNA, foram observados nos três tecidos analisados, aumentos de 5 vezes no fígado, 4 vezes no cérebro e 10 vezes no pulmão. No entanto, os níveis de adutos de DNA não sofreram alteração, com exceção do 1,*N*²-propanodGuo que aumentou 5 vezes no cérebro destes animais, mostrando que este aduto é um biomarcador de exposição tanto em tratamentos i.p. como gavagem.

Já, o tratamento de 60 mg/kg por gavagem durante 30 dias, induziu aumento significativo de lipoperoxidação apenas no pulmão (2 vezes) e, tendência de aumento nos níveis de fragmentação do DNA. Além disso, também observamos aumento de 1,*N*²- ϵ dGuo (2,2 vezes) no fígado e no pulmão (1,9 vezes) destes animais. Os níveis de 1,*N*²-propanodGuo aumentaram apenas no fígado, no entanto, este foi bastante pronunciado, cerca de 3,5 vezes maiores que os controle e veículos.

No tratamento de animais por inalação de diferentes concentrações de acetaldeído houve aumento de lipoperoxidação nos três tecidos analisados, sendo este dose dependente no fígado e pulmão. Já no cérebro, os níveis de MDA foram significativamente maiores em 10 ppb e 30 ppb em relação a 0 ppb e controle, e diminuíram significativamente em 90 ppb. Em relação aos níveis de fragmentação do DNA, o único tecido que houve alteração em resposta ao tratamento foi o pulmão, este aumento foi dose dependente em relação à concentração de aldeído. Porém, nos animais que receberam 90 ppb, o momento da cauda do cometa formado foi menor em relação aos demais tratamentos, isto pode ser

atribuído ao fato de que quanto maior o número de propano adutos, maior também o número de ligações cruzadas DNA-DNA e DNA - proteínas e portanto menor a sensibilidade do ensaio.

Por fim, em relação à quantificação de $1,N^2$ - ϵ dGuo e $1,N^2$ -propanodGuo, foram detectados no pulmão aumentos de ambos os adutos em relação dose dependente ao aumento da concentração de aldeído. Os níveis de $1,N^2$ - ϵ dGuo aumentaram 3,0 vezes nos animais tratados com 90 ppb e cerca de 1,5 vezes nos tratamentos de 10 ppb e 30 ppb de acetaldeído em relação aos controles, enquanto os níveis de $1,N^2$ -propanodGuo aumentaram dose dependente em relação à quantidade de aldeído inalada e foram cerca de 1,5 vezes maiores nos tratamentos de 10 ppb, 1,7 vezes nos de 30 ppb e 2,3 vezes nos de 90 ppb. No fígado, os níveis de $1,N^2$ -propanodGuo aumentaram cerca de 2 vezes tanto nos animais que respiraram 30 ppb quanto os que respiraram 90 ppb do aldeído. Os animais que inalaram 10 ppb do aldeído não sofreram aumento de $1,N^2$ -propanodGuo e em nenhum dos tratamentos foi observado alteração nos níveis de eteno aduto no fígado. Os cérebros dos animais que inalaram acetaldeído não tiveram aumento significativos dos adutos de DNA, apesar de tanto no eteno quanto no propano terem sido observadas tendências de aumento destes adutos.

A tabela 7.1 apresenta o resumo dos resultados dos animais tratados com acetaldeído intraperitoneal, gavagem e respiração.

A análise da tabela 7.1 nos permite observar que o tratamento com acetaldeído intraperitoneal foi especialmente prejudicial ao fígado dos animais, em ambos os tratamentos (8 e 30 dias), sendo que os cérebros dos animais tratados por 30 dias também apresentaram sensibilidade ao tratamento mais longo.

Tabela 7.1. Resumo dos resultados obtidos nos tratamentos de ratos *Wistar* com acetaldeído

Tratamento	Tecido	Massa corpórea	Lipoperoxidação	Fragmentação do DNA	1,N ² -εdGuo	1,N ² -propanodGuo
150 mg/kg i.p. 8 dias	Fígado	↓	↑	↑	↑	↑
	Cérebro		—	—	—	—
	Pulmão	↓	—	—	—	—
60 mg/kg i.p. 30 dias	Fígado	↑	↑	↑	↑	—
	Cérebro		↑	↑	↑	↑
	Pulmão	↑	—	—	—	—
150 mg/kg gavage 8 dias	Fígado	↑	↑	↑	—	—
	Cérebro		↑	↑	—	↑
	Pulmão		↑	↑	—	—
60 mg/kg gavage 30 dias	Fígado	↑	—	↑	↑	↑
	Cérebro		—	—	—	—
	Pulmão		↑	—	↑	—
Respiração 50 dias	Fígado	↑	↑	↑	—	↑
	Cérebro		↑	—	↑	↑
	Pulmão		↑	↑	↑	↑

↑ Aumento do dano ↑ Tendência de aumento do dano — Sem efeito

O tratamento por gavage resultou também em danos ao fígado dos animais, porém diferente do tratamento intra-peritoneal por 8 dias, este ainda resultou em danos ao cérebro. O tratamento por 30 dias gavage, além de também apresentar danos aos cérebros como seu similar intra-peritoneal, resultou em efeitos significativos sobre lipoperoxidação nos pulmões.

Os animais que respiraram acetaldeído, diferentemente dos resultados com os outros tratamentos i.p. e gavage, apresentaram danos em todos os tecidos analisados dose dependente em relação ao aldeído inalado, com pequenas exceções, como o caso de diminuição de lipoperoxidação no cérebro dos animais que respiraram 90 ppb de aldeído. Estes dados evidenciam que o aldeído inalado, em menores concentrações que as administradas via intraperitoneal ou gavage é mais tóxico aos animais.

Dados da literatura demonstraram o efeito citotóxico, genotóxico e carcinogênico do acetaldeído em ratos, principalmente associado como produto da oxidação do etanol (Dahchour et al., 2005; De Silva et al., 2000; Franco-Perez et al., 2006; Novitskiy et al., 2006; Quertemont et al., 2005; Satoh et al., 2008; Tambour et al., 2005; Tambour et al., 2006; Xi et al., 2004). Dentre eles, destacamos que Xi e col. observaram a formação de 8-oxodGuo e quebra de DNA em animais tratados com acetaldeído, no entanto, este grupo discute que a reação do acetaldeído com DNA é fraca, sendo capaz de oxidá-lo via catálise de Fe^{2+} (Xi et al., 2004).

O acetaldeído também é associado a diversos efeitos de mudanças neurocomportamentais em animais expostos via intraperitoneal ou intravenosa em concentrações entre 2 e 400 mg / kg, sendo eles, depressão, perda de reflexos, efeitos ansiolíticos, discriminatórios e aversivos, revisado por (Quertemont et al., 2005). A diminuição locomotora, no tempo de resposta a estímulos e em pressionar uma alavanca (do inglês lever pressing) foram avaliados em animais tratados por administração central e periférica do aldeído (McLaughlin et al., 2008; Tambour et al., 2006).

Discutimos, anteriormente, dados que comprovam a formação de radicais livres pela ação de enzimas (xantina oxidase, aldeído oxidase) e frações celulares (mitocôndria e microssomas) que oxidam acetaldeído (Albano et al., 1994; Boh et al., 1982; Gonthier et al., 1991; Nakao et al., 1999; Puntarulo et al., 1989; Rajasinghe et al., 1990). Em modelos animais, a formação de radicais foi monitorada no hipocampo de animais expostos a 200 mg/kg de acetaldeído, onde foi detectado o aumento de espécies reativas (Dahchour et al., 2005). A detecção inequívoca por EPR de radicais metila e acetila, derivados de acetaldeído marcado com carbono 13 foram comprovados na bile de ratos *Sprague-Dawley* tratados com acetaldeído (Nakao et al., 2000). Estes dados suportam nossos resultados que apontam o fígado como um órgão bastante susceptível aos tratamentos com acetaldeído por diferentes vias.

Estudos com inalação de acetaldeído em diferentes modelos animais, já foram reportados desde 1900, ano em que Lewin mostrou propriedades anestésicas do aldeído em animais expostos. Posteriormente, muitos trabalhos vêm demonstrando, efeitos carcinogênicos em diferentes modelos que respiraram concentrações altíssimas de acetaldeído (Lewin, 1900; Shiohara *et al.*, 1985). Dentre eles, destaca-se o tratamento, realizado por um grupo holandês, com duração 52 semanas e concentrações que variaram de 0 a 5000 ppm do aldeído durante 6h por dia, 5 dias na semana. Neste estudo, reportado em 4 artigos na revista *Toxicology* nos anos 80, foi observado efeitos do acetaldeído em concentrações maiores que 400 ppm, em que os animais apresentaram degeneração do epitélio olfativo. Os efeitos encontrados nos animais submetidos a concentrações maiores variaram desde hiper e metaplasia das células do epitélio olfatório, diminuição de linfócitos e de produção de urina, aumento de neutrófilos, retardamento no crescimento, até o desenvolvimento de câncer (de células escamosas e adenocarcinomas) (Appelman *et al.*, 1982; Woutersen *et al.*, 1984; Woutersen *et al.*, 1986; Woutersen *et al.*, 1987).

Em contrapartida, o tratamento de humanos por inalação de 50 ppm de acetaldeído durante 4 horas por dia, concentração esta estabelecida como o valor máximo fixado na Alemanha para exposição do aldeído e prevenção contra irritação, não apresentou aumentos de interleucinas 1 β , 6 e 8, fator de necrose tumoral α , fator estimulante de formação de colônias de macrófagos-granulócitos, proteína quimioestática monocítica 1 e ciclooxigenases 1 e 2 (Muttray *et al.*, 2009).

Dorman e col. também submeteram ratos *F-344* a concentrações de 0 ppm a 1500 ppm de acetaldeído por inalação e não observaram a formação de ligações cruzadas entre DNA - proteínas e por esta razão concluíram que o acetaldeído não está associado à formação de lesões nestas concentrações. Neste estudo, outros parâmetros como, proliferação celular do epitélio olfatório em concentrações maiores que 1500 ppm. Inflamação, metaplasia escamosa e hiperplasia do epitélio respiratório foram observados

em concentrações maiores que 500 ppm do aldeído. Além disso, este trabalho afirma que estas concentrações de acetaldeído não afetam o ganho de peso dos animais (Dorman *et al.*, 2008).

Segundo a Cetesb, em seu relatório anual de qualidade do ar na cidade de São Paulo, disponível para consulta na página da web da instituição (<http://www.cetesb.sp.gov.br/Ar/publicacoes.asp>), os níveis de acetaldeído aferidos na subestação localizada no bairro de Cerqueira César, foram em média 5,6 ppb, tendo alcançado o valor máximo de 13 ppb durante o ano de 2008. Recentemente, foi publicado um estudo baseado em modelos atmosféricos 3-D que comprova o aumento global da concentração do acetaldeído nos próximos anos, advindo do crescente uso de combustíveis, como etanol e gasolina (Millet *et al.*, 2010)

Nossos dados mostraram que concentrações próximas às que estamos susceptíveis todos os dias, 10 ppb de acetaldeído, promovem danos significativos em ratos *Wistar* expostos por apenas 50 dias ao aldeído. Os resultados apontaram aumento de lipoperoxidação no pulmão e cérebro, aumentos de 1,N²- ϵ dGuo no pulmão e 1,N²-propanodGuo no cérebro, além de aumento significativo de 1,N²-propanodGuo no pulmão dos animais tratados. Estudos com animais expostos a esta concentração de acetaldeído por períodos mais longos precisam ser realizados.

