

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

CARACTERIZAÇÃO E DETECÇÃO DE ADUTOS ENTRE
2'-DESOXIGUANOSINA E *TRANS,TRANS*-2,4-DECADIENAL

ANA PAULA DE MELO LOUREIRO

Tese de Doutorado apresentada ao
Departamento de Bioquímica

Profa. Dra. MARISA HELENA GENNARI DE MEDEIROS

Orientadora


São Paulo
2000

**“Caracterização e Detecção de Adutos
Entre 2´-Desoxiguanosina e
Trans,Trans-2,4-Decadienal”**

ANA PAULA DE MELO LOUREIRO

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

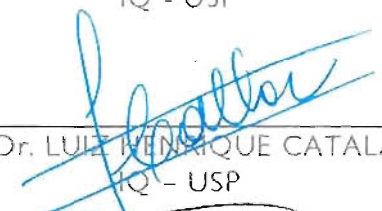
Aprovada por:



Prof. Dra. MARISA HELENA GENNARI DE MEDEIROS
IQ - USP
(Orientadora e Presidente)



Prof. Dra. IOLANDA MIDEÁ CUCCOVIA
IQ - USP



Prof. Dr. LUIZ HENRIQUE CATALANI
IQ - USP



Prof. Dra. DULCINEIA SAES PARRA ABDALLA
FCF - USP



Prof. Dra. ELIZABETH ANGÉLICA LEMES MARTINS
IB

SÃO PAULO
21 DE DEZEMBRO DE 2000.

*“Quero saber o Saber que liberta...
Quero amar o Amor redenção, doação, amplificação...
Quero servir o Serviço sem apego, sem retribuição...
Quero doar o Serviço de quem sabe Amar e ama o Saber...
Quero aprender o Saber, o Amor, o Servir que o mundo
precisa aprender para não se destruir.”*

José Hermógenes

*A Deus que nos proporciona a Vida, fonte
inesgotável de trabalho.*

*Aos meus pais, minha família e meus amigos, os quais
fazem a Vida valer a pena.*

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Marisa Helena Gennari de Medeiros pela orientação científica, paciência, incentivo, confiança e amizade ao longo de todos esses anos. Obrigada pelo apoio em todos os momentos difíceis.

Ao Prof. Dr. Paolo Di Mascio por me permitir utilizar sem restrições o seu laboratório, pela colaboração científica, confiança, incentivo e amizade constantes.

Ao Prof. Dr. Rogério Meneghini e à Dra. Clélia Bertoncini pela doação das células e ajuda imprescindível no início deste trabalho.

Ao Osmar F. Gomes, técnico do nosso laboratório, pela importante ajuda na realização dos experimentos, por estar sempre pronto para atender aos meus pedidos de resolução de problemas, pela paciência e grande amizade ao longo desses anos.

À Miriam Uemi da Central Analítica do I.Q. pela grande atenção na aquisição dos espectros de RMN.

À Michele Susin, ex-estagiária do nosso laboratório que, com a sua grande disposição, me ajudou na realização dos experimentos para investigação de fragmentação do DNA das células.

Aos estudantes de iniciação científica Leonardo Bellot e Maysa Yumico, que estão colaborando significativamente para os estudos de detecção dos adutos *in vivo*.

À Christiane Cardoso, técnica do laboratório do Paolo, pela atenção no atendimento aos meus pedidos de reagentes e outros materiais do seu laboratório.

A todos os funcionários do I.Q., sem os quais o instituto não funcionaria adequadamente. Agradeço especialmente ao Francisco e ao Jailton pelo constante cuidado nas cópias xerográficas; ao pessoal da seção de pós-graduação pela atenção aos meus pedidos de informação; aos funcionários da seção de atividades auxiliares pela atenção às minhas solicitações de equipamentos para as apresentações de seminários; aos funcionários da secretaria da Bioquímica e da Biblioteca; e aos porteiros do instituto pela importante vigilância.

À Profa. Dra. Maria Tereza Macchini pela amizade e pela oportunidade de participar como monitora do curso de Bioquímica Experimental da Farmácia.

A todos os professores e alunos que participam do grupo de estudos de Radicais Livres, pelo apoio e discussões produtivas.

Aos professores do Colégio Sagrado Coração de Jesus, do Instituto de Biociências e do Instituto de Química da USP que muito contribuíram para a minha formação.

A todos os meus colegas e amigos dos laboratórios da Marisa e do Paolo: Bellot, Christiane, Clécio, Eduardo, Flávio, Gláucia, Humberto, Janice, Lydia, Maysa, Marcelo, Osmar, Patrícia, Priscila, Sabrina, Tedra e Valdemir. Obrigada pela presença alegre de todos, pela compreensão nos momentos em que estive muito atarefada e não pude dar a vocês a atenção adequada e pelo constante apoio e incentivo que recebo de cada um.

À Tedra Mendonça que com a sua alegre e importante amizade me ajudou a conhecer pessoas e situações novas.

À Sabrina Marques pela importante amizade e constante disponibilidade para ajudar na resolução de problemas.

Ao Humberto R. Matos pela convivência alegre.

Ao Valdemir Carvalho que com o seu senso crítico me ajudou a ser mais exigente e cuidadosa com o meu trabalho.

A todos os colegas e amigos do I.Q. e da aula de dança realizada no instituto que de alguma forma contribuíram para a minha formação científica e para tornar a minha vida mais feliz.

Às amigas de vários anos Liz Watanabe e Erika Saito que acompanharam de perto a minha trajetória desde a graduação. Obrigada pelos ótimos conselhos e pela valiosa amizade. Meu agradecimento se estende à Cláudia Saito, que se juntou a nós nos últimos dois anos e se tornou uma grande amiga.

À Janice Onuki que com a sua valiosa amizade contribui muito para tornar a minha vida mais leve. Obrigada pelo apoio especial nos momentos críticos, incluindo o término desta tese.

À Regina Maki Sasahara pela amizade e sempre grande receptividade e equilíbrio.

Ao amigo Joaquim Nobre pela compreensão e carinho durante a fase da minha vida que incluiu a realização deste trabalho.

A todas as pessoas da minha família (avôs, avós, tios, tias, primos, primas, padrinho e madrinha) pela preocupação e carinho.

Aos meus pais Fernando e Izaumar que me proporcionaram a vida maravilhosa que sempre tive. À minha irmã Márcia, minha mais antiga amiga.

A DEUS, pois sem Ele nada existiria.

MUITO OBRIGADA A TODOS !!!!!

APOIO FINANCEIRO

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

CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

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

PRONEX/FINEP – Programa de Apoio aos Núcleos de Excelência

PADCT – Programa de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico

Pró - Reitoria de Pesquisa – Universidade de São Paulo

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

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS, TABELAS E ESQUEMAS	i
ABREVIACÕES	x
RESUMO	xiii
ABSTRACT.....	xv
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Espécies Reativas de Oxigênio: presença natural nos organismos aeróbicos ...	2
1.1.1. Destinos do O ₂ nos organismos aeróbicos.....	2
1.1.2. Causas da toxicidade do O ₂ : radicais livres e outras espécies reativas...	6
1.1.3. Algumas considerações químicas sobre as espécies reativas de oxigênio.....	7
1.1.4. Fontes intracelulares das espécies reativas de oxigênio	15
1.2. Estresse Oxidativo e Carcinogênese.....	19
1.2.1. O ciclo celular.....	19
1.2.2. Carcinogênese.....	22
1.2.3. Danos em DNA induzidos por carcinógenos ocupacionais e ambientais	23
1.2.4. Danos basais em DNA: I. Oxidação	26
1.2.5. Peroxidação lipídica e danos em DNA.....	30
1.2.5.1. Danos basais em DNA: II. Reação com malonaldeído	39
1.2.5.2. Danos basais em DNA: III. Propanoadutos	45
1.2.5.3. Danos basais em DNA: IV. Etenoadutos	49
1.2.5.4. Estudos realizados com <i>trans,trans</i> -2,4-decadial (DDE)	56
2. OBJETIVOS.....	60
3. MATERIAIS E MÉTODOS	61
3.1. Reagentes	61
3.2. Equipamentos.....	61

3.3.	Danos celulares induzidos por DDE.....	62
3.3.1.	Cultivo das células	62
3.3.2.	Tratamento das células com DDE	63
3.3.2.1.	Incubações para extração do DNA e medidas de fluorescência.....	63
3.3.2.2.	Incubações para medidas de viabilidade celular	64
3.3.2.3.	Incubações para dosagem de sulfidrilas não proteicas (NPSH)	65
3.3.2.4.	Incubações para medidas de fragmentação do DNA	66
3.3.2.5.	Incubações para análise da formação de adutos em DNA ...	66
3.3.3.	Viabilidade celular	67
3.3.3.1.	Determinação da viabilidade celular pelo método de coloração com azul de tripan.....	67
3.3.3.2.	Determinação da viabilidade celular pelo ensaio do brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT).....	68
3.3.4.	Dosagem de sulfidrilas não proteicas (NPSH)	69
3.3.5.	Dosagem de proteínas – método de Bradford.....	70
3.3.6.	Medida de fragmentação do DNA	71
3.3.7.	Extração do DNA.....	72
3.3.8.	Hidrólise do DNA	73
3.3.9.	Análise da presença de diferentes produtos em DNA de células incubadas com DDE por HPLC-UV/fluorescência e HPLC-EC.....	73
3.3.10.	Tratamento estatístico dos dados	74
3.4.	Análise da formação de adutos entre 2'-desoxiguanosina e DDE <i>in vitro</i>	75
3.4.1.	Condições para separação e purificação dos diferentes produtos por HPLC	75
3.4.2.	Síntese do padrão 1,N ² -eteno-2'-desoxiguanosina	76
3.4.3.	Determinação da concentração de peróxidos no THF	77
3.4.4.	Reação de 2'-desoxiguanosina com DDE na presença de peróxidos: síntese e purificação dos adutos.....	77
3.4.5.	Pré-purificação de amostras através de tubos de fase sólida <i>Supelclean LC-18</i>	78

3.4.6.	Caracterização química dos adutos.....	79
3.4.6.1.	Espectros de absorvância (UV).....	79
3.4.6.2.	Espectros de ressonância magnética nuclear (RMN).....	79
3.4.6.3.	Espectros de massas (ESI/MS).....	80
3.4.7.	Determinação dos coeficientes de extinção molar (ϵ) dos adutos.....	80
3.4.8.	Reação de DNA de timo de bezerro com DDE na presença de peróxidos.....	81
3.4.9.	Reação de 2'-desoxiguanosina com DDE sem adição de peróxidos....	82
3.5.	Padronização de metodologias para detecção dos adutos em sistemas biológicos.....	83
3.5.1.	Detecção eletroquímica.....	83
3.5.1.1.	Hidrólise ácida de 1,N ² -eteno-2'-desoxiguanosina.....	83
3.5.1.2.	Detecção de 1,N ² -eteno-2'-desoxiguanosina e 1,N ² -etenoguanina.....	84
3.5.1.3.	Eletrovoltamograma de 1,N ² -etenoguanina.....	84
3.5.1.4.	Hidrólise ácida do DNA.....	84
3.5.2.	Detecção por LC/ESI/MS-MS.....	85
3.5.2.1.	Organização do sistema.....	85
3.5.2.2.	Detecção no espectrômetro de massas.....	85
3.5.2.3.	Síntese dos padrões internos [¹⁵ N ₅]-1,N ² -eteno-2'-desoxiguanosina e [¹⁵ N ₅]A2.....	86
3.5.2.4.	Quantificação dos adutos A1 e A2 em DNA.....	86
4.	RESULTADOS.....	88
4.1.	Danos celulares induzidos por DDE.....	88
4.1.1.	Alteração do formato das células CV1-P após incubação com DDE... 88	88
4.1.2.	Medidas da viabilidade celular pelo método de coloração com azul de tripan e pelo ensaio do MTT.....	90
4.1.3.	Alteração do nível de sulfidrilas não proteicas (NPSH).....	92
4.1.4.	Análise da fragmentação do DNA.....	101
4.1.5.	Análise da presença de produtos fluorescentes no DNA das células .	104

4.1.6.	Análise da presença de diferentes produtos em DNA de células incubadas com DDE por HPLC-UV/fluorescência e HPLC-EC.....	107
4.1.6.1.	Síntese e caracterização química do aduto 1,N ² -eteno-2'-desoxiguanosina	113
4.1.6.2.	Uso do padrão 1,N ² -eteno-2'-desoxiguanosina para análise preliminar da sua presença em DNA de células incubadas com DDE	119
4.2.	Formação e caracterização química de adutos 1,N ² -eteno-2'-desoxiguanosina a partir da reação de DDE com 2'-desoxiguanosina <i>in vitro</i>	121
4.2.1.	Condições de incubação e detecção dos produtos formados	121
4.2.2.	Caracterização química do aduto A1	125
4.2.3.	Caracterização química dos adutos A2-1 e A2-2	128
4.3.	Padronização de metodologias sensíveis para detecção da formação dos adutos 1,N ² -eteno-2'-desoxiguanosina em sistemas biológicos	148
4.3.1.	Detecção eletroquímica.....	148
4.3.2.	Detecção por LC/ESI/MS-MS	156
4.3.2.1.	Detecção e quantificação dos adutos A1 e A2 em DNA de timo de bezerro incubado com DDE na presença de peróxidos <i>in vitro</i>	161
4.3.2.2.	Detecção e quantificação dos adutos A1 e A2 em DNA de células	165
5.	DISCUSSÃO.....	169
5.1.	Ocorrência do <i>trans,trans</i> -2,4-decadienal e estudos de citotoxicidade	169
5.2.	Danos em DNA induzidos por <i>trans,trans</i> -2,4-decadienal	182
6.	CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS	192
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	194

ÍNDICE DE FIGURAS, TABELAS E ESQUEMAS

Figura 1.1: Mecanismo para hidroxilação de substratos por citocromo P450 no retículo endoplasmático de fígado.	5
Figura 1.2: Distribuição eletrônica na molécula de oxigênio e em algumas espécies reativas.	8
Figura 1.3: Redução monoeletrônica do O ₂ dissolvido em água. Os valores em milivolts (mV) são os potenciais de óxido-redução em pH 7 e concentrações molares, exceto H ₂ O, que é água líquida pura.	10
Figura 1.4: Algumas bases oxidadas encontradas em DNA.	27
Figura 1.5: Estruturas de alguns ácidos graxos poliinsaturados presentes nas membranas biológicas.	31
Figura 1.6: Representação geral das fases da peroxidação lipídica.	32
Figura 1.7: Mecanismo proposto para formação de hidroperóxidos lipídicos e peróxidos cíclicos a partir do ácido araquidônico.	33
Figura 1.8: Mecanismos propostos para formação de alguns produtos secundários da peroxidação lipídica.	36
Figura 1.9: Mecanismo proposto para formação de aldeídos α,β -insaturados a partir da oxidação de aminoácidos.	39
Figura 1.10: Reação do MDA com bases do DNA.	40
Figura 1.11: Exemplo de base-propenal e sua reação com bases do DNA.	41
Figura 1.12: Abertura do anel de M ₁ dG em DNA dupla-fita.	44
Figura 1.13: Estrutura do aduto formado pela reação entre 2'-desoxiadenosina e o produto de condensação de malonaldeído com acetaldeído.	45
Figura 1.14: Mecanismo proposto para a formação de 1,N ² -propano-2'-desoxiguanosina.	47
Figura 1.15: Estruturas dos etenoadutos detectados <i>in vivo</i>	51
Figura 1.16: Mecanismo para formação de etenoadutos a partir de haletos de vinila.	52
Figura 4.1: A) Células CV1-P controle (aumento = 50 x); B) Células CV1-P incubadas com DDE na concentração de 65 μ M por 5 horas (aumento = 50 x). O tratamento das células foi feito como descrito no item 3.3.2.5.c de <i>Materiais e Métodos</i>	89

Figura 4.2: Medidas da sobrevivência relativa de células CV1-P incubadas com: **A)** DDE 65 μM por diferentes períodos de tempo (método de exclusão por coloração com azul de tripan); **B)** DDE 65 μM e etanol 0,13% (v/v) por diferentes períodos de tempo (ensaio do MTT; N = 3); **C)** diferentes concentrações de DDE por 5 horas (ensaio do MTT; N = 3), teste t: *p = 0,00015 em relação ao controle (meio + soro). Concentração de etanol nas incubações: 0,13% (v/v). Os tratamentos das células e as medidas de viabilidade foram feitos como descrito nos itens 3.3.2.2, 3.3.3.1 e 3.3.3.2 de *Materiais e Métodos*.91-92

Figura 4.3: Determinação da concentração de sulfidrilas não-proteicas (NPSH) (pmoles NPSH/ μg proteína) em células CV1-P.

A) Apresentação gráfica dos dados da **tabela 4.1**. [Etanol] = 0,19% (v/v); [DDE] = 65 μM ;

B) Apresentação gráfica dos dados da **tabela 4.2**. [Etanol] = 0,19% (v/v); [DDE] = 65 μM ;

C) Apresentação gráfica dos dados da **tabela 4.3**. [Etanol] = 0,19% (v/v); [DDE] = 100 μM .

O tratamento das células e dosagem de NPSH foram feitos como descrito nos itens 3.3.2.3a,b,c e 3.3.4 de *Materiais e Métodos*. * p<0,05 quando comparado com o controle.. 95

Figura 4.4: Apresentação gráfica dos dados da **tabela 4.4**. Determinação da concentração de sulfidrilas não-proteicas (NPSH) (pmoles NPSH/ μg proteína) em células CV1-P não submetidas a qualquer tratamento (controle) e incubadas com BSO em diferentes concentrações durante 3 horas em meio de cultura sem soro. A dosagem de NPSH foi feita como descrito no item 3.3.4 de *Materiais e Métodos*. * p<0,05 quando comparado com BSO 300 μM 97

Figura 4.5: Efeito da depleção de GSH na sobrevivência relativa das células CV1-P incubadas com 65 μM de DDE. Concentração de etanol nas incubações: 0,13% (v/v). Os tratamentos das células e as medidas de viabilidade foram feitos como descrito nos itens 3.3.2.2b,c e 3.3.3.2 de *Materiais e Métodos*. 98

Figura 4.6: **A)** Células CV1-P incubadas com 300 μM de BSO durante 3 horas (aumento = 50 x);

B) Células CV1-P incubadas com 65 μM de DDE por 5 horas após a incubação com BSO (aumento = 50 x). 100

Figura 4.7: Apresentação gráfica dos dados da **tabela 4.5**. Determinação da porcentagem de quebras de fita simples + sítios AP em DNA de células CV1-P não submetidas a qualquer tratamento (controle), incubadas com 0,5% de etanol (v/v) e com diferentes concentrações de DDE durante 3 horas. O tratamento das células e as medidas de fragmentação do DNA foram feitos como descrito nos itens 3.3.2.4a e 3.3.6 de *Materiais e Métodos*. * p<0,05 quando comparado com o controle. 102

Figura 4.8: Apresentação gráfica dos dados da **tabela 4.6**. Determinação da porcentagem de quebras de fita simples + sítios AP em DNA de células CV1-P não submetidas a qualquer tratamento (controle), incubadas com 0,5% de etanol (v/v) e com 100 μM de DDE por diferentes períodos de tempo. O tratamento das células e as medidas de fragmentação do DNA foram feitos como descrito nos itens **3.3.2.4b** e **3.3.6** de *Materiais e Métodos*. * $p < 0,05$ quando comparado com o controle e o respectivo controle com etanol. 104

Figura 4.9: Espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{\text{exc.}} = 335 \text{ nm}$) do DNA extraído das células CV1-P. **A)** As células foram incubadas com 70 μM de DDE por 50 min, o meio de cultura foi trocado e as células incubadas por mais 3 h, 6 h e 8 h antes de ser extraído o DNA; **B)** As células foram incubadas com 50 μM de DDE por 1h 45min, o meio de cultura foi trocado e as células incubadas por mais 2 h, 6 h e 22 h antes de ser extraído o DNA. Concentração de etanol nas incubações: $\approx 0,2\%$ (v/v). A concentração de DNA em todas as amostras foi ajustada para 5 $\mu\text{g/mL}$ antes de serem feitas as medidas de fluorescência. Os tratamentos das células e a extração do DNA foram feitos como descrito nos itens **3.3.2.1** e **3.3.7** de *Materiais e Métodos*. 106

Figura 4.10: Cromatogramas obtidos com detecção por fluorescência ($\lambda_{\text{exc.}} = 300 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em.}} = 420 \text{ nm}$) do DNA extraído das células CV1-P não submetidas a qualquer tratamento (controle) e incubadas com 65 μM de DDE. A massa de DNA em cada análise, calculada como descrito no item **3.3.9** de *Materiais e Métodos*, está indicada. O tratamento das células, extração e hidrólise do DNA foram feitos como descrito nos itens **3.3.2.5b**, **3.3.7** e **3.3.8** de *Materiais e Métodos*. A condição de análise por HPLC está descrita no item **3.3.9** (**sistema 3.3.9.A** e **condição 3.3.9.1**) de *Materiais e Métodos*. UA: unidades arbitrárias. 108

Figura 4.11: Cromatogramas obtidos com detecção por absorvância ($\lambda = 225 \text{ nm}$) e fluorescência ($\lambda_{\text{exc.}} = 300 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em.}} = 420 \text{ nm}$) do DNA extraído das células CV1-P incubadas com etanol (0,2% v/v) (controle) e com DDE (65 μM , 5 horas). A massa de DNA em cada análise, calculada como descrito no item **3.3.9** de *Materiais e Métodos*, está indicada. O tratamento das células, extração e hidrólise do DNA foram feitos como descrito nos itens **3.3.2.5c**, **3.3.7** e **3.3.8** de *Materiais e Métodos*. A condição de análise por HPLC está descrita no item **3.3.9** (**sistema 3.3.9.A** e **condição 3.3.9.2**) de *Materiais e Métodos*. UA: unidades arbitrárias. 109

Figura 4.12: Cromatogramas obtidos com detecção eletroquímica (potencial = +600 mV) do DNA extraído das células CV1-P não submetidas a qualquer tratamento (controle) e incubadas com 65 μM de DDE. A massa de DNA em cada análise, calculada como descrito no item **3.3.9** de *Materiais e Métodos*, está indicada. O tratamento das células, extração e hidrólise do DNA foram feitos como descrito nos itens **3.3.2.5b**, **3.3.7** e **3.3.8** de *Materiais e Métodos*. A condição de análise por HPLC está descrita no item **3.3.9** (**sistema 3.3.9.B** e **condição 3.3.9.3**) de *Materiais e Métodos*. UA: unidades arbitrárias. . 111

- Figura 4.13:** Cromatogramas e espectros de absorvância dos produtos A e B (figura 4.12) purificados do DNA das células CV1-P incubadas com DDE. Esses espectros foram obtidos em um detector com fotodiodos acoplado ao HPLC (sistema 3.3.9.A). A condição de análise por HPLC está descrita no item 3.3.9.3 de *Materiais e Métodos*. Para comparação, foram apresentados os espectros de 2'-desoxiguanosina e aduto 1,N²-etenodG. O espectro deste último foi obtido em espectrofotômetro. UA: unidades arbitrárias. 112
- Figura 4.14:** Cromatogramas obtidos com detecção por absorvância ($\lambda = 254$ nm) e fluorescência ($\lambda_{exc.} = 300$ nm; $\lambda_{em.} = 420$ nm) do resultado da incubação de 2'-desoxiguanosina com cloroacetaldeído e respectivo controle. A massa de 2'-desoxiguanosina em cada análise está indicada. As condições de incubação e análise por HPLC estão descritas, respectivamente, nos itens 3.4.2 e 3.4.1.1 de *Materiais e Métodos*. UA: unidades arbitrárias. 114
- Figura 4.15:** Espectros de absorvância do produto α em diferentes pHs (item 3.4.6.1 de *Materiais e Métodos*): pH 1, 50 mM HCl/KCl; pH 7, tampão fosfato 50 mM; pH 11, tampão carbonato-bicarbonato 50 mM. UA: unidades arbitrárias..... 114
- Figura 4.16:** Espectro de ¹H RMN do produto α obtido em um equipamento de 500 MHz em DMSO-*d*₆, como descrito no item 3.4.6.2 de *Materiais e Métodos*..... 116
- Figura 4.17:** Espectro de massas (ESI/MS) do produto α . Voltagem do cone: 25 V. As condições estão descritas no item 3.4.6.3 de *Materiais e Métodos*. 118
- Figura 4.18:** Cromatogramas obtidos com detecção por absorvância ($\lambda = 225$ nm) do DNA extraído das células CV1-P incubadas com DDE (65 μ M, 5 horas). Os cromatogramas foram feitos sem adição e com adição (*spiking*) de 1,N²-etenodG à amostra de DNA. A massa de DNA, calculada como descrito no item 3.3.9 de *Materiais e Métodos*, está indicada. O tratamento das células, extração e hidrólise do DNA foram feitos como descrito nos itens 3.3.2.5c, 3.3.7 e 3.3.8 de *Materiais e Métodos*. A condição de análise por HPLC está descrita no item 3.3.9 (sistema 3.3.9.A e condição 3.3.9.2) de *Materiais e Métodos*. 120
- Figura 4.19:** Cromatogramas obtidos com detecção por absorvância ($\lambda = 225$ nm). A) Resultado da reação de dGuo com DDE na presença de peróxidos; B) Controle. As condições de incubação e análise por HPLC estão descritas, respectivamente, nos itens 3.4.4.3 e 3.4.1.3 de *Materiais e Métodos*. 123
- Figura 4.20:** Cromatogramas obtidos com detecção por absorvância ($\lambda = 280$ nm) do aduto A2 pré-purificado. Foi utilizada a condição de HPLC 3.4.1.7 descrita em *Materiais e Métodos*. 124
- Figura 4.21:** Espectros de absorvância do aduto A1 em diferentes pHs (item 3.4.6.1 de *Materiais e Métodos*): pH 1, 50 mM HCl/KCl; pH 7, tampão fosfato 50 mM; pH 11, tampão carbonato-bicarbonato 50 mM. UA: unidades arbitrárias..... 125

- Figura 4.22:** Cromatogramas obtidos com detecção por absorvância ($\lambda = 225$ nm). **A)** Resultado da reação de dGuo com DDE na presença de peróxidos; **B)** Mesma mistura de reação com adição de 1,N²-etenodG. As condições de incubação e análise por HPLC estão descritas, respectivamente, nos itens 3.4.4.3 e 3.4.1.3 de *Materiais e Métodos*. 126
- Figura 4.23:** Espectro de massas (ESI/MS) do aduto A1. Voltagem do cone: 25 V. As condições estão descritas no item 3.4.6.3 de *Materiais e Métodos*. 128
- Figura 4.24:** Espectros de absorvância dos adutos A2 em diferentes pHs (item 3.4.6.1 de *Materiais e Métodos*): pH 1, 50 mM HCl/KCl; pH 7, tampão fosfato 50 mM; pH 11, tampão carbonato-bicarbonato 50 mM. UA: unidades arbitrárias..... 129
- Figura 4.25:** Espectros de massas (ESI/MS) dos adutos (a) A2-1 e (b) A2-2. Voltagem do cone: 35 V. As condições estão descritas no item 3.4.6.3 de *Materiais e Métodos*. 130
- Figura 4.26:** Espectro de ¹H RMN do aduto A2-1 obtido em um equipamento de 500 MHz em DMSO-*d*₆, como descrito no item 3.4.6.2 de *Materiais e Métodos*. 132
- Figura 4.27:** Espectro de ¹H RMN do aduto A2-2 obtido em um equipamento de 500 MHz em DMSO-*d*₆, como descrito no item 3.4.6.2 de *Materiais e Métodos*. 133
- Figura 4.28:** Espectro de RMN de correlação bidimensional ¹H-¹H (COSY) do aduto A2-1 obtido em um equipamento de 500 MHz em DMSO-*d*₆, como descrito no item 3.4.6.2 de *Materiais e Métodos*. 136
- Figura 4.29:** Espectro de RMN de correlação bidimensional ¹H-¹H (COSY) do aduto A2-2 obtido em um equipamento de 500 MHz em DMSO-*d*₆, como descrito no item 3.4.6.2 de *Materiais e Métodos*. 137
- Figura 4.30:** Espectro de ¹³C RMN do aduto A2-1 obtido em um equipamento de 500 MHz em DMSO-*d*₆, como descrito no item 3.4.6.2 de *Materiais e Métodos*. 139
- Figura 4.31:** Espectro de ¹³C RMN do aduto A2-2 obtido em um equipamento de 500 MHz em DMSO-*d*₆, como descrito no item 3.4.6.2 de *Materiais e Métodos*. 140
- Figura 4.32:** Espectro de RMN DEPT do aduto A2-1 obtido em um equipamento de 500 MHz em DMSO-*d*₆, como descrito no item 3.4.6.2 de *Materiais e Métodos*. 141
- Figura 4.33:** Espectro de RMN DEPT do aduto A2-2 obtido em um equipamento de 500 MHz em DMSO-*d*₆, como descrito no item 3.4.6.2 de *Materiais e Métodos*. 142
- Figura 4.34:** Espectro de RMN de correlação heteronuclear bidimensional ¹H-¹³C (HMQC) do aduto A2-1 obtido em um equipamento de 500 MHz em DMSO-*d*₆, como descrito no item 3.4.6.2 de *Materiais e Métodos*. 143
- Figura 4.35:** Espectro de RMN de correlação heteronuclear bidimensional ¹H-¹³C (HMQC) do aduto A2-2 obtido em um equipamento de 500 MHz em DMSO-*d*₆, como descrito no item 3.4.6.2 de *Materiais e Métodos*. 144