7.4. Desenvolvimento da metodologia para detecção e quantificação de 8-oxodGuo, 1,N²- ϵ dGuo e 1,N²-propanodGuo na urina

O desenvolvimento da metodologia de análise de adutos de DNA, como 8-oxodGuo, 1,N²- ϵ dGuo e principalmente o 1,N²-propanodGuo, na urina de humanos e animais é um método bastante interessante para avaliação de estresse oxidativo e exposição a aldeídos *in vivo*, uma vez que, diferente das metodologias para análise de adutos, que se baseiam na extração de DNA de sangue ou tecidos, estas medidas na urina, por serem não

invasivas, são de grande vantagem para avaliação de adutos em grande escala e em estudos populacionais.

Adicionalmente, a avaliação de três adutos em uma única metodologia é bastante interessante, pois permite comparar diferentes parâmetros de estresse oxidativo. 8-oxodGuo é uma base oxidada (Breen *et al.*, 1995), 1,*N*²-εdGuo uma eteno base formada por diferentes mecanismos, entre eles, lipoperoxidação e oxidação da desoxiribose (Awada *et al.*, 2001). E o 1,*N*² propanodGuo é resultado da ação direta de acetaldeído e crotonaldeído, provindos de fontes endógenas e exógenas (Sako *et al.*, 2003).

A presença na urina de 8-oxodGuo, 8-OHdGuo e eteno bases, como 1,*N*²-eteno-2'-desoxiguanosina, 3,*N*⁴-eteno-2'-desoxicitidina e 1,*N*⁶-eteno-2'-desoxiadenosina, já foram descritas na literatura (Chen *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2004; Hillestrom *et al.*, 2004; Hillestrom *et al.*, 2006; Marie *et al.*, 2009; Nair *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2004). Os níveis basais destes adutos na urina de humanos ainda precisam ser melhor investigados e estabelecidos, uma vez que variam de acordo com o estilo de vida, idade, local onde habitam, entre outros.

A quantidade de adutos presentes na urina, não é somente provinda de bases eliminadas por reparo, mas também de moléculas formadas em nucleotídeos livres no citossol, provenientes da dieta, células apoptóticas e necróticas, que foram excretados por não terem sido utilizados para transcrição, replicação, metabolismo e demais funções (Knutson *et al.*, 2008). 8-oxodGuo e eteno bases são reparadas principalmente por excisão de base ou nucleotídeo (BER e NER) pela ação de enzimas, alquilpurina-DNA-*N*-glicosilase e FPG (formamido pirimidina [DNA glicosilase]), principalmente, (Boiteux *et al.*, 2002; Dosanjh *et al.*, 1994; Sapparbaev *et al.*, 2002; Velez-Cruz *et al.*, 2005). Recentemente, foi reportado que adutos formados por acetaldeído são reparados principalmente por recombinação homóloga e NER (Mechilli *et al.*, 2008).

Como qualquer outro metabólito, os níveis de adutos de DNA detectados na urina podem estar subestimados, já que uma parte deles pode estar sendo liberado nas fezes pela ação das atividades biliares (Knutson *et al.*, 2008). Além disso, alguns estudos têm demonstrado que adutos de DNA podem sofrer biotransformação quando livres no citossol e ao serem eliminados (Knutson *et al.*, 2007; Knutson *et al.*, 2008; Knutson *et al.*, 2007; Otteneider *et al.*, 2006). Em estudos recentes, Knutson e col. (Knutson *et al.*, 2009) estudaram a biotransformação de eteno adutos *in vitro*, $1,N^2\text{-}\epsilon\text{Gua}$, $N^2\text{-}3\text{-}\epsilon\text{Gua}$, heptananona- $1,N^2\text{-}\epsilon\text{Gua}$, $1,N^6\text{-}\epsilon\text{Ade}$, $3,N^4\text{-}\epsilon\text{Cyt}$ e seus respectivos 2'-desoxinucleotídeos que foram usados em diversas incubações como substratos de diversas enzimas, xantina oxidoreductase e purina nucleosídeo fosforilase. Estes estudos mostraram que $1,N^2\text{-}\epsilon\text{Gua}$ e heptananona- $1,N^2\text{-}\epsilon\text{Gua}$ são substratos para reações enzimáticas no citossol de fígado de rato, formando sempre um produto de oxidação no anel imidazólico da base. No entanto, nucleotídeos são menos susceptíveis a oxidação do que nucleosídeos, porém estão mais sujeitos a clivagem glicolítica. O 2-oxo- $1,N^2\text{-}\epsilon\text{Gua}$ foi detectado após a oxidação do $1,N^2\text{-}\epsilon\text{Gua}$, que por sua vez pode ser formado após a clivagem glicolítica do $1,N^2\text{-}\epsilon\text{dGuo}$. Entretanto, Knutson e col. (Knutson *et al.*, 2009) também demonstraram maior estabilidade de propano derivados em estudos com propano adutos formados por acroleína e que possuem, assim como o propano aduto derivado de HNE e crotonaldeído/acetaldéido, um grupo -OH como ramificação do anel propano adicionado à base nitrogenada.

De fato, estudos preliminares na urina de 20 residentes da cidade de São Paulo apresentou níveis detectáveis de propano adutos (125 pmol / mg de creatinina). Estes dados mostram que esta técnica pode ser, utilizada em estudos para comparar os níveis destes adutos em grupos de pessoas expostas a concentrações diferentes de acetaldéido poluente e mesmo entre indivíduos em diferentes estágios de alcoolismo.

Portanto, o propano aduto é potencialmente um biomarcador adequado para monitorar exposição ao acetaldéido e pode ser detectado com eficiência, especificidade e

sensibilidade pela metodologia por HPLC-MS/MS desenvolvida neste trabalho. Monitorar o 1,N²-propanodGuo na urina de humanos pode fornecer informações importantes para a formulação de políticas públicas para proteção saúde da população contra, por exemplo, os efeitos da poluição.

8. CONCLUSÕES

A reação do acetaldeído com o DNA, foi comprovada pela detecção de 1,*N*²-propanodGuo, produto comprovadamente mutagênico e carcinogênico da reação direta do aldeído. Este aduto, assim como o 1,*N*²-εdGuo foram detectados por HPLC acoplado a espectrometria de massa, metodologia ultra-sensível desenvolvida neste trabalho, que nos permitiu avaliar o possível envolvimento do acetaldeído como biomarcador de estresse oxidativo em modelos celulares e animais experimentais.

Nossos resultados apontam efeito significativo do acetaldeído, em concentrações menores que 200 µM em fibroblastos pulmonares humanos normais, nas induções de lipoperoxidação, fragmentação do DNA, aumento de cálcio intracelular, e também na formação de 1,*N*²-εdGuo e 1,*N*²-propanodGuo. O efeito antioxidante promovido pelo licopeno em algumas destas lesões foi estudado. Os dados indicaram que o carotenóide é um potencial protetor, em células, contra os danos promovidos pelo aldeído.

O acetaldeído também promove aumentos significativos de lipoperoxidação, fragmentação do DNA e a formação 1,*N*²-εdGuo e 1,*N*²-propanodGuo em fígado de ratos *Wistar* tratados *i.p.* com 60 e 150 mg/kg de acetaldeído. Aumentos significativos de lipoperoxidação e a formação 1,*N*²-εdGuo no cérebro de ratos *Wistar* tratados *i.p.* com 60 mg/kg de acetaldeído também foram observados. Ratos expostos a acetaldeído por gavage apresentaram aumentos de estresse oxidativo nos três tecidos analisados. Principalmente, ratos expostos por gavage tiveram aumento do propano aduto no pulmão dos animais que receberam acetaldeído por 8 dias e aumentos de eteno e propano no fígado dos animais tratados por 30 dias.

O tratamento dos ratos *Wistar* por inalação de acetaldeído por 50 dias, evidenciou que a partir de concentrações semelhantes às que estamos expostos na cidade de São Paulo (10 ppb), podemos observar o aumento de lipoperoxidação e fragmentação do DNA nos pulmões, cérebros e fígados dos animais. Os níveis de 1,*N*²-propanodGuo também

estavam significativamente aumentados nesta concentração. Em concentrações mais elevadas, observamos também aumentos significativos nos níveis de $1,N^2$ - ϵ dGuo. É interessante notar que o aumento nos níveis dos propano adutos estão relacionados dose dependente com as quantidades de aldeído inalada.

Portanto, demonstramos que o acetaldeído é bastante citotóxico e genotóxico em baixas doses *in vitro* e *in vivo*. Todos os resultados comprovam que o acetaldeído reage com lipídeos promovendo lipoperoxidação que resulta em aldeídos reativos que podem reagir com proteínas, outros lipídeos e com o DNA levando, por exemplo, à formação de $1,N^2$ - ϵ dGuo. Também, comprovamos em nossos experimentos o aumento da formação de $1,N^2$ -propanodGuo, formado pela reação direta do acetaldeído com o dGuo.

Apresentamos o desenvolvimento de metodologia ultra-sensível para a detecção de três adutos de DNA em urina de humanos. Os resultados mostraram pela primeira vez a detecção de $1,N^2$ -propanodGuo na urina de moradores da cidade de São Paulo, além de também, quantificar os níveis de 8-oxodGuo e $1,N^2$ - ϵ dGuo nestas amostras.

Nossos resultados comprovam que o acetaldeído é um forte agente citotóxico e genotóxico, mesmo em concentrações muito baixas, podendo contribuir para o esclarecimento dos mecanismos de desenvolvimento de doenças atribuídas ao aldeído, como o câncer. Além disso, o desenvolvimento de metodologias ultra-sensíveis para detecção e quantificação de adutos na urina e DNA isolado contribui para o emprego destes adutos, em especial o $1,N^2$ -propano- 2'-desoxiguanosina, como possível biomarcador de exposição de atmosferas poluídas e doenças associadas ao estresse oxidativo.

9. REFERÊNCIAS

- Abrantes, R., Assunção, J. V., Hirai, E. Y. (2005). Emission of aldehydes from light duty diesel vehicles. **Revista de Saúde Pública**, 39, 479-485.
- Adibhatla, R. M., Hatcher, J. F. (2007). Role of Lipids in Brain Injury and Diseases. **Future lipidology**, 2, 403-422.
- Akasaka, S., Guengerich, F. P. (1999). Mutagenicity of site-specifically located 1,*N*²-ethenoguanine in Chinese hamster ovary cell chromosomal DNA. **Chemical research in toxicology**, 12, 501-507.
- Albano, E., Clot, P., Comoglio, A., Dianzani, M. U., Tomasi, A. (1994). Free radical activation of acetaldehyde and its role in protein alkylation. **FEBS letters**, 348, 65-69.
- Andersson, B. S., Sadeghi, T., Siciliano, M. J., Legerski, R., Murray, D. (1996). Nucleotide excision repair genes as determinants of cellular sensitivity to cyclophosphamide analogs. **Cancer chemotherapy and pharmacology**, 38, 406-416.
- Andic, F., Garipagaoglu, M., Yurdakonar, E., Tuncel, N., Kucuk, O. (2009). Lycopene in the prevention of gastrointestinal toxicity of radiotherapy. **Nutrition and cancer**, 61, 784-788.
- Appelman, L. M., Woutersen, R. A., Feron, V. J. (1982). Inhalation toxicity of acetaldehyde in rats. I. Acute and subacute studies. **Toxicology**, 23, 293-307.
- Arab, K., Pedersen, M., Nair, J., Meerang, M., Knudsen, L. E., Bartsch, H. (2008). Typical signature of DNA damage in white blood cells: A pilot study on etheno adducts in Danish mother-newborn child pairs. **Carcinogenesis**.
- Arab, K., Pedersen, M., Nair, J., Meerang, M., Knudsen, L. E., Bartsch, H. (2009). Typical signature of DNA damage in white blood cells: a pilot study on etheno adducts in Danish mother-newborn child pairs. **Carcinogenesis**, 30, 282-285.
- Augusto, O. (2006). *Radicais Livres: bons, maus e naturais*, Vol. 1, Oficina dos textos, São Paulo.
- Augusto, O., Bonini, M. G., Amanso, A. M., Linares, E., Santos, C. C., De Menezes, S. L. (2002). Nitrogen dioxide and carbonate radical anion: two emerging radicals in biology. **Free radical biology & medicine**, 32, 841-859.
- Augusto, O., Muntz Vaz, S. (2007). EPR spin-trapping of protein radicals to investigate biological oxidative mechanisms. **Amino acids**, 32, 535-542.
- Awada, M., Dedon, P. C. (2001). Formation of the 1,*N*²-glyoxal adduct of deoxyguanosine by phosphoglycolaldehyde, a product of 3'-deoxyribose oxidation in DNA. **Chemical research in toxicology**, 14, 1247-1253.
- Baan, R., Straif, K., Grosse, Y., Secretan, B., El Ghissassi, F., Bouvard, V., Altieri, A., Coglian, V. (2007). Carcinogenicity of alcoholic beverages. **The lancet oncology**, 8, 292-293.
- Badouard, C., Menezo, Y., Panteix, G., Ravanat, J. L., Douki, T., Cadet, J., Favier, A. (2008). Determination of new types of DNA lesions in human sperm. **Zygote (Cambridge, England)**, 16, 9-13.
- Balbo, S., Hashibe, M., Gundy, S., Brennan, P., Canova, C., Simonato, L., Merletti, F., Richiardi, L., Agudo, A., Castellsague, X., Znaor, A., Talamini, R., Bencko, V., Holcatova, I., Wang, M., Hecht, S. S., Boffetta, P. (2008). *N*²-ethyldeoxyguanosine as a potential biomarker for assessing effects of alcohol consumption on DNA. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, 17, 3026-3032.

- Barbin, A. (2000). Etheno-adduct-forming chemicals: from mutagenicity testing to tumor mutation spectra. ***Mutation Research***, 462, 55-69.
- Barbosa, L. F. (2008). Danos em DNA promovidos pela enzima Cu,Zn-superóxido dismutase. Implicações para a apoptose em um modelo celular de esclerose lateral amiotrófica. Departamento de Bioquímica, Instituto de Química. São Paulo, Universidade de São Paulo. **Doutorado**: 139.
- Barhoumi, R., Bowen, J. A., Stein, L. S., Echols, J., Burghardt, R. C. (1993). Concurrent analysis of intracellular glutathione content and gap junctional intercellular communication. ***Cytometry***, 14, 747-756.
- Bartosz, G. (2006). Use of spectroscopic probes for detection of reactive oxygen species. ***Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry***, 368, 53-76.
- Basu, A. K., McNulty, J. M., McGregor, W. G. (1999). Solution conformation and mutagenic specificity of 1,N⁶-ethenoadenine. ***IARC scientific publications***, 325-333.
- 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.
- Blair, I. A. (2008). DNA adducts with lipid peroxidation products. ***Journal of Biological Chemistry***, 283, 15545-15549.
- Boh, E. E., Baricos, W. H., Bernofsky, C., Steele, R. H. (1982). Mitochondrial chemiluminescence elicited by acetaldehyde. ***Journal of bioenergetics and biomembranes***, 14, 115-133.
- Boiteux, S., Gellon, L., Guibourt, N. (2002). Repair of 8-oxoguanine in *Saccharomyces cerevisiae*: interplay of DNA repair and replication mechanisms. ***Free radical biology & medicine***, 32, 1244-1253.
- Bradford, M. M. (1976). Rapid and Sensitive Method for Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing Principle of Protein-Dye Binding. ***Analytical Biochemistry***, 72, 248-254.
- Breen, A. P., Murphy, J. A. (1995). Reactions of oxyl radicals with DNA. ***Free radical biology & medicine***, 18, 1033-1077.
- Brigelius-Flohe, R. (1999). Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. ***Free radical biology & medicine***, 27, 951-965.
- Brooks, P. J., Theruvathu, J. A. (2005). DNA adducts from acetaldehyde: implications for alcohol-related carcinogenesis. ***Alcohol***, 35, 187-193.
- Budiawan, Eder, E. (2000). Detection of 1,N²-propanodeoxyguanosine adducts in DNA of Fischer 344 rats by an adapted P-32-post-labeling technique after per os application of crotonaldehyde. ***Carcinogenesis***, 21, 1191-1196.
- Burri, B. J. (1997). Beta-carotene and human health: A review of current research. ***Nutrition Research***, 17, 547-580.
- Burrows, C. J., Muller, J. G. (1998). Oxidative Nucleobase Modifications Leading to Strand Scission. ***Chemical reviews***, 98, 1109-1152.
- Cadet, J., Bellon, S., Berger, M., Bourdat, A. G., Douki, T., Duarte, V., Frelon, S., Gasparutto, D., Muller, E., Ravanat, J. L., Sauvaigo, S. (2002). Recent aspects of oxidative DNA damage:

- guanine lesions, measurement and substrate specificity of DNA repair glycosylases. **Biological chemistry**, 383, 933-943.
- Cadet, J., Douki, T., Ravanat, J. L. (2008). Oxidatively generated damage to the guanine moiety of DNA: mechanistic aspects and formation in cells. **Accounts of chemical research**, 41, 1075-1083.
- Cai, J. Y., Yang, J., Jones, D. P. (1998). Mitochondrial control of apoptosis: the role of cytochrome c. **Biochimie Biophysica Acta**, 1366, 139-149.
- Caliskan-Can, E., Firat, H., Ardic, S., Simsek, B., Torun, M., Yardim-Akaydin, S. (2008). Increased levels of 8-hydroxydeoxyguanosine and its relationship with lipid peroxidation and antioxidant vitamins in lung cancer. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, 46, 107-112.
- Carvalho, V. M., Asahara, F., Di Mascio, P., de Arruda Campos, I. P., Cadet, J., Medeiros, M. H. (2000). Novel 1,*N*⁶-etheno-2'-deoxyadenosine adducts from lipid peroxidation products. **Chemical research in toxicology**, 13, 397-405.
- Carvalho, V. M., Di Mascio, P., de Arruda Campos, I. P., Douki, T., Cadet, J., Medeiros, M. H. (1998). Formation of 1,*N*⁶-etheno-2'-deoxyadenosine adducts by trans,trans-2, 4-Decadienal. **Chemical research in toxicology**, 11, 1042-1047.
- Cassina, A. M., Hodara, R., Souza, J. M., Thomson, L., Castro, L., Ischiropoulos, H., Freeman, B. A., Radi, R. (2000). Cytochrome c nitration by peroxynitrite. **Journal of Biological Chemistry**, 275, 21409-21415.
- Chen, H. J., Chiu, W. L. (2005). Association between cigarette smoking and urinary excretion of 1,*N*²-ethenoguanine measured by isotope dilution liquid chromatography-electrospray ionization/tandem mass spectrometry. **Chemical research in toxicology**, 18, 1593-1599.
- Chen, H. J., Lin, W. P. (2009). Simultaneous quantification of 1,*N*²-propano-2'-deoxyguanosine adducts derived from acrolein and crotonaldehyde in human placenta and leukocytes by isotope dilution nanoflow LC nanospray ionization tandem mass spectrometry. **Analytical chemistry**, 81, 9812-9818.
- Chen, H. J., Wu, C. F., Hong, C. L., Chang, C. M. (2004). Urinary excretion of 3,*N*⁴-etheno-2'-deoxycytidine in humans as a biomarker of oxidative stress: association with cigarette smoking. **Chemical research in toxicology**, 17, 896-903.
- Cheng, K. C., Cahill, D. S., Kasai, H., Nishimura, S., Loeb, L. A. (1992). 8-Hydroxyguanine, an abundant form of oxidative DNA damage, causes G----T and A----C substitutions. **Journal of Biological Chemistry**, 267, 166-172.
- 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 U S A**, 88, 9974-9978.
- Chepiga, T. A., Morton, M. J., Murphy, P. A., Avalos, J. T., Bombick, B. R., Doolittle, D. J., Borgerding, M. F., Swauger, J. E. (2000). A comparison of the mainstream smoke chemistry and mutagenicity of a representative sample of the US cigarette market with two Kentucky reference cigarettes (K1R4F and K1R5F). **Food Chem Toxicol**, 38, 949-962.
- Cho, Y. J., Wang, H., Kozekov, I. D., Kurtz, A. J., Jacob, J., Voehler, M., Smith, J., Harris, T. M., Lloyd, R. S., Rizzo, C. J., Stone, M. P. (2006). Stereospecific formation of interstrand carbinolamine DNA cross-links by crotonaldehyde- and acetaldehyde-derived alpha-CH3-gamma-OH-1,*N*²-propano-2'-deoxyguanosine adducts in the 5'-CpG-3' sequence. **Chemical research in toxicology**, 19, 195-208.

- Christlbauer, M., Schieberle, P. (2009). Characterization of the key aroma compounds in beef and pork vegetable gravies a la chef by application of the aroma extract dilution analysis. **Journal of agricultural and food chemistry**, 57, 9114-9122.
- Chung, F. L., Chen, H. J. C., Nath, R. G. (1996). Lipid peroxidation as a potential endogenous source for the formation of exocyclic DNA adducts. **Carcinogenesis**, 17, 2105-2111.
- Chung, F. L., Hecht, S. S. (1983). Formation of cyclic 1,*N*²--adducts by reaction of deoxyguanosine with alpha-acetoxy-N-nitrosopyrrolidine, 4-(carbethoxynitrosamino) butanal, or crotonaldehyde. **Cancer research**, 43, 1230-1235.
- Clinton, S. K., Emenhiser, C., Giovannucci, E. L., Bostwick, D. G., Schwartz, S. J. (1995). Cis-Trans Isomers of Lycopene in the Human Prostate - a Role in Cancer Prevention. **Faseb Journal**, 9, A442-A442.
- Collins, A. R., Cadet, J., Moller, L., Poulsen, H. E., Vina, J. (2004). Are we sure we know how to measure 8-oxo-7,8-dihydroguanine in DNA from human cells? **Archives of biochemistry and biophysics**, 423, 57-65.
- Crabb, D. W., Matsumoto, M., Chang, D., You, M. (2004). Overview of the role of alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase and their variants in the genesis of alcohol-related pathology. **The Proceedings of the Nutrition Society**, 63, 49-63.
- Custovic, Z., Zarkovic, K., Cindric, M., Cipak, A., Jurkovic, I., Sonicki, Z., Uchida, K., Zarkovic, N. (2010). Lipid peroxidation product acrolein as a predictive biomarker of prostate carcinoma relapse after radical surgery. **Free radical Research**, 44, 497-504.
- Dahchour, A., Lallemand, F., Ward, R. J., De Witte, P. (2005). Production of reactive oxygen species following acute ethanol or acetaldehyde and its reduction by acamprosate in chronically alcoholized rats. **European journal of pharmacology**, 520, 51-58.
- Danial, N. N., Korsmeyer, S. J. (2004). Cell death: Critical control points. **Cell**, 116, 205-219.
- De Benedetto, G. E., Fanigliulo, M. (2009). A new CE-ESI-MS method for the detection of stable hemoglobin acetaldehyde adducts, potential biomarkers of alcohol abuse. **Electrophoresis**, 30, 1798-1807.
- de los Santos, C., Zaliznyak, T., Johnson, F. (2001). NMR characterization of a DNA duplex containing the major acrolein-derived deoxyguanosine adduct gamma-OH-1,*N*²-propano-2 '-deoxyguanosine. **Journal of Biological Chemistry**, 276, 9077-9082.
- De Martins, B. S., Kado, N. Y., carvalho, L. R. F., Okamoto, R. A., Gundel, L. A. (1999). Genotoxicity of fractionated organic material in airborne particles from São Paulo. **Mutation Research**, 446, 83-94.
- De Silva, I. U., McHugh, P. J., Clingen, P. H., Hartley, J. A. (2000). Defining the roles of nucleotide excision repair and recombination in the repair of DNA interstrand cross-links in mammalian cells. **Molecular and cellular biology**, 20, 7980-7990.
- Di Mascio, P. (1985). molecular oxygen: Generation, reactivity, identification and biological effects. **Ciência e Cultura**, 47, 297.
- Di Mascio, P., Kaiser, S., Sies, H. (1989). Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. **Archives of biochemistry and biophysics**, 274, 532-538.
- Dorman, D. C., Struve, M. F., Wong, B. A., Gross, E. A., Parkinson, C., Willson, G. A., Tan, Y. M., Campbell, J. L., Teeguarden, J. G., Clewell, H. J., 3rd, Andersen, M. E. (2008). Derivation of