- Figura 4.36:** Espectro de RMN de correlação heteronuclear bidimensional ^1H - ^{13}C a longa distância (HMBC) do aduto A2-1 obtido em um equipamento de 500 MHz em DMSO- d_6 , como descrito no item 3.4.6.2 de *Materiais e Métodos*. 145
- Figura 4.37:** Espectro de RMN de correlação heteronuclear bidimensional ^1H - ^{13}C a longa distância (HMBC) do aduto A2-2 obtido em um equipamento de 500 MHz em DMSO- d_6 , como descrito no item 3.4.6.2 de *Materiais e Métodos*. 146
- Figura 4.38:** Cromatogramas obtidos com detecção por absorvância ($\lambda = 280 \text{ nm}$) e detecção eletroquímica (potencial = +800 mV) do aduto 1, N^2 -eteno-2'-desoxiguanosina (A1). A condição de análise por HPLC está descrita no item 3.5.1.2 de *Materiais e Métodos*. UA: unidades arbitrárias. 149
- Figura 4.39:** Cromatogramas obtidos com detecção por absorvância ($\lambda = 280 \text{ nm}$) e detecção eletroquímica (potencial = +800 mV) dos produtos da hidrólise ácida de 1, N^2 -eteno-2'-desoxiguanosina (A1). A condição de análise por HPLC está descrita no item 3.5.1.2 de *Materiais e Métodos*. UA: unidades arbitrárias. 151
- Figura 4.40:** Espectros de absorvância do produto A' em diferentes pHs (item 3.4.6.1 de *Materiais e Métodos*): pH 1, 50 mM HCl/KCl; pH 7, tampão fosfato 50 mM; pH 11, tampão carbonato-bicarbonato 50 mM. UA: unidades arbitrárias. Os espectros correspondem aos obtidos por Sattangí e colaboradores (1977) para o aduto 1, N^2 -etenoguanina. 152
- Figura 4.41:** Espectro de massas (ESI/MS) do produto A'. Voltagem do cone: 25 V. As condições estão descritas no item 3.4.6.3 de *Materiais e Métodos*. 153
- Figura 4.42:** Eletrovoltamograma de 1, N^2 -etenoguanina. As condições de análise estão descritas no item 3.5.1.3 de *Materiais e Métodos*. EC: detecção eletroquímica. UV: detecção por absorvância a 280 nm. 154
- Figura 4.43:** Cromatogramas obtidos com detecção eletroquímica (potencial = +800 mV) dos produtos da hidrólise ácida do DNA incubado com DDE na presença de peróxidos *in vitro*, do respectivo controle e da amostra de DNA com adição de 1, N^2 -etenoguanina (*spiking*). As condições de incubação, hidrólise e análise por HPLC estão descritas nos itens 3.4.8, 3.5.1.4 e 3.5.1.2 de *Materiais e Métodos*. UA: unidades arbitrárias. 155
- Figura 4.44:** Espectros de massas (ESI/MS) do aduto [$^{15}\text{N}_5$]-1, N^2 -edGuo em diferentes voltagens de cone. As condições estão descritas no item 3.4.6.3 de *Materiais e Métodos*. 158
- Figura 4.45:** Espectro de massas (ESI/MS-MS) do aduto [$^{15}\text{N}_5$]A2. As condições de análise em MS₂ estão descritas no item 3.4.6.3 de *Materiais e Métodos*. 159
- Figura 4.46:** Cromatogramas obtidos após injeção de uma solução contendo 50 fmol do aduto 1, N^2 -edGuo (5 fmol/ μL) e 1000 fmol do padrão interno [$^{15}\text{N}_5$]-1, N^2 -edGuo (100 fmol/ μL) no sistema LC/ESI/MS-MS. As condições de análise estão descritas nos itens 3.5.2.1 e 3.5.2.2 de *Materiais e Métodos*. Fase móvel: 30% de acetonitrila em água. 159

- Figura 4.47:** Cromatogramas obtidos após injeção de uma solução contendo 50 fmol da mistura dos adutos A2 (2,5 fmol/ μ L) e 3500 fmol do padrão interno [$^{15}\text{N}_5$]A2 (175 fmol/ μ L) no sistema LC/ESI/MS-MS. As condições de análise estão descritas nos itens 3.5.2.1 e 3.5.2.2 de *Materiais e Métodos*. Fase móvel: 50% de acetonitrila em água. 160
- Figura 4.48:** Curvas de calibração para quantificação dos etenoadutos: (a) 1, N^2 - ϵ dGuo; (b) A2. As condições de análise estão descritas nos itens 3.5.2.1, 3.5.2.2 e 3.5.2.4 de *Materiais e Métodos*. 161
- Figura 4.49:** Detecção do aduto A1 em DNA de timo de bezerro através do sistema LC/ESI/MS-MS. As condições de análise estão descritas nos itens 3.5.2.1, 3.5.2.2 e 3.5.2.4 de *Materiais e Métodos*. Fase móvel: 30% de acetonitrila em água. (a) DNA controle; (b) DNA incubado com DDE na presença de peróxidos. 163
- Figura 4.50:** Detecção dos adutos A2 em DNA de timo de bezerro através do sistema LC/ESI/MS-MS. As condições de análise estão descritas nos itens 3.5.2.1, 3.5.2.2 e 3.5.2.4 de *Materiais e Métodos*. Fase móvel: 50% de acetonitrila em água. (a) DNA controle; (b) DNA incubado com DDE na presença de peróxidos. 164
- Figura 4.51:** Detecção do aduto A1 em DNA de células CV1-P através do sistema LC/ESI/MS-MS. As condições de análise estão descritas nos itens 3.5.2.1, 3.5.2.2 e 3.5.2.4 de *Materiais e Métodos*. Fase móvel: 30% de acetonitrila em água. (a) células incubadas com etanol (0,2% v/v) (controle); (b) células incubadas com 50 μ M de DDE por 5 horas. 166
- Figura 4.52:** Detecção dos adutos A2 em DNA de células CV1-P através do sistema LC/ESI/MS-MS. As condições de análise estão descritas nos itens 3.5.2.1, 3.5.2.2 e 3.5.2.4 de *Materiais e Métodos*. Fase móvel: 50% de acetonitrila em água. (a) células incubadas com etanol (0,2% v/v) (controle); (b) células incubadas com 50 μ M de DDE por 5 horas. 167
- Tabela 1.1:** Aldeídos que foram identificados como produtos da peroxidação lipídica induzida em microssomos de fígado de ratos pelo sistema ADP- Fe^{2+} /NADPH. 37
- Tabela 4.1:** Determinação da concentração de sulfidrilas não-proteicas (NPSH) (pmoles NPSH/ μ g proteína) em células CV1-P não submetidas a qualquer tratamento (controle), incubadas com 0,19% de etanol (v/v) por 4 h e incubadas com 65 μ M de DDE por 2,5 h, 3 h e 4 h (N = 3). O tratamento das células e dosagem de NPSH foram feitos como descrito nos itens 3.3.2.3a e 3.3.4 de *Materiais e Métodos*. 93
- Tabela 4.2:** Determinação da concentração de sulfidrilas não-proteicas (NPSH) (pmoles NPSH/ μ g proteína) em células CV1-P não submetidas a qualquer tratamento (controle), incubadas com 0,19% de etanol (v/v) por 8 h e 24 h e incubadas com 65 μ M de DDE por 2 h, 3 h, 4 h, 5 h, 8 h e 24 h (N = 3). O tratamento das células e dosagem de NPSH foram feitos como descrito nos itens 3.3.2.3b e 3.3.4 de *Materiais e Métodos*. 94

Tabela 4.3: Determinação da concentração de sulfidrilas não-proteicas (NPSH) (pmoles NPSH/ μg proteína) em células CV1-P não submetidas a qualquer tratamento (controle) e incubadas com 100 μM de DDE por 1,5 h; 2,5 h, 3,5 h e 4,5 h (N = 3). O tratamento das células e dosagem de NPSH foram feitos como descrito nos itens 3.3.2.3c e 3.3.4 de <i>Materiais e Métodos</i>	94
Tabela 4.4: Determinação da concentração de sulfidrilas não-proteicas (NPSH) (pmoles NPSH/ μg proteína) em células CV1-P não submetidas a qualquer tratamento (controle) e incubadas com diferentes concentrações de BSO por 3 horas em meio de cultura sem soro (N = 3). A solução de BSO foi preparada em água. A dosagem de NPSH foi feita como descrito no item 3.3.4 de <i>Materiais e Métodos</i>	97
Tabela 4.5: Determinação da porcentagem de quebras de fita simples + sítios AP em DNA de células CV1-P não submetidas a qualquer tratamento (controle), incubadas com 0,5% de etanol (v/v) e com diferentes concentrações de DDE por 3 horas em meio de cultura sem soro. O tratamento das células e as medidas de fragmentação do DNA (N = 6) foram feitos como descrito nos itens 3.3.2.4a e 3.3.6 de <i>Materiais e Métodos</i>	102
Tabela 4.6: Determinação da porcentagem de quebras de fita simples + sítios AP em DNA de células CV1-P não submetidas a qualquer tratamento (controle), incubadas com 0,5% de etanol (v/v) e com 100 μM de DDE por diferentes períodos de tempo. O tratamento das células e as medidas de fragmentação do DNA (N = 6) foram feitos como descrito nos itens 3.3.2.4b e 3.3.6 de <i>Materiais e Métodos</i>	103
Tabela 4.7: Valores de $\lambda_{\text{máx}}$ e coeficientes de extinção molar (ϵ) do produto α nos diferentes pHs indicados na figura 4.16 . Os valores de ϵ foram determinados como descrito no item 3.4.7 de <i>Materiais e Métodos</i>	115
Tabela 4.8: Deslocamentos químicos no espectro de ^1H RMN do produto α em DMSO- d_6 apresentado na figura 4.16	117
Tabela 4.9: Deslocamentos químicos no espectro de ^1H RMN do aduto A1 em DMSO- d_6	127
Tabela 4.10: Valores de $\lambda_{\text{máx}}$ e coeficientes de extinção molar (ϵ) dos adutos A2-1 e A2-2 nos diferentes pHs indicados na figura 4.24 . Os valores de ϵ foram determinados como descrito no item 3.4.7 de <i>Materiais e Métodos</i>	129
Tabela 4.11: Deslocamentos químicos no espectro de ^1H RMN do aduto A2-1 em DMSO- d_6	134
Tabela 4.12: Deslocamentos químicos no espectro de ^1H RMN do aduto A2-2 em DMSO- d_6	135
Tabela 4.13: Deslocamentos químicos nos espectros de ^{13}C RMN dos adutos A2-1 e A2-2 em DMSO- d_6	147

Tabela 4.14: Níveis dos adutos detectados em DNA controle e DNA incubado com DDE na presença de peróxidos *in vitro*. 165

Tabela 4.15: Níveis do aduto **A1** detectado em DNA de células. 168

Tabela 4.16: Níveis dos adutos **A2** detectados em DNA de células. 168

Esquema 5.1: Formação de 2,4-decadienal a partir ácido linoleico. 170

Esquema 5.2: Mecanismo **1** proposto para a formação de adutos 1,N²-eteno-2'-desoxiguanosina por DDE. 186

Esquema 5.3: Mecanismo **2** proposto para a formação de adutos 1,N²-eteno-2'-desoxiguanosina por DDE. 189

ABREVIACÕES

$\cdot\text{OH}$	Radical hidroxila
$^1\Delta\text{gO}_2$	Oxigênio singlete
$^3\Sigma\text{gO}_2$	Oxigênio no estado fundamental
ϵdAdo	1, N^6 -eteno-2'-desoxiadenosina
ϵdCyt	3, N^4 -eteno-2'-desoxicitidina
$N^2,3\text{-}\epsilon\text{dG}$	$N^2,3$ -eteno-2'-desoxiguanosina
1, N^2 - ϵdG	1, N^2 -eteno-2'-desoxiguanosina
5-OHCyt	5-hidroxicitosina
5-OHdCyd	5-hidroxi-2'-desoxicitidina
5-OHdUrd	5-hidroxi-2'-desoxiuridina
5-OHUra	5-hidroxiuracila
8-HETE	Ácido 8-hidroxieicosatetraenóico
8-oxodA	8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiadenosina
8-oxodG	8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina
12-HETE	Ácido 12-hidroxieicosatetraenóico
Abs	Absorbância
A1	Tautômero de 1, N^2 -etheno-2'-deoxyguanosine
A2-1 e A2-2	Diastereoisômeros de 1- $\{[3\text{-}(2'\text{-deoxy-}\beta\text{-D-erythro-pentafuranosyl})\text{-}5,9\text{-dihydro-}9H\text{-imidazo}[2,1-i]\text{purin-}9\text{-hydroxy}]\text{-}7\text{-yl}\}\text{-}2\text{-one-}3\text{-octanol}$.
AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
AP	Apurínicos/apirimidínicos, abásicos
ATPase	Adenosina 5'-trifosfatase
BHT	Hidroxitolueno butilado
CCl_4	Tetracloroeto de carbono
CHO	Células de ovário de hamster chinês
CoA	Coenzima A
COSY	Espectroscopia de RMN de correlação bidimensional $^1\text{H-}^1\text{H}$
CV1-P	Fibroblastos renais de macaco verde africano
CYP	Citocromo P450
dA	2'-Desoxiadenosina
Da	Daltons
DAN	2,3-Diaminonaftaleno
DDE	<i>trans,trans</i> -2,4-Decadienal
DEPT	RMN de correlação $^1\text{H-}^{13}\text{C}$ com intensificação do sinal sem
distorção por transferência de polarização	
dG	2'-Desoxiguanosina
dGTP	2'-Desoxiguanosina 5'-trifosfato
dGuo	2'-Desoxiguanosina
DI	Diâmetro interno
DMBA	Dimetilbenzantraceno
DMEM	Meio Eagle modificado por Dulbecco
DMSO- d_6	Dimetilsulfóxido deuterado
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNase	Desoxirribonuclease

dNTP	Didesoxinucleotídeotri-fosfato
D ₂ O	Óxido de deutério
DSS	Propanossulfonato de sódio
DTNB	bis(3-carboxi-4-nitrofenil)dissulfeto(ditionitrobenzoato)
DTPA	Ácido dietilenetriaminopentaacético
EC	Eletroquímico
EDTA	Ácido etilenediaminotetraacético
EGF	Fator de crescimento epidérmico
ESI	Ionização por eletrospray
ESI/MS-MS ionização por electrospray	Espectrometria de massas – espectrometria de massas com ionização por electrospray
Fapy	Formamidopiridina
FapyGua	2,6-diamino-4-hidroxi-5-formamidopiridina
Fe-NTA	Nitrilotriacetato de ferro
FGF	Fator de crescimento de fibroblastos
Fpg	Formamidopirimidina DNA <i>N</i> -glicosilase
GC	Cromatografia gasosa
GMP	Guanosina 5'-monofosfato
GSH	Glutathiona reduzida
GSSG	Glutathiona oxidada
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HEL	Linhagem celular de eritroleucemia humana
HO ₂ [•]	Radical peridroxil
HHE	4-Hidroxi-2-hexenal
His	Histidina
HMBC	Correlação heteronuclear bidimensional ¹ H- ¹³ C a longa distância
HMQC	Correlação heteronuclear bidimensional ¹ H- ¹³ C a curta distância
HNE	<i>trans</i> -4-Hidroxi-2-nonenal
HOCl	Ácido hipocloroso
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance
IGF-1	Fator de crescimento do tipo insulina 1
IL	Interleucina
J	Constante de acoplamento
L-BSO	<i>L</i> -butionina (<i>S,R</i>) sulfoximina
LC	Cromatografia líquida
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LH	Ácido graxo poliinsaturado
L [•]	Radical lipídico centrado no carbono
LOO [•]	Radical peroxila
LOOH	Hidroperóxido lipídico
MDA	Malonaldeído
M ₁ dA	<i>N</i> ⁶ -(3-oxopropenil)desoxiadenosina
M ₁ dC	<i>N</i> ⁴ -(3-oxopropenil)desoxicitidina
M ₁ dG	Aduto cíclico pirimidopurinona
MNU	Metilnitrosouréia

MRM	Monitoramento de reação múltipla
MS	Espectrometria de massas
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio
NAD ⁺	Nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma oxidada)
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma reduzida)
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma reduzida)
NAT	<i>N</i> -acetiltransferase
NGF	Fator de crescimento de nervos
NO [•]	Óxido nítrico
NPSH	Sulfidrilas não-proteicas
O ₂	Oxigênio molecular
O ₃	Ozônio
O ₂ ^{•-}	Ânion radical superóxido
ONOO ⁻	Peroxinitrito
ONOOCO ₂ ⁻	Ânion nitrosoperoxicarbonato
PBS	Tampão fosfato salina
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
pH	Potencial hidrogeniônico
PMA	Acetato de forbol miristato
RMN	Ressonância magnética nuclear
RNA	Ácido ribonucleico
RNase	Ribonuclease
RO [•]	Radical alcóxil
RO ₂ [•]	Radical peróxil
ROS	Espécies reativas de oxigênio
rpm	Rotações por minuto
S ⁻	Ânion tiolato
SFB	Soro fetal bovino
SH	Tiol
SIR ou SIM	Monitoramento de um íon selecionado
SQ ^{•-}	Semiquinona
RS [•]	Radical tiil
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SFB	Soro fetal bovino
SOD	Superóxido dismutase
TGF-β	Fator de crescimento de transformação β
THF	Tetraidrofurano
TIC	Corrente iônica total
TMS	Tetrametilsilano
TPA	12-O-tetradecanoil-forbol-13-acetato
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
UA	Unidades arbitrárias
UV	Ultravioleta

RESUMO

Vários adutos resultantes da reação de aldeídos α,β -insaturados, ou de seus epóxidos, com bases do DNA têm sido caracterizados nos últimos anos. Esses adutos podem levar à incorporação errada de bases durante a replicação ou a transcrição, resultando, se não reparados, em mutações que podem contribuir para a carcinogênese. O *trans,trans*-2,4-decadienal (DDE) é um dos aldeídos mais citotóxicos gerados endogenamente a partir da peroxidação lipídica. Verificamos que este aldeído afeta a viabilidade e altera o nível de glutatona de células CV1-P, além de induzir fragmentação do DNA e formação de diferentes produtos com o mesmo. Além da sua formação endógena, DDE é também encontrado em alguns alimentos, contribuindo para o aroma dos mesmos.

Neste trabalho detectamos e isolamos 6 produtos formados a partir da reação de DDE com 2'-desoxiguanosina (dG), sendo que fizemos a caracterização química completa de 3 desses produtos. Através desses estudos mostramos que um deles é o aduto 1,N²-eteno-2'-desoxiguanosina (1,N²-edGuo), também formado a partir da reação de dG com compostos carcinogênicos conhecidos, como o cloreto de vinila. Os outros dois produtos são dois diastereoisômeros correspondentes a 1,N²-edGuo com uma cadeia lateral substituinte. São produtos inéditos descritos pela primeira vez neste nosso trabalho. A detecção e caracterização desses produtos, assim como os mecanismos de formação propostos, podem contribuir para um melhor entendimento da genotoxicidade associada à peroxidação lipídica.

Em paralelo desenvolvemos uma técnica muito sensível baseada em LC/ESI/MS-MS para detecção desses adutos em sistemas biológicos. A detecção dos adutos caracterizados em DNA incubado com DDE *in vitro* e em DNA de células expostas ao aldeído aponta para a importância biológica desses compostos.

Existe um crescente interesse no uso de adutos exocíclicos de DNA como marcadores de exposição a diversos carcinógenos ambientais e também a processos endógenos envolvendo a peroxidação lipídica. O mecanismo de formação e a estrutura química desses adutos são importantes para revelar as características estruturais que influenciam a alquilação do DNA por aldeídos insaturados e para que se possa estimar o papel desses aldeídos na carcinogênese. A formação dos adutos por produtos da peroxidação

lipídica sugere a necessidade de estudos epidemiológicos para avaliar riscos de exposição ambiental, via alimentação ou mesmo via fatores indutores de lipoperoxidação. Os resultados aqui obtidos podem contribuir para o estabelecimento de relações entre estrutura química e função e para a avaliação do possível papel dessas lesões na toxicidade associada à exposição a essa classe de compostos.

ABSTRACT

A number of ring-extended DNA adducts resulting from the reaction of α,β unsaturated aldehydes, or their epoxides, with DNA bases have been characterized in recent years. These adducts may lead to miscoding during DNA replication or transcription, resulting, if not repaired, in mutations that can contribute to cancer development. *trans,trans*-2,4-Decadienal (DDE) is one of the highly cytotoxic aldehydes endogenously formed from lipid peroxidation. Besides its endogenous formation, DDE is also present in foods, contributing to their aroma.

Here we report that DDE affects CV1-P cells viability, changes the cellular glutathione level, and induces DNA fragmentation. Moreover, DDE reacts with cellular DNA yielding several products.

To evaluate its DNA damaging potential, we have investigated the reaction of DDE with 2'-deoxyguanosine (dG) in the presence of peroxides. Six main adducts were isolated by reverse-phase HPLC. After extensive spectroscopic analysis, three of them were characterized. Adduct **A1**, 3-(2-deoxy- β -D-erythro-pentafuranosyl)-5,9-dihydro-9H-imidazo[2,1-*i*]purin-9-hydroxy, is a tautomer of 1, N^2 -etheno-2'-deoxyguanosine, a well known reaction product of epoxy aldehydes with dG. Two new diastereoisomeric products, **A2-1** and **A2-2**, 1-[[3-(2'-deoxy- β -D-erythro-pentafuranosyl)-5,9-dihydro-9H-imidazo[2,1-*i*]purin-9-hydroxy]-7-yl]-2-one-3-octanol, were isolated and characterized on the basis of their spectroscopic features as 1, N^2 -etheno adducts possessing a carbon side chain with a carbonyl and a hydroxyl group. One possible reaction mechanism for the formation of adducts **A2** involves DDE double epoxidation and hydrolysis of the C4 epoxy group prior to nucleophilic addition of the exocyclic amino group of dG to C1 of the aldehyde, followed by cyclization *via* nucleophilic attack on the C2 epoxy group by *N*-1 and elimination of H₂O.

This study also reports the detection and quantification of adducts **A1** and **A2** in calf thymus DNA and in CV1-P cells DNA after treatment with DDE using a liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry (LC/ESI/MS-MS) technique. This method provided high specificity, reproducibility, and sensitivity.

Increasing interest in etheno adducts as possible markers of cancer risk associated with dietary fat intake, oxidative stress, chronic inflammatory/infectious processes, and protective dietary antioxidants has spurred the chemical characterization of a variety of them in serving as standards for *in vivo* occurrence research. When the importance of DDE as a compound present in foods and as a product of lipid peroxidation is considered, the results presented herein should contribute to a better understanding of the chemical structures of adducts resulting from the reaction of aldehydes with nucleic acid bases, a necessary step to assess the genotoxic risks associated with this class of compounds.

Introdução

1. Introdução

O aparecimento do oxigênio molecular (O_2) em quantidades significativas na atmosfera terrestre há cerca de 2,5 bilhões de anos, como resultado da evolução dos organismos fotossintetizantes, foi muito importante para o início da expansão da vida em nosso planeta. A sobrevivência e evolução de organismos na superfície da água e no solo foi possível graças à filtração da radiação ultravioleta do sol pelas moléculas de O_2 e pela camada de ozônio (O_3), que se desenvolveu na estratosfera após o aumento da concentração de O_2 na atmosfera ($O + O_2 \rightarrow O_3$). Entretanto, ao mesmo tempo, esse aumento na concentração de O_2 deve ter exercido um grande estresse sobre os organismos presentes (Meneghini, 1987).

Como a atmosfera terrestre era inicialmente pobre em O_2 , os primeiros organismos vivos eram essencialmente anaeróbicos. Microorganismos anaeróbicos ainda sobrevivem nos dias de hoje, mas seu crescimento é inibido e eles frequentemente morrem quando são expostos a 21% de O_2 , o nível atual de O_2 na atmosfera (pressão parcial de 159 mmHg ao nível do mar). Assim, à medida em que a concentração de O_2 na atmosfera foi aumentando, muitos organismos primitivos devem ter morrido. Os que sobreviveram devem ter seguido uma de duas linhas evolutivas: ou se restringiram a ambientes nos quais o O_2 não pudesse penetrar e, provavelmente, originaram os organismos anaeróbicos que conhecemos hoje; ou desenvolveram sistemas antioxidantes para se protegerem contra os efeitos danosos do O_2 . Os que seguiram esta última linha passaram a tolerar a presença de O_2 e a usá-lo para transformações metabólicas (através de enzimas dos tipos oxidase, oxigenase e hidroxilase, por exemplo) e para produção eficiente de energia (através da transferência de elétrons das moléculas orgânicas para o O_2). Tal evolução possibilitou o desenvolvimento de organismos multicelulares complexos, os quais passaram a contar com sistemas que permitiam a distribuição controlada de O_2 para todas as células, evitando assim que as mesmas ficassem expostas a altas concentrações de O_2 : por exemplo, a tensão de O_2 no sangue venoso humano varia em torno de 40 mmHg ($53 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$) e no interior das células humanas varia de 1 a 10 mmHg (Halliwell e Gutteridge, 1999).

Os efeitos tóxicos sofridos pelos organismos anaeróbicos após exposição ao O_2 são o resultado das oxidações de componentes celulares essenciais, tais como tióis,

cofatores enzimáticos, proteínas, nucleotídeos, ácidos nucleicos, lipídios e carboidratos. A oxidação de substratos provoca, simultaneamente, a redução do O₂ para espécies reativas de oxigênio (radicais livres e espécies não radicalares), as quais contribuem para a multiplicação dos danos aos componentes celulares. A evolução dos organismos anaeróbicos para os aeróbicos só foi possível graças ao desenvolvimento de mecanismos protetores contra esses efeitos tóxicos do O₂ (Halliwell e Gutteridge, 1999).

Atualmente sabe-se que o oxigênio é essencial para muitos processos metabólicos indispensáveis a todas as formas de vida aeróbica (procariontes, protistas, plantas, fungos e animais) (Ahmad, 1995). Entretanto, mesmo com a existência de mecanismos protetores, uma consequência normal da vida aeróbica é a ocorrência de danos estruturais em uma grande variedade de compostos orgânicos (DNA, proteínas, carboidratos e lipídios) como resultado de reações oxidativas desencadeadas pelas espécies reativas de oxigênio (Sies, 1986; Halliwell, 1996; Halliwell, 1999). Além da formação endógena das espécies reativas de oxigênio, uma grande quantidade de fatores ambientais, incluindo resíduos industriais e de mineração, pesticidas, fumaça de cigarro, solventes orgânicos, drogas terapêuticas, radiação eletromagnética (raios x, raios γ , ultravioleta), radiação particulada (elétrons, prótons, nêutrons, dêuterons, partículas α e β) e hidrocarbonetos aromáticos, contribuem para o aparecimento de espécies prooxidantes que levam a um aumento do estresse oxidativo endógeno (Freeman e Crapo, 1982; Sies, 1986; Ahmad, 1995). Quando os mecanismos de defesa antioxidantes passam a ser insuficientes para reduzir os danos oxidativos provocados pelas espécies prooxidantes, surge a possibilidade de desenvolvimento de alguns processos biológicos, tais como o envelhecimento, a cataratogênese, a aterosclerose, a doença de Parkinson, doenças inflamatórias e a carcinogênese (Halliwell, 1987; Spector, 1995; Becker, 1999; Chisolm e Steinberg, 2000; Halliwell, 2000).

1.1. Espécies Reativas de Oxigênio: presença natural nos organismos aeróbicos

1.1.1. Destinos do O₂ nos organismos aeróbicos

Cerca de 85 a 90% do O₂ capturado pelos animais é utilizado para síntese de ATP na cadeia de transporte de elétrons presente na membrana interna das mitocôndrias. A etapa da cadeia em que há utilização de O₂ é a catalisada pela enzima citocromo oxidase.

Tal enzima atua removendo um elétron de cada uma de quatro moléculas de citocromo *c* reduzidas (Fe²⁺-heme), oxidando-as para a forma Fe³⁺-heme. Os quatro elétrons são, então, transferidos em etapas para o O₂, uma vez que é quimicamente impossível fazer essa transferência de uma só vez. A reação geral é $O_2 + 4H^+ + 4e^- \rightarrow 2H_2O$.

A enzima citocromo oxidase é um sistema bastante complexo. Uma vez que as espécies resultantes da redução parcial do O₂ (espécies reativas de oxigênio) induzem danos em várias biomoléculas, é muito importante que a citocromo oxidase as mantenha ligadas de forma segura aos seus sítios ativos até que elas sejam completamente reduzidas para água. Para isso, esta enzima contém tanto ferro heme como íons cobre, os quais exercem papel importante na redução do O₂ e na ligação segura das espécies reativas intermediárias. Uma outra característica importante da citocromo oxidase de mamíferos é que ela possui alta afinidade pelo O₂, funcionando bem mesmo quando a pressão parcial de O₂ é inferior a 1 mmHg. Assim, as células aeróbicas não precisam ficar expostas a altas concentrações de O₂ para funcionarem corretamente, o que não deixa de ser um mecanismo de defesa antioxidante (Malmstrom, 1998).

Os outros 10 a 15% do O₂ capturado pelos organismos aeróbicos são utilizados por várias enzimas dos tipos oxidase e oxigenase e também em reações de oxidação química direta ou catalisada por metais de transição (por exemplo, ferro ou cobre) (Doss e col., 2000; Pierre, 2000; Carr e col., 2000; Jones e col., 2000).