- an inhalation reference concentration based upon olfactory neuronal loss in male rats following subchronic acetaldehyde inhalation. *Inhalation toxicology*, 20, 245-256.
- Dosanjh, M. K., Chenna, A., Kim, E., Fraenkel-Conrat, H., Samson, L., Singer, B. (1994). All four known cyclic adducts formed in DNA by the vinyl chloride metabolite chloroacetaldehyde are released by a human DNA glycosylase. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A*, 91, 1024-1028.
- Duryee, M. J., Klassen, L. W., Jones, B. L., Willis, M. S., Tuma, D. J., Thiele, G. M. (2008). Increased immunogenicity to P815 cells modified with malondialdehyde and acetaldehyde. *International immunopharmacology*, 8, 1112-1118.
- Eder, E., Budiawan. (2001). Cancer risk assessment for the environmental mutagen and carcinogen crotonaldehyde on the basis of TD(50) and comparison with 1,N²-propanodeoxyguanosine adduct levels. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 10, 883-888.
- Eder, E., Budiawan, Schuler, D. (1996). Crotonaldehyde: a carcinogenic and mutagenic air, water and food pollutant. *Central European journal of public health*, 4 Suppl, 21-22.
- Eder, E., Schuler, D., Budiawan. (1999). Cancer risk assessment for crotonaldehyde and 2-hexenal: an approach. *IARC scientific publications*, 219-232.
- 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.
- Esterbauer, H., Lang, J., Zadavec, S., Slater, T. F. (1984). Detection of malonaldehyde by high-performance liquid chromatography. *Methods in enzymology*, 105, 319-328.
- Fang, J. L., Vaca, C. E. (1997). Detection of DNA adducts of acetaldehyde in peripheral white blood cells of alcohol abusers. *Carcinogenesis*, 18, 627-632.
- Fang, Q., Nair, J., Sun, X., Hadjiolov, D., Bartsch, H. (2007). Etheno-DNA adduct formation in rats gavaged with linoleic acid, oleic acid and coconut oil is organ- and gender specific. *Mutation Research*, 624, 71-79.
- Fernandes, P. H., Kanuri, M., Nechev, L. V., Harris, T. M., Lloyd, R. S. (2005). Mammalian cell mutagenesis of the DNA adducts of vinyl chloride and crotonaldehyde. *Environmental and molecular mutagenesis*, 45, 455-459.
- Ferrer-Sueta, G., Radi, R. (2009). Chemical biology of peroxynitrite: kinetics, diffusion, and radicals. *ACS chemical biology*, 4, 161-177.
- Fiala, E. S., Conaway, C. C., Mathis, J. E. (1989). Oxidative DNA and RNA damage in the livers of Sprague-Dawley rats treated with the hepatocarcinogen 2-nitropropane. *Cancer Research*, 49, 5518-5522.
- Finlayson-Pits, B. J., Jr., J. N. P. (2000). *Chemistry of the upper and Lower atmosphere*, Vol. 1, Academic Press, San Diego.
- Franco-Perez, J., Padilla, M., Paz, C. (2006). Sleep and brain monoamine changes produced by acute and chronic acetaldehyde administration in rats. *Behavioural brain research*, 174, 86-92.
- Fridovich, I. (1989). Oxygen radicals from acetaldehyde. *Free radical biology & medicine*, 7, 557-558.
- Frimer, A. (1985). *Singlete O₂*, Boca Raton: CRC Press.

- Gago-Dominguez, M., Castelao, J. E. (2008). Role of lipid peroxidation and oxidative stress in the association between thyroid diseases and breast cancer. **Critical reviews in oncology/hematology**, 68, 107-114.
- Gallicchio, L., Boyd, K., Matanoski, G., Tao, X. G., Chen, L., Lam, T. K., Shiels, M., Hammond, E., Robinson, K. A., Caulfield, L. E., Herman, J. G., Guallar, E., Alberg, A. J. (2008). Carotenoids and the risk of developing lung cancer: a systematic review. **American Journal of Clinical Nutrition**, 88, 372-383.
- Gapstur, S. M., Potter, J. D., Sellers, T. A., Folsom, A. R. (1992). Increased risk of breast cancer with alcohol consumption in postmenopausal women. **American journal of epidemiology**, 136, 1221-1231.
- Gogvadze, V., Orrenius, S. (2006). Mitochondrial regulation of apoptotic cell death. **Chemico-Biological Interactions**, 163, 4-14.
- Gonthier, B., Jeunet, A., Barret, L. (1991). Electron spin resonance study of free radicals produced from ethanol and acetaldehyde after exposure to a Fenton system or to brain and liver microsomes. **Alcohol**, 8, 369-375.
- Green, D. R., Reed, J. C. (1998). Mitochondria and apoptosis. **Science**, 281, 1309-1312.
- Gros, L., Ishchenko, A. A., Saparbaev, M. (2003). Enzymology of repair of etheno-adducts. **Mutation Research**, 531, 219-229.
- Guimarães, G. S., Varandas, L. S., Arbilla, G. (2010). Formaldehyde and acetaldehyde concentrations in the idle and taxiway areas of urban airport. **Journal of the brasilian chemical society**, 21, 481-488.
- Halliwell, B., Gutteridge, J. (2007). *Free Radicals in Biology and Medicine*, 4 ed., Oxford University Press, New York, USA.
- Hang, B., Guliaev, A. B. (2007). Substrate specificity of human thymine-DNA glycosylase on exocyclic cytosine adducts. **Chemico Biological Interactions**, 165, 230-238.
- Haseen, F., Cantwell, M. M., O'Sullivan, J. M., Murray, L. J. (2009). Is there a benefit from lycopene supplementation in men with prostate cancer? A systematic review. **Prostate cancer and prostatic diseases**, 12, 325-332.
- Heber, D., Lu, Q. Y. (2002). Overview of mechanisms of action of lycopene. **Experimental of Biological Medicine**, 227, 920-923.
- Hecht, S. S., McIntee, E. J., Wang, M. Y. (2001). New DNA adducts of crotonaldehyde and acetaldehyde. **Toxicology**, 166, 31-36.
- Heinonen, O. P., Huttunen, J. K., Albanes, D., Haapakoski, J., Palmgren, J., Pietinen, P., Pikkariainen, J., Rautalahti, M., Virtamo, J., Edwards, B. K., Greenwald, P., Hartman, A. M., Taylor, P. R., Haukka, J., Jarvinen, P., Malila, N., Rapola, S., Jokinen, P., Karjalainen, J., Lauronen, J., et al. (1994). Effect of Vitamin-E and Beta-Carotene on the Incidence of Lung-Cancer and Other Cancers in Male Smokers. **New England Journal of Medicine**, 330, 1029-1035.
- Hentze, M. W., Muckenthaler, M. U., Andrews, N. C. (2004). Balancing acts: molecular control of mammalian iron metabolism. **Cell**, 117, 285-297.
- Hillestrom, P. R., Hoberg, A. M., Weimann, A., Poulsen, H. E. (2004). Quantification of 1,N⁶-etheno-2'-deoxyadenosine in human urine by column-switching LC/APCI-MS/MS. **Free radical biology & medicine**, 36, 1383-1392.

- Hillestrom, P. R., Weimann, A., Poulsen, H. E. (2006). Quantification of urinary etheno-DNA adducts by column-switching LC/APCI-MS/MS. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, 17, 605-610.
- Holownia, A., Ledig, M., Braszko, J. J., Menez, J. F. (1999). Acetaldehyde cytotoxicity in cultured rat astrocytes. **Brain Research**, 833, 202-208.
- Hu, C. W., Yen, C. C., Huang, Y. L., Pan, C. H., Lu, F. J., Chao, M. R. (2010). Oxidatively damaged DNA induced by humic acid and arsenic in maternal and neonatal mice. **Chemosphere**, 79, 93-99.
- Hussain, S. P., Harris, C. C. (1998). Molecular epidemiology of human cancer: contribution of mutation spectra studies of tumor suppressor genes. **Cancer research**, 58, 4023-4037.
- International Agency for Research on Cancer. (1985) Allyl compounds, aldehydes, epoxides and peroxides. **In Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans**, Vol. 36, pp 101-132, International Agency for Research on Cancer, Lyon, France
- International Agency for Research on Cancer (1995). Dry cleaning some chlorinated solvents and others chemicals. **In Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans**, Vol. 63, pp 33-477, International Agency for Research on Cancer, Lyon, France.
- International Agency for Research on Cancer. (1995) Crotonaldehyde. **In Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans**, Vol. 63, pp 373-391, International Agency for Research on Cancer, Lyon, France.
- Inagaki, S., Esaka, Y., Deyashiki, Y., Sako, M., Goto, M. (2003). Analysis of DNA adducts of acetaldehyde by liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of chromatography**, 987, 341-347.
- Jones, D. P. (2008). Radical-free biology of oxidative stress. **American Journal of Physiology Cell Physiology**, 295, C849-868.
- 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. **Chemico Biological 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. **Chemico Biological Interactions**, 67, 295-304.
- Kawai, Y., Takeda, S., Terao, J. (2007). Lipidomic analysis for lipid peroxidation-derived aldehydes using gas chromatography-mass spectrometry. **Chemical research in toxicology**, 20, 99-107.
- Kelvin, E. A., Edwards, S., Jedrychowski, W., Schleicher, R. L., Camann, D., Tang, D., Perera, F. P. (2009). Modulation of the effect of prenatal PAH exposure on PAH-DNA adducts in cord blood by plasma antioxidants. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, 18, 2262-2268.
- Knutson, C. G., Akingbade, D., Crews, B. C., Voehler, M., Stec, D. F., Marnett, L. J. (2007). Metabolism in vitro and in vivo of the DNA base adduct, M1G. **Chemical research in toxicology**, 20, 550-557.
- Knutson, C. G., Robinson, E. H., Akingbade, D., Anderson, C. S., Stec, D. F., Petrova, K. V., Kozekov, I. D., Guengerich, F. P., Rizzo, C. J., Marnett, L. J. (2009). Oxidation and glycolytic cleavage of etheno and propano DNA base adducts. **Biochemistry**, 48, 800-809.

- Knutson, C. G., Skipper, P. L., Liberman, R. G., Tannenbaum, S. R., Marnett, L. J. (2008). Monitoring in vivo metabolism and elimination of the endogenous DNA adduct, M1dG {3-(2-deoxy-beta-D-erythro-pentofuranosyl)pyrimido[1,2-alpha]purin-10(3H)- one}, by accelerator mass spectrometry. **Chemical research in toxicology**, 21, 1290-1294.
- Knutson, C. G., Wang, H., Rizzo, C. J., Marnett, L. J. (2007). Metabolism and elimination of the endogenous DNA adduct, 3-(2-deoxy-beta-D-erythropentofuranosyl)-pyrimido[1,2-alpha]purine-10(3H)- one, in the rat. **Journal of Biological Chemistry**, 282, 36257-36264.
- Koc, H., Swenberg, J. A. (2002). Applications of mass spectrometry for quantitation of DNA adducts. **Journal of Chromatography B Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, 778, 323-343.
- Kochetkov, N. K., Shibaev, V. N., Kost, A. A. (1971). New reactions of adenine and cytosine derivatives, potentially useful for nucleic acids modifications. **Tetrahedron Letters**, 22, 1933-1996.
- Krantic, S., Mechawar, N., Reix, S., Quirion, R. (2005). Molecular basis of programmed cell death involved in neurodegeneration. **Trends in neurosciences**, 28, 670-676.
- Kristal, A. R., Cohen, J. H. (2000). Invited commentary: Tomatoes, lycopene, and prostate cancer. How strong is the evidence? **American journal of epidemiology**, 151, 124-127.
- Kuykendall, J. R., Bogdanffy, M. S. (1992). Efficiency of DNA-Histone Cross-Linking Induced by Saturated and Unsaturated Aldehydes Invitro. **Mutation Research**, 283, 131-136.
- Lachenmeier, D. W., Sohnius, E. M. (2008). The role of acetaldehyde outside ethanol metabolism in the carcinogenicity of alcoholic beverages: evidence from a large chemical survey. **Food Chemistry Toxicology**, 46, 2903-2911.
- Lancaster, J. R., Jr. (1997). A tutorial on the diffusibility and reactivity of free nitric oxide. **Nitric Oxide**, 1, 18-30.
- Langouet, S., Mican, A. N., Muller, M., Fink, S. P., Marnett, L. J., Muhle, S. A., Guengerich, F. P. (1998). Misincorporation of nucleotides opposite five-membered exocyclic ring guanine derivatives by escherichia coli polymerases in vitro and in vivo: 1,N²-ethenoguanine, 5,6,7,9-tetrahydro-9-oxoimidazo[1, 2-a]purine, and 5,6,7,9-tetrahydro-7-hydroxy-9-oxoimidazo[1, 2-a]purine. **Biochemistry**, 37, 5184-5193.
- 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.
- Le Page, F., Margot, A., Grollman, A. P., Sarasin, A., Gentil, A. (1995). Mutagenicity of a unique 8-oxoguanine in a human Ha-ras sequence in mammalian cells. **Carcinogenesis**, 16, 2779-2784.
- Leonard, N. J. (1992). Etheno-bridged nucleotides in structural diagnosis and carcinogenesis. **Biochemistry and Molecular Biology**, 3, 273-297.
- Levine, A. J. (1997). p53, the cellular gatekeeper for growth and division. **Cell**, 88, 323-331.
- Lewin, L. (1900). Über die Giftwirkungen des akrolein. Ein beitrage zur toxicologie der aldehyde. **Arch. exptl. pathol. Pharmacol. Naunyn-Schmiedeberg's**, 43, 351-366.

- Lin, T. S., Cheng, J. C., Ishiguro, K., Sartorelli, A. C. (1985). 8-Substituted guanosine and 2'-deoxyguanosine derivatives as potential inducers of the differentiation of Friend erythroleukemia cells. **Journal of medicinal chemistry**, 28, 1194-1198.
- Liu, C., Russell, R. M., Wang, X. D. (2006). Lycopene supplementation prevents smoke-induced changes in p53, p53 phosphorylation, cell proliferation, and apoptosis in the gastric mucosa of ferrets. **Journal of Nutrition**, 136, 106-111.
- Liu, X., Lao, Y., Yang, I. Y., Hecht, S. S., Moriya, M. (2006). Replication-coupled repair of crotonaldehyde/acetaldehyde-induced guanine-guanine interstrand cross-links and their mutagenicity. **Biochemistry**, 45, 12898-12905.
- Loidl-Stahlhofen, A., Hannemann, K., Spiteller, G. (1994). Generation of alpha-hydroxyaldehydic compounds in the course of lipid peroxidation. **Biochimica et biophysica acta**, 1213, 140-148.
- Loureiro, A. P., Di Mascio, P., Gomes, O. F., Medeiros, M. H. (2000). trans,trans-2,4-decadienal-induced 1,N²-etheno-2'-deoxyguanosine adduct formation. **Chemical research in toxicology**, 13, 601-609.
- Loureiro, A. P. M., Marques, S. A., Garcia, C. C. M., Di Mascio, P., Medeiros, M. H. G. (2002). Development of an on-line liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry assay to quantitatively determine 1,N²-etheno-2'-deoxyguanosine in DNA. **Chemical research in toxicology**, 15, 1302-1308.
- Lowe, G. M., Booth, L. A., Young, A. J., Bilton, R. F. (1999). Lycopene and beta-carotene protect against oxidative damage in HT29 cells at low concentrations but rapidly lose this capacity at higher doses. **Free Radical Research**, 30, 141-151.
- Maciejewska, A. M., Ruszel, K. P., Nieminuszczy, J., Lewicka, J., Sokolowska, B., Grzesiuk, E., Kusmierek, J. T. (2010). Chloroacetaldehyde-induced mutagenesis in Escherichia coli: The role of AlkB protein in repair of 3,N⁴-ethenocytosine and 3,N⁴-alpha-hydroxyethanocytosine. **Mutation Research**, 684, 24-34.
- Mangal, D., Vudathala, D., Park, J. H., Lee, S. H., Penning, T. M., Blair, I. A. (2009). Analysis of 7,8-dihydro-8-oxo-2'-deoxyguanosine in cellular DNA during oxidative stress. **Chemical research in toxicology**, 22, 788-797.
- Mao, H., Schnetz-Boutaud, N. C., Weisenseel, J. P., Marnett, L. J., Stone, M. P. (1999). Duplex DNA catalyzes the chemical rearrangement of a malondialdehyde deoxyguanosine adduct. **Proceedings of the National Academy of Sciences U S**, 96, 6615-6620.
- Marie, C., Ravanat, J. L., Badouard, C., Marques, M., Balducci, F., Maitre, A. (2009). Urinary levels of oxidative DNA and RNA damage among workers exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons in silicon production: comparison with 1-hydroxypyrene. **Environmental and molecular mutagenesis**, 50, 88-95.
- Marklund, S. L., Westman, N. G., Lundgren, E., Roos, G. (1982). Copper- and zinc-containing superoxide dismutase, manganese-containing superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase in normal and neoplastic human cell lines and normal human tissues. **Cancer research**, 42, 1955-1961.
- Martinez, G. R., Gasparutto, D., Ravanat, J. L., Cadet, J., Medeiros, M. H., Di Mascio, P. (2005). Identification of the main oxidation products of 8-methoxy-2'-deoxyguanosine by singlet molecular oxygen. **Free radical biology & medicine**, 38, 1491-1500.

- 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 U S**, 89, 9331-9334.
- Matsuda, T., Terashima, I., Matsumoto, Y., Yabushita, H., Matsui, S., Shibutani, S. (1999). Effective utilization of N²-ethyl-2'-deoxyguanosine triphosphate during DNA synthesis catalyzed by mammalian replicative DNA polymerases. **Biochemistry**, 38, 929-935.
- Matsuda, T., Yabushita, H., Kanaly, R. A., Shibutani, S., Yokoyama, A. (2006). Increased DNA damage in ALDH2-deficient alcoholics. **Chemical research in toxicology**, 19, 1374-1378.
- Mayne, S. T. (1996). Beta-carotene, carotenoids, and disease prevention in humans. **FASEB Journal**, 10, 690-701.
- McLaughlin, P. J., Chuck, T. L., Arizzi-LaFrance, M. N., Salamone, J. D., Correa, M. (2008). Central vs. peripheral administration of ethanol, acetaldehyde and acetate in rats: effects on lever pressing and response initiation. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, 89, 304-313.
- Mechilli, M., Schinoppi, A., Kobos, K., Natarajan, A. T., Palitti, F. (2008). DNA repair deficiency and acetaldehyde-induced chromosomal alterations in CHO cells. **Mutagenesis**, 23, 51-56.
- Medeiros, M. H. G. (2009). Exocyclic DNA Adducts as Biomarkers of Lipid Oxidation and Predictors of Disease. Challenges in Developing Sensitive and Specific Methods for Clinical Studies. **Chemical research in toxicology**, 22, 419-425.
- Meerang, M., Nair, J., Sirankapracha, P., Thephinlap, C., Srichairatanakool, S., Fucharoen, S., Bartsch, H. (2008). Increased urinary 1,N⁶-ethenodeoxyadenosine and 3,N⁴-ethenodeoxycytidine excretion in thalassemia patients: markers for lipid peroxidation-induced DNA damage. **Free radical biology & medicine**, 44, 1863-1868.
- Menegola, E., Broccia, M. L., Di Renzo, F., Giavini, E. (2001). Acetaldehyde in vitro exposure and apoptosis: a possible mechanism of teratogenesis. **Alcohol**, 23, 35-39.
- Mikes, P., Korinek, M., Linhart, I., Krouzelka, J., Frantik, E., Vodickova, L., Neufussova, L. (2008). Excretion of urinary N⁷ guanine and N³ adenine DNA adducts in mice after inhalation of styrene. **Toxicology letters**.
- Millet, D. B., Guenther, A., Siegel, D. A., Nelson, N. B., Singh, H. B., de Gouw, J. A., Warneke, C., Williams, J., Eerdekens, G., Sinha, V., Karl, T., Flocke, F., Apel, E., Riemer, D. D., Palmer, P. I., Barkley, M. (2010). Global atmospheric budget of acetaldehyde: 3-D model analysis and constraints from in-situ and satellite observations. **Atmospheric Chemistry and Physics**, 10, 3405-3425.
- Minko, I. G., Kozekov, I. D., Harris, T. M., Rizzo, C. J., Lloyd, R. S., Stone, M. P. (2009). Chemistry and biology of DNA containing 1,N²-deoxyguanosine adducts of the alpha,beta-unsaturated aldehydes acrolein, crotonaldehyde, and 4-hydroxynonenal. **Chemical research in toxicology**, 22, 759-778.
- Minko, I. G., Washington, M. T., Kanuri, M., Prakash, L., Prakash, S., Lloyd, R. S. (2003). Translesion synthesis past acrolein-derived DNA adduct, gamma-hydroxypropanodeoxyguanosine, by yeast and human DNA polymerase eta. **Journal of Biological Chemistry**, 278, 784-790.
- 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 U S A**, 91, 11899-11903.