As oxidases são enzimas que catalisam oxidações nas quais o oxigênio molecular é o acceptor de elétrons, mas os átomos de oxigênio não aparecem no produto oxidado. Alguns exemplos são a enzima D-aminoácido oxidase, que usa O₂ para oxidar D-aminoácidos, a flavoproteína desidrogenase que cria uma ligação dupla no acila graxo-CoA durante a oxidação de ácidos graxos nos peroxissomos, e a xantina oxidase, uma flavoenzima que contém um átomo de molibdênio e quatro centros ferro-enxofre e transfere elétrons para o O₂ durante a oxidação de hipoxantina e xantina para ácido úrico.

As oxigenases catalisam reações oxidativas nas quais os átomos de oxigênio são diretamente incorporados na molécula substrato, formando um novo grupo hidroxila ou carboxila, por exemplo. As dioxigenases catalisam reações nas quais os dois átomos de oxigênio (O₂) são incorporados na molécula substrato. Monooxigenases, as quais são mais abundantes e mais complexas na sua ação, catalisam reações nas quais apenas um dos dois átomos de oxigênio é incorporado no substrato orgânico. O outro é reduzido para H₂O por

um co-substrato, que pode ser FMNH₂, FADH₂, NADH, NADPH ou tetra-hidrobiopterina, entre outros. Como a maioria das monooxigenases catalisam reações nas quais o substrato principal se torna hidroxilado, elas são também chamadas hidroxilases. Algumas vezes são também chamadas oxidases de função mista ou oxigenases de função mista. Alguns exemplos são as enzimas prolina hidroxilase e lisina hidroxilase que usam O₂ para adicionarem grupos hidroxila (-OH) aos aminoácidos prolina e lisina durante a síntese de colágeno, e a enzima tirosina hidroxilase que utiliza O₂ para adicionar um grupo -OH ao aminoácido tirosina no início da síntese dos hormônios epinefrina (adrenalina) e norepinefrina (noradrenalina).

Usualmente, o retículo endoplasmático liso de muitos tecidos de animais e vegetais contém citocromos conhecidos coletivamente como citocromos P450 (Goepfert e col., 1995). Eles são proteínas heme que contêm uma única cadeia polipeptídica na qual quatro ligantes para o ferro são fornecidos pelo grupo heme, o quinto ligante é o ânion tiolato (S⁻) de um resíduo de cisteína e, na proteína latente, o sexto ligante é a água. Foram descritos mais que 150 genes para codificação da superfamília P450. O nome P450 deriva do fato de as formas reduzidas desses citocromos ligarem monóxido de carbono produzindo um complexo que absorve luz fortemente a 450 nm. Eles catalisam reações de ^{oxidação}hidroxilação nas quais um substrato orgânico RH é ^{oxidado}hidroxilado para R-OH às custas de um átomo da molécula de oxigênio. O outro átomo de oxigênio é reduzido para H₂O por NADH ou NADPH (figura 1.1).

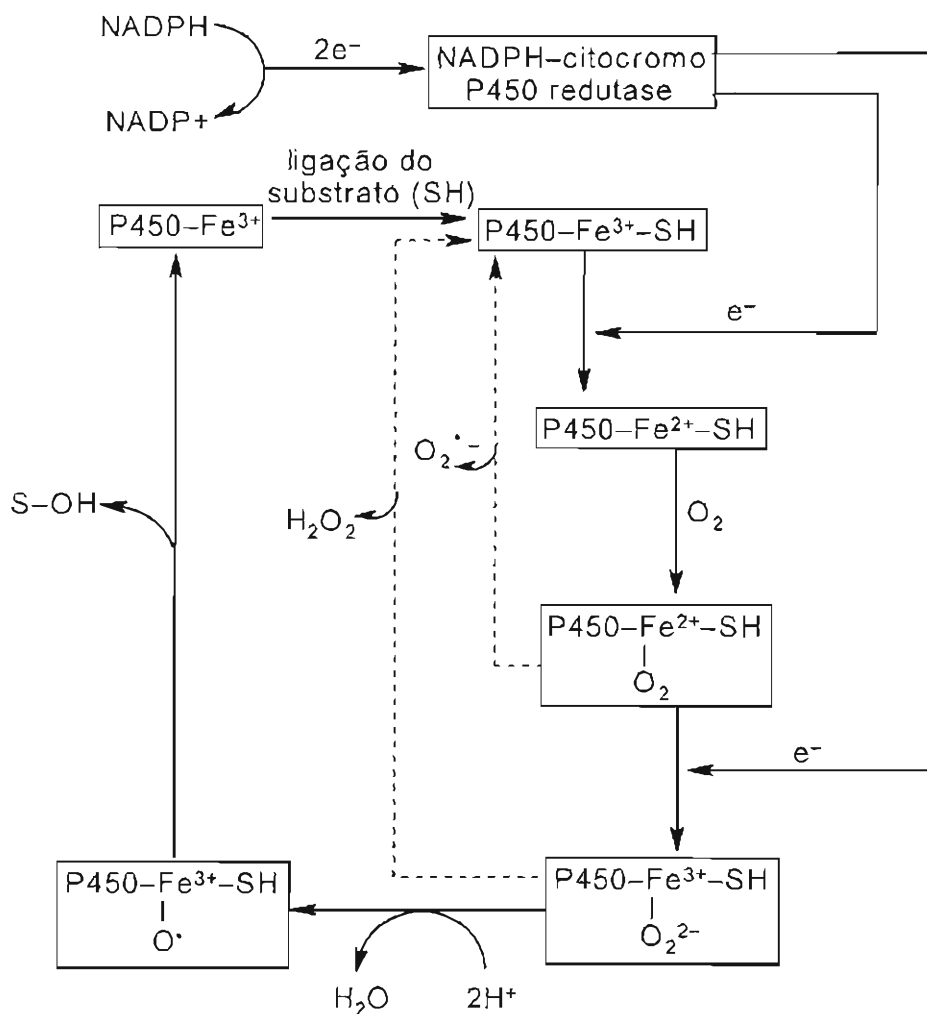


Figura 1.1: Mecanismo para hidroxilação de substratos por citocromo P450 no retículo endoplasmático de fígado (esquema modificado de Halliwell e Gutteridge, 1999).

Nas células hepáticas o retículo endoplasmático é especialmente rico em citocromos P450 (CYP), os quais metabolizam uma série de substâncias químicas. Algumas substâncias podem levar a um aumento da síntese de uma ou mais formas de citocromo P450, como é o caso da indução de CYP2B1 e CYP2B2 pelo barbiturato fenobarbital, cuja hidroxilação aumenta a sua solubilidade e facilita a sua excreção do organismo. Também o etanol leva a um aumento da síntese de uma forma específica de citocromo P450, CYP2E1 ou citocromo P450 induzível por etanol, o que aumenta a capacidade de as frações microsossomais do fígado oxidarem essa substância. CYP2E1 também oxida outros álcoois, acetona e alguns outros solventes orgânicos, como benzeno, clorofórmio e tetracloreto de carbono (McGregor e Lang, 1996; Shimada e col., 1996; Zangar e col., 2000; Powley e Carlson, 2000; Novak e Woodcroft, 2000). Outros substratos para os citocromos P450 incluem inseticidas, hidrocarbonetos tais como benzo[*a*]pireno e tolueno, drogas tais como

fenacetina, anfetamina e paracetamol (Goeptar e col., 1995), haletos de vinila, carbamato de etila (uretano) (Guengerich e col., 1991; Bartsch e col., 1994) e aldeídos α,β insaturados, tal como *trans*-4-hidroxi-2-nonenal (Kuo e col., 1997). Algumas substâncias exercem seus efeitos tóxicos após sofrerem metabolização por citocromo P450, como ocorre com etanol (Iimuro e col., 1996), benzo[α]pireno (Abernath, 1971), paracetamol (Moore e col., 1985), clorofórmio (Pohl, 1979; Brent e Rumack, 1993), tetracloreto de carbono (Brent e Rumack, 1993; McGregor e Lang, 1996), cloreto de vinila e carbamato de etila (Guengerich, 1991), por exemplo. A exposição a esses xenobióticos na presença de indutores de síntese de citocromos P450 pode ser muito prejudicial.

1.1.2. Causas da toxicidade do O₂: radicais livres e outras espécies reativas

No final do século XIX já eram conhecidos os efeitos tóxicos desencadeados por altas concentrações de O₂ ao tecido pulmonar, incluindo edema, depósitos de fibrina, congestão, inflamação e hemorragia (Lorrain-Smith, 1899). Estudos realizados durante a primeira metade do século XX (revisados por Haugaard, 1968) sugeriram que esses efeitos tóxicos poderiam ser consequência da inibição de enzimas celulares por O₂. Entretanto, apesar das várias demonstrações de inativação direta de enzimas por O₂ *in vitro*, havia relutância em atribuir a causa da toxicidade do O₂ em animais a tais efeitos diretos no metabolismo. Tal inativação ocorria muito lentamente e em extensão muito limitada para ser a causa do rápido início dos danos pulmonares observados (Haugaard, 1968).

A importância dos radicais de oxigênio na indução de danos aos tecidos biológicos foi avaliada no campo da radiobiologia por muitos anos (Dainton, 1951; Rajewsky, 1952; Gray, 1953; Gray e col., 1953), sendo bem caracterizado e quantificado o efeito do O₂ na irradiação de células (Alper e Howard-Flanders, 1956). Na presença de O₂, a dose de raios X necessária para matar as células era cerca de um terço da dose necessária para produzir o mesmo efeito sob condições anóxicas (Alper e Howard-Flanders, 1956; Dewey, 1960). Em 1954, quando eram feitas especulações a respeito do papel dos radicais de oxigênio nos danos radiobiológicos, Rebecca Gershman e seus colaboradores propuseram que o O₂ e os raios X podiam estar danificando as células através de um mecanismo comum: a produção de radicais de oxigênio (Gerschman e col., 1954).

Em 1969, McCord e Fridovich mostraram a existência de uma enzima que catalisa especificamente a remoção do radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$): a superóxido dismutase (SOD) (McCord e Fridovich, 1969). A partir dessa descoberta, os radicais de oxigênio, tais como $O_2^{\bullet-}$ e hidroxila (HO^{\bullet}), e outras espécies reativas, tais como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e peróxidos lipídicos, passaram a ser considerados agentes importantes que levam a danos celulares em muitas condições patofisiológicas, incluindo a injúria causada por reperfusão após um período de isquemia, câncer, a ação de algumas drogas anti-tumorais, inflamação, a doença de Parkinson, catarata, a aterosclerose e o envelhecimento, além dos danos provocados por radiação e hiperóxia (Sies, 1986; Halliwell, 1987; Jamieson, 1989; Halliwell e Gutteridge, 1999). É importante mencionar, no entanto, que não poderíamos sobreviver sem a produção endógena das espécies reativas de oxigênio. Um exemplo do seu papel benéfico encontra-se nos pacientes que sofrem de granulomatose crônica. Nesses indivíduos os fagócitos são incapazes de produzir espécies reativas de oxigênio, embora sejam aptos a fazer fagocitose. Conseqüentemente, surgem processos inflamatórios agravados, de difícil controle, mostrando que essas espécies são importantes para o combate aos microorganismos invasores (Kume e Dinauer, 2000).

1.1.3. Algumas considerações químicas sobre as espécies reativas de oxigênio

Um radical livre é qualquer espécie capaz de existência independente que contém um ou mais elétrons desemparelhados. Tal característica faz com que algumas dessas espécies sejam altamente reativas. As espécies reativas de oxigênio incluem todos os radicais do oxigênio e as espécies não radicalares, tais como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), oxigênio singlete ($^1\Delta_g O_2$), ozônio (O_3), ácido hipocloroso ($HOCl$) e peroxinitrito ($ONOO^-$), que são mais reativas que a molécula de oxigênio no estado fundamental (Augusto e col., 1995).

A molécula de oxigênio no estado fundamental ($^3\Sigma_g O_2$) possui dois elétrons desemparelhados (com *spins* paralelos) em dois orbitais antiligantes π^* diferentes, sendo portanto um radical livre (**figura 1.2**). Por possuir dois elétrons desemparelhados com *spins* paralelos, a molécula de oxigênio só poderia receber um par de elétrons, a partir da oxidação de um outro átomo ou molécula, se esses elétrons possuíssem *spins* antiparalelos aos do O_2 ,

de modo a preencherem os orbitais π^* . Entretanto, um par de elétrons em um orbital atômico ou molecular não atende a esse critério, uma vez que eles têm *spins* opostos, de acordo com o princípio de Pauli. Tal fato impõe uma restrição à transferência de elétrons, fazendo com que o oxigênio receba um elétron de cada vez e seja um fraco oxidante, reagindo lentamente com espécies não-radicalares (Meneghini, 1987). A toxicidade do O_2 é resultante, portanto, não da sua própria reatividade, a qual é baixa em condições fisiológicas, mas da sua ativação metabólica *in situ*.

A ativação do oxigênio ocorre através de reações que podem ser divididas em dois grupos: reações de transferência de energia e reações de transferência de elétrons (Cadenas, 1995).

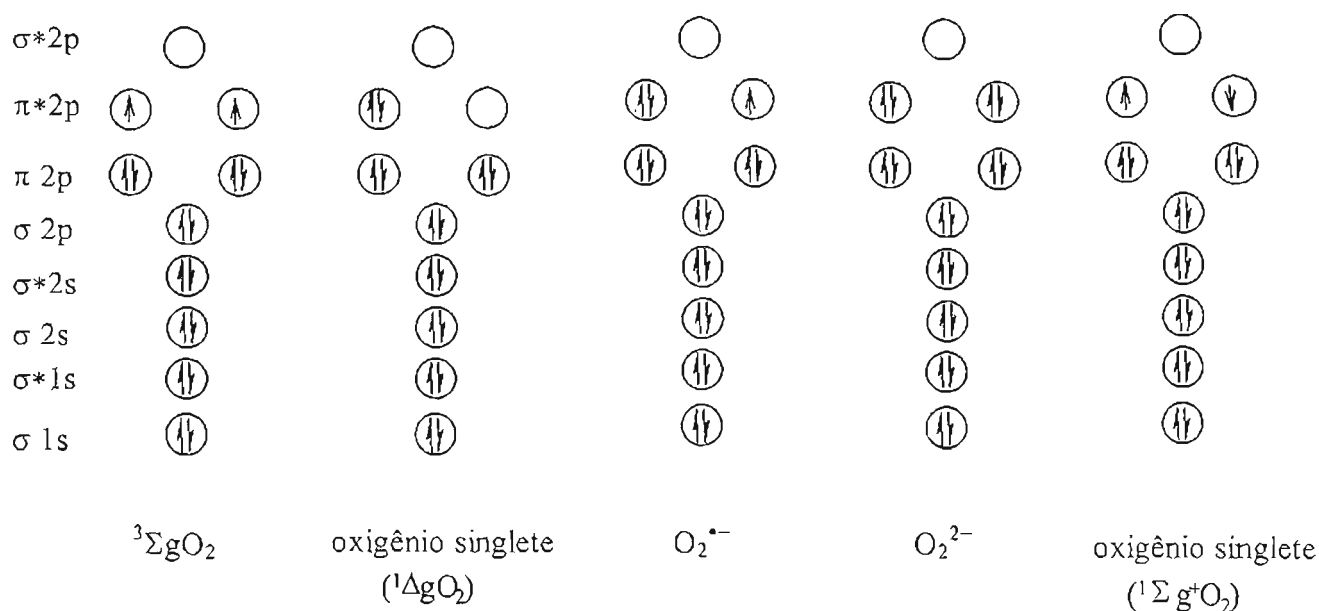


Figura 1.2: Distribuição eletrônica na molécula de oxigênio (Halliwell e Gutteridge, 1999).

Ativação do oxigênio por transferência de energia

Formas reativas do oxigênio, conhecidas como oxigênio singlete, podem ser geradas *via* absorção de energia pelo oxigênio molecular. O oxigênio singlete existe em dois estados: o estado ${}^1\Delta_g O_2$, no qual os dois elétrons passam a ocupar o mesmo orbital com *spins* opostos (figura 1.2); e o estado ${}^1\Sigma_g^+ O_2$, no qual os elétrons permanecem em orbitais separados mas adquirem *spins* opostos (figura 1.2). O estado ${}^1\Delta_g O_2$ tem uma energia de

22.4 kcal acima do estado fundamental e é o de ocorrência mais provável *in vivo*. Sua existência é de aproximadamente 3,8 μs em água, 62 μs em D_2O , 31 μs em hexano e 3900 μs em hexafluorobenzeno. O estado $^1\Sigma_g^+\text{O}_2$ é mais energético, 37.5 kcal acima do estado fundamental, mas decai espontaneamente para formar $^1\Delta_g\text{O}_2$. Em ambas as formas, a restrição de spin é removida e a capacidade oxidante é grandemente aumentada (Merkel e Kearns, 1972).

Ativação do oxigênio por transferência de elétrons

A redução monoeletrônica do oxigênio (O_2) leva à formação de radicais livres e outras espécies reativas intermediárias. A adição de um elétron à molécula de O_2 origina o radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) (figuras 1.2 e 1.3), cuja forma protonada é o radical peridroxil (HO_2^{\bullet}). Se mais um elétron for adicionado, é formado o íon peróxido (O_2^{2-}) (figuras 1.2 e 1.3), sendo o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a sua forma protonada. Como os elétrons extras em $\text{O}_2^{\bullet-}$ e O_2^{2-} estão preenchendo orbitais antiligantes, a força da ligação O–O diminui. No estado fundamental há duas ligações covalentes entre os átomos de oxigênio, mas em $\text{O}_2^{\bullet-}$ ocorre como se os átomos estivessem unidos por uma ligação e meia e em O_2^{2-} por apenas uma ligação. A adição de outro par de elétrons ao O_2^{2-} elimina inteiramente a ligação, uma vez que eles ocuparão os orbitais σ^*2p , sendo formados 2O^{2-} que, protonados, originam $2\text{H}_2\text{O}$. Usualmente, em sistemas biológicos, o produto da redução do oxigênio por dois elétrons é o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o produto da redução por quatro elétrons é a água (Halliwell e Gutteridge, 1999).

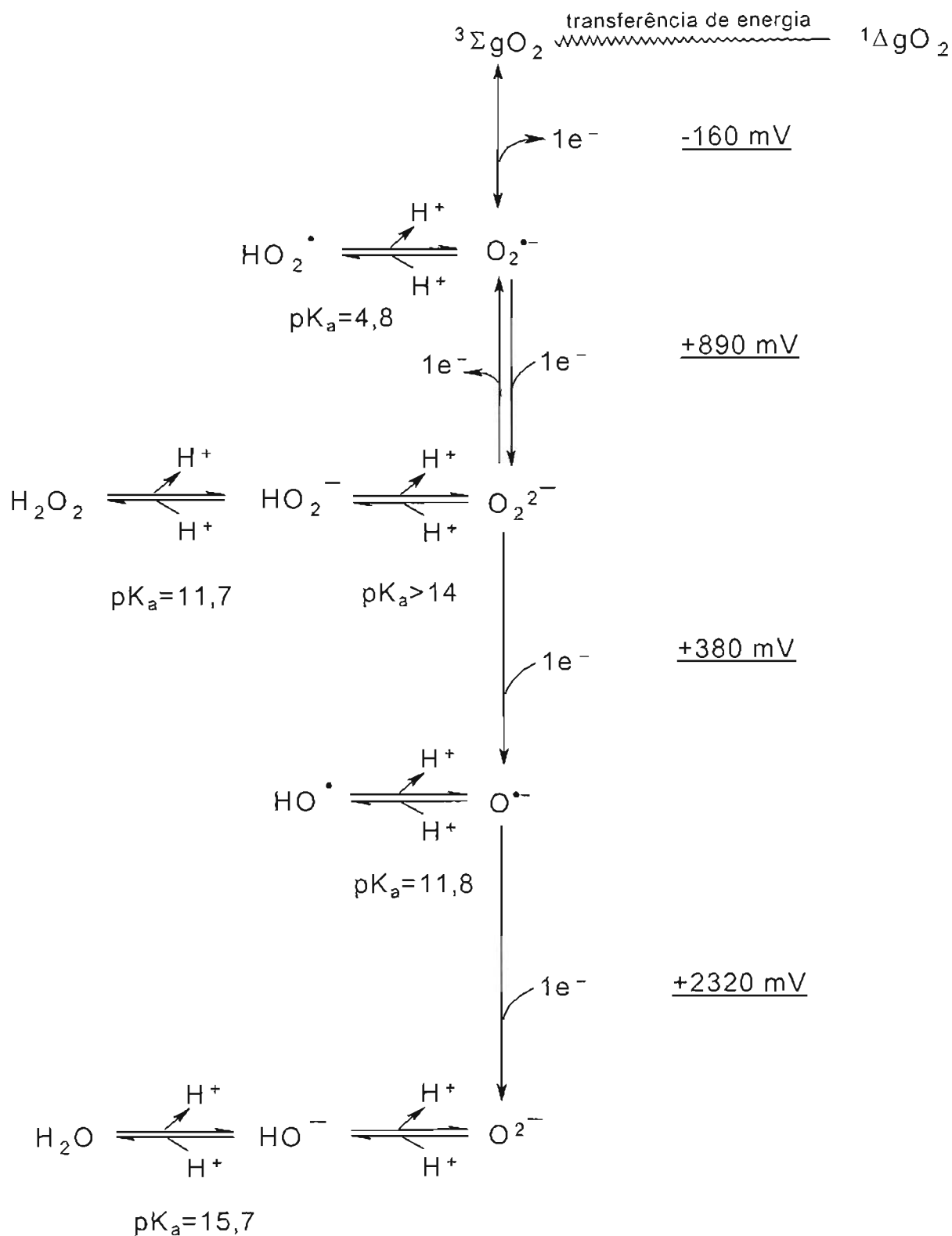
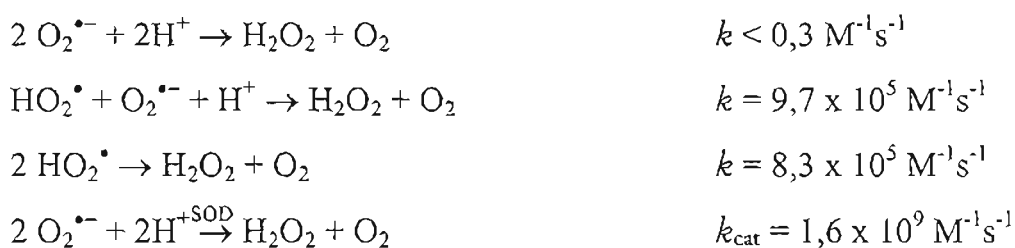


Figura 1.3: Redução monoelétrica do O_2 dissolvido em água. Os valores em milivolts (mV) são os potenciais de óxido-redução em pH 7 e concentrações molares, exceto H_2O , que é água líquida pura.

O radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) é uma espécie que recebe bastante atenção entre as espécies reativas de oxigênio geradas em sistemas biológicos. Em soluções aquosas de pH neutro, a reatividade química do $O_2^{\bullet-}$ inclui principalmente três tipos de reações (Sawyer e Valentine, 1981; Cadenas, 1995; Halliwell e Gutteridge, 1999):

$\Rightarrow O_2^{\bullet-}$ se comporta como uma base fraca e pode ser protonado, originando o radical peridroxil (HO_2^{\bullet}). O pK_a desse grupo é 4,8 (figura 1.3) e, portanto, em pH ~ 7 a razão $O_2^{\bullet-}/HO_2^{\bullet}$ é aproximadamente 100. Entretanto, o pH na proximidade das membranas biológicas pode ser mais ácido e podem ser criadas zonas intracelulares onde a razão $O_2^{\bullet-}/HO_2^{\bullet}$ é mais baixa. O radical HO_2^{\bullet} é mais reativo que $O_2^{\bullet-}$. Ele é capaz de, por exemplo, abstrair um átomo de hidrogênio bis-alílico de um ácido graxo poliinsaturado, iniciando assim a peroxidação lipídica.

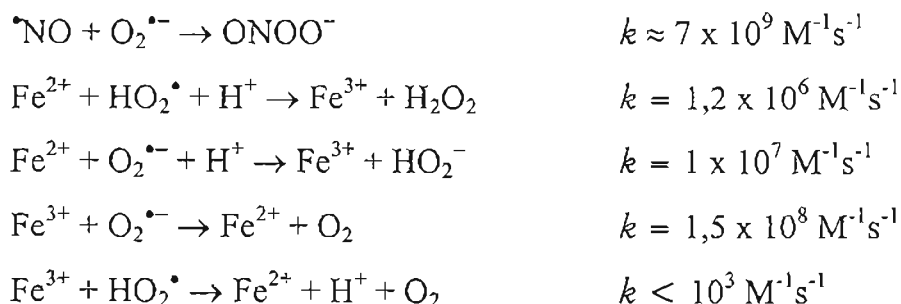
$O_2^{\bullet-}$ é uma espécie que tem reatividade relativamente baixa com DNA, lipídios, aminoácidos e a maioria dos outros metabólitos e tende a dismutar. Em sistemas biológicos, a velocidade da reação de dismutação é aproximadamente $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ e ocorre preferencialmente via protonação do $O_2^{\bullet-}$, seguida pela reação de HO_2^{\bullet} com $O_2^{\bullet-}$. A reação de dismutação é também catalisada pelas superóxido dismutases, as quais contêm íons metálicos que apresentam potencial redox de um elétron com valores entre os potenciais para oxidação (-160 mV) e redução (+ 890 mV) do $O_2^{\bullet-}$ (ex.: Cu^{2+} na Cu-Zn superóxido dismutase com potencial redox de + 420 mV). As reações de dismutação são:



$\Rightarrow O_2^{\bullet-}$ se comporta como agente redutor de aceptores adequados de elétrons, tais como citocromo c (Fe^{3+}), íon Cu^{2+} em proteínas que contêm cobre (plastocianina em cloroplastos e ceruloplasmína, por exemplo), íons Fe^{3+} complexados por EDTA (mas não por desferroxamina) e quinonas com potenciais redox apropriados, tal como p-benzoquinona.

$\Rightarrow O_2^{\bullet-}$ age também como oxidante de Fe^{2+} , de NADH ligado a enzimas e de moléculas que possuem prótons ácidos, tal como ascorbato. Foi também verificado que ele é capaz de oxidar a forma hidroquinona da vitamina K, originando o radical semiquinona.

A química do $O_2^{\bullet-}$ difere de acordo com a ocorrência das reações em meio hidrofílico ou hidrofóbico. Ele é mais estável e mais reativo em ambientes apolares, nos quais se comporta como uma base ($O_2^{\bullet-} + H^+ \rightarrow HO_2^{\bullet}$), um nucleófilo e um agente redutor. $O_2^{\bullet-}$ gerado no interior das membranas biológicas pode ser, portanto, mais prejudicial. Entretanto, o dano biológico causado por $O_2^{\bullet-}$ frequentemente envolve a sua reação com outros radicais, como por exemplo $^{\bullet}NO$ ou íons ferro (Koppenol e col., 1978; Winterbourn, 1982; Beckman e Koppenol, 1996):



A redução de Fe^{3+} para Fe^{2+} deve ocorrer através da formação de espécies intermediárias, tais como ferril e perferril (Halliwell e Gutteridge, 1992):



Os valores das constantes de velocidade das reações do radical $O_2^{\bullet-}$ com íons ferro são alterados pela ligação dos íons ferro a agentes quelantes, tais como EDTA, transferrina, lactoferrina, desferroxamina, citrato, ADP e DETAPAC (Buettner, 1993; Halliwell e Gutteridge, 1999).

A reação de $O_2^{\bullet-}$ com $^{\bullet}NO$ é biologicamente importante por, pelo menos, duas razões. Primeiro porque ambos os radicais antagonizam as ações biológicas um do outro. É sabido que os efeitos mediados por $^{\bullet}NO$ são frequentemente aumentados pela adição de SOD às preparações fisiológicas, pois há redução da velocidade de perda de $^{\bullet}NO$ (Moncada

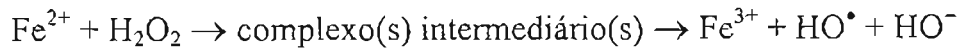
e Higgs, 1995). Se o dano induzido em um determinado sistema for dependente de $O_2^{\bullet-}$, $\cdot NO$ pode proteger contra esse dano pela remoção de $O_2^{\bullet-}$. $\cdot NO$ pode inibir a peroxidação lipídica em alguns sistemas pela remoção dos radicais peroxil (RO_2^{\bullet}) (Rubbo e col., 1995). A segunda consideração a ser feita diz respeito às conseqüências da formação de peroxinitrito ($ONOO^-$). A forma protonada do peroxinitrito ($ONOOH$) é uma espécie citotóxica altamente oxidante (Pryor e Squadrito, 1995). A adição de $ONOO^-$ a células, tecidos ou fluidos corpóreos leva à sua rápida protonação, seguida por depleção de grupos $-SH$ e outros antioxidantes, oxidação de lipídios (Graham e col., 1993), quebras no DNA, nitração e desaminação de bases do DNA (Yermilov e col., 1996) e nitração de resíduos aromáticos de aminoácidos em proteínas (Beckman e Koppenol, 1996). Uma série de mecanismos complexos levam à formação de diferentes espécies reativas de nitrogênio e oxigênio, a partir do peroxinitrito, que devem ser responsáveis pelos danos observados (Santos e col., 2000).

Qualquer sistema biológico que gere $O_2^{\bullet-}$ produzirá H_2O_2 *via* reação de dismutação, a menos que $O_2^{\bullet-}$ seja interceptado. O peróxido de hidrogênio é a segunda espécie reativa resultante da redução monoelétrica do O_2 (**figuras 1.2 e 1.3**). H_2O_2 não é um radical, pois não possui elétrons desemparelhados e apresenta reatividade química moderada (Chance e col., 1979; Cadenas, 1995).

Além da sua produção como resultado da dismutação de $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 é também um produto natural de várias oxidases (principalmente oxidases peroxissomais) e algumas enzimas mitocondriais. O fígado de um rato adulto pode produzir aproximadamente 80 nmol H_2O_2 /g e a sua concentração intra-hepática varia entre 10^{-7} e 10^{-9} M (Oshino e col., 1973). H_2O_2 é também gerado por granulócitos durante a fagocitose (Chance e col., 1979; Cadenas, 1995).

A reatividade química de H_2O_2 é substancialmente aumentada por duas características: primeiro, H_2O_2 pode atravessar livremente as membranas biológicas; segundo, H_2O_2 reage com íons Fe^{2+} ou $O_2^{\bullet-}$ e gera um oxidante extremamente potente, o radical hidroxila (HO^{\bullet}). Também pode reagir com hemoproteínas e originar os complexos oxoferril ($Fe^{2+}=O$) e com Cl^- na presença de mieloperoxidases e gerar $HOCl$. $HOCl$ pode reagir com $O_2^{\bullet-}$ ou Fe^{2+} e também formar o radical hidroxila (Halliwell e Gutteridge, 1999).

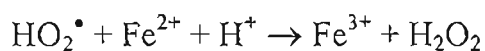
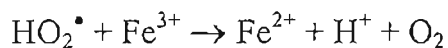
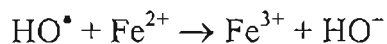
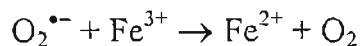
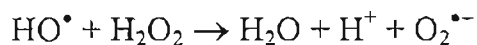
Uma mistura de peróxido de hidrogênio com Fe^{2+} , o que deve ocorrer em sistemas biológicos em certas circunstâncias, leva à formação de radicais HO^\bullet através da reação de Fenton (Walling e col., 1975):



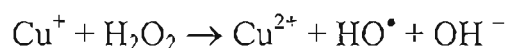
Traços de Fe^{3+} também podem reagir com H_2O_2 , mas essa reação é muito lenta em pH fisiológico (Halliwell e Gutteridge, 1999):



Outras reações possíveis são:



Sais de cobre (I) também reagem com H_2O_2 formando radicais hidroxila (Halliwell e Gutteridge, 1990):



O radical HO^\bullet reage com velocidade extremamente alta com quase todo tipo de molécula encontrada nas células vivas: açúcares, aminoácidos, fosfolipídios, nucleotídeos e ácidos orgânicos, sendo uma das espécies químicas mais reativas conhecida. Um importante princípio da química dos radicais é que a reação de um radical livre com uma espécie não-radicalar origina um radical livre diferente que pode ser mais, igualmente ou menos reativo

que o radical original. Os radicais produzidos por reação com HO^\bullet são normalmente menos reativos, uma vez que o radical HO^\bullet é altamente reativo (Halliwell e Gutteridge, 1999).

Há várias possibilidades, além do processo normal do metabolismo, de o indivíduo ficar exposto aos radicais livres. Radicais de oxigênio produzidos por fagócitos ativados têm ação microbicida, mas podem danificar os tecidos (Freeman e Crapo, 1982). Muitos agentes antracíclicos antineoplásicos, tais como adriamicina (doxorubicina), daunorrubicina (daunomicina), e outros antibióticos que contêm grupos quinóides, ou ligam metais para sua atividade, são capazes de gerar radicais de oxigênio através de ciclos redox. Alguns dos efeitos citotóxicos dessas drogas são atribuídos à habilidade de as correspondentes semiquinonas ($\text{SQ}^{\bullet-}$) reduzirem o oxigênio molecular para $\text{O}_2^{\bullet-}$, H_2O_2 e HO^\bullet (Freeman e Crapo, 1982; Luo e col., 1997). A irradiação de organismos com radiação eletromagnética (raios-x e raios- γ) e radiação particulada (elétrons, prótons, nêutrons, dêuterons e partículas α e β) gera radicais primários pela transferência de sua energia para componentes celulares, tal como a água. Esses radicais primários, incluindo e^-_{aq} , HO^\bullet e H^\bullet , podem desencadear reações secundárias com O_2 dissolvido ou com solutos celulares. Uma grande quantidade de fatores ambientais incluindo poluentes, hiperóxia, pesticidas, fumaça de cigarro, solventes orgânicos, anestésicos e hidrocarbonetos aromáticos também levam à formação de radicais livres que danificam as células. Esses xenobióticos são convertidos para espécies radicalares pelo metabolismo intracelular e processo de detoxificação (Freeman e Crapo, 1982).

1.1.4. Fontes intracelulares das espécies reativas de oxigênio

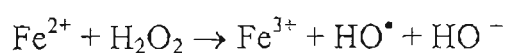
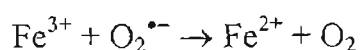
Muitos componentes celulares, tais como tióis (Baccanari, 1978), hidroquinonas (McCord e Fridovich, 1970), catecolaminas (Misra e Fridovich, 1972), flavinas (Ballou e col., 1969) e tetrahydropterinas (Fisher e Kaufman, 1973; Davis e col., 1988) podem sofrer reações de óxido-redução em pH neutro, sendo importantes contribuintes para a produção intracelular de radicais livres. O radical primário formado é $\text{O}_2^{\bullet-}$, resultante da redução do O_2 por essas moléculas (Freeman e Crapo, 1982). Além disso, tióis, ascorbato e outras moléculas redutoras podem reduzir Fe^{3+} quelado para Fe^{2+} , o qual pode sofrer autooxidação, produzindo $\text{O}_2^{\bullet-}$, ou participar da reação de Fenton (McCord e Day, 1978). A dismutação do

$O_2^{\bullet-}$ leva à formação de H_2O_2 . Portanto, processos celulares que geram $O_2^{\bullet-}$ também irão gerar H_2O_2 como produto da dismutação de $O_2^{\bullet-}$.

Várias enzimas geram radicais livres durante seu ciclo catalítico. Uma das mais estudadas é a xantina oxidase, que leva à formação de $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 durante a oxidação de hipoxantina e xantina para ácido úrico. A proporção relativa de $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 liberados do sítio ativo da enzima depende do pH, concentração de O_2 e concentração do substrato (Fridovich, 1970). A xantina oxidase humana tem, *in vivo*, função de desidrogenase dependente de NAD^+ e não produz radicais livres intermediários, pois os elétrons são transferidos para o NAD^+ e não para o O_2 . Durante sua purificação ou em condições de isquemia *in vivo* há modificação proteolítica da enzima e/ou oxidação de grupos tióis ($-SH$), o que faz com que ela seja convertida da forma desidrogenase para a forma oxidase geradora de $O_2^{\bullet-}$ (Ray e McCord, 1982). A aldeído oxidase (Rajagopalan, 1980) e as peroxidases (como a mieloperoxidase de neutrófilos) são outras enzimas que levam à formação de $O_2^{\bullet-}$ (De Groot e Littauer, 1989).

A cadeia de transporte de elétrons mitocondrial é outra fonte de $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 (Freeman e Crapo, 1982; Turrens, 1997; Nishikawa e col., 2000). Como já mencionado, a redução de O_2 para H_2O pela citocromo c oxidase mitocondrial envolve a transferência de 4 elétrons sem formação de radicais livres intermediários (Chance e col., 1979). A geração de $O_2^{\bullet-}$ pela mitocôndria ocorre quando os outros componentes da cadeia de transporte de elétrons deixam vaziar alguns elétrons diretamente para o O_2 ao transferirem a grande maioria dos mesmos para o próximo componente da cadeia (Turrens, 1997). Se o oxigênio estiver presente em concentrações que limitam a sua redução para H_2O pela citocromo oxidase, a redução elevada da cadeia respiratória e o acúmulo de cofatores reduzidos nas células podem favorecer a produção de $O_2^{\bullet-}$ em células isquêmicas após a reperfusão (Freeman e Crapo, 1982). Também a presença de concentrações elevadas de O_2 aumenta a taxa de vazamento de elétrons, uma vez que a citocromo oxidase tem sua atividade saturada sob baixas tensões de O_2 . Na presença de níveis normais de O_2 , cerca de 1 a 3% do O_2 consumido pelas mitocôndrias é reduzido para $O_2^{\bullet-}$ (Turrens, 1997). Estudos realizados com mitocôndrias isoladas de diferentes tecidos mostraram que o sítio de maior produção de $O_2^{\bullet-}$ é a região ubiquinona-citocromo b da cadeia de transporte de elétrons (Dionisi e col., 1975; Boveris e col., 1976; Boveris, 1977; Nohl e Hegner, 1978). Os dados sugeriram que a

geração de $O_2^{\bullet-}$ nessa região é devida à autoxidação da ubisemiquinona. NADH desidrogenase e dihidroorotato desidrogenase são também carregadores de elétrons responsáveis por parte da produção mitocondrial de $O_2^{\bullet-}$ (Forman e Kennedy, 1976). A dismutação de $O_2^{\bullet-}$ pela superóxido dismutase mitocondrial leva à formação de H_2O_2 e mantém a concentração de $O_2^{\bullet-}$ intramitocondrial em um nível muito baixo (8×10^{-12} M) (Freeman e Crapo, 1982). A ocorrência de $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 e um metal de transição (ex.: ferro) leva à produção de radical hidroxila pela mitocôndria, através da reação de Haber-Weiss catalisada por ferro (Prousek, 1995):



Nessa reação o ferro reduzido pelo $O_2^{\bullet-}$ reduz H_2O_2 , formando HO^{\bullet} . Outros agentes redutores, tal como ascorbato, podem também reduzir Fe^{3+} , permitindo que uma fonte de peróxidos na presença de metais de transição gere HO^{\bullet} na ausência de $O_2^{\bullet-}$ (Prousek, 1995). A mitocôndria intacta pode liberar H_2O_2 para o citoplasma (Boveris e Chance, 1973), mas libera muito pouco ou nenhum $O_2^{\bullet-}$ (Freeman e Crapo, 1982). Sendo assim, além de essas espécies reativas de oxigênio danificarem as proteínas, lipídios e DNA mitocondriais, também podem iniciar danos no citosol.

Cada mitocôndria contém até 10 moléculas circulares de DNA dupla-fita, com apenas 16 549 pares de base por molécula. O DNA mitocondrial codifica apenas treze das proteínas mitocondriais (sete subunidades do complexo I, uma proteína do complexo III, três do complexo IV, duas do complexo V), vinte e dois RNAs transportadores e dois RNAs ribossômicos. Ao contrário do DNA nuclear, não está complexado com histonas, estando, portanto, susceptível a danos. Mutações no DNA mitocondrial são acumuladas com a idade e têm sido associadas com algumas doenças neurodegenerativas, incluindo a neuropatia óptica hereditária de Leber (degeneração do nervo óptico), provocada por mutações nos genes que codificam constituintes da cadeia de transporte de elétrons, e MELAS (encefalomiopatia mitocondrial, acidose láctica e episódios do tipo apoplexia), provocada por mutações nos genes que codificam um RNA transportador para o aminoácido leucina (Cadenas e Davies, 2000).

As espécies reativas de oxigênio produzidas pelos sistemas de transporte de elétrons do retículo endoplasmático e da membrana nuclear também podem desencadear reações intra-organelas e citosólicas. No caso das espécies reativas derivadas da membrana nuclear, o DNA é particularmente susceptível aos danos (Freeman e Crapo, 1982). Essas membranas contêm os citocromos P₄₅₀ e b₅, os quais podem oxidar ácidos graxos poliinsaturados (Capdevila e col., 1981) e xenobióticos (Chignell, 1979) e reduzir O₂ (Aust e col., 1972), entre outros substratos. Essas oxidases convertem compostos não polares para derivados hidroxilados através de reações de transferência de elétrons. Os produtos mais polares são mais facilmente excretados pelos rins. Para essas reações são necessários NADH ou NADPH como cofatores. As espécies reativas são geradas quando o O₂ é reduzido para O₂^{•-} e H₂O₂, ao invés de ser adicionado ao substrato (**figura 1.1**). Os citocromos P450 induzíveis por fenobarbital (CYP2B) e etanol (CYP2E1) exibem altas taxas de redução de O₂ para O₂^{•-} e H₂O₂. Alguns substratos também facilitam essas reações (por exemplo, 1,1,1-tricloroetano e hexobarbital se ligam aos citocromos P450, mas não são facilmente oxidados e levam à liberação de espécies reativas de oxigênio) (Goepfert e col., 1995). Citocromo redutases contendo flavoproteínas, que fornecem os elétrons para as reações mediadas por citocromo P₄₅₀ e b₅, também são capazes de autooxidar e produzir O₂^{•-} e H₂O₂ (Freeman e Crapo, 1982).

Os peroxissomos, por conterem altas concentrações de oxidases (D-aminoácido oxidase, urato oxidase, L- α -hidroxiácido oxidase, acila graxo-CoA oxidase), são também importantes fontes de H₂O₂ (Masters e Holmes, 1977). Outras fontes de radicais O₂^{•-} são as oxidações da hemoglobina e mioglobina para meta-hemoglobina e metamioglobina respectivamente ($\text{heme-Fe}^{2+}-\text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2^{\bullet-} + \text{heme-Fe}^{3+}$). Cerca de 3% da hemoglobina presente nos eritrócitos humanos sofre esta oxidação todos os dias, estando essas células expostas a um constante fluxo de O₂^{•-} (Winterbourn, 1985). Há também produção de espécies reativas de oxigênio mediada pela NADPH oxidase da membrana plasmática de fagócitos. Tais espécies podem danificar os próprios fagócitos como também outras células que estejam próximas, apesar de serem importantes para a ação microbicida dos mesmos (Freeman e Crapo, 1982).

Um sítio crítico para a ocorrência de reações envolvendo radicais livres é a membrana plasmática. Isso porque os radicais livres gerados extracelularmente precisam

cruzar a membrana antes de reagir com outros componentes celulares, podendo assim desencadear reações na mesma. Além disso, os ácidos graxos poliinsaturados presentes nas membranas e as proteínas transmembranares contendo aminoácidos oxidáveis são susceptíveis ao ataque dos radicais livres. O aumento da permeabilidade da membrana, provocado pela peroxidação lipídica ou oxidação de proteínas estruturalmente importantes, pode alterar os gradientes de íons através da membrana, levar à perda de funções secretórias e inibição de processos metabólicos celulares integrados (Freeman e Crapo, 1982; Grijalba e col., 1999).

Como mencionado anteriormente, o peróxido de hidrogênio pode cruzar livremente as membranas, enquanto que $O_2^{\bullet-}$ cruza as membranas via canais aniônicos (Kellogg e Fridovich, 1977). A superfície celular polianiônica atrai uma grande concentração de íons positivos, em sua maior parte íons H^+ . Isso faz com que seja criado um microambiente com duas a três unidades de pH abaixo do pH do fluido circundante e favorece o surgimento da forma protonada do $O_2^{\bullet-}$, o radical peridroxil (HO_2^{\bullet}). Este é um oxidante mais forte que $O_2^{\bullet-}$ e particiona melhor nos lipídios e no centro hidrofóbico das proteínas, exercendo efeitos mais tóxicos. A membrana celular pode, portanto, servir como alvo dos radicais livres reativos e também modificar as espécies radicalares para formas mais permeáveis e reativas (Freeman e Crapo, 1982).

1.2. Estresse Oxidativo e Carcinogênese

1.2.1. O ciclo celular

As células, para iniciarem o processo de divisão, precisam receber sinais de crescimento. Alguns exemplos de fatores de crescimento responsáveis por essa sinalização são o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), o fator de crescimento epidérmico (EGF), o fator de crescimento do tipo insulina 1 (IGF-1), o fator de crescimento de transformação β (TGF- β), o fator de crescimento de fibroblastos (FGF), os fatores de crescimento de nervos (NGFs), eritropoietina e interleucinas (IL). Alguns desses fatores atuam em uma grande variedade de células (PDGF, FGF, EGF, IGF-1, TGF- β), enquanto outros são mais seletivos (IL-2 age em linfócitos T, NGFs em neurônios, eritropoietina na

medula óssea e em células precursoras de eritrócitos, IL-3 em células da medula óssea). A ação desses fatores se dá através da sua ligação a receptores presentes nas células alvo, o que ativa mecanismos de sinalização intracelular, normalmente cascatas de proteínas quinases, que alteram a expressão de certos genes. Existem genes que respondem rapidamente (*c-fos* e *c-myc*, por exemplo) e estão envolvidos na ativação de outros genes de resposta tardia. Células em meio de cultura suplementado com soro como fonte de fatores de crescimento irão crescer até que uma monocamada confluyente seja obtida, pois, em geral, a proliferação é inibida quando as células entram em contato umas com as outras. Tanto moléculas de adesão celular, como proteínas de junções comunicantes (conexinas, por exemplo) estão envolvidas nessa “inibição por contato” (Touw e col., 2000; Gerwins e col., 2000; Werner e Le Roith, 2000; Chisolm e Chai, 2000).

Durante o processo de divisão celular, o DNA é cuidadosamente replicado e os cromossomos são igualmente separados em duas células filhas geneticamente idênticas. O ciclo celular pode ser dividido em duas fases distintas: a intérfase, na qual ocorre a replicação do DNA, e a mitose, na qual ocorre a divisão celular propriamente dita. A intérfase é subdividida em três fases: G_1 , S e G_2 , e a mitose se subdivide em prófase, metáfase, anáfase e telófase. Após a replicação do DNA na fase S da intérfase e passagem da célula pelo intervalo G_2 , ocorre, no início da mitose, a condensação da cromatina em cromossomos que se tornam visíveis. Em seguida há formação do fuso mitótico a partir de microtúbulos celulares, o qual dirige a correta separação dos cromossomos, e a membrana nuclear se rompe. Após o movimento dos cromossomos para os pólos do fuso, os núcleos são refeitos e a célula, então, se divide em duas. Na maioria das células a mitose tem duração aproximada de 60 minutos e o tempo total do ciclo celular é de aproximadamente 24 horas. O intervalo entre o término da mitose e o início de um novo período de replicação do DNA recebe o nome de fase G_1 . As fases G_1 e G_2 constituem períodos nos quais as células sintetizam outros componentes importantes para a sua função. As células em G_1 podem não entrar na fase S de replicação do DNA e, neste caso, param o seu avanço ao longo do ciclo celular, sendo dito que elas se encontram no estado latente G_0 . A remoção dos fatores de crescimento de células que estejam se proliferando faz com que elas entrem no estado G_0 . Tais células não expressam os genes de resposta precoce ou tardia (Boilly e col., 2000).

Células normais de mamíferos contêm genes (proto-oncogenes: *c-fos*, *c-myc*, *c-jun*, *K-ras*, etc.) que estão usualmente relacionados com o crescimento celular. Eles codificam fatores de transcrição, fatores de crescimento, receptores para esses fatores, proteínas envolvidas na transferência do sinal de crescimento dos receptores da superfície celular para o núcleo, ou proteínas envolvidas no controle da morte celular. Mutações em proto-oncogenes podem levar a um aumento da proliferação celular e ao desenvolvimento de tumores. Muitas proteínas estão envolvidas no controle do ciclo celular. Um grupo importante é o das proteínas quinases dependentes de ciclina, cuja função de fosforilar determinados alvos celulares é regulada por uma outra classe de proteínas, as ciclinas. Estas, por sua vez, têm os seus níveis regulados por um complexo de protease multicatalítica denominado proteassomo, o qual degrada proteínas ligadas a moléculas de ubiquitina (Volin e Koch, 2000).

Existem vários pontos de checagem ao longo do ciclo celular pelos quais as células só passam se tiverem cumprido certas exigências, como, por exemplo, completado a replicação do DNA ou atingido um tamanho mínimo. Esse tipo de controle é essencial para atrasar a mitose até que a replicação do DNA tenha se completado na fase S ou tenha sido efetuado o reparo de possíveis danos a essa molécula. Os genes envolvidos no bloqueio da divisão celular são chamados genes supressores de tumor. Um gene importante pertencente a essa classe é o p53. A proteína p53 é um fator de transcrição que age no sentido de bloquear a divisão celular. O gene p53 é ativado em resposta a danos ao DNA ou alterações anormais em grupos de nucleotídeos precursores. Seu produto aumenta a transcrição de vários outros genes, incluindo p21 (o qual codifica um inibidor da ciclina quinase) e *GADD45* (relacionado com a parada de crescimento na presença de danos ao DNA). A expressão do gene p53 é aumentada em células submetidas a estresse causador de danos ao DNA (raios x, raios γ e luz UV, por exemplo) e a replicação do DNA pára até que os danos sejam reparados. O estímulo do gene p53 também pode desencadear apoptose. Se ambos os alelos do gene p53 forem inativados, as células entram no processo de divisão com o DNA danificado. Mutações nos genes p53 são lesões comuns em cânceres humanos, sendo encontradas em mais que 50% dos casos (Diamantis, 1994).

1.2.2. Carcinogênese

O processo de conversão de uma célula normal em uma célula maligna é chamado carcinogênese e os agentes indutores desse processo são denominados carcinógenos. A carcinogênese é um processo longo que pode ser dividido em três estágios: a iniciação, a promoção e a progressão. Frequentemente, após a alteração inicial, aparecem novas populações celulares que representam a evolução de células normais para células pré-neoplásicas, pré-malignas e malignas (Sun, 1990; Di Giovanni, 1992).

A iniciação é causada por uma alteração irreversível do DNA, como por exemplo a reação desta molécula com carcinógenos. Assim, mecanismos de detoxificação de carcinógenos, reparo do DNA e eliminação das células que tenham DNA modificado (por apoptose, por exemplo) são importantes para a proteção contra a iniciação do câncer. Para que a iniciação ocorra, é necessário que haja não só a modificação do DNA, mas também a sua replicação e a proliferação celular para que a mutação inicial possa se fixar. A maioria dos cânceres humanos são originários de células epiteliais (carcinoma), pois as mesmas estão expostas aos carcinógenos (presentes no ar ou nos alimentos, por exemplo) e se proliferam rapidamente (Brown e col., 1994).

A iniciação é seguida pela promoção, a qual envolve a seleção e expansão das células iniciadas, podendo levar ao desenvolvimento de um tumor benigno. Durante a promoção do tumor, o material genético alterado da célula iniciada altera a expressão dos genes que regulam a diferenciação e o crescimento celular. Quando administrados em altas doses, muitos carcinógenos são tanto iniciadores como promotores. Entretanto, uma dose baixa não indutora de tumor se torna efetiva se administrada juntamente com certas substâncias não carcinogênicas conhecidas como promotoras de tumor. Exemplos de promotores de tumor são o acetato de forbol miristato (PMA), um composto normalmente usado para induzir a explosão respiratória em células fagocíticas, e o 12-*O*-tetradecanoil-forbol-13-acetato (TPA). Muitos promotores de tumor, incluindo o PMA, são potentes indutores de inflamação, mas ainda não há um princípio que explique a ação de todos os agentes promotores. Eles podem levar a alterações reversíveis da proliferação celular e expressão fenotípica. A remoção do promotor pode resultar em retorno do tecido para um estado quase normal, embora ainda esteja iniciado (Kensler e Taffe, 1986; Wei e col., 1993; Nair e col., 2000).

O estágio final da carcinogênese consiste na progressão de uma lesão benigna ou pré-maligna para uma maligna, o que envolve alterações adicionais no DNA (por exemplo, nos genes supressores de tumor). A conversão de tumores benignos para malignos é acompanhada por perda no controle do crescimento, invasão de tecidos, metástase e instabilidade genética aumentada. Alguns exemplos são a progressão de pólipos benignos do cólon para adenocarcinoma e de nódulos hepáticos benignos para hepatoma (Sun, 1990).

1.2.3. Danos em DNA induzidos por carcinógenos ocupacionais e ambientais

É muito antiga a observação de que a exposição dos seres humanos a determinadas substâncias presentes no meio ambiente ou no seu local de trabalho pode levar ao desenvolvimento de câncer. No final do século XVIII, o médico e cirurgião inglês Percival Pott já relatava que a ocorrência de câncer de escroto em limpadores de chaminés poderia estar relacionada com a deposição de fuligem e alcatrão nas suas pregas escrotais. Posteriormente foi mostrado que a aplicação repetida de alcatrão de hulha na pele de animais levava ao eventual desenvolvimento de tumores malignos no sítio da aplicação. Hoje sabemos que o alcatrão de hulha contém hidrocarbonetos aromáticos carcinogênicos, tal como benzo[*a*]pireno. No século XIX, o médico alemão Rehn percebeu uma associação entre a exposição de pintores a aminas aromáticas, tal como benzidina, e o desenvolvimento de câncer na bexiga. Somente após 1930 foi demonstrada a associação entre a exposição de animais a diversas aminas aromáticas e o desenvolvimento desse tipo de câncer. Hoje são conhecidas várias substâncias químicas carcinogênicas (Otteneider e Lutz, 1999).

Usualmente é necessária a exposição repetida aos carcinógenos para que haja o desenvolvimento de tumores malignos. Esse desenvolvimento ocorre muito lentamente devido à natureza complexa da carcinogênese, a qual acontece em várias etapas. Muitos carcinógenos, por exemplo o benzo[*a*]pireno, são chamados carcinógenos completos, por serem tanto iniciadores como promotores da carcinogênese. Outros são apenas iniciadores (carcinógenos incompletos) e só levam a uma transformação maligna se, subsequentemente, houver a promoção. Entretanto, o comportamento de um carcinógeno depende da sua dose, da espécie na qual está sendo testado e da forma com que está sendo administrado. Por exemplo, o carbamato de etila (uretano) age como um carcinógeno completo em pulmão de

fetos de animais e como um carcinógeno incompleto em pele de camundongos (Nair e col., 2000).

Em geral, os carcinógenos são substâncias eletrofilicas ou são metabolizados para as mesmas durante o seu processo de detoxificação. Tais substâncias são atraídas por moléculas com alta densidade eletrônica, como é o caso das bases do DNA, às quais acabam se ligando e levando à formação de adutos (Bartsch, 1996). A base do DNA mais comumente atacada é a guanina, mas já foram relatados adutos formados com todas as bases (Dipple, 1995). Sendo formados no DNA através de mecanismos químicos específicos, tais adutos podem levar a mutações, por exemplo em proto-oncogenes ou em genes supressores de tumor, e iniciar o processo de carcinogênese (Lehman e Harris, 1994; Kinzler e Vogelstein, 1996). Essa seqüência de eventos que leva à tumorigênese foi esclarecida no decorrer dos últimos 20 anos (Balmain e Harris, 2000).

A elucidação das estruturas químicas de vários adutos formados com DNA foi de fundamental importância para os avanços feitos nesta área nas últimas duas décadas. Adutos formados tanto em reações *in vitro* como em sistemas experimentais de modelos biológicos foram caracterizados através de técnicas como espectrometria de massas, fluorescência e ressonância magnética nuclear (RMN) (Weston, 1993; Hemminki, 1993; Hemminki e col., 1994; Dipple, 1995). Além da estrutura química, foram feitas também determinações de estereoespecificidade e estrutura tridimensional (Geacintov e col., 1997; Patel e col., 1998).

Na busca de uma correlação entre os níveis de adutos formados em DNA e a incidência de tumores, foi feito um estudo no qual foram compilados dados disponíveis a respeito dos níveis desses adutos após exposição crônica de ratos ou camundongos aos carcinógenos. Entre os diferentes carcinógenos investigados, foi observada grande variação nos níveis de adutos que resultavam em 50% de incidência de tumor (53–5543 adutos/ 10^8 nucleotídeos), mostrando a existência de diferença na capacidade de os vários adutos de DNA levarem a mutações críticas (Otteneder e Lutz, 1999). Os níveis de adutos em DNA são um reflexo das velocidades de formação e remoção dos mesmos, o que depende da ativação do carcinógeno, da eficiência de reparo das lesões, da estabilidade do aduto e da velocidade de renovação do tecido (Poirier e col., 2000). Outros estudos também mostraram associações entre a formação de adutos em DNA e mutagênese e tumorigênese (Poirier e Beland, 1992; Hemminki, 1993; Verna e col., 1996; Culp e col., 1998), enquanto reduções dos níveis dos adutos foram associadas com quimioprevenção (Kensler e col., 1996). Os

resultados obtidos nesses estudos mostraram que: a formação de adutos em DNA é tipicamente linear nas doses mais baixas de carcinógenos; esses adutos estão presentes na ausência de tumores, mas os tumores não se desenvolvem na ausência dos adutos; e outros eventos tecido-específicos (por exemplo, proliferação celular) são necessários para que os tumores apareçam (Poirier e Beland, 1992; Verna e col., 1996; Culp e col., 1998).

Além da formação de adutos de carcinógenos ou produtos da metabolização dos mesmos com bases do DNA, é frequentemente observado aumento dos níveis de 7,8-dihidro-8-oxo-2'-desoxiguanosina (8-oxodG) nas lesões pré-neoplásicas e neoplásicas de tecidos tratados com carcinógenos (por exemplo, benzeno, benzo[α]pireno, bromato de potássio, nitrilotriacetato de ferro, fumaça de cigarro e aflatoxina). Essa observação é indicativa de que um estresse oxidativo desencadeado pelos carcinógenos esteja também envolvido na carcinogênese. Como os citocromos P450 podem gerar espécies reativas de oxigênio, a sua indução pelos carcinógenos pode contribuir para o estresse oxidativo. Também uma redução na velocidade de reparo de 8-oxodG pode explicar o seu aumento (Novak e Woodcroft, 2000).