- Moynahan, M. E., Cui, T. Y., Jasin, M. (2001). Homology-directed dna repair, mitomycin-c resistance, and chromosome stability is restored with correction of a Brca1 mutation. **Cancer research**, 61, 4842-4850.
- Muller, K., Carpenter, K. L., Challis, I. R., Skepper, J. N., Arends, M. J. (2002). Carotenoids induce apoptosis in the T-lymphoblast cell line Jurkat E6.1. **Free Radical Research**, 36, 791-802.
- Murata, M., Kawanishi, S. (2000). Oxidative DNA damage by vitamin A and its derivative via superoxide generation. **Journal of Biological Chemistry**, 275, 2003-2008.
- Musa-Veloso, K., Card, J. W., Wong, A. W., Cooper, D. A. (2009). Influence of observational study design on the interpretation of cancer risk reduction by carotenoids. **Nutrition Reviews**, 67, 527-545.
- Muttray, A., Gosepath, J., Brieger, J., Faldum, A., Pribisz, A., Mayer-Popken, O., Jung, D., Rossbach, B., Mann, W., Letzel, S. (2009). No acute effects of an exposure to 50 ppm acetaldehyde on the upper airways. **International archives of occupational and environmental health**, 82, 481-488.
- Nair, J., Barbin, A., Guichard, Y., Bartsch, H. (1995). 1,*N*⁶-ethenodeoxyadenosine and 3,*N*⁴-ethenodeoxycytine in liver DNA from humans and untreated rodents detected by immunoaffinity/32P-postlabeling. **Carcinogenesis**, 16, 613-617.
- Nair, J., Barbin, A., Velic, I., Bartsch, H. (1999). Etheno DNA-base adducts from endogenous reactive species. **Mutation Research**, 424, 59-69.
- Nair, J., Srivatanakul, P., Haas, C., Jedpiyawongse, A., Khuhaprema, T., Seitz, H. K., Bartsch, H. (2010). High urinary excretion of lipid peroxidation-derived DNA damage in patients with cancer-prone liver diseases. **Mutation Research**, 683, 23-28.
- Nair, U., Bartsch, H., Nair, J. (2007). Lipid peroxidation-induced DNA damage in cancer-prone inflammatory diseases: a review of published adduct types and levels in humans. **Free radical biology & medicine**, 43, 1109-1120.
- Nakao, L. S., Kadiiska, M. B., Mason, R. P., Grijalba, M. T., Augusto, O. (2000). Metabolism of acetaldehyde to methyl and acetyl radicals: in vitro and in vivo electron paramagnetic resonance spin-trapping studies. **Free radical biology & medicine**, 29, 721-729.
- Nakao, L. S., Ouchi, D., Augusto, O. (1999). Oxidation of acetaldehyde by peroxynitrite and hydrogen Peroxide/Iron(II). Production Of acetate, formate, and methyl radicals. **Chemical research in toxicology**, 12, 1010-1018.
- 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.
- Natarajan, A. T., Palitti, F. (2008). DNA repair and chromosomal alterations. **Mutation Research**, 657, 3-7.
- Nath, R. G., Chung, F. L. (1994). Detection of exocyclic 1,*N*²-propanodeoxyguanosine adducts as common DNA lesions in rodents and humans. **Proceedings of the National Academy of Sciences U S**, 91, 7491-7495.
- Nath, R. G., Ocando, J. E., Chung, F. L. (1996). Detection of 1, *N*²-propanodeoxyguanosine adducts as potential endogenous DNA lesions in rodent and human tissues. **Cancer research**, 56, 452-456.

- Nath, R. G., Ocando, J. E., Guttenplan, J. B., Chung, F. L. (1998). 1,*N*²-propanodeoxyguanosine adducts: potential new biomarkers of smoking-induced DNA damage in human oral tissue. **Cancer research**, 58, 581-584.
- Navarro, A., Boveris, A. (2009). Brain mitochondrial dysfunction and oxidative damage in Parkinson's disease. **Journal of bioenergetics and biomembranes**, 41, 517-521.
- Nicholls, R., Dejersey, J., Worrall, S., Wilce, P. (1992). Modification of Proteins and Other Biological Molecules by Acetaldehyde - Adduct Structure and Functional-Significance. **International Journal of Biochemistry**, 24, 1899-1906.
- Nicoletti, I., Migliorati, G., Pagliacci, M. C., Grignani, F., Riccardi, C. (1991). A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. **Journal of immunological methods**, 139, 271-279.
- Niemela, O. (1993). Acetaldehyde Adducts of Proteins - Diagnostic and Pathogenic Implications in Diseases Caused by Excessive Alcohol-Consumption. **Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation** 53, 45-54.
- Nishikawa, A., Sodum, R., Chung, F. L. (1992). Acute toxicity of trans-4-hydroxy-2-nonenal in Fisher 344 rats [corrected]. **Lipids**, 27, 54-58.
- Novitskiy, G., Traore, K., Wang, L., Trush, M. A., Mezey, E. (2006). Effects of ethanol and acetaldehyde on reactive oxygen species production in rat hepatic stellate cells. **Alcoholism, clinical and experimental research**, 30, 1429-1435.
- Oancea, E., Wolfe, J. T., Clapham, D. E. (2006). Functional TRPM7 channels accumulate at the plasma membrane in response to fluid flow. **Circulation research**, 98, 245-253.
- Obe, G., Anderson, D. (1987). Genetic-Effects of Ethanol. **Mutation Research**, 186, 177-200.
- Obe, G., Natarajan, A. T., Meyers, M., Denhertog, A. (1979). Induction of Chromosomal-Aberrations in Peripheral Lymphocytes of Human-Blood Invitro, and of Sces in Bone-Marrow Cells of Mice Invivo by Ethanol and Its Metabolite Acetaldehyde. **Mutation Research**, 68, 291-294.
- Obolenskaya, M. Y., Teplyuk, N. M., Divi, R. L., Poirier, M. C., Filimonova, N. B., Zadrozna, M., Pasanen, M. J. (2010). Human placental glutathione S-transferase activity and polycyclic aromatic hydrocarbon DNA adducts as biomarkers for environmental oxidative stress in placentas from pregnant women living in radioactivity- and chemically-polluted regions. **Toxicology letters**.
- Ogawa, H., Gomi, T., Fujioka, M. (2000). Serine hydroxymethyltransferase and threonine aldolase: are they identical? **The international journal of biochemistry & cell biology**, 32, 289-301.
- Olson, J. A., Krinsky, N. I. (1995). Introduction: the colorful, fascinating world of the carotenoids: important physiologic modulators. **FASEB Journal**, 9, 1547-1550.
- Orrenius, S. (2004). Mitochondrial regulation of apoptotic cell death. **Free Radical Biology & Medicine**, 36, S1-S1.
- Otteneeder, M. B., Knutson, C. G., Daniels, J. S., Hashim, M., Crews, B. C., Rummel, R. P., Wang, H., Rizzo, C., Marnett, L. J. (2006). In vivo oxidative metabolism of a major peroxidation-derived DNA adduct, M1dG. **Proceedings of the National Academy of Sciences U S A**, 103, 6665-6669.
- 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.

- Palozza, P., Sheriff, A., Serini, S., Boninsegna, A., Maggiano, N., Ranelletti, F. O., Calviello, G., Cittadini, A. (2005). Lycopene induces apoptosis in immortalized fibroblasts exposed to tobacco smoke condensate through arresting cell cycle and down-regulating cyclin D1, pAKT and pBad. **Apoptosis**, 10, 1445-1456.
- Pamplona, R. (2008). Membrane phospholipids, lipoxidative damage and molecular integrity: a causal role in aging and longevity. **Biochimica et biophysica acta**, 1777, 1249-1262.
- Pan, J., Davis, W., Trushin, N., Amin, S., Nath, R. G., Salem, N., Jr., Chung, F. L. (2006). A solid-phase extraction/high-performance liquid chromatography-based (32)P-postlabeling method for detection of cyclic 1,N²-propanodeoxyguanosine adducts derived from enals. **Analytical Biochemistry**, 348, 15-23.
- Pandya, G. A., Moriya, M. (1996). 1,N⁶-ethenodeoxyadenosine, a DNA adduct highly mutagenic in mammalian cells. **Biochemistry**, 35, 11487-11492.
- Pang, B., Zhou, X., Yu, H., Dong, M., Taghizadeh, K., Wishnok, J. S., Tannenbaum, S. R., Dedon, P. C. (2007). Lipid peroxidation dominates the chemistry of DNA adduct formation in a mouse model of inflammation. **Carcinogenesis**, 28, 1807-1813.
- Paoletti, P. (1995). Application of Biomarkers in Population Studies for Respiratory Nonmalignant Diseases. **Toxicology**, 101, 99-105.
- Peddi, P., Loftin, C. W., Dickey, J. S., Hair, J. M., Burns, K. J., Aziz, K., Francisco, D. C., Panayiotidis, M. I., Sedelnikova, O. A., Bonner, W. M., Winters, T. A., Georgakilas, A. G. (2010). DNA-PKcs deficiency leads to persistence of oxidatively-induced clustered DNA lesions in human tumor cells. **Free radical biology & medicine**, in press.
- Peluso, M., Munnia, A., Hoek, G., Krzyzanowski, M., Veglia, F., Airoidi, L., Autrup, H., Dunning, A., Garte, S., Hainaut, P., Malaveille, C., Gormally, E., Matullo, G., Overvad, K., Raaschou-Nielsen, O., Clavel-Chapelon, F., Linseisen, J., Boeing, H., Trichopoulou, A., Trichopoulos, D., et al. (2005). DNA adducts and lung cancer risk: A prospective study. **Cancer research**, 65, 8042-8048.
- Pereira, M. L., Carvalho, J. C., Peres, F., Fernandes, M. H. (2010). Simultaneous effects of nicotine, acrolein, and acetaldehyde on osteogenic-induced bone marrow cells cultured on plasma-sprayed titanium implants. **The International journal of oral & maxillofacial implants**, 25, 112-122.
- Petrova, K. V., Jalluri, R. S., Kozekov, I. D., Rizzo, C. J. (2007). Mechanism of 1,N²-etheno-2'-deoxyguanosine formation from epoxyaldehydes. **Chemical research in toxicology**, 20, 1685-1692.
- Porter, N. A. (1984). Chemistry of lipid peroxidation. **Methods in enzymology**, 105, 273-282.
- Puntarulo, S., Cederbaum, A. I. (1989). Chemiluminescence from acetaldehyde oxidation by xanthine oxidase involves generation of and interactions with hydroxyl radicals. **Alcoholism, clinical and experimental research**, 13, 84-90.
- Quertemont, E., Tambour, S., Tirelli, E. (2005). The role of acetaldehyde in the neurobehavioral effects of ethanol: a comprehensive review of animal studies. **Progress in neurobiology**, 75, 247-274.
- Rajasinghe, H., Jayatilleke, E., Shaw, S. (1990). DNA cleavage during ethanol metabolism: role of superoxide radicals and catalytic iron. **Life Science**, 47, 807-814.

- Rao, D. N., Yang, M. X., Lasker, J. M., Cederbaum, A. I. (1996). 1-Hydroxyethyl radical formation during NADPH- and NADH-dependent oxidation of ethanol by human liver microsomes. **Molecular pharmacology**, 49, 814-821.
- Ravanat, J. L., Douki, T., Duez, P., Gremaud, E., Herbert, K., Hofer, T., Lasserre, L., Saint-Pierre, C., Favier, A., Cadet, J. (2002). Cellular background level of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine: an isotope based method to evaluate artefactual oxidation of DNA during its extraction and subsequent work-up. **Carcinogenesis**, 23, 1911-1918.
- Ravanat, J. L., Martinez, G. R., Medeiros, M. H., Di Mascio, P., Cadet, J. (2004). Mechanistic aspects of the oxidation of DNA constituents mediated by singlet molecular oxygen. **Archives of biochemistry and biophysics**, 423, 23-30.
- Riccioni, G. (2009). Carotenoids and cardiovascular disease. **Current atherosclerosis reports**, 11, 434-439.
- Rich, T., Allen, R. L., Wyllie, A. H. (2000). Defying death after DNA damage. **Nature**, 407, 777-783.
- Robertson, J. D., Orrenius, S., Zhivotovsky, B. (2000). Nuclear events in apoptosis. **Journal of Structural Biology**, 129, 346-358.
- Roderick, H. L., Cook, S. J. (2008). Ca²⁺ signalling checkpoints in cancer: remodelling Ca²⁺ for cancer cell proliferation and survival. **Nature reviews**, 8, 361-375.
- Sako, M., Inagaki, S., Esaka, Y., Deyashiki, Y. (2003). Histones accelerate the cyclic 1,N²-propanoguanine adduct-formation of DNA by the primary metabolite of alcohol and carcinogenic crotonaldehyde. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, 13, 3497-3498.
- Sako, M., Yaekura, I., Deyashiki, Y. (2002). Chemo- and regio-selective modifications of nucleic acids by acetaldehyde and crotonaldehyde. **Nucleic acids research**, 21-22.
- Salvesen, G. S., Dixit, V. M. (1997). Caspases: Intracellular signaling by proteolysis. **Cell**, 91, 443-446.
- Saparbaev, M., Langouet, S., Privezentzev, C. V., Guengerich, F. P., Cai, H., Elder, R. H., Laval, J. (2002). 1,N(2)-ethenoguanine, a mutagenic DNA adduct, is a primary substrate of Escherichia coli mismatch-specific uracil-DNA glycosylase and human alkylpurine-DNA-N-glycosylase. **Journal of Biological Chemistry**, 277, 26987-26993.
- Sato, H., Suzuki, K. T., Sone, H., Yamano, Y., Kagawa, J., Aoki, Y. (2003). DNA-adduct formation in lungs, nasal mucosa, and livers of rats exposed to urban roadside air in Kawasaki City, Japan. **Environmental Research**, 93, 36-44.
- Satoh, Y., Ide, Y., Sugano, T., Koda, K., Momose, Y., Tagami, M. (2008). Hypotensive and hypertensive effects of acetaldehyde on blood pressure in rats. **Nihon Arukoru Yakubutsu Igakkai zasshi = Japanese journal of alcohol studies & drug dependence**, 43, 188-193.
- Schafer, F. Q., Buettner, G. R. (2001). Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. **Free radical biology & medicine**, 30, 1191-1212.
- Schuler, B. D., Eder, E. (2000). Development of a ³²P-postlabelling method for the detection of 1,N²-propanodeoxyguanosine adducts of crotonaldehyde in vivo. **Archives Toxicology**, 74, 404-414.
- Schulze, P. C., Lee, R. T. (2005). Oxidative stress and atherosclerosis. **Current atherosclerosis reports**, 7, 242-248.

- Seet, R. C., Lee, C. Y., Lim, E. C., Tan, J. J., Quek, A. M., Chong, W. L., Looi, W. F., Huang, S. H., Wang, H., Chan, Y. H., Halliwell, B. (2010). Oxidative damage in Parkinson disease: Measurement using accurate biomarkers. **Free radical biology & medicine**, 48, 560-566.
- Shibutani, S., Suzuki, N., Matsumoto, Y., Grollman, A. P. (1996). Miscoding properties of 3,*N*⁴-etheno-2'-deoxycytidine in reactions catalyzed by mammalian DNA polymerases. **Biochemistry**, 35, 14992-14998.
- Shibutani, S., Takeshita, M., Grollman, A. P. (1991). Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxodG. **Nature**, 349, 431-434.
- Shiohara, E., Tsukada, M., Chiba, S., Yamazaki, H., Nishiguchi, K., Miyamoto, R., Nakanishi, S. (1985). Effect of chronic administration of acetaldehyde by inhalation on (Na⁺ + K⁺)-activated adenosine triphosphatase activity of rat brain membranes. **Toxicology**, 34, 277-284.
- Shultz, J., Weiner, H., Westcott, J. (1980). Retardation of ethanol absorption by food in the stomach. **Journal of studies on alcohol**, 41, 861-870.
- Sies, H. (1993). Damage to plasmid DNA by singlet oxygen and its protection. **Mutation Research**, 299, 183-191.
- Sies, H., Krinsky, N. I. (1995). The Present Status of Antioxidant Vitamins and Beta-Carotene. **American Journal of Clinical Nutrition**, 62, S1299-S1300.
- Sigolo, C. A., Di Mascio, P., Kowaltowski, A. J., Garcia, C. C., Medeiros, M. H. (2008). trans,trans-2,4-decadienal induces mitochondrial dysfunction and oxidative stress. **Journal of bioenergetics and biomembranes**, 40, 103-109.
- Singer, B., Antocchia, 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,*N*⁶-ethenoadenine-binding protein and purified human 3-methyladenine-DNA glycosylase act on 1,*N*⁶-ethenoadenine and 3-methyladenine. **Proceedings of the National Academy of Sciences U S A**, 89, 9386-9390.
- Sippel, H. W. (1974). The acetaldehyde content in rat brain during ethanol metabolism. **Journal of neurochemistry**, 23, 451-452.
- Speit, G., Frohler-Keller, M., Schutz, P., Neuss, S. (2008). Low sensitivity of the comet assay to detect acetaldehyde-induced genotoxicity. **Mutation Research**, 657, 93-97.
- Spiteller, G. (2010). Is lipid peroxidation of polyunsaturated acids the only source of free radicals that induce aging and age-related diseases? **Rejuvenation research**, 13, 91-103.
- Stevens, J. F., Maier, C. S. (2008). Acrolein: sources, metabolism, and biomolecular interactions relevant to human health and disease. **Molecular nutrition & food research**, 52, 7-25.
- Sun, X., Karlsson, A., Bartsch, H., Nair, J. (2006). New ultrasensitive 32P-postlabelling method for the analysis of 3,*N*⁴-etheno-2'-deoxycytidine in human urine. **Biomarkers**, 11, 329-340.
- Taghizadeh, K., McFaline, J. L., Pang, B., Sullivan, M., Dong, M., Plummer, E., Dedon, P. C. (2008). Quantification of DNA damage products resulting from deamination, oxidation and reaction with products of lipid peroxidation by liquid chromatography isotope dilution tandem mass spectrometry. **Nature protocols**, 3, 1287-1298.
- Tambour, S., Didone, V., Tirelli, E., Quertemont, E. (2005). Dissociation between the locomotor and anxiolytic effects of acetaldehyde in the elevated plus-maze: evidence that acetaldehyde is not involved in the anxiolytic effects of ethanol in mice. **European Neuropsychopharmacol**, 15, 655-662.

- Tambour, S., Didone, V., Tirelli, E., Quertemont, E. (2006). Locomotor effects of ethanol and acetaldehyde after peripheral and intraventricular injections in Swiss and C57BL/6J mice. **Behavioural brain research**, 172, 145-154.
- Tatum, V. L., Ghangchit, C., Chow, C. K. (1990). Measurement of malonaldehyde by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Lipides**, 25, 226-229.
- Tebbe, B. (2001). Relevance of oral supplementation with antioxidants for prevention and treatment of skin disorders. **Skin pharmacology and applied skin physiology**, 14, 296-302.
- Terashima, I., Matsuda, T., Fang, T. W., Suzuki, N., Kobayashi, J., Kohda, K., Shibutani, S. (2001). Miscoding potential of the *N*²-ethyl-2'-deoxyguanosine DNA adduct by the exonuclease-free Klenow fragment of Escherichia coli DNA polymerase I. **Biochemistry**, 40, 4106-4114.
- Toppo, S., Flohe, L., Ursini, F., Vanin, S., Maiorino, M. (2009). Catalytic mechanisms and specificities of glutathione peroxidases: variations of a basic scheme. **Biochimica et biophysica acta**, 1790, 1486-1500.
- Vaca, C. E., Wilhelm, J., Harms-Ringdahl, M. (1988). Interaction of lipid peroxidation products with DNA. A review. **Mutation Research**, 195, 137-149.
- Velez-Cruz, R., Riggins, J. N., Daniels, J. S., Cai, H., Guengerich, F. P., Marnett, L. J., Osheroff, N. (2005). Exocyclic DNA lesions stimulate DNA cleavage mediated by human topoisomerase II alpha in vitro and in cultured cells. **Biochemistry**, 44, 3972-3981.
- Victor, V. M., Rocha, M., Sola, E., Banuls, C., Garcia-Malpartida, K., Hernandez-Mijares, A. (2009). Oxidative stress, endothelial dysfunction and atherosclerosis. **Current pharmaceutical design**, 15, 2988-3002.
- Visapaa, J. P., Gotte, K., Benesova, M., Li, J., Homann, N., Conradt, C., Inoue, H., Tisch, M., Horrmann, K., Vakevainen, S., Salaspuro, M., Seitz, H. K. (2004). Increased cancer risk in heavy drinkers with the alcohol dehydrogenase 1C*1 allele, possibly due to salivary acetaldehyde. **International journal in gastroenterology**, 53, 871-876.
- Voss, P., Siems, W. (2006). Clinical oxidation parameters of aging. **Free Radical Research**, 40, 1339-1349.
- Wang, M., McIntee, E. J., Cheng, G., Shi, Y., Villalta, P. W., Hecht, S. S. (2000). Identification of DNA adducts of acetaldehyde. **Chemical research in toxicology**, 13, 1149-1157.
- Wang, M., Yu, N., Chen, L., Villalta, P. W., Hochalter, J. B., Hecht, S. S. (2006). Identification of an acetaldehyde adduct in human liver DNA and quantitation as *N*²-ethyldeoxyguanosine. **Chemical research in toxicology**, 19, 319-324.
- Wardman, P. (2007). Fluorescent and luminescent probes for measurement of oxidative and nitrosative species in cells and tissues: progress, pitfalls, and prospects. **Free radical biology & medicine**, 43, 995-1022.
- Warnakulasuriya, S., Parkkila, S., Nagao, T., Preedy, V. R., Pasanen, M., Koivisto, H., Niemela, O. (2008). Demonstration of ethanol-induced protein adducts in oral leukoplakia (pre-cancer) and cancer. **Journal of Oral Pathology and Medicine**, 37, 157-165.
- Weber, L. W., Boll, M., Stampfl, A. (2003). Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: carbon tetrachloride as a toxicological model. **Critical reviews in toxicology**, 33, 105-136.
- Wei, W., Liu, Q., Tan, Y., Liu, L., Li, X., Cai, L. (2009). Oxidative stress, diabetes, and diabetic complications. **Hemoglobin**, 33, 370-377.

- Wilson, D. M., 3rd, McNeill, D. R. (2007). Base excision repair and the central nervous system. **Neuroscience**, 145, 1187-1200.
- Winterbourn, C. C. (2008). Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. **Nature chemical biology**, 4, 278-286.
- Wood, R. D., Mitchell, M., Sgouros, J., Lindahl, T. (2001). Human DNA repair genes. **Science**, 291, 1284-1289.
- Worrall, S., Dejersey, J., Nicholls, R., Wilce, P. (1993). Acetaldehyde-Protein Interactions - Are They Involved in the Pathogenesis of Alcoholic Liver-Disease. **Journal of Digestive Diseases**, 11, 265-277.
- Woutersen, R. A., Appelman, L. M., Feron, V. J., Van der Heijden, C. A. (1984). Inhalation toxicity of acetaldehyde in rats. II. Carcinogenicity study: interim results after 15 months. **Toxicology**, 31, 123-133.
- Woutersen, R. A., Appelman, L. M., Van Garderen-Hoetmer, A., Feron, V. J. (1986). Inhalation toxicity of acetaldehyde in rats. III. Carcinogenicity study. **Toxicology**, 41, 213-231.
- Woutersen, R. A., Feron, V. J. (1987). Inhalation toxicity of acetaldehyde in rats. IV. Progression and regression of nasal lesions after discontinuation of exposure. **Toxicology**, 47, 295-305.
- Wu, G., Fang, Y. Z., Yang, S., Lupton, J. R., Turner, N. D. (2004). Glutathione metabolism and its implications for health. **Journal of Nutrition**, 134, 489-492.
- Wu, L. L., Chiou, C. C., Chang, P. Y., Wu, J. T. (2004). Urinary 8-OHdG: a marker of oxidative stress to DNA and a risk factor for cancer, atherosclerosis and diabetics. **Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry**, 339, 1-9.
- Wu, S. C., Yen, G. C. (2004). Effects of cooking oil fumes on the genotoxicity and oxidative stress in human lung carcinoma (A-549) cells. **Toxicology In Vitro**, 18, 571-580.
- Xi, Z. G., Chao, F. H., Yang, D. F., Sun, Y. M., Li, G. X., Zhang, H. S., Zhang, W., Yang, Y. H., Liu, H. L. (2004). [The effects of DNA damage induced by acetaldehyde]. **Huan jing ke xue= Huanjing kexue / [bian ji, Zhongguo ke xue yuan huan jing ke xue wei yuan hui "Huan jing ke xue" bian ji wei yuan hui**, 25, 102-105.
- Yang, I. Y., Chan, G., Miller, H., Huang, Y., Torres, M. C., Johnson, F., Moriya, M. (2002). Mutagenesis by acrolein-derived propanodeoxyguanosine adducts in human cells. **Biochemistry**, 41, 13826-13832.
- Yang, I. Y., Hossain, M., Miller, H., Khullar, S., Johnson, F., Grollman, A., Moriya, M. (2001). Responses to the major acrolein-derived deoxyguanosine adduct in Escherichia coli. **Journal of Biological Chemistry**, 276, 9071-9076.
- Yeh, S. L., Hu, M. L. (2000). Antioxidant and pro-oxidant effects of lycopene in comparison with beta-carotene on oxidant-induced damage in Hs68 cells. **Journal of Nutritional Biochemistry**, 11, 548-554.
- Yeh, S. L., Hu, M. L. (2001). Induction of oxidative DNA damage in human foreskin fibroblast Hs68 cells by oxidized beta-carotene and lycopene. **Free Radical Research**, 35, 203-213.
- Yokoyama, A., Tsutsumi, E., Imazeki, H., Suwa, Y., Nakamura, C., Mizukami, T., Yokoyama, T. (2008). Salivary Acetaldehyde Concentration According to Alcoholic Beverage Consumed and Aldehyde Dehydrogenase-2 Genotype. **Alcoholism, clinical and experimental research**, 32, 1607-1614.