Muitos estudos têm sido feitos no sentido de identificar os espectros de mutação em uma variedade de genes alvos (*ras*, p53 ou transgenes como *lacI*) como consequência da exposição a carcinógenos particulares *in vivo* (Gorelick e col., 1995; Wang e col., 1998a; Ross e Nesnow, 1999; Sills e col., 1999). Se o mecanismo de mutagênese de um carcinógeno particular pode ser suficientemente bem definido de modo a ser usado como uma assinatura para aquela classe de agente, então surge a possibilidade de usar essa assinatura molecular para estabelecer uma correlação entre eventos genéticos particulares nos tumores e a exposição ao carcinógeno (Balmain e Harris, 2000). Por exemplo, tumores mamários induzidos por exposição a metilnitrosouréia (MNU) têm mutações G→A no codon 12 do gene H-*ras*, compatível com o mecanismo de ação proposto para carcinógenos metilantes (Sukumar e col., 1983; Zarbl e col., 1985). A mesma mutação não foi detectada em tumores similares induzidos por exposição a dimetilbenzantraceno (DMBA), sugerindo que a mutação foi diretamente causada por exposição ao carcinógeno (Zarbl e col., 1985). Tumores de pele de camundongo iniciados com DMBA mostraram predominantemente mutações no resíduo de adenosina do codon 61 (CAA) do gene H-*ras*, resultando em conversão para timidina (CTA) (Quintanilla e col., 1986; Bizub e col., 1986). A mesma mutação não foi observada em tumores induzidos pelos agentes alquilantes MNU ou *N*-

metil-*N'*-nitro-*N*-nitroso-guanidina, os quais mostraram as mutações G→A esperadas no mesmo gene alvo (Brown e col., 1990). O mecanismo de ação do DMBA foi entendido graças à observação de que o diol epóxido resultante da ativação metabólica do DMBA forma adutos primariamente com resíduos de adenosina (Dipple e col., 1983; Cheng e col., 1988). Esta observação pode explicar a alta frequência de mutações nos resíduos de adenosina do codon 61 (CAA) do gene *H-ras* em tumores induzidos por DMBA.

Estudos epidemiológicos moleculares com o potencial de elucidar as relações entre formação de adutos em DNA e risco de câncer em humanos provavelmente serão muito aplicados no futuro e poderão gerar hipóteses a respeito dos mecanismos biológicos básicos fundamentais que levam ao desenvolvimento de tumores. Grandes variações entre os indivíduos no que se refere à formação de adutos carcinógeno-DNA sugerem que determinantes genéticos do metabolismo de carcinógenos, reparo do DNA e controle do ciclo celular podem contribuir para as conseqüências dos danos ao DNA (Poirier e col., 2000).

1.2.4. Danos basais em DNA: I. Oxidação

Um grande avanço na área da carcinogênese ao longo dos últimos 20 anos foi a observação de que danos em DNA e mutações ocorrem mesmo na ausência de exposição a carcinógenos genotóxicos através de um tratamento específico ou um hábito particular. Os agentes que levam a esses danos incluem produtos normais do metabolismo celular e fontes exógenas inevitáveis, tais como radiação UV, radiação ionizante, radioisótopos de ocorrência natural e numerosas substâncias químicas genotóxicas presentes naturalmente ou como contaminantes na dieta e no ar (Ames, 1989; Gupta e Lutz, 1999). O desenvolvimento de métodos analíticos suficientemente sensíveis para a detecção dos danos basais ao DNA foi de fundamental importância para que se pudesse avaliar a contribuição desses danos para a carcinogênese (Gupta e col., 1982; Randerath e col., 1986; Dizdaroglu e Gajewski, 1990; Fedtke e col., 1990a,b; Chaudhary e col., 1994).

Existem várias fontes endógenas de danos ao DNA: espécies reativas de oxigênio, produtos da peroxidação lipídica, agentes alquilantes, estrógenos, espécies

reativas de nitrogênio, agentes clorinantes e certos intermediários de algumas vias metabólicas (Burcham, 1999).

Muitos dos danos endógenos observados no DNA correspondem a oxidações de bases (figura 1.4). Entretanto, os níveis detectados de danos oxidativos no DNA de células normais variam de acordo com a metodologia utilizada (HPLC/EC, GC/MS ou ^{32}P -*postlabeling*) e também entre laboratórios, o que tem sido motivo para grandes debates nesta área (Ravanat e col., 1995). Níveis de 8-oxoG e 8-oxodG relatados em tecidos humanos variam de 1 aduto em 10^7 nucleotídeos a 1 aduto em 10^3 nucleotídeos (Cadet e col., 1997) e os níveis basais nos mesmos tecidos relatados por diferentes laboratórios variam em ordens de magnitude (Beckman e Ames, 1999). Esforços têm sido feitos no sentido de identificar e controlar as fontes de erros dessas medidas (Ravanat e col., 1995; Douki e col., 1996; Cadet e col., 1997; Jenner e col., 1998). Mesmo assim, fazendo uma comparação com os níveis de adutos detectados em células expostas a carcinógenos conhecidos (por exemplo, o nível de adutos de benzo[α]pireno em DNA de carcinoma pulmonar de fumantes varia de 65 a 533 por 10^8 nucleotídeos), esses níveis de danos oxidativos são altos e podem ser importantes contribuintes para a etiologia de muitos cânceres humanos (Totter, 1980; Loft e Poulsen, 1996).

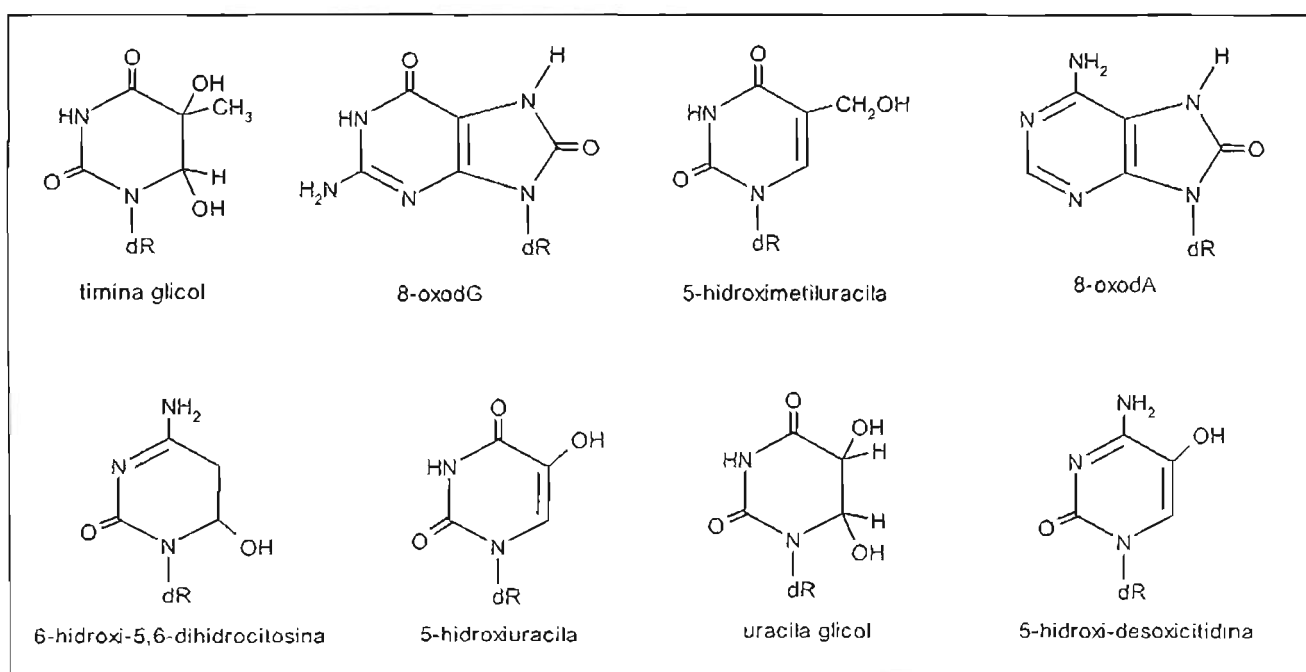


Figura 1.4: Algumas bases oxidadas encontradas em DNA.

A identidade dos oxidantes responsáveis pela oxidação de bases do DNA ainda é matéria de investigação. O radical HO^\bullet é extremamente reativo, podendo se adicionar a bases do DNA ou abstrair átomos de hidrogênio das mesmas e originar muitos dos produtos observados no genoma (Ward, 1988). É provável que o radical HO^\bullet desempenhe um papel na oxidação endógena do DNA, mas a sua formação deve ser imediatamente adjacente à molécula de ácido nucleico para que os danos sejam gerados. Neste caso, H_2O_2 seria a espécie que se difundiria até o DNA, onde reagiria com íons metálicos gerando o oxidante (Pryor, 1986; Henle e Linn, 1997; Cadet e col., 1999; Meneghini e col., 1995; Meneghini, 1997).

Outro oxidante que pode gerar muitos dos produtos de oxidação observados no DNA é o peroxinitrito (ONOO^-), o qual pode se difundir intracelularmente e ser capturado por algumas células via canais aniônicos (Beckman e col., 1990; Koppenol e col., 1992; Radi, 1998). A forma protonada do peroxinitrito (ácido peroxinitroso, ONOOH ; $\text{pK}_a = 6.8$) é um oxidante extremamente reativo capaz de oxidar o DNA independentemente da sua habilidade em gerar HO^\bullet (Kissner e col., 1997; Richeson e col., 1998). Peroxinitrito também pode reagir com uma molécula de CO_2 e levar à formação de nitrosoperoxicarbonato (ONOOCO_2^-). Radicais carbonato resultantes de ONOOCO_2^- podem contribuir para os danos celulares observados na presença de peroxinitrito (Uppu e col., 1996a; Lyman e col., 1996; Lyman e Hurst, 1998; Santos e col., 2000). O padrão de produtos gerados pela oxidação do DNA por peroxinitrito é complexo e reflete a diversidade de bases oxidadas detectadas nos tecidos (Burney e col., 1999). Uma observação importante é a de que o peroxinitrito é bastante reativo com 8-oxodG (pelo menos 1000 vezes mais em relação à reatividade com 2'-desoxiguanosina) e, à medida em que o nível dessa base oxidada aumenta, ela pode competir com as bases não modificadas no DNA pela reação com peroxinitrito, levando à formação de outros produtos (Uppu e col., 1996b; Burney e col., 1999; Tretyakova e col., 2000). Tal fato faz com que 8-oxodG não seja sempre um bom marcador para danos ao DNA induzidos por estresse oxidativo. $^\bullet\text{NO}$ e $\text{O}_2^{\bullet-}$ são produzidos simultaneamente nos macrófagos e, portanto, níveis elevados de peroxinitrito serão produzidos em células inflamatórias ativadas. Condições patofisiológicas de infecções crônicas e inflamações são conhecidos fatores de risco para vários cânceres humanos e uma possível ligação entre inflamação e a indução de mutações é a habilidade de o peroxinitrito

oxidar o DNA (De Flora e col., 1996). Recentemente foi demonstrada uma associação entre a ocorrência de transversões G→T no gene p53 de câncer colorretal humano e o nível de expressão da forma induzível da óxido nítrico sintase (Ambs e col., 1999).

O produto de oxidação do DNA mais extensivamente estudado, devido à facilidade com que pode ser detectado, é a 8-oxodG (Floyd e col., 1986). Suas propriedades biológicas foram amplamente investigadas, tendo sido verificado que é uma lesão mutagênica em bactérias e células de mamífero, levando principalmente a transversões G→T (Shibutani e col., 1991; Cheng e col., 1992; Moriya, 1993; Le Page e col., 1995). Transversões G→T são muito encontradas em genes supressores de tumor e protooncogenes mutados (Hussain e Harris, 1998). Outros estudos de mutagênese sítio-específica mostraram que 8-oxo-adenina, timina glicol, 5-hidroxiuracila, uracila glicol e 5-hidroxi-desoxicitidina também são lesões mutagênicas (Wang e col., 1998b; Kreutzer e Essigmann, 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. Níveis aumentados de vários produtos resultantes de danos oxidativos ao DNA foram encontrados em tecidos de câncer de mama em relação aos respectivos níveis presentes no DNA de áreas adjacentes. Aumentos semelhantes foram observados em cânceres de pulmão, cólon, estômago, ovário e cérebro (Malins e col., 1996). Foi também observado que na hiperplasia prostática benigna, a qual freqüentemente se relaciona com o posterior desenvolvimento de câncer de próstata, há níveis elevados de bases oxidadas no DNA (Olinski e col., 1995).

Uma descoberta crucial que sustenta a hipótese de que danos oxidativos no DNA são importantes contribuintes para a ocorrência de mutações espontâneas foi a de que existe um sistema elaborado de reparo em *Escherichia coli* para reduzir a mutagênese devida a 8-oxodG. Este sistema inclui uma glicosilase para remover 8-oxoguanina do DNA (glicosilase FAPY/produto do gene *mutM*), uma glicosilase que remove adenina no pareamento errado 8-oxodG:dA (produto do gene *mutY*) e uma hidrolase (8-oxodGTPase/produto do gene *mutT*) para eliminar 8-oxodGTP da reserva de nucleotídeos (Tchou e col., 1991; Michaels e col., 1992; Mo e col., 1992). Linhagens de *E. coli* com mutações em qualquer um desses genes apresentam não só aumento dos níveis basais de 8-oxodG, como também aumento da freqüência de mutações espontâneas, principalmente transversões G→T (Michaels e Miller,

1992; Tajiri e col., 1995; Glassner e col., 1998). Existem também glicosilases para remoção de outras bases oxidadas do DNA (Singer e Hang, 1997), sendo que as endonucleases III e VIII de *E.coli* participam da remoção de diversas pirimidinas oxidadas, tal como timina glicol, 6-hidroxi-5,6-dihidrocitosina e uracila glicol (Katcher e Wallace, 1983; Breimer e Lindahl, 1984; Singer e Hang, 1997; Pural e col., 1998). Homólogos dessas enzimas de reparo estão presentes em organismos eucariontes (Demple e Harrison, 1994; Girard e Boiteux, 1997; Mitra e col., 1997).

As medidas dos níveis basais de danos oxidativos no DNA, a evidência molecular a respeito das propriedades mutagênicas dessas lesões e a verificação de que dietas ricas em antioxidantes são anticarcinogênicas sugerem fortemente que danos genéticos induzidos por oxidantes endógenos contribuem para a carcinogênese (Potter e Steinmetz, 1996; Loft e Poulsen, 1996; Tanaka, 1997).

1.2.5. Peroxidação lipídica e danos em DNA

As espécies reativas de oxigênio e nitrogênio podem danificar não só o DNA, mas também outros componentes celulares. Devido à sua abundância nas células e susceptibilidade à oxidação pela presença de grupos metilênicos entre duplas ligações (figura 1.5), os ácidos graxos poliinsaturados são, para os oxidantes, alvos mais prováveis do que o DNA (Cerutti, 1985; Porter, 1986; Dix e Aikens, 1993; Wagner e col., 1994). É estimado que aproximadamente 60 moléculas de ácido linoleico (18:2 $\Delta^{9,12}$) e 200 de ácido araquidônico (20:4 $\Delta^{5,8,11,14}$) (os ácidos graxos poliinsaturados mais abundantes em nossas células) são consumidas por oxidante que reage com a bicamada lipídica (Howard, 1973). Como essa oxidação desencadeia uma cascata autocatalítica que gera numerosas substâncias genotóxicas, tais danos aos lipídios têm grandes implicações para a integridade do DNA.

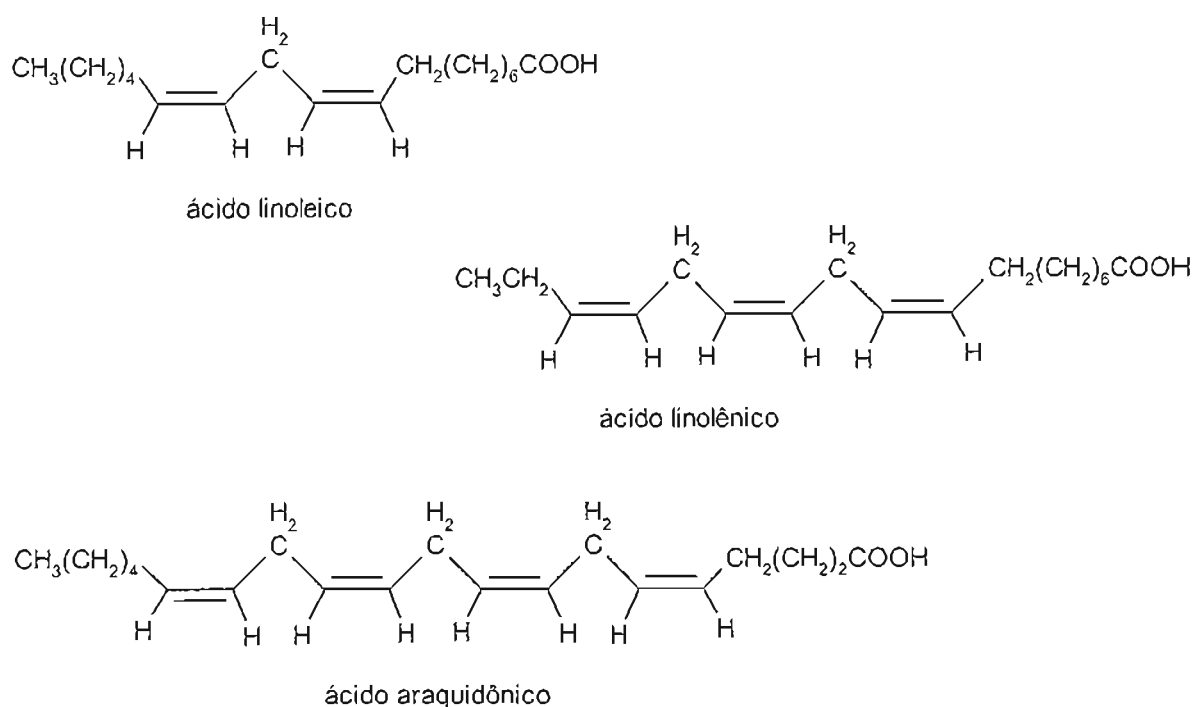


Figura 1.5: Estruturas de alguns ácidos graxos poliinsaturados presentes nas membranas biológicas.

A peroxidação lipídica se inicia pelo ataque à bicamada lipídica de qualquer espécie suficientemente reativa para abstrair um átomo de hidrogênio bis-aliílico de um ácido graxo poliinsaturado. Foi verificado que espécies tais como HO^\bullet , HO_2^\bullet , $^\bullet\text{NO}_2$, RO^\bullet , RO_2^\bullet podem realizar essa oxidação (Barber e Thomas, 1978; Pryor e Lightsey, 1981; Aikens e Dix, 1991). Após iniciado, o processo se torna autocatalítico, levando à formação de hidroperóxidos e produtos secundários. As **figuras 1.6** e **1.7** resumem as três fases do processo. É importante mencionar que a oxidação enzimática do ácido araquidônico, que ocorre durante a síntese de eicosanóides, é uma importante fonte de espécies reativas de oxigênio. Além dos eicosanóides envolvidos na sinalização intra- e intercelular, radicais de oxigênio e hidroperóxidos lipídicos são gerados durante as reações catalisadas por ciclooxigenases ou lipoxigenases (Mamett, 1994).

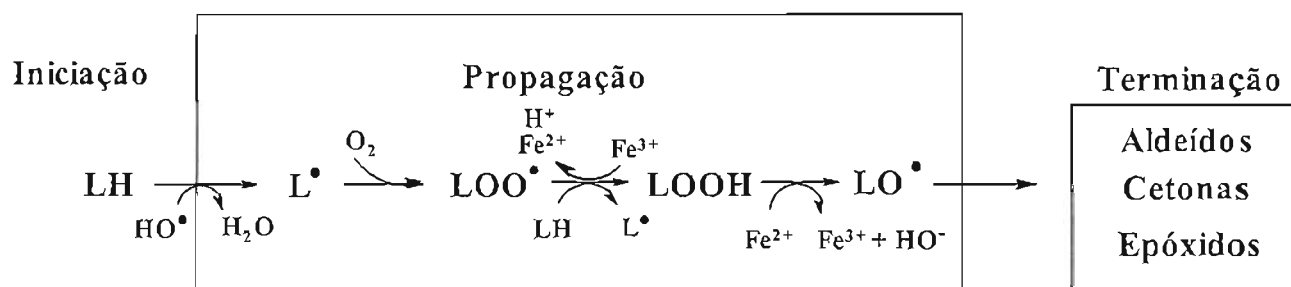


Figura 1.6: Representação geral das fases da peroxidação lipídica. (esquema modificado de Vaca e col., 1988).

Após a abstração do átomo de hidrogênio do ácido graxo poliinsaturado (LH) levando à formação de um radical lipídico centrado no carbono (L^\bullet), este é estabilizado por um rearranjo molecular, adquirindo a estrutura de dieno conjugado. A adição extremamente rápida de uma molécula de oxigênio ao radical lipídico leva à formação do radical peróxido (LOO^\bullet). Este é capaz de reagir com outro ácido graxo poliinsaturado, iniciando uma nova cadeia de oxidação a partir da formação de outro radical lipídico (L^\bullet) (fase de propagação). O radical LOO^\bullet se combina com o átomo de hidrogênio abstraído e forma um hidroperóxido lipídico (LOOH) (Vaca e col., 1988). Alternativamente, os radicais LOO^\bullet podem formar peróxidos cíclicos (**figura 1.7**) pelo ataque a uma dupla ligação na mesma cadeia. Esses peróxidos cíclicos também podem propagar a peroxidação lipídica e, no caso da oxidação dos ácidos araquidônico, docosahexaenóico ($22:6 \Delta^{4,7,10,13,16,19}$) e eicosapentaenóico ($20:5 \Delta^{5,8,11,14,17}$), podem levar à formação de isoprostanos (Gardner, 1989). Os isoprostanos são uma classe de produtos tóxicos isômeros dos leucotrienos e prostaglandinas e são utilizados como biomarcadores de peroxidação lipídica. Estão presentes em plasma e urina de seres humanos saudáveis, o que indica que a peroxidação lipídica é um processo que ocorre continuamente (Awad e col., 1993; Morrow e Roberts, 1996; Roberts e Morrow, 1997; Basu, 1998; Lawson e col., 1999).

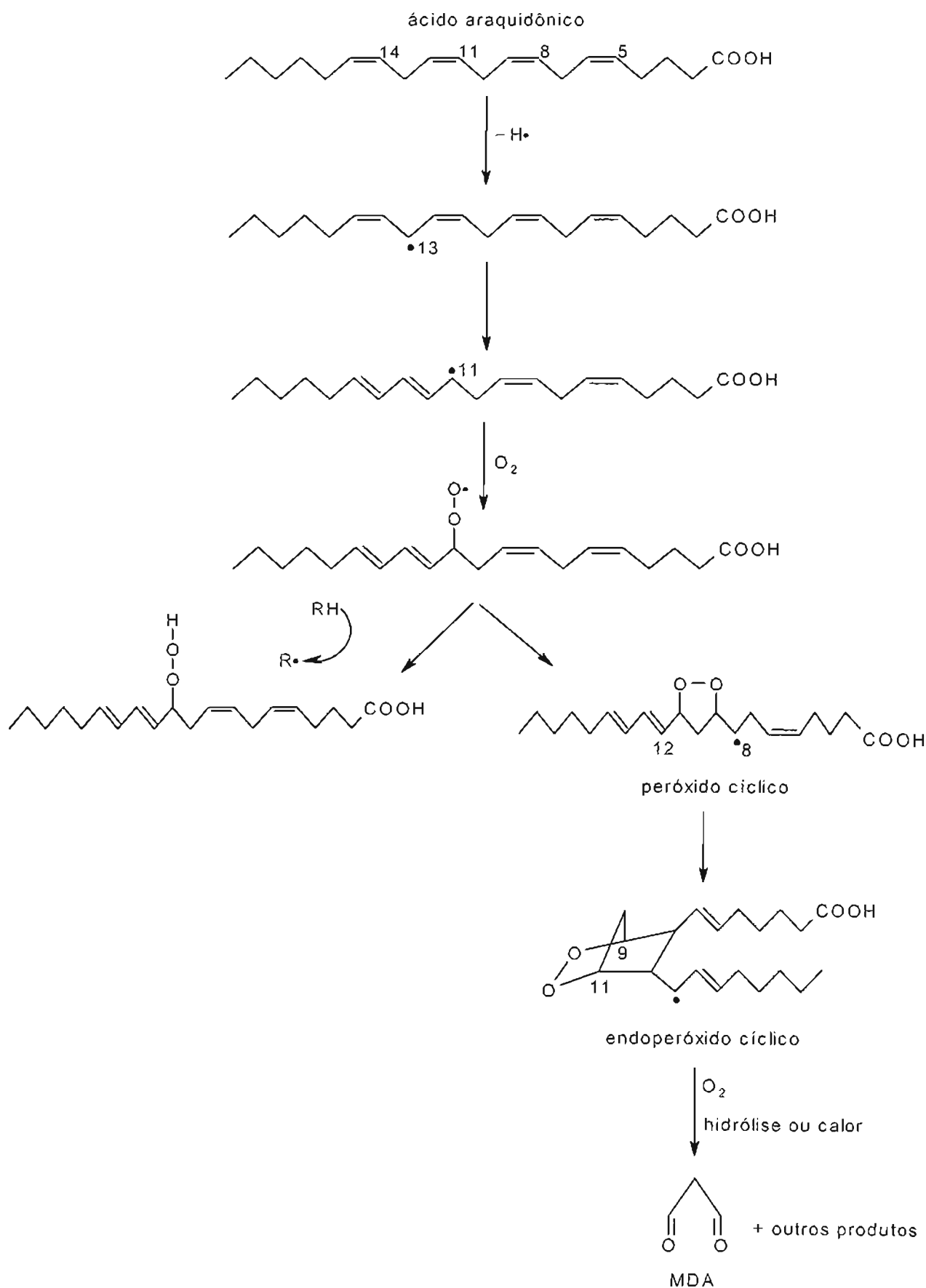
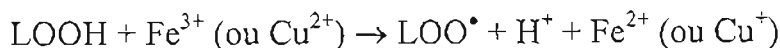
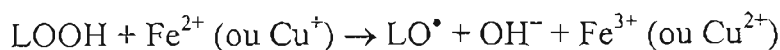


Figura 1.7: Mecanismo proposto para formação de hidroperóxidos lipídicos e peróxidos cíclicos a partir do ácido araquidônico (Pryor e Stanley, 1975).

Os hidroperóxidos lipídicos são instáveis na presença de metais de transição, tais como ferro ou cobre, e formam radicais alcóxil (LO^\bullet) e peróxil (LOO^\bullet) (Halliwell e Gutteridge, 1999):



A reação de íons Fe^{2+} com hidroperóxidos lipídicos é frequentemente mais rápida que a reação com H_2O_2 (k_2 para $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2$ é aproximadamente $76 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$; k_2 para $\text{LOOH} + \text{Fe}^{2+}$ é aproximadamente $1.5 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$). A reação dos hidroperóxidos com Fe^{2+} é mais rápida que a sua reação com Fe^{3+} . Portanto, a velocidade de propagação da peroxidação lipídica na presença de Fe^{3+} *in vitro* pode ser aumentada pela adição de agentes redutores em baixas concentrações, tal como ascorbato, de modo a ser atingida uma razão ótima $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ que favoreça a propagação (Minotti e Aust, 1992). Os íons cobre são poderosos promotores da decomposição de peróxidos (Gutteridge e Stocks, 1981).

Os radicais alcóxil podem abstrair átomos de hidrogênio de outros ácidos graxos poliinsaturados e hidroperóxidos lipídicos, formando outros radicais lipídicos (L^\bullet) e radicais LOO^\bullet , respectivamente. Assim, contribuem também para a propagação da peroxidação lipídica.

Além de contribuírem para a propagação da peroxidação lipídica, são também de interesse as reações dos radicais LOO^\bullet com outras macromoléculas (Viner e col., 1997; Garner e col., 1998). Seu tempo de vida é de aproximadamente 5 a 10 segundos e, uma vez formados nas membranas nucleares, o DNA passa a ser um alvo importante (Greenley e Davies, 1994). Foi verificado, a partir da replicação em células humanas de vetores previamente modificados por LOO^\bullet , que esses radicais induzem predominantemente substituições nos pares de base G:C, sendo que transversões G→T foram as principais substituições observadas (Burcham e Harkin, 1999). Não são conhecidas as lesões pró-mutagênicas que levam a essas substituições (Harkin e Burcham, 1997; Valentine e col., 1998; Burcham, 1999) e o esclarecimento dos eventos químicos que estão por trás dos efeitos mutagênicos dos radicais LOO^\bullet é de fundamental importância para a avaliação da

contribuição dessas lesões para o conjunto de danos basais presentes no DNA (Burcham, 1999).

Pode-se observar, portanto, que um único evento de iniciação leva à formação de várias moléculas de peróxidos como resultado da reação em cadeia. Um outro fator que aumenta a complexidade da peroxidação lipídica é que a abstração inicial de um átomo de hidrogênio pode ocorrer em diferentes pontos da cadeia de um ácido graxo poliinsaturado. Assim, a peroxidação do ácido linoleico dá origem a principalmente quatro diferentes hidroperóxidos (dienos *trans,cis* ou *trans,trans* substituídos em C-9 ou C-13), a do ácido linolênico (18:3 $\Delta^{9,12,15}$) também origina quatro (dienos *trans,cis* substituídos em C-9, C-12, C-13 ou C-16), a do ácido araquidônico seis (dienos *trans,cis* substituídos em C-5, C-8, C-9, C-11, C-12 ou C-15) e assim por diante (Porter, 1984; Gardner, 1989). Além disso, como mencionado anteriormente, os radicais peroxil podem reagir de modo a formar peróxidos cíclicos e endoperóxidos (Porter, 1984). Outras variações surgem do fato de que os ácidos graxos poliinsaturados podem estar contidos em fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina, glicolípídios ou esterificados ao colesterol e suas oxidações podem ter diferentes propriedades biológicas e patológicas (Esterbauer e col., 1990). A oxidação do colesterol para 5,6-epóxido e 5 α -hidroperóxido é também de especial interesse biológico, uma vez que o colesterol epoxidado ocorre em altas concentrações em fluido de mama humana e foi identificado como mutagênico (Petrakis e col., 1981; Sevanian e Peterson, 1984).

A decomposição dos hidroperóxidos lipídicos é importante porque, além de gerar radicais que propagam a peroxidação lipídica, gera produtos não radicalares. Esses produtos secundários (aldeídos, cetonas, epóxidos, entre outros) são mais estáveis do que os radicais livres que iniciaram o processo e os radicais lipídicos formados durante a fase de propagação. Conseqüentemente, podem atingir pontos distantes do local em que se formaram (Vaca e col., 1988).

Os mecanismos pelos quais esses produtos secundários são gerados envolvem: cisão- β por clivagem homolítica entre o carbono do radical alcóxil e uma ligação C-C adjacente, originando um aldeído e um radical de hidrocarboneto que é estabilizado pela abstração de hidrogênio de uma outra molécula (esse mecanismo origina os gases etano e pentano, cujas medidas são utilizadas para a avaliação da peroxidação lipídica *in vivo*);

estabilização do radical alcoxil para o respectivo ácido oxodienóico; ou ataque do radical alcoxil a uma dupla ligação adjacente, podendo formar epóxidos (**figura 1.8**). Como os sistemas biológicos contêm uma mistura de diferentes ácidos graxos poliinsaturados com vários graus de insaturação, a peroxidação lipídica irá gerar uma mistura de hidroperóxidos lipídicos cujas quebras podem produzir uma variedade de produtos secundários diferentes, dentre os quais os aldeídos são os mais estudados (Porter, 1984; Mlakar e Spiteller, 1994; Loidl-Stahlhofen e col., 1994; Mlakar e Spiteller, 1996).

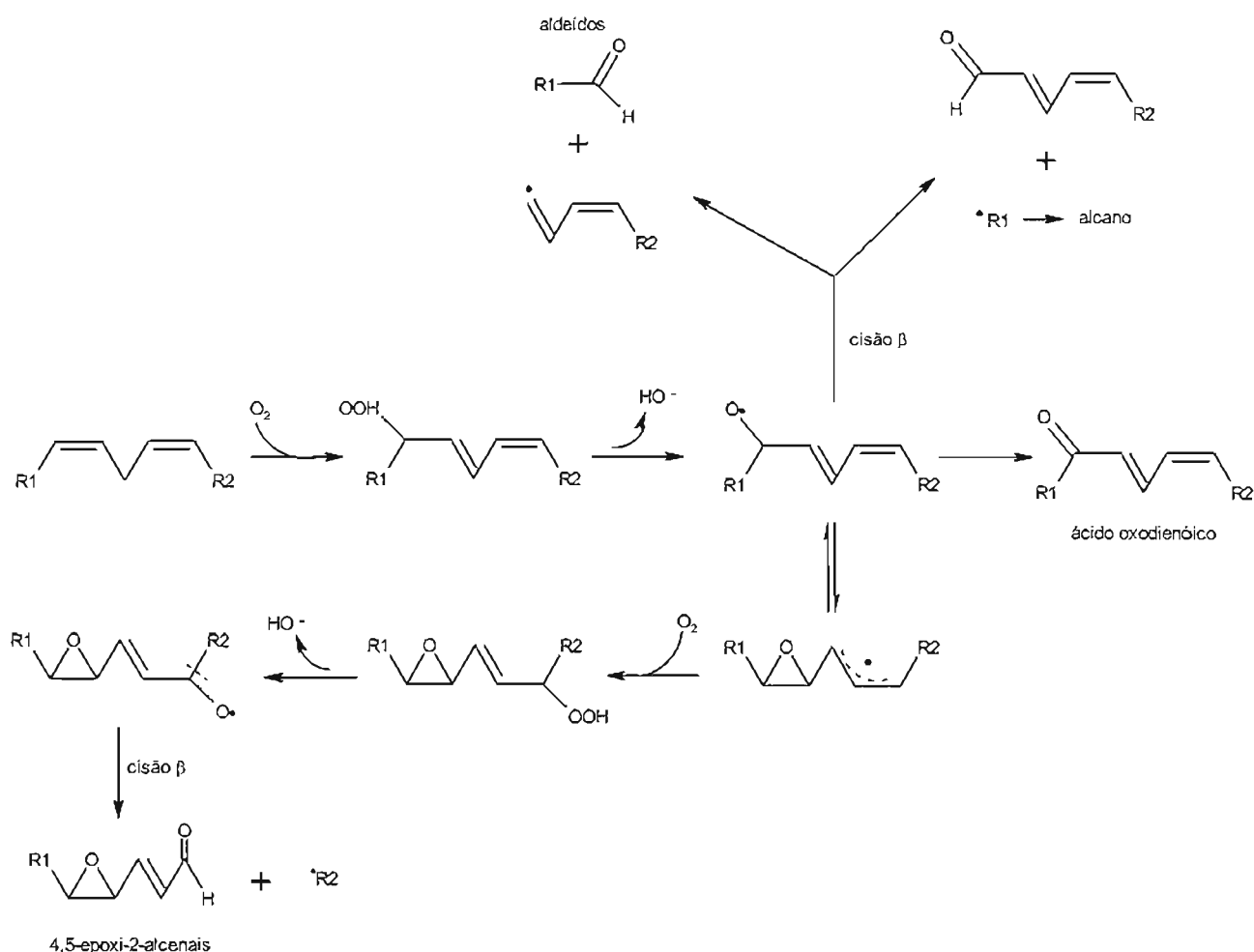


Figura 1.8: Mecanismos propostos para formação de alguns produtos secundários da peroxidação lipídica. $\omega - 6$: $R1 = CH_3(CH_2)_4$; $\omega - 3$: $R1 = CH_3CH_2$.

A **tabela 1.1** apresenta uma lista de aldeídos que foram identificados como produtos da peroxidação lipídica induzida em microsossomos de fígado de ratos pelo sistema

ADP-Fe²⁺/NADPH (Benedetti e col, 1980; Esterbauer e col., 1982; Benedetti e col, 1984a, b; Poli e col., 1985; Esterbauer e col., 1985).

Tabela 1.1: Aldeídos que foram identificados como produtos da peroxidação lipídica induzida em microsossomos de fígado de ratos pelo sistema ADP-Fe²⁺/NADPH.

4-hidroxi-alcenais	2-alcenais	n-alcenais	outros
4-hidroxi-2-nonenal	acroleína	propanal	malonaldeído
4-hidroxi-2-hexenal	2-pentenal	butanal	2,4-heptadienal
4-hidroxi-2,5-nonadienal	2-hexenal	pentanal	2,4-decadienal
4,5-dihidroxi-2-decenal	2-heptenal	hexanal	5-hidroxi-2-octanal
	2-octenal	nonanal	butanona
	2-nonenal		2-pentanona
			3-pentanona
			2-octanona

A concentração gerada desses aldeídos depende das condições de oxidação e da composição de ácidos graxos poliinsaturados nas membranas. Por exemplo, *trans*-4-hidroxi-2-nonenal (HNE) é formado a partir da oxidação de ácidos graxos poliinsaturados ω -6, tais como ácido araquidônico e linoleico, tendo sido detectado em vários tecidos de humanos, cachorros e roedores em níveis que variam de 0,3 a 8 nmol/g de tecido e 0,1 a 45 μ M em plasma, dependendo do tecido e das condições patológicas (Esterbauer e col., 1990; Esterbauer e col., 1991). A concentração intracelular de HNE medida em hepatócitos incubados com CCl₄ (um indutor de peroxidação lipídica após ser metabolizado para CCl₃• via citocromos P450) foi de aproximadamente 7 μ M (Poli e col., 1985) e, considerando que os aldeídos derivados de lipídios não se distribuem uniformemente entre as fases aquosa e lipídica, foi estimado que a concentração total local de aldeídos no interior das membranas de microsossomos peroxidados pode atingir o nível de 100 mM (Esterbauer e col., 1982; Benedetti e col., 1984b; Poli e col., 1985), sendo que essa concentração estimada de HNE fica em torno de 4,5 mM (Esterbauer, 1985).

Malonaldeído (MDA) é formado enzimaticamente durante o metabolismo de prostaglandinas (Hecker e Ulrich, 1989; Marnett, 1994) e espermina (Quash e col., 1987) e

a partir da oxidação de ácidos graxos com mais de duas duplas ligações, tais como os ácidos linolênico, araquidônico, docosahexaenóico e eicosapentaenóico, sendo que os ácidos graxos ω -3 (linolênico, docosahexaenóico e eicosapentaenóico) também originam 4-hidroxi-2-hexenal (HHE) (Esterbauer e col., 1990; Van Kuijk e col., 1990). Os níveis de MDA determinados em plasma de indivíduos sadios através de diferentes metodologias variam de 0,0 a 47,2 μ M, sendo que os valores mais baixos foram encontrados através da utilização de metodologias mais específicas, baseadas em HPLC ou cromatografia gasosa (Esterbauer e col., 1991). O nível de MDA encontrado em urina humana normal, determinado como derivado de pentafluorofenil-hidrazina por cromatografia gasosa com ionização por captura de elétrons, situa-se na faixa de 0,2 a 0,8 μ M (Tomita e col., 1990). MDA, HNE, HHE, juntamente com acroleína (2-propenal) e crotonaldeído (2-butenal), são os aldeídos mais largamente estudados com relação às suas propriedades químicas e biológicas (Esterbauer e col., 1991; Chung e col., 1996).

A peroxidação lipídica tem sido associada ao desenvolvimento de uma variedade de condições patológicas induzidas por exposição a agentes oxidantes. Alguns exemplos são a injúria devida à isquemia - reperfusão (Grune e col., 1993; Grune e col., 1994; Siems e col., 1995), a hepatotoxicidade devida ao tetracloreto de carbono (Morrow e col., 1992; Brent e Rumack, 1993; Mc Gregor e Lang, 1996), a carcinogênese (Cheeseman, 1993; Nair e col., 2000), a aterogênese (Esterbauer e col., 1987; Salmon e col., 1987; Ylä-Herttuala e col., 1989; Witztum e Steinberg, 1991; Kotani e col., 1994; Holvoet e col., 1995; Salomon e col., 2000), a formação de pigmentos de lipofucsina associados ao envelhecimento (Yin, 1996; Hidalgo e Zamora, 2000) e diabetes (Sato e col., 1979; Suzuki e col., 1992; Reagan e col., 2000). Considerando que os aldeídos α,β -insaturados (aqueles que apresentam uma dupla ligação C=C conjugada com o grupo carbonila), variantes estruturais dos mesmos (tais como 4-hidroxi-2-hexenal e epoxialdeídos) e malonaldeído são agentes alquilantes com capacidade de se ligarem covalentemente a grupos nucleofílicos presentes em DNA, peptídeos e proteínas, provocando alterações nas funções dessas moléculas, muitos trabalhos têm sugerido a implicação desses aldeídos em vários processos degenerativos associados ao estresse oxidativo (Brambilla e col., 1985; Witz, 1989; Eder e col., 1993; Szweda e col., 1993; Requena e col., 1997; Salomon e col., 2000; Hidalgo e Zamora, 2000; Nair e col., 2000).

Recentemente foi descrita uma outra fonte endógena de aldeídos α,β -insaturados (**figura 1.9**). A mieloperoxidase, na presença de H_2O_2 e Cl^- , gera ácido hipocloroso (HOCl), o qual oxida aminoácidos para cloraminas. Estes últimos derivados perdem Cl^- e CO_2 , formando iminas que são hidrolisadas para aldeídos. No caso da treonina, o hidroxialdeído resultante sofre desidratação e origina acroleína. Esta pode ser uma importante via de formação de alguns aldeídos em sítios de inflamação (Hazen e col., 1998).

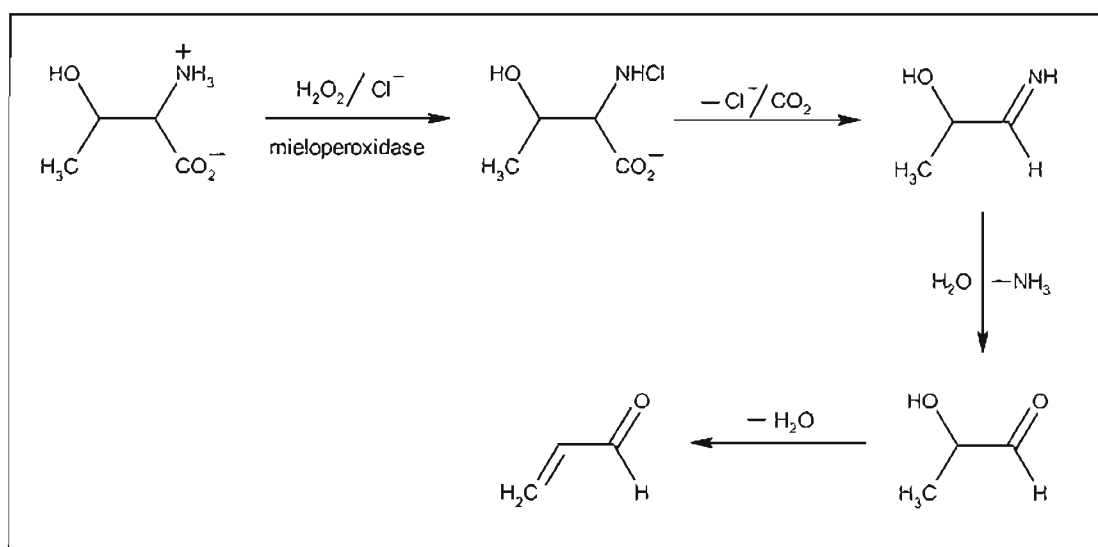


Figura 1.9: Mecanismo proposto para formação de aldeídos α,β -insaturados a partir da oxidação de aminoácidos.

1.2.5.1. Danos basais em DNA: II. Reação com malonaldeído

Malonaldeído (MDA) pode existir em diferentes formas em solução aquosa, de acordo com o pH (**figura 1.10**). O valor de pK do grupo OH enólico é 4,5 e, portanto, em pH fisiológico a forma predominante é o ânion enolato, que tem baixa reatividade com a maioria dos grupos amino. A reatividade aumenta à medida em que o pH diminui e a forma enol não dissociada, β -hidroxiacroleína, se torna a espécie predominante, em equilíbrio com a forma *ceto*. Essa espécie é um eletrófilo que pode reagir com nucleófilos através de adição de Michael, de modo semelhante à reação de outros aldeídos α,β -insaturados (Esterbauer e col., 1991).

Diversos estudos mostraram que MDA é mutagênico em bactérias e células de mamífero (Schamberg e col., 1979; Marnett e Tuttle, 1980; Yonei e Furui, 1981; Basu e

Marnett,1983; Marnett e col., 1985; Benamira e col., 1995) e carcinogênico em ratos (Spalding, 1988). Tais características podem ser explicadas pela capacidade de reação deste aldeído com proteínas e DNA (Esterbauer e col., 1991; Marnett, 1999).

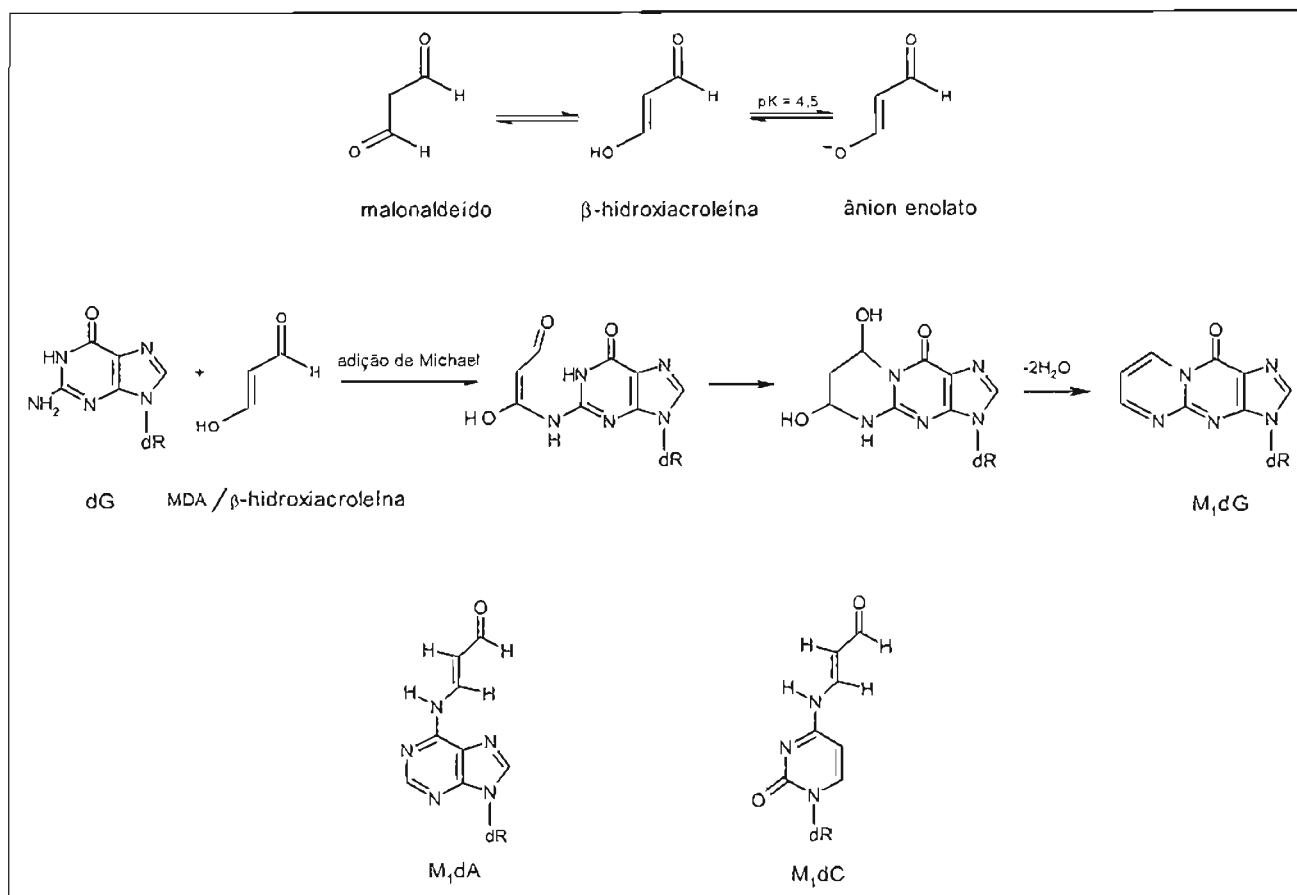


Figura 1.10: Reação do MDA com bases do DNA.

Reiss e colaboradores descreveram a formação de produtos fluorescentes com emissão máxima a 460 nm quando excitados a 390 nm após a reação de DNA com MDA (Reiss e col.,1972). Foi sugerido que essa fluorescência era devida à formação de uma estrutura amino-iminopropeno conjugada, $R-N=C-C=C-N-R'$, entre os grupos amino das bases do DNA e malonaldeído (Reiss e col., 1972). Alguns anos mais tarde foram caracterizados adutos resultantes da reação de dG, dA e dC com MDA (figura 1.10) (Seto e col., 1983; Nair e col., 1984; Marnett e col., 1986; Stone e col., 1990a,b). Apenas o aduto cíclico pirimidopurinona formado com dG (M_1dG) é fluorescente, sendo também o de maior rendimento na reação de MDA com DNA (presente em concentração cinco vezes maior que

N^6 -(3-oxopropenil)desoxiadenosina (M_1dA). N^7 -(3-oxopropenil)desoxicitidina (M_1dC) é formado em quantidades muito pequenas (Marnett, 1999).

Uma via alternativa para formação de M_1dG e, provavelmente, M_1dA e M_1dC é a reação das respectivas bases com base-propenais (Dedon e col., 1998). A oxidação direta do DNA por agentes que abstraem o átomo de hidrogênio 4' da desoxirribose inicia uma série de reações que levam à formação de base-propenais. Um desses agentes oxidantes é o antibiótico antitumoral Fe(II) bleomicina que induz quebras no DNA (Burger e col., 1980; Giloni e col., 1981; Grollman e col., 1985). Base-propenais são derivados oxopropenil das bases do DNA, estruturalmente análogos a acroleínas substituídas na posição β (figura 1.11). Esses compostos transferem o seu grupo oxopropenil para dG, formando M_1dG . O tratamento de DNA com bleomicina na ausência completa de lipídios leva à formação de M_1dG . Esse aduto também é formado pela reação direta de adenina-propenal com DNA (Dedon e col., 1998).

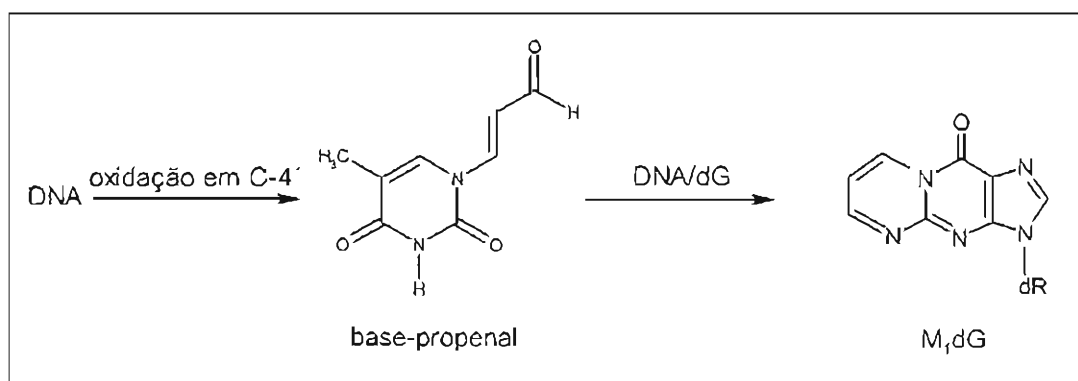


Figura 1.11: Exemplo de base-propenal e sua reação com bases do DNA.

Para obtenção de informação a respeito da presença do aduto M_1dG em DNA *in vivo*, foram desenvolvidas metodologias altamente sensíveis e muito específicas para a detecção de danos basais. A metodologia utilizada deve permitir a verificação inequívoca do aduto, o que não é uma tarefa fácil para qualquer aduto de DNA (Marnett, 1999).

Primeiramente foi utilizada pós-marcação com ^{32}P (^{32}P -postlabeling) para detecção e quantificação do aduto M_1dG em DNA. Foi detectado um nível de 6 adutos/ 10^6 nucleotídeos em DNA de fígado de camundongos tratados com MDA (20 $\mu\text{mol/kg}$ peso corpóreo) (Vaca e col., 1992). Em estudos subsequentes, o tratamento de camundongos com MDA na concentração de 200 $\mu\text{mol/kg}$ peso corpóreo estimulou a formação de adutos

MDA-hemoglobina em sangue e M₁dG em fígado. Os níveis de M₁dG diminuíram lentamente após o tratamento com MDA, apresentando uma meia-vida de 12,5 dias (Kautiainen e col., 1993). Em outro estudo foi demonstrado um aumento de duas a três vezes no nível de M₁dG em rins de hamsters Syrian tratados com doses de dietilestilbestrol ou oestradiol indutoras de câncer nesse órgão (Wang e Liehr, 1995). Um nível de $2,6 \pm 1,2$ adutos por 10^7 nucleotídeos foi detectado em leucócitos humanos de 26 voluntários e uma análise paralela de sete voluntárias indicou um nível de $3,0 \pm 1,3$ M₁dG por 10^7 nucleotídeos em tecido de mama normal (Vaca e col., 1995). Um outro estudo mostrou que o nível de adutos em tecido de mama normal de mulheres com câncer de mama é duas a três vezes maior que no tecido de mama de mulheres sem câncer. Além disso, o nível de adutos encontrado no tumor foi menor que o presente no tecido normal circundante (Wang e col., 1996). Foi ainda verificado um grande aumento (aproximadamente 20 vezes) do nível de M₁dG em leucócitos de mulheres (mas não de homens) alimentadas com uma dieta rica em ácidos graxos poliinsaturados (1,2 a 28 adutos/ 10^7 nucleotídeos) em relação a um grupo que recebeu uma dieta rica em ácidos graxos monoinsaturados (0,2 a 2,5 adutos/ 10^7 nucleotídeos) (Fang e col., 1996).

O uso da cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) com ionização química negativa permitiu a detecção e quantificação de M₁dG em fígado, células brancas do sangue e pâncreas humanos em níveis que variam desde abaixo do nível de detecção (1 aduto/ 10^8 nucleotídeos) até 1,2 adutos por 10^6 nucleotídeos (aproximadamente 6500 adutos por célula) (Chaudhary e col., 1994; Rouzer e col., 1997; Kadlubar e col., 1998). A especificidade do método é dada pela combinação de cromatografia por imunoafinidade para separar o aduto dos outros nucleosídeos presentes no DNA, derivatização química, coeluição cromatográfica com um padrão interno adicionado à amostra de DNA antes da hidrólise e monitoramento de um único íon no espectrômetro de massas (Marnett, 1999). A identidade de M₁dG nas amostras de DNA de fígado humano e células brancas do sangue foi independentemente verificada por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em tandem (Chaudhary e col., 1995; Rouzer e col., 1997). É importante notar que os níveis de M₁dG encontrados *in vivo* se assemelham aos níveis de 8-oxodG (seção 1.2.4).

O potencial mutagênico dos adutos MDA-DNA foi avaliado por diferentes abordagens. A reação de MDA, em pH neutro, com um genoma simples-fita de

bacteriófago, seguida por transformação de linhagens de *E.coli* induzidas para resposta SOS, provocou mutações por substituição de pares de bases (76%) e deslocamento da seqüência de bases (por exemplo devido a adições) no gene *lacZα* contido no vetor. Aumento na concentração de MDA levou a aumento no número de mutações, coincidente com o aumento no nível de M₁dG. As principais substituições observadas foram transversões G→T (35%) e transições C→T (32%) e A→G (25%), provavelmente decorrentes dos adutos correspondentes formados com MDA (Benamira e col., 1995). Experimentos de mutagênese sítio-específica utilizando vetores dupla-fita confirmaram que o aduto M₁dG é mutagênico em *E.coli*, induzindo transversões para T e transições para A (Reddy e Marnett, 1995; Fink e col., 1997). A freqüência total de mutações foi de aproximadamente 18% (Fink e col., 1997).

Transformações de linhagens de *E.coli* deficientes em enzimas de reparo com vetores contendo M₁dG sugeriram que o reparo deste aduto se dá por meio de excisão de nucleotídeos. Linhagens deficientes em formamidopirimidina (FAPY) glicosilase ou 3-metiladenina glicosilase, enzimas conhecidas por participarem do reparo de 8-oxodG e adutos exocíclicos, não tiveram as freqüências de mutações afetadas, enquanto que um grande aumento na freqüência de mutações foi observado em células deficientes em reparo por excisão de nucleotídeos (*uvrA*⁻ ou *uvrB*⁻) (Fink e col., 1997; Johnson e col., 1997).

Recentemente foi verificado, através de análises de espectros de ressonância magnética nuclear, que M₁dG sofre rápida e quantitativa abertura do anel exocíclico para N²-oxopropenil-dG quando está presente em DNA dupla-fita, mas não quando em DNA simples-fita (**figura 1.12**). A desnaturação térmica do DNA leva à rápida ciclização de N²-oxopropenil-dG para M₁dG e o inverso ocorre quando o DNA é renaturado. A presença do grupo amino exocíclico da dC oposta ao aduto M₁dG parece ser importante para a abertura do anel, uma vez que tal abertura não ocorre quando M₁dG está oposta a timina (Mao e col., 1999). Essa interconversão resulta em diferenças significativas no potencial mutagênico e susceptibilidade para o reparo, além de fornecer grupos funcionais reativos no interior da molécula de DNA que podem levar à formação de ligações cruzadas entre as cadeias do DNA e entre proteínas e DNA (Niedemhofer e col., 1997; Mao e col., 1999). Foi demonstrado que MDA induz tais ligações cruzadas, mas os eventos moleculares responsáveis pelas mesmas ainda não são bem compreendidos (Summerfield e Tappel,

1983; Summerfield e Tappel, 1984a; Summerfield e Tappel, 1984b; Voitkun e Zhitkovich, 1999).

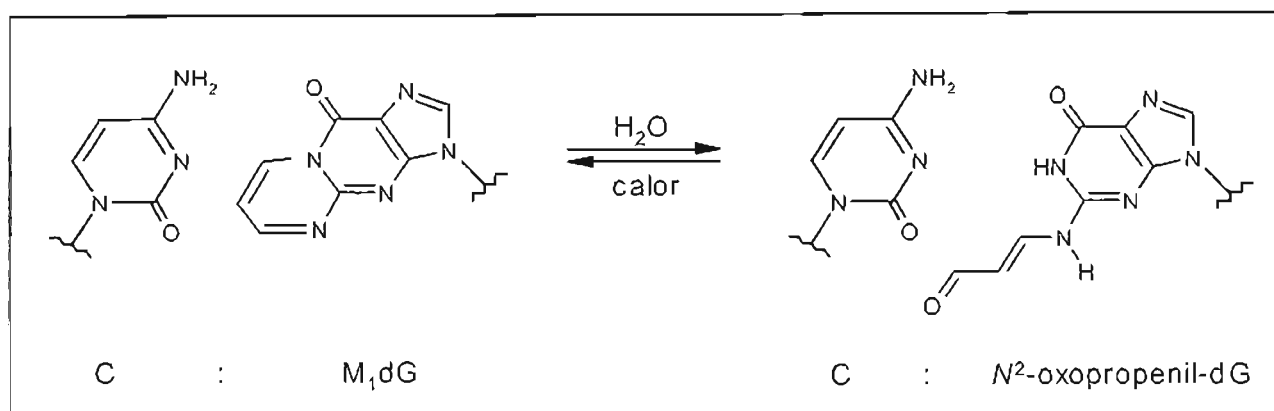


Figura 1.12: Abertura do anel de M_1dG em DNA dupla-fita.

Apesar de os estudos de mutagenicidade indicarem um envolvimento direto do aduto M_1dG na indução de mutações, mais investigações são necessárias para que seja esclarecida a importância desse aduto na carcinogênese humana e outras doenças crônicas. Para isso, torna-se importante avaliar a distribuição de M_1dG em diferentes tecidos ou tipos celulares e se os seus níveis podem ser modulados pela dieta ou outros fatores ambientais (Leuratti e col., 1998).

Uma outra possível fonte da fluorescência observada por Reis e colaboradores em DNA incubado com MDA (Reiss e col., 1972) pode ser o aduto 1,4-dihidropiridina altamente fluorescente resultante da reação do grupo amino exocíclico de 2'-desoxiadenosina com um produto da condensação de duas moléculas de malonaldeído com uma de acetaldeído (**figura 1.13**) (Le Curieux e col., 1998). Acetaldeído pode ser formado a partir de malonaldeído via oxidação deste para o semialdeído ácido malônico e descarboxilação (Esterbauer e col., 1991). Esse aduto pode ser biologicamente importante, uma vez que o acetaldeído é um composto formado endogenamente a partir da oxidação enzimática do etanol no fígado, além de também estar presente na fumaça de cigarro e emissões de automóveis. Em fígado de ratos que ingeriram etanol foi encontrado o aduto dihidropiridina correspondente em proteínas, indicando que o produto da condensação de MDA com acetaldeído é formado *in vivo* (Tuma e col., 1996; Xu e col., 1997). Trabalhos anteriores haviam mostrado que derivados dihidropiridínicos são formados em reações de

aminas primárias com MDA em misturas contendo aldeídos saturados (Kikugawa e Ido, 1984; Nair e col., 1988). Foi sugerido que a condensação de aldeídos alifáticos com malonaldeído é uma reação geral, o que significa que outros aldeídos, além de acetaldeído, presentes em fluidos fisiológicos podem formar com malonaldeído produtos de condensação reativos (Gómez-Sánchez e col., 1993).

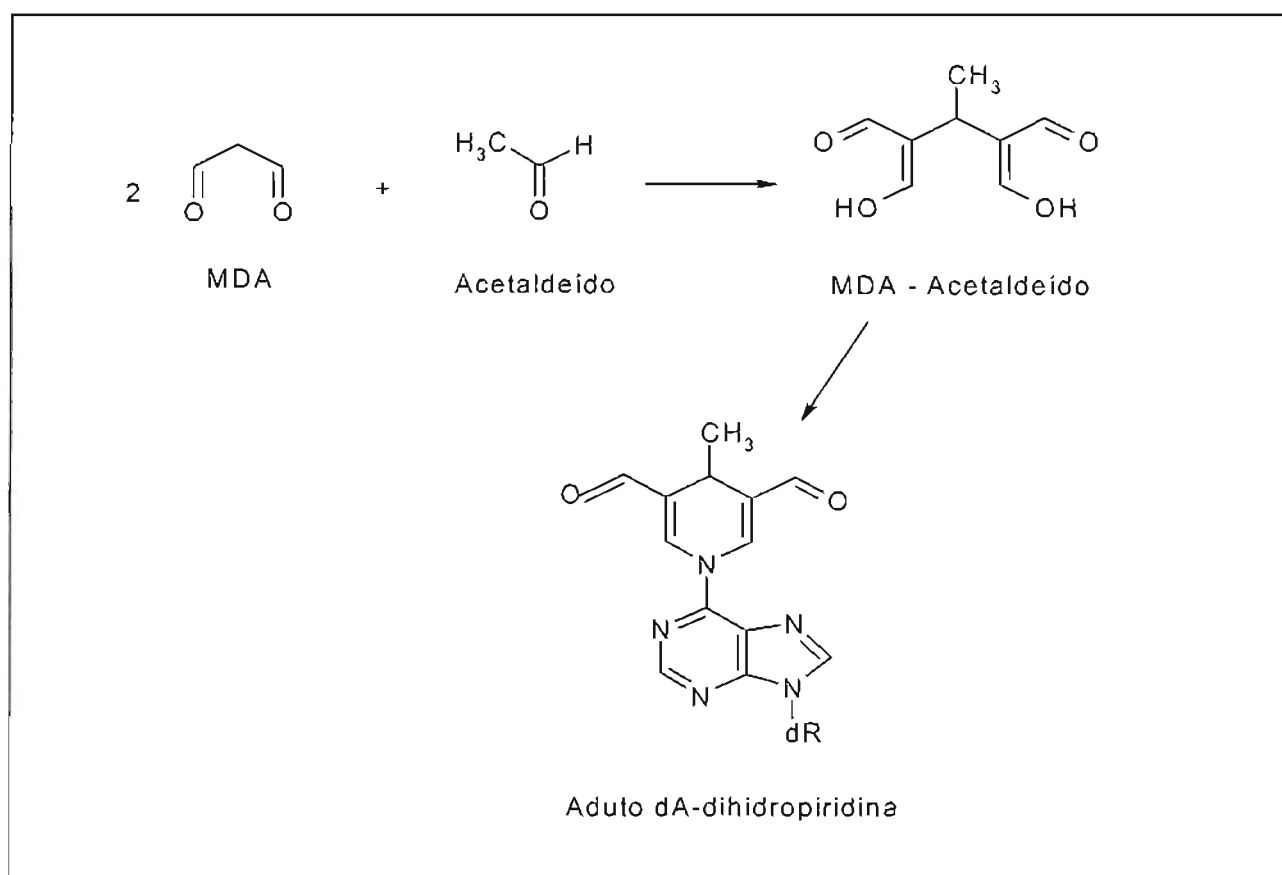


Figura 1.13: Estrutura do aduto formado pela reação entre 2'-desoxiadenosina e o produto de condensação de malonaldeído com acetaldeído (Le Curieux e col., 1998).

1.2.5.2. Danos basais em DNA: III. Propanoadutos

Além de malonaldeído, outros aldeídos gerados endogenamente podem contribuir para o conjunto de danos basais presentes no DNA. Dentre eles, os mais estudados são os *trans*-4-hidroxi-2-alcenais e *trans*-2-alcenais, os quais, em pH fisiológico, são mais eletrofílicos que o MDA (Burcham, 1988; Toyokuni e col., 1997).

O *trans*-4-hidroxi-2-nonenal (HNE), principal hidroxialcenal resultante do processo de peroxidação lipídica, exhibe, de acordo com a sua concentração, uma série de

atividades biológicas. Estas incluem inibição de enzimas, inibição da síntese de proteínas, DNA e RNA, indução de proteínas de choque térmico, bloqueio da proliferação de várias linhagens celulares, redução de comunicação intercelular via junções comunicantes, estímulo da migração de neutrófilos e modulação de vários genes (Esterbauer, 1985; Esterbauer e col., 1991; Fazio e col., 1992; Parola e col., 1993; Spycher e col., 1996; Barrera e col., 1996; Leonarduzzi e col., 1997). Tem sido verificado que proteínas modificadas por HNE ocorrem em lesões ateroscleróticas e que existem anticorpos contra as mesmas em plasma de coelhos e humanos (Steinberg e col., 1989; Palinski e col., 1990; Salomon e col., 2000). HNE também apresenta efeitos genotóxicos e mutagênicos em células (Brambilla e col., 1986; Esterbauer e col., 1991).

Outro 4-hidroxiacetal, *trans*-4-hidroxi-2-hexenal (HHE), recebeu atenção após ter sido verificado que, além de ser um produto de peroxidação lipídica (Van Kuijk e col., 1990; Esterbauer e col., 1991), é o produto final formado em fígado durante o metabolismo de alcalóides pirrolizidínicos, tal como senecionina, podendo desempenhar um papel na toxicidade devida a esses alcalóides (Segall e col., 1985). Tais alcalóides são produzidos por uma variedade de plantas e são responsáveis por muitas mortes de animais e envenenamentos humanos (Bull e col., 1968). Muitos são hepatotóxicos (McLean, 1970), genotóxicos (Williams e col., 1980; Green e col., 1981) e carcinogênicos (Schoental, 1968).

A reatividade dos 4-hidroxiacetais é devida à presença de três grupos funcionais principais em suas estruturas: o grupo aldeído, a dupla ligação e o grupo hidroxila (**figura 1.14**) (Esterbauer e col., 1991). A sua habilidade em reagir rapidamente com nucleófilos em pH fisiológico contribui significativamente para sua toxicidade. Assim, reagem com grupos tióis (-SH) presentes em GSH e proteínas e grupos amino presentes em bases de DNA, proteínas (por exemplo, resíduos de lisina em lipoproteínas) e nos fosfolipídios fosfatidiletanolamina e fosfatidilserina (Esterbauer e col., 1991).

O padrão de danos induzidos em DNA por esses aldeídos é bem diversificado, uma vez que os adutos podem ser formados tanto através da reação direta dos aldeídos com as bases do DNA, como via seus derivados epoxidados (Chung e col., 1996). No caso da reação direta dos aldeídos com bases do DNA (adição de Michael do grupo amino exocíclico da base ao C-3 do aldeído, seguida por ciclização), os principais produtos são os adutos cíclicos formados com dG, os quais são análogos saturados, 8-hidroxi propano C-6 substituídos, do aduto derivado da reação de dG com malonaldeído (**figura 1.14**). Recebem

a denominação geral de propanoadutos. A cadeia lateral no C-6 do novo anel revela qual enal gerou o aduto. Uma vez que os adutos contêm dois novos centros quirais, os produtos compreendem uma mistura de diastereoisômeros (Winter e col., 1986; Yi e col., 1997).

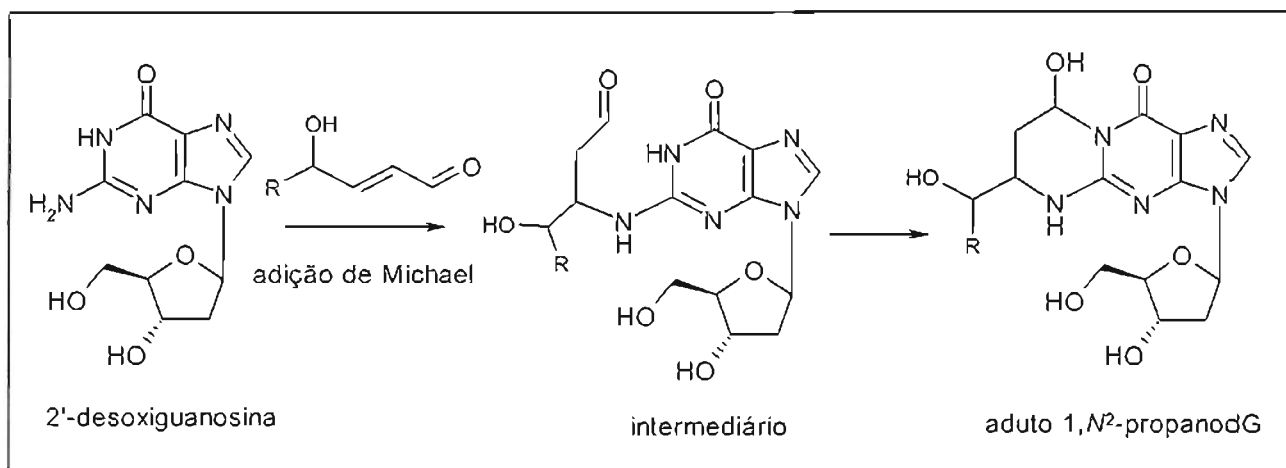


Figura 1.14: Mecanismo proposto para a formação de 1,N²-propano-2'-desoxiguanosina.

Dentre os *trans*-2-alcenais, os mais estudados são acroleína [H₂C=CH–HC=O] e crotonaldeído [H₃C–CH=CH–HC=O]. Eles são formados endogenamente como resultado da oxidação de lipídios (Esterbauer e col., 1991), aminoácidos (Hazen e col., 1998) e poliaminas (Alarcon, 1970) e ocorrem no ambiente como componentes da fumaça de cigarro (acroleína: 10–140 µg/cigarro) e exaustão de automóveis, sendo também produzidos quando alimentos contendo gordura são cozidos (Wynder e col., 1965; Esterbauer e col., 1991; Wilson e col., 1991); ocorrem também como produtos do metabolismo de drogas (Rees e Tarlow, 1967; Alarcon, 1970; Patel e col., 1980; Nelson e Boor, 1982), carcinógenos (ex.: *N*-nitrosopirrolidina origina crotonaldeído) e agentes quimioterapêuticos (ex.: ciclofosfamida e ifosfamida originam acroleína) (Izard e Libermann, 1978; Hales, 1982; Nath e Chung, 1994). Outro *trans*-2-alcenal, hexenal, é um importante aromatizante que ocorre naturalmente em muitas frutas e vegetais, sendo, por causa do seu aroma, utilizado como aditivo alimentar, além de também ser gerado por processos de autooxidação (Götz-Schmidt e Schreier, 1986; Feron e col., 1991; van Ruth e col., 1995; Gölzer e col., 1996). Diversos estudos mostram que esses aldeídos são mutagênicos em bactérias e células de mamífero (Marnett e col., 1985; Curren e col., 1988; Smith e col., 1990; Canonero e col., 1990; Eder e col., 1992), tendo sido verificado que crotonaldeído leva à formação de

tumores em fígado de ratos após administração oral crônica (42 mg/L de água) (Chung e col., 1986) e acroleína inicia a carcinogênese em bexiga urinária de ratos (Cohen e col., 1992).

Acroleína, crotonaldeído e hexenal também reagem, via adição de Michael, com bases do DNA, levando à formação dos respectivos propanoadutos (Chung e Hecht, 1983; Chung e col., 1984; Gölzer e col., 1996). Como no caso dos *trans*-4-hidroxi-2-alcenais, os principais adutos observados são os resultantes da reação com dG, embora adutos cíclicos também sejam formados a partir da reação de acroleína com desoxiadenosina e desoxicitidina (Sodum e Shapiro, 1988; Smith e col., 1989; Smith e col., 1990).

Adutos 1,*N*²-propano-2'-desoxiguanosina derivados da reação de dG com acroleína ou crotonaldeído foram detectados em tecidos de fígado, pele, glândulas mamárias, rins, cérebro, pulmão, próstata, leucócitos e bexiga urinária de roedores não submetidos a qualquer tratamento (nível total: 1,1 a 16,9 adutos por 10⁷ dG) e em fígado, leucócitos, gengiva e mama humanos (nível total: 0,1 a 75,3 adutos por 10⁷ dG) (Nath e Chung, 1994; Nath e col., 1996; Nath e col., 1998). O aduto derivado da reação de dG com HNE foi recentemente detectado em DNA de fígado e cólon de ratos não tratados e humanos (Chung e col., 2000). Diversos estudos realizados *in vitro* e *in vivo* mostraram que a oxidação dos ácidos graxos poliinsaturados é uma importante fonte desses níveis basais de propanoadutos (Chung e col., 1999).

A presença de níveis basais de adutos 1,*N*²-propano-2'-desoxiguanosina em tecidos de roedores e humanos levanta questões a respeito da participação dessas lesões nos processos de mutagênese e carcinogênese. Entretanto, as propriedades mutagênicas desses adutos ainda não foram avaliadas por experimentos de mutagênese sítio-específica (Marnett e col., 1985; Cajelli e col., 1987) devido ao fato de a instabilidade dos mesmos impedir a sua incorporação em oligonucleotídeos e vetores ponte (Khullar e col., 1999). Uma nova estratégia para formação do aduto 1,*N*²-propano-2'-desoxiguanosina derivado de acroleína após a síntese do oligonucleotídeo foi recentemente descrita e deverá tornar possível a construção dos vetores necessários para esses estudos (Khullar e col., 1999). Um modelo do aduto 1,*N*²-propano-2'-desoxiguanosina sem o grupo hidroxila no anel propano, o qual não ocorre naturalmente, foi usado como substituto nos estudos de mutagênese sítio-específica realizados. Esses estudos mostraram que esse aduto modelo induz substituições G→A e G→T com alta eficiência em *E.coli*, além de alteração na seqüência de bases (Benamira e

col., 1992; Moriya e col., 1994; Burcham e Marnett, 1994). Com a utilização de vetores ponte replicados em células de mamífero foi determinado o espectro de mutações induzidas por crotonaldeído, consistindo em 86% das substituições envolvendo pares de base G:C (Kawanishi e col., 1998). As alterações mais comuns foram transversões G→T seguidas por transições G→A (Kawanishi e col., 1998).

Pouco também é conhecido a respeito do reparo desses adutos. O aduto modelo não hidroxilado é substrato para o complexo de reparo por excisão de nucleotídeos de *E.coli* e células de mamífero, sendo também reconhecido e reparado pelo sistema de reparo de pareamento errado (reparo de *mismatch*) (Johnson e col., 1997; Johnson e col., 1999).

Os dados existentes até o momento sugerem que os propanoadutos são lesões continuamente geradas em nosso DNA e, provavelmente, os adutos resultantes das reações de dG com crotonaldeído, acroleína ou HNE representam apenas uma pequena parcela dessas lesões. O entendimento do papel desses adutos cíclicos no desenvolvimento do câncer é uma importante e desafiante área para investigação futura, bem como a observação da forma com que os níveis basais e padrões dessas lesões pró-mutagênicas em tecidos humanos variam de acordo com a dieta e fatores genéticos e ambientais (Chung e col., 1999).

1.2.5.3. Danos basais em DNA: IV. Etenoadutos

Dentre os adutos exocíclicos de DNA, os etenoadutos (**figura 1.15**) têm sido bastante estudados ao longo dos últimos 25 anos (Bartsch, 1999). Um grande interesse no estudo dessas lesões teve início com a verificação de que elas são induzidas em DNA por conhecidos carcinógenos ocupacionais e ambientais, tais como cloreto de vinila e carbamato de etila (uretano), após metabolização para os respectivos oxiranos (**figura 1.16**) (Barbin e col., 1975; Foiles e col., 1993; Bartsch e col., 1994). Os derivados exocíclicos 1,N⁶-eteno-2'-desoxiadenosina (ϵ dAdo), 3,N⁴-eteno-2'-desoxicitidina (ϵ dCyd) e N²,3-eteno-2'-desoxiguanosina (N²,3- ϵ dG) foram detectados em diferentes tecidos de ratos expostos ao cloreto de vinila (600 ppm, 4 h/dia, 5 dias) em níveis que variam de 2,9 a 9,8 ϵ dCyd/10⁷dC, 0,4 a 2,1 ϵ dAdo/10⁷dA e 2,1 a 18,1 N²,3- ϵ dG/10⁷dG (Eberle e col., 1989; Ciroussel e col., 1990; Fedtke e col., 1990a,b; Swenberg e col., 1992) e levam à incorporação errada de bases

após a replicação ou a transcrição (Singer e col., 1987; Cheng e col., 1991; Mroczkowska e Kusmierk, 1991; Singer e col., 1991; Basu e col., 1993). Os estudos de fidelidade de replicação ou transcrição foram feitos inicialmente *in vitro* com a utilização de oligonucleotídeos modificados em um sítio específico e as especificidades mutagênicas encontradas foram subseqüentemente confirmadas por estudos de mutagênese sítio-específica através da replicação de vetores simples-fita em *E. coli* e células de mamífero. Nesses estudos foi verificado que ϵ Ado induz transições A→G e transversões A→T e A→C (Basu e col., 1993; Pandya e Moriya, 1996), ϵ Cyd induz transversões C→A e transições C→T (Palejwala e col., 1993; Moriya e col., 1994), e $N^2,3$ - ϵ G induz transições G→A (Cheng e col., 1991), sendo que as eficiências mutagênicas de ϵ Ado e ϵ Cyd foram maiores em células de mamífero (70% para ϵ Ado e 81% para ϵ Cyd) que em *E. coli* (ϵ Ado: 0,53% em células pré-irradiadas com UV e menos que 0,18% em células não irradiadas; ϵ Cyd: 32% em células pré-irradiadas com UV e 2% em células não irradiadas) (Moriya e col., 1994; Pandya e Moriya, 1996; Shibutani e col., 1996). Os resultados desses estudos foram consistentes com os resultados de dois estudos separados referentes às mutações em tumores de ratos e humanos expostos ao cloreto de vinila. Em um desses estudos, cinco de seis angiosarcomas de fígado humano associados com exposição ao cloreto de vinila mostraram transições G:C→A:T no codon 13 do gene *c-Ki-ras-2*, o que está de acordo com as propriedades mutagênicas de ϵ Cyd e $N^2,3$ - ϵ G (Marion e col., 1991). No outro estudo, tumores de ratos expostos ao cloreto de vinila mostraram transições G→A, transversões A→C e transições C→T em genes *N-ras*, também consistentes com as propriedades pró-mutagênicas dos etenoadutos (Froment e col., 1994).

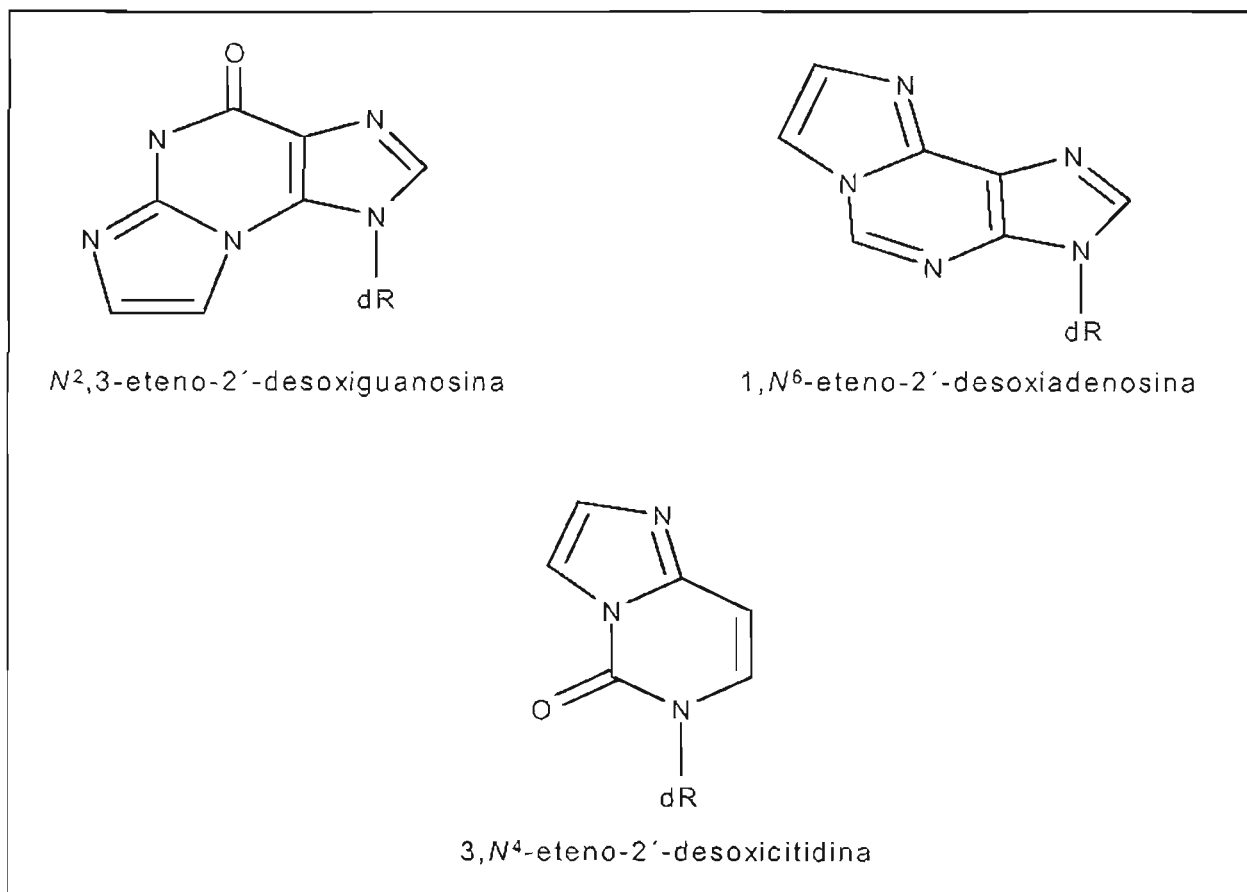


Figura 1.15: Estruturas dos etenoadutos detectados *in vivo*.

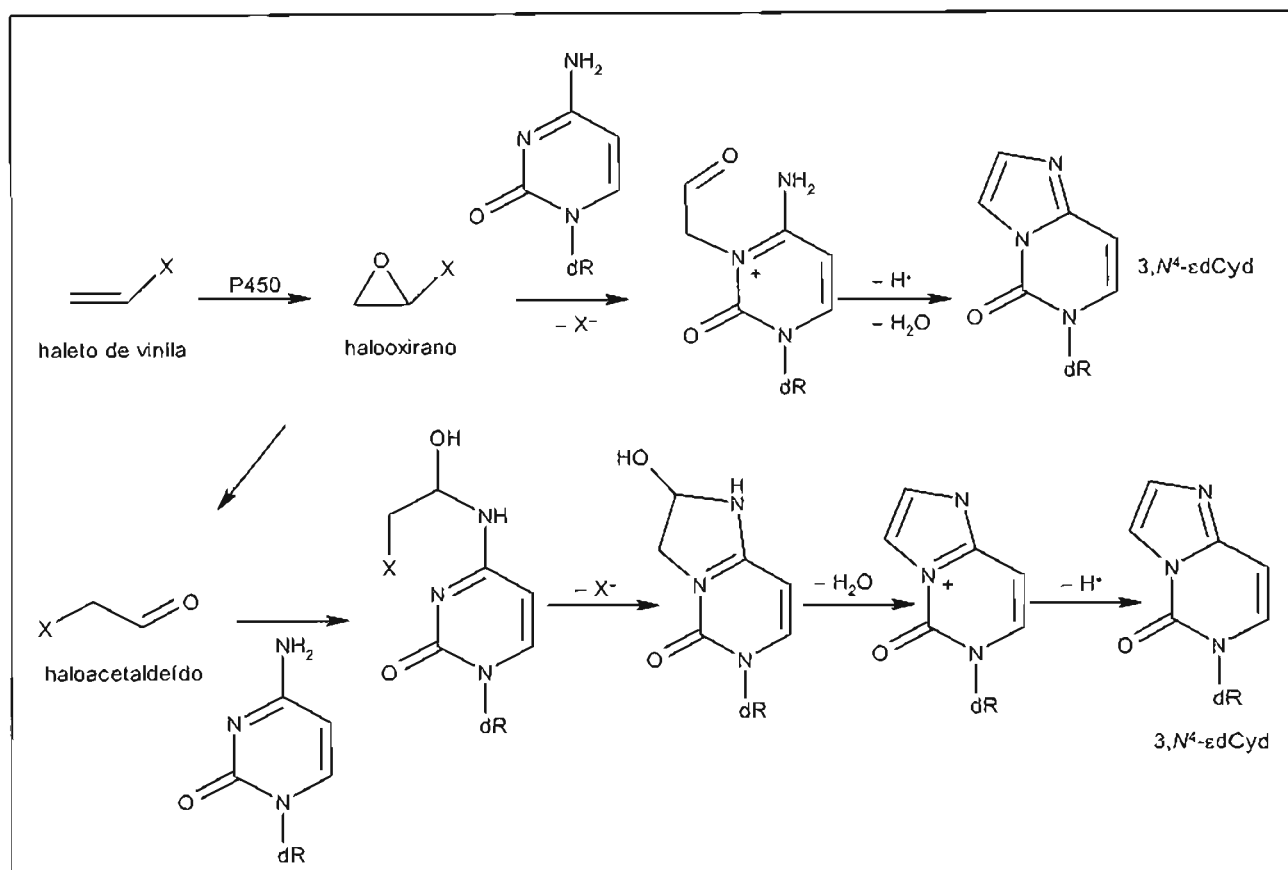
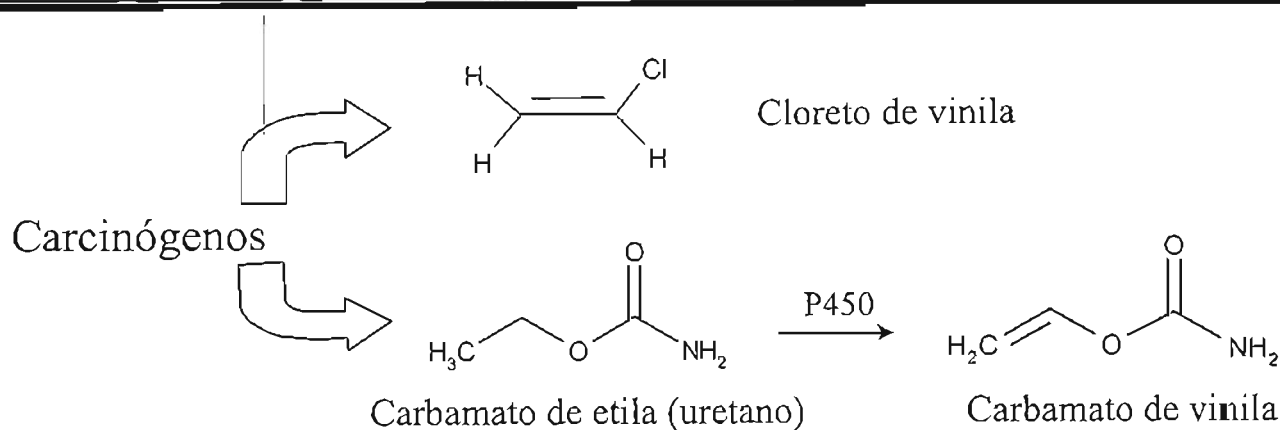


Figura 1.16: Mecanismo para formação de etenoadutos a partir de haletos de vinila.

Com os avanços tecnológicos que permitiram o desenvolvimento de métodos analíticos ultra-sensíveis para detecção de adutos em DNA, tais como GC-MS, LC-ESI/MS, HPLC/radioimunoensaio, imunoafinidade/³²P-postlabeling, níveis basais de vários adutos exocíclicos, incluindo os etenoadutos ϵ dAdo, ϵ dCyd e N²,3- ϵ dG, passaram a ser observados em DNA de roedores e humanos não expostos a carcinógenos (Bartsch e col., 1994; Chung e col., 1996; Nair e col., 1999). Os níveis basais de ϵ dAdo/10⁷dA detectados em tecidos humanos variam de <0,005 a 2,5 e em tecidos de roedores variam de 0,002 a 2,1; os valores

correspondentes para $\text{edCyd}/10^7\text{dC}$ variam de $<0,005$ a $1,1$ e $0,003$ a $2,4$ respectivamente (Nair e col., 1999). Tais observações estimularam a busca por substâncias geradas endogenamente que poderiam levar à formação dessas lesões. Há, atualmente, muitas evidências de que níveis basais dos adutos exocíclicos são derivados da reação de produtos da peroxidação lipídica com o DNA.

Um número crescente de trabalhos têm mostrado que os aldeídos interagem diretamente com o DNA ou são metabolizados a epóxidos, compostos conhecidos por serem agentes alquilantes do DNA com alta atividade mutagênica (Ehrenberg e col., 1977; Segerbäck, 1983). Acroleína, crotonaldeído, *trans*-2-hexenal e *trans*-4-hidroxi-2-nonenal (HNE) reagem com bases do DNA originando adutos cíclicos do tipo propano que puderam ser detectados *in vivo* (Chung e col., 1999). Alternativamente esses aldeídos podem ser convertidos para os correspondentes derivados epoxidados tanto enzimaticamente como via reação com hidroperóxidos de ácidos graxos endógenos ou H_2O_2 (Chen e Chung, 1996). A reação dos epoxi-aldeídos com bases do DNA leva à formação dos etenoadutos.

Muito esforço tem sido feito no sentido de elucidar as fontes, o significado toxicológico e as conseqüências genéticas dessas lesões basais de DNA; os tipos de fatores exógenos ou condições patofisiológicas que levam ao seu aumento; e se esses adutos, quando gerados através de reações mediadas por estresse oxidativo, desempenham um papel na carcinogênese humana ou em outras doenças neurodegenerativas (Bartsch, 1999).

Estudos *in vitro* mostraram que $1,N^6$ -etenoadenina (ϵA) e $3,N^4$ -etenocitosina (ϵC) são formados quando microsomas de fígado de ratos são submetidos à peroxidação lipídica mediada por ferro na presença de nucleosídeos ou nucleotídeos (el Ghissassi e col., 1995) e que aldeídos α,β insaturados, tais como HNE, acroleína e crotonaldeído, reagem com bases de DNA, via seus epóxidos, originando os etenoadutos edAdo , edCyd e um outro etenoaduto de dG, $1,N^2$ -eteno-2'-desoxiguanosina ($1,N^2$ - edG) (Goldschmidt e col., 1968; Nair e Offerman, 1985; Sodum e Chung, 1988; Chung e col., 1996).

Apesar de ter sido sugerida a possibilidade de $1,N^2$ - edG ser um bom marcador para danos em DNA induzidos por produtos da peroxidação lipídica (Sodum e Chung, 1988), a sua formação em sistemas biológicos ainda não foi demonstrada (Møller e Wallin, 1998; Burcham, 1999). Apenas recentemente foram publicados os primeiros dados referentes a mutações induzidas por esse aduto em *E. coli* (Langouët e col., 1998) e células

de mamífero (Akasaka e Guengerich, 1999) com a utilização de vetores dupla-fita. No caso do estudo feito em bactérias, houve incorporação errada de bases em cerca de 3% da progênie viral, consistindo principalmente em transições G→A, seguidas por transversões G→T e G→C (Langouët e col., 1998). No estudo feito em células de mamífero, foi utilizado um sistema de mutagênese sítio-específica intracromossômico, tendo sido observada uma frequência aparente de mutações de 4,6%. A análise da sequência de 21 clones derivados da fração mutante revelou cinco que correspondiam a mutações diretamente no sítio de incorporação de 1,N²-εdG (principalmente transições G→A). Os outros mutantes diferiam dos gerados a partir do oligonucleotídeo não modificado e incluíam deleções, rearranjos, duplos-mutantes e substituições de pares de base em sítios próximos ao sítio do aduto (Akasaka e Guengerich, 1999).

Em estudos *in vivo*, o tratamento de ratos com indutores de peroxidação lipídica, tais como CCl₄ (Chaudhary e col., 1994), ferro + CCl₄ ou ferro + etanol (Nair e col., 1999) resulta em aumento dos níveis de etenoadutos nos fígados desses animais. Condições que induzem estresse oxidativo ou peroxidação lipídica em animais ou humanos, como produção excessiva de óxido nítrico (*NO) (Nair e col., 1998a) e certas doenças genéticas de estoque de metais, tais como doença de Wilson e hemocromatose primária (Nair e col., 1998b), aumentam os níveis de etenoadutos nos tecidos afetados. A produção excessiva de *NO ocorre sob condições patofisiológicas de infecções crônicas e inflamações, conhecidos fatores de risco para vários cânceres humanos. Recentemente foi demonstrado em um modelo de rato que a formação de etenoadutos em DNA ocorre como consequência da superprodução de *NO *in vivo* (Nair e col., 1998a; Nair e col., 1999). Esta observação sugere que os etenoadutos podem contribuir para o desenvolvimento de cânceres humanos associados com processos inflamatórios crônicos causados por infecções virais, bacterianas e parasitárias persistentes (Ohshima e Bartsch, 1994). De forma interessante, não foi detectado aumento concomitante de 8-oxodG nas mesmas amostras de DNA analisadas para verificação da presença de etenoadutos. O aumento no nível de 8-oxodG seria esperado, uma vez que o peroxinitrito (ONOO⁻) é um forte agente oxidante. Entretanto, a velocidade de degradação de 8-oxodG por peroxinitrito parece ser mais rápida que a sua velocidade de formação, o que faz com que essa base oxidada não seja sempre um bom marcador para danos ao DNA induzidos por estresse oxidativo. Neste caso, produtos de oxidação

secundários mais estáveis, como os adutos exocíclicos, parecem ser marcadores mais úteis (Bartsch, 1999). Outra evidência de que a peroxidação lipídica está envolvida na formação de etenoadutos em DNA vem da observação da presença de níveis elevados desses adutos exocíclicos em DNA de leucócitos de mulheres com dieta rica em ácidos graxos poliinsaturados ω -6 (Nair e col., 1997).

Em um estudo recente foi observada correlação entre o acúmulo de metabólitos do ácido araquidônico (ácidos 8-hidroxi-eicosatetraenóico (8-HETE) e 12-hidroxi-eicosatetraenóico (12-HETE)) e a formação dos adutos ϵ dAdo e ϵ dCyd no modelo de carcinogênese induzida por 7,12-dimetilbenzantraceno (DMBA) e promovida por 12-*O*-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) em pele de camundongos (Nair e col., 2000). Em papilomas reversíveis obtidos após 20 semanas de tratamento com TPA foram observados aumentos de 15 e 68 vezes nos níveis de 8-HETE e 12-HETE, respectivamente, em relação ao controle. Paralelamente, os níveis de ϵ dAdo e ϵ dCyd aumentaram, respectivamente, em 12 e 9 vezes (Nair e col., 2000). Alguns estudos mostraram que tumores de pele induzidos experimentalmente acumulam altos níveis de prostaglandinas (Müller-Decker e col., 1995) e ácidos 8-HETE e 12-HETE (precursores dos leucotrienos) (Lehmann e col., 1992; Krieg e col., 1995; Bürger e col., 1999) e têm expressão aumentada das ciclooxigenases e lipoxigenases envolvidas na síntese dessas substâncias. A inibição dessas enzimas inibe significativamente o desenvolvimento de tumor em pele de camundongos (Müller-Decker e col., 1998). Foi também demonstrado um aumento significativo dos níveis de etenoadutos em DNA de pólipos de pacientes com polipose adenomatosa familiar (FAP) nos quais havia superexpressão da ciclooxigenase-2, em comparação com o epitélio de cólon normal (Schmid e col., 2000). Esses dados sugerem uma correlação entre a formação de etenoadutos em DNA e a síntese de eicosanóides, além de mostrarem o envolvimento dos etenoadutos no processo de carcinogênese (Nair e col., 2000).

A verificação de que os etenoadutos são reconhecidos por enzimas de reparo mostra a existência de mecanismos de defesa celular contra essas lesões genotóxicas (Bartsch, 1999). O aduto ϵ A é substrato para a enzima de reparo alquilpurina-DNA-*N*-glicosilase de células de mamífero, mesma enzima que efetua o reparo de 3-metiladenina. O aduto ϵ C é reparado eficientemente por uma outra DNA-glicosilase, a enzima timina-DNA glicosilase que repara T no pareamento errado G:T (Singer e Hang, 1999). Os etenoadutos

$1,N^2$ - ϵ G e $N^2,3$ - ϵ G são liberados por extratos de células HeLa a uma velocidade menor que ϵ A ou ϵ C, mas não são conhecidas as enzimas que efetuam esse reparo (Singer e Hang, 1999). A inibição dessas enzimas de reparo ou a falta de expressão das mesmas em certos tipos de células podem levar a um acúmulo ou persistência dos etenoadutos em seu DNA (Swenberg e col., 1992; Guichard e col., 1996) e a todas as conseqüentes mutações. Apesar de serem bons substratos para o reparo por glicosilases, não pode ser descartada a possibilidade de que outras vias também estejam envolvidas no reparo de etenoadutos. Por exemplo, a mutagenicidade de $1,N^2$ - ϵ dG aumenta quando presente em vetores que são transfectados para linhagens de *E.coli* deficientes em reparo por excisão de nucleotídeos (Langouët e col., 1998).

Todos esses estudos nos levam a acreditar que ao utilizarem-se métodos específicos e sensíveis para analisar amostras biológicas facilmente disponíveis, como leucócitos e urina, vários fatores que influenciam a peroxidação lipídica, tais como dietas ricas em lipídios, baixos níveis de antioxidantes e processos inflamatórios, podem ser avaliados com a utilização dos etenoadutos como marcadores de exposição às espécies reativas formadas a partir do processo de lipoperoxidação (Nair, 1999).

1.2.5.4. Estudos realizados com *trans,trans*-2,4-decadienal

Sabemos que muitos aldeídos são formados na fase de terminação da peroxidação lipídica. Em sistemas de peroxidação não enzimáticos, aproximadamente 30 a 40 moles de compostos carbonílicos são formados por mol de MDA (Vaca e col., 1988).

Em uma série de estudos foi caracterizada a formação de produtos fluorescentes a partir da interação de lipídios oxidados com o DNA. Esses produtos fluorescentes apresentavam um espectro com excitação máxima a 315 nm e emissão máxima a 420 nm (Reiss e Tappel, 1973; Fujimoto e col., 1984), sendo, portanto, diferente do obtido a partir da reação de MDA com DNA (Reiss e col., 1972). Esses resultados foram indicativos de que outros compostos carbonílicos formados durante a peroxidação lipídica poderiam reagir com o DNA e originar produtos caracterizados por diferentes espectros de fluorescência (Fujimoto e col., 1984).

Foram testados hidroperóxidos resultantes da oxidação do metil linolato e linolenato. Os testes foram feitos na presença de metais e agentes redutores (cisteína e ácido ascórbico), pois, nessa condição, os hidroperóxidos são facilmente decompostos, resultando na formação de uma grande variedade de compostos carbonílicos e espécies reativas de oxigênio que podem reagir com o DNA (Fujimoto e col., 1984).

Foi verificado que epidióxidos de linolenato autoxidado são precursores de 2,4-alcadienais (Frankel e col., 1983). Os hidroperoxi epidióxidos do linolenato estão entre os mais ativos dos produtos secundários da oxidação do linolenato, reagindo com DNA na presença de metais e agentes redutores e levando à formação de produtos fluorescentes com emissão máxima a 420 nm ($\lambda_{exc.} = 315$ nm) (Fujimoto e col., 1984). Diversos aldeídos poliinsaturados foram testados, sendo que os 2,4-alcadienais e o 2,4,7-decatrienal foram os mais eficientes na formação dos adutos fluorescentes com o DNA (Frankel e col., 1987).

Hasegawa e colaboradores investigaram as estruturas químicas dos produtos formados a partir da reação de adenina com hidroperóxidos do metil linolato ou com aldeídos resultantes da decomposição desses hidroperóxidos na presença de Fe^{2+} e ácido ascórbico. O 2,4-decadienal (DDE) e o 2-octenal reagiram diretamente com adenina, levando à formação de produtos fluorescentes (Hasegawa e col., 1988).

Experimentos preliminares realizados por Frankel e colaboradores e em nosso laboratório (Medeiros e col., 1992; Medeiros e col., 1995) mostraram que o DDE reage com DNA de timo de bezerro, formando adutos fluorescentes com emissão máxima a 420 nm quando excitados a 335 nm. Além disso, foi possível confirmar que o aduto formado entre adenina e DDE é a principal espécie responsável pela fluorescência observada (Medeiros e col., 1992). Recentemente foram caracterizados em nosso laboratório cinco etenoadutos fluorescentes resultantes da reação de metabólitos do DDE com 2'-desoxiadenosina *in vitro* (Carvalho e col., 1998; Carvalho e col., 2000).

Foi ainda demonstrado que os produtos secundários da peroxidação lipídica, principalmente os aldeídos α,β -insaturados, são altamente tóxicos para fibroblastos (Kaneko e col., 1987) e células endoteliais humanas (Kaneko e col., 1988). Dentre eles, os mais citotóxicos foram o 2,4-decadienal e o 4-hidroxi-2-nonenal. A concentração de 2,4-decadienal que levou a 50% de indução de morte (DL 50) foi 9 μ M (Kaneko e col., 1988).

Um estudo mostrou que radicais lipídicos induzem quebras no DNA (Yang e Schaich, 1996). Esses radicais lipídicos podem ser tanto radicais alcóxil e/ou peróxil resultantes da fase de propagação da peroxidação lipídica, como aqueles resultantes da oxidação de aldeídos insaturados (Yang e Schaich, 1996). A incubação de DDE com pBR322 levou à ocorrência de quebras no DNA, sendo a porcentagem do dano maior que a induzida por outros aldeídos insaturados testados (hexenal, heptenal, octenal, nonenal, 2,4-heptadienal e 2,4-nonadienal) (Yang e Schaich, 1996). Outro estudo mostrou que esse aldeído inibe o crescimento celular, altera o nível de glutatona celular e induz fragmentação do DNA (Nappez e col., 1996).

2,4-Decadienal é um aldeído bastante difundido no meio ambiente, sendo encontrado na água (Bao e col., 1997), em alimentos como peixe (Milo e Grosch, 1996; Yoshiwa e col., 1997; Cha e Cadwallader, 1998), carne (Brewer e Vega, 1995; Konopka e col., 1995), frango (Farkas e col., 1997; Kerler e Grosch, 1997) e pão (Schieberle e Grosch, 1991), estando presente como aromatizante natural em plantas (Moshonas e Shaw, 1979; Boosfeld e Vitzthum, 1995), sendo parte de secreções de defesa de alguns insetos (Boeve e col., 1997) e também gerado a partir de ácidos graxos poliinsaturados pela ação de lipoxigenases de plantas (Almosnino e Belin, 1991; Andrianarison e col., 1991). Além disso, é gerado endogenamente como produto da peroxidação lipídica (Esterbauer, 1985).

Dada a sua presença no meio ambiente e em nosso organismo e com base nas evidências preliminares de que esse aldeído induz danos celulares, sendo que esses danos ainda não haviam sido satisfatoriamente caracterizados, nosso laboratório começou a investigar a interação do DDE com bases do DNA.

O interesse em iniciarmos o trabalho com as células de mamífero veio de uma colaboração entre grupos de pesquisa do nosso departamento. No início deste trabalho o nosso grupo estava investigando reações entre aldeídos e nucleosídeos que levavam ao aparecimento de produtos fluorescentes. Nesse período iniciamos uma colaboração com o grupo do Prof. Rogério Meneghini, uma vez que uma de suas estudantes, Clélia Bertoncini, durante o seu trabalho com produtos de quebras de DNA, observou o aparecimento de fluorescência no DNA de células CV1-P incubadas com nitrilotriacetato de ferro (Fe-NTA), um conhecido indutor de peroxidação lipídica. Tentamos verificar se os produtos por ela observados coincidiam com os que estávamos observando *in vitro*. Entretanto, o sistema com as células/Fe-NTA mostrou-se bastante complexo, havendo variação no rendimento

dos produtos com pequenas variações nas condições de trabalho. As dificuldades encontradas na interpretação dos resultados nos indicaram que deveríamos primeiro entender o sistema de reação *in vitro* e em células expostas ao aldeído para então partirmos para a compreensão do que estava ocorrendo com as células na presença do indutor de peroxidação lipídica, que pode gerar diferentes aldeídos com rendimentos diferentes dependendo das condições das células.

Objetivos

2. Objetivos

Com o intuito de podermos compreender melhor os efeitos citotóxicos e genotóxicos associados com a exposição a produtos da peroxidação lipídica, nos concentramos nos seguintes objetivos:

1. Observação de alterações em DNA de células de mamífero (linhagem CV1-P) após incubação com DDE;
2. Identificação, isolamento e caracterização química de adutos formados a partir da reação de 2'-desoxiguanosina com DDE *in vitro*;
3. Detecção da formação desses adutos em DNA incubado com DDE *in vitro* e em DNA de células de mamífero (linhagem CV1-P).

Materiais e Métodos

3. Materiais e Métodos

3.1. Reagentes

Todos os reagentes utilizados foram da mais alta pureza comercialmente disponíveis. *trans, trans*-2,4-Decadienal (DDE), HF-piridina (70%) e 3-(trimetilsilil)-1-propanosulfonato de sódio (DSS) foram adquiridos da Aldrich (Milwaukee, WI). Soro fetal bovino (SFB) foi proveniente da Cultilab - materiais para cultura de células (Campinas, SP, Brasil). Clorofórmio e etanol (P.A.) foram fornecidos pela Cinética Química (São Paulo, Brasil). 2'-Desoxiguanosina, ácido fórmico, tetrahydrofurano (THF), metanol, hidróxido de sódio, fosfato de potássio monobásico, sulfato de magnésio, ácido fosfórico, dimetilformamida, ácido perclórico e 2-cloroacetaldeído foram obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha). [¹⁵N₅]-2'-desoxiguanosina foi fornecida por Cambridge Isotope Laboratories (Andover, MA). Fosfatase alcalina, nuclease P1 e brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT) foram provenientes da Pharmacia Biotech (Uppsala, Suécia). Acetonitrila e metanol grau cromatografia foram adquiridos da EM Science (Gibbstown, NJ). Carbonato de sódio anidro foi fornecido pela Mallinckrodt Chemical (Paris, França), azul de tripan pela Nuclear (São Paulo, Brasil), alaranjado de xilenol pela Labsynth Produtos para laboratórios Ltda (Diadema, SP, Brasil), líquido de cintilação pela fundação SARDI (São Paulo, Brasil), [³H] timidina pela Amersham Life Science Products (Buckinghamshire, Inglaterra), tubos Supelclean LC-18 (6 mL, 1 g) pela Supelco (Bellefonte, PA) e filtros Ultrafree-Mc (10,000 NMWL) e Ultrafree-Mc (poro: 0,22 µm) pela Millipore (Bedford, MA). Todos os outros reagentes foram obtidos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO).

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

3.2. Equipamentos

Os espectros de absorvância foram adquiridos em um espectrofotômetro Hitachi U3000 (Tokyo, Japão). As medidas de fluorescência foram feitas em um espectrofluorímetro Spex modelo 1681 (Spex Industries, Edison, NJ). Os espectros de ¹H e

^{13}C RMN em uma e duas dimensões foram adquiridos a 27°C em espectrômetros DPX-300 e DRX-500 MHz (Bruker, MA). Os espectros de massas foram obtidos em um espectrômetro Quattro II (Micromass, Manchester, U.K.). Para as centrifugações foram utilizadas as centrífugas refrigeradas modelos Centrifuge 5403 da Eppendorf (Hamburg, Alemanha) e Himac CR21E da Hitachi. As incubações que necessitavam de agitação foram feitas em um Orbital Incubator Shaker, Gyromax TM 703 (Amerex Instruments, Lafayette, CA). 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 potenciômetro da Corning modelo 320 (Sigma). As células foram incubadas em uma estufa de CO_2 Napco®, modelo 5100 da Precision Scientific (Chicago, Illinois). As liofilizações foram feitas em um sistema consistindo de uma bomba de vácuo de alta performance, modelo VLP120, da Savant (Savant instruments, Holbrook, NY), um micromódulo E-C para secagem a baixas temperaturas (E-C Apparatus, Holbrook, NY) e um concentrador modelo 5301 da Eppendorf. Foram utilizados balança analítica da A&D Company (Tokyo, Japan), banho maria modelo 144 da Fanem e um módulo para esterilização do ar, equipado com luz UV (EACI/ENVIRCO Environmental Air Control, Albuquerque, NM).

3.3. Danos celulares induzidos por DDE

3.3.1. Cultivo das células

Meio de cultura: meio Eagle modificado por Dulbecco (DME) suplementado com NaHCO_3 (1,2 g/L), 100 $\mu\text{g/mL}$ de penicilina, 94 $\mu\text{g/mL}$ 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 da Corning. O SFB estéril foi adicionado a alíquotas do meio estéril de acordo com a necessidade de uso.

Soluções

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

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

Fibroblastos renais de macaco verde africano, linhagem CV1-P, doados pelo Prof. Rogério Meneghini (LNLS - Campinas, SP), foram cultivados no meio de cultura suplementado, em atmosfera com 5% de CO₂, a 37°C, no escuro. As células cresceram aderidas à superfície de garrafas plásticas de cultura e foram repicadas em períodos de 5 a 6 dias.

Procedimento para o repique das células: após a retirada do meio, a cultura foi lavada 2 vezes com PBS. A seguir, foi incubada a 37°C com volume mínimo (5 ml) de solução de tripsina até que as células se desprendessem (± 2 min). As células foram, então, ressuspensas no meio de cultura suplementado e a suspensão distribuída para novas garrafas ou placas na diluição desejada.

3.3.2. Tratamento das células com DDE

Após as células atingirem a confluência (aproximadamente 1×10^6 células/poço de 1,6 cm de diâmetro, 6×10^6 células/placa de 10 cm de diâmetro ou 3×10^7 células/placa de 15 cm de diâmetro), o meio de cultura foi substituído por outro sem soro. As incubações com DDE, partindo de uma solução estoque de 35 mM de DDE em etanol 98% preparada imediatamente antes do uso, foram feitas na estufa de CO₂ a 37°C de diferentes formas.

3.3.2.1. Incubações para extração do DNA e medidas de fluorescência

As células cultivadas em placas de 15 cm de diâmetro foram incubadas com DDE nas concentrações finais de 50 µM, 60 µM ou 70 µM em 15 mL de meio de cultura sem soro conforme descrito abaixo:

- a) adição de solução de DDE para a concentração final de 60 μM . A incubação foi feita por 50 minutos e o DNA foi extraído para medida de fluorescência;
- b) adição de solução de DDE para a concentração final de 50 μM . A incubação foi feita por 1 hora e 45 minutos e, em seguida, o meio de cultura contendo DDE foi substituído por meio de cultura suplementado com SFB e as células foram incubadas por mais 2 horas, 6 horas ou 22 horas antes de ser extraído o DNA para medida de fluorescência;
- c) adição de solução de DDE para a concentração final de 70 μM . A incubação foi feita por 50 minutos e, em seguida, o meio de cultura contendo DDE foi substituído por meio de cultura suplementado com SFB e as células foram incubadas por mais 3 horas, 6 horas ou 8 horas antes de ser extraído o DNA para medida de fluorescência.

Paralelamente foi extraído DNA de células não submetidas ao tratamento com DDE (controle).

3.3.2.2. Incubações para medidas de viabilidade celular

As incubações foram feitas de quatro diferentes formas:

- a) as células cultivadas em poços de 1,6 cm de diâmetro foram incubadas com DDE na concentração final de 65 μM em 1,5 mL de meio de cultura sem soro por 1 hora, 3 horas, 7 horas e 9 horas. Após o término de cada período de incubação, a viabilidade celular foi determinada pelo método de coloração com azul de tripan;
- b) as células cultivadas em poços de 1,6 cm de diâmetro foram incubadas com DDE na concentração final de 65 μM em 1,5 mL de meio de cultura sem soro por 2 horas, 4 horas, 6 horas, 8 horas e 24 horas. Após o término de cada período de incubação, a viabilidade celular foi determinada pelo ensaio do MTT;

- c) as células cultivadas em poços de 1,6 cm de diâmetro foram incubadas com 300 μM de BSO em 1 mL de meio de cultura sem soro por 3 horas e, em seguida, 65 μM de DDE em 1,5 mL de meio de cultura sem soro por 2 horas, 4 horas, 8 horas e 24 horas. Após o término de cada período de incubação, a viabilidade celular foi determinada pelo ensaio do MTT;
- d) as células cultivadas em poços de 1,6 cm de diâmetro foram incubadas com DDE nas concentrações finais de 1 μM , 6 μM , 12,5 μM , 25 μM , 50 μM e 100 μM em 1,5 mL de meio de cultura sem soro por 5 horas. Após esse período de incubação, a viabilidade celular foi determinada pelo ensaio do MTT.

Paralelamente, foram feitas medidas de viabilidade de células não submetidas a qualquer tratamento (controle) e incubadas com L-butionina-[S,R]-sulfoximina (BSO) e/ou etanol nas concentrações correspondentes às presentes em cada incubação com DDE.

3.3.2.3. Incubações para dosagem de sulfidrilas não proteicas (NPSH)

As células cultivadas em placas de 10 cm de diâmetro foram incubadas com DDE nas concentrações finais de 65 μM ou 100 μM em 10 mL de meio de cultura sem soro por diferentes intervalos de tempo como descrito abaixo:

- a) adição de solução de DDE para a concentração final de 65 μM . As células ficaram expostas ao aldeído por 2,5 horas, 3 horas e 4 horas. Após o término de cada período de incubação, foi feita a lise para dosagem de NPSH;
- b) adição de solução de DDE para a concentração final de 65 μM . As células ficaram expostas ao aldeído por 2 horas, 3 horas, 4 horas, 5 horas, 8 horas e 24 horas. Após o término de cada período de incubação, foi feita a lise para dosagem de NPSH;
- c) adição de solução de DDE para a concentração final de 100 μM . As células ficaram expostas ao aldeído por 1,5 horas, 2,5 horas, 3,5 horas e 4,5 horas.

Após o término de cada período de incubação, foi feita a lise para dosagem de NPSH.

Paralelamente, foram feitas dosagens de NPSH de células não submetidas a qualquer tratamento (controle) e incubadas com etanol nas concentrações correspondentes às presentes nas incubações com DDE.

3.3.2.4. Incubações para medidas de fragmentação do DNA

As células cultivadas em poços de 1,6 cm de diâmetro foram incubadas com diferentes concentrações de DDE por diferentes intervalos de tempo como descrito abaixo:

- a) adição de solução de DDE para as concentrações finais de 6 μM , 12,5 μM , 25 μM e 50 μM . As células ficaram expostas ao aldeído por 3 horas. Após esse período foi seguido o procedimento para a determinação da porcentagem de DNA fragmentado;
- b) adição de solução de DDE para a concentração final de 100 μM em 1 mL de meio de cultura sem soro. As células ficaram expostas ao aldeído por 3 horas, 5 horas, 8 horas e 24 horas. Após o fim de cada período de incubação, foi seguido o procedimento para a determinação da porcentagem de DNA fragmentado.

Paralelamente foram feitas medidas da fragmentação do DNA de células não submetidas a qualquer tratamento (controle) e incubadas com etanol nas concentrações correspondentes às presentes nas incubações com DDE.

3.3.2.5. Incubações para análise da formação de adutos em DNA

As células cultivadas em placas de 15 cm de diâmetro foram incubadas com diferentes concentrações de DDE em 15 mL de meio de cultura sem soro por diferentes intervalos de tempo como descrito abaixo:

- a) adição de solução de DDE para a concentração final de 50 μM . A incubação foi feita por 5 horas;
- b) adição de solução de DDE para a concentração final de 65 μM . A incubação foi feita por 50 minutos e, em seguida, o meio de cultura contendo DDE foi substituído por meio de cultura suplementado com SFB e as células foram incubadas por mais 2 a 3 horas antes de ser extraído o DNA;
- c) adição de solução de DDE para a concentração final de 65 μM . A incubação foi feita por 5 horas;
- d) adição de solução de DDE para a concentração final de 100 μM . A incubação foi feita por 5 horas.

Após o fim de cada período de incubação, foi iniciada a extração do DNA para a verificação de formação de adutos. Paralelamente foram feitas as mesmas medidas em células não submetidas ao tratamento com DDE (controle).

3.3.3. Viabilidade