- Zadak, Z., Hyspler, R., Ticha, A., Hronek, M., Fikrova, P., Rathouska, J., Hrnčiarikova, D., Stetina, R. (2009). Antioxidants and vitamins in clinical conditions. ***Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca***, 58 Suppl 1, S13-17.
- Zhang, H., Beckman, J. W., Guengerich, F. P. (2009). Frameshift deletion by *Sulfolobus solfataricus* P2 DNA polymerase Dpo4 T239W is selective for purines and involves normal conformational change followed by slow phosphodiester bond formation. ***Journal of Biological Chemistry***, 284, 35144-35153.
- Zhang, Q. H., Sheng, H. P., Loh, T. T. (2001). bcl-2 protects HL-60 cells from apoptosis by stabilizing their intracellular calcium pools. ***Life Sciences***, 68, 2873-2883.
- Zhang, S., Villalta, P. W., Wang, M., Hecht, S. S. (2006). Analysis of crotonaldehyde- and acetaldehyde-derived 1,*N*²-propanodeoxyguanosine adducts in DNA from human tissues using liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry. ***Chemical research in toxicology***, 19, 1386-1392.
- Zhang, S., Villalta, P. W., Wang, M. Y., Hecht, S. S. (2006). Analysis of crotonaldehyde- and acetaldehyde-derived 1,*N*²-propanodeoxyguanosine adducts in DNA from human tissues using liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry. ***Chemical research in toxicology***, 19, 1386-1392.
- Zielonka, J., Kalyanaraman, B. (2008). "ROS-generating mitochondrial DNA mutations can regulate tumor cell metastasis"--a critical commentary. ***Free radical biology & medicine***, 45, 1217-1219.
- Zimatkin, S. M. (1991). Histochemical study of aldehyde dehydrogenase in the rat CNS. ***Journal of neurochemistry***, 56, 1-11.
- Zou, H., Li, Y. C., Liu, H. S., Wang, X. D. (1999). An APAF-1 center dot cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. ***J Biol Chem***, 274, 11549-11556.

SÚMULA CURRICULAR

DADOS PESSOAIS

Camila Carrião Machado Garcia

Mogi das Cruzes, 07 de março de 1981

FORMAÇÃO ACADÊMICA

- 2004** Doutorado em Ciências/Bioquímica
 Instituto de Química da Universidade de São Paulo.
 Orientador: Marisa Helena Gennari de Medeiros.
 Bolsa: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo.
- 2001 - 2004** Graduação em Química
 Instituto de Química da Universidade de São Paulo, Brasil.
- 1998 – 2000** Ensino Médio – Colégio Objetivo, Mogi das Cruzes- SP

FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

- Principles of Fluorescence Techniques. (Carga horária: 32h). Department of Physics. University of Genova, Genova, 2008.
- Biomarcadores de processos oxidativos. (Carga horária: 6h). Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, Salvador, 2007.
- Free Radical School. (Carga horária: 5h). Society for Free Radicals in Biology and Medicine, Montevideo, 2007.
- Sunrise Free Radical School. (Carga horária: 5h). South American Group of the Society for Free Radical Biology and Medicine, Águas de Lindóia, 2005.
- New Paradigms in the Genetic Toxicology. (Carga horária: 8h). Sociedade Brasileira de Toxicologia, Mangaratiba, 2005.
- Eletroforese Capilar. (Carga horária: 8h). Instituto de Química da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

ATIVIDADES ACADÊMICAS

- 2004** Instituto de Química da Universidade de São Paulo, Brasil
- Estudante de Doutorado
- Projeto: Quantificação de danos em DNA induzidos por acetaldeído. Potencial biomarcador de poluição ambiental.
- 2001-2004** Instituto de Química da Universidade de São Paulo, Brasil
- Iniciação Científica
- Projeto – Danos em DNA induzidos por Ferro

PUBLICAÇÕES

Artigos em Revistas Internacionais

1. Garcia, Camila C.M.; Freitas, Florencio P.; Di Mascio, Paolo; Medeiros, Marisa H.G. Ultra-sensitive simultaneous quantification of 8-oxo-7,8-dihidro-2'-deoxyguanosine, 1,*N*²-etheno-2'-deoxyguanosine and 1,*N*²-propano-2'-deoxyguanosine in human urine by an on-line liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry assay. *Em preparação*.
2. Garcia, Camila C.M.; Angeli, Jose P.F.; Di Mascio, Paolo; Medeiros, Marisa H.G. Lycopene decrease biomolecules damage in cells treated with acetaldehyde. *Em preparação*.
3. Garcia, Camila C.M.; Freitas, Florencio P.; Gomes, Osmar, F.; Sanchez, Angelica; Di Mascio, Paolo; Medeiros, Marisa H.G. Effects of acetaldehyde in rats. *Em preparação*.
4. Garcia, Camila C.M.; Freitas, Florencio P.; Di Mascio, Paolo; Medeiros, Marisa H.G. Ultra-sensitive simultaneous quantification of 1,*N*²-etheno-2'-deoxyguanosine and 1,*N*²-propano-2'-deoxyguanosine in DNA by an on-line liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry assay. *Aceito para publicação – Chemical Research in Toxicology*.
5. Barbosa, Livea F.; Cerqueira, Fernanda M.; Macedo, Antero F.A.; Garcia, Camila C.M.; Angeli, José Pedro F.; Schumacher, Robert I.; Sogayar, Mari Cleide; Augusto, Ohara ; Carri, Maria Teresa; Di Mascio, Paolo; Medeiros, Marisa H.G.. *Biochemica et Biophysica Acta. Molecular Basis of Disease*, v. 1802, p. 462-471, 2010.

6. Fujita, Livea F.; Garcia, Camila C.M. ; Di Mascio, Paolo ; Medeiros, Marisa H.G. . *Dalton Transactions* p. 1450-1459, 2009.
7. Sigolo, Carlos A. O. ; Di Mascio, Paolo ; Kowaltowski, Alicia J. ; Garcia, Camila C. M.; Medeiros, Marisa H. G. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, v. 40, p. 103-109, 2008.
8. Alves, Eduardo A. ; Bainy, Celso D., Loureiro, Ana Paula M., A Martinez, Glaucia R.; Miyamoto, Sayuri ; Onuki, Janice ; Barbosa, Livea F. ; Garcia, Camila C.M. ; Prado, Fernanda M. Ronsein, Garaziela E.; Medeiros, Marisa H.G.; Di Mascio, Paolo. *Comparative Biochemistry and Physiology. A, Molecular & Integrative Physiology*, v. 146, p. 588-600, 2007.
9. Paixao, Tiago R.L.C.; Garcia, Camila C.M. ; Medeiros, Marisa H.G. ; Bertotti, Mauro. *Analytical Chemistry (Washington)*, v. 79, p. 5392-5398, 2007.
10. Marques, Sabrina A.; Loureiro, Ana Paula M. ; GOMES, Osmar. F.; Garcia, Camila C. M ; Di Mascio, Paolo ; Medeiros, Marisa H. G. *FEBS Letters*, v. 560, p. 125-130, 2004.
11. Martinez, Glaucia R.; Loureiro, Ana Paula M. ; Marques, Sabrina A. ; Miyamoto, Sayuri ; Yamaguchi, Lydia F. ; Onuki, Janice ; Almeida, Eduardo A. ; Garcia, Camila C. M. ; Barbosa, Livea F ; Medeiros, Marisa H. G. ; Di Mascio, Paolo. *Mutation Research. Reviews in Mutation Research*, v. 544, p. 115-127, 2003.
12. Loureiro, Ana Paula M. ; Marques. Sabrina A. ; Garcia, Camila. C. M. ; DI Mascio, Paolo. ; Medeiros, Marisa H. G. *Chemical Research in Toxicology*, USA, v. 15, n. 10, p. 1302-1308, 2002.

Capítulos de Livros

1. Garcia, Camila C.M. Angeli, Jose P.F., Almeida, Eduardo A.; Medeiros, Marisa M.H.; Di Mascio, Paolo. Evaluation of DNA adducts formed by lipid peroxidation by-products. *Oxidative Stress in Aquatic Ecosystems*. ed: Wiley-Blackwell Publishing Oxford, England, in press

Resumos em Congressos (últimos 3 anos)

1. Garcia, Camila C.M.; Freitas, Florencio P.; Gomes; Di Mascio, Paolo; Medeiros, Marisa H.G.. Ultra-sensitive simultaneous determination of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine,

1,*N*²-etheno-2'-deoxyguanosine and 1,*N*²-propano-2'-deoxyguanosine in human urine. *SFRBM's 16th Annual Meeting*. San Francisco, CA. 2009

2. Garcia, Camila C.M.;Freitas, Florencio P.; Gomes; Di Mascio, Paolo; Medeiros, Marisa H.G.. Detection and Quantification of Basal Levels of 1,*N*²-Etheno-2'-Deoxyguanosine and 1,*N*²-Propano-2'-Deoxyguanosine in Live Cells and Tissue Using a Newly Developed On-Line Liquid Chromatography-Electrospray Tandem Mass Spectrometry Assay. Writing. *VI Meeting of SFRBM- South American Group*. Santiago, Chile. 2009
3. Garcia, Camila C.M.;Freitas, Florencio P.; Gomes; Di Mascio, Paolo; Medeiros, Marisa H.G. Acetaldehyde increase biomolecule damage in rats.XXXVIII Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology. Águas de Lindóia, Brasil. 2009
4. Garcia, Camila C.M.;Freitas, Florencio P.; Gomes; Di Mascio, Paolo; Medeiros, Marisa H.G.. Effects of acetaldehyde in rats. XXXVII Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology and XI Congress of the Pan American Association for Biochemistry and Molecular Biology. Agues de Lindóia, Brasil. 2008
5. Garcia, Camila C.M.; Gomes; Di Mascio, Paolo; Medeiros, Marisa H.G.. Lycopene Inhibits biomolecule damage and apoptosis in IMR-90 cells treated with acetaldehyde. V Meeting of SFRBM- South American Group and V International Conference on Peroxynitrite and Reactive Nitrogen Species Montevideo, Uruguay. 2007
6. Garcia, Camila C.M.; Paolo; Medeiros, Marisa H.G.. Lycopene Protect Against DNA Damage in Mammalian Cells Exposed to Acetaldehyde. XXXVI Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology and 10th International Union of Biochemistry and Molecular Biology. Salvador, Brazil. 2007
7. Garcia, Camila C.M.; Di Mascio, Paolo; Medeiros, Marisa H.G. Quantification of lipid peroxidation and DNA damage in rats treated with acetaldehyde. VIII Congresso Brasileiro de Mutagênese Carcinogênese e Teratogênese Ambiental. Mangaratiba, Brasil. 2007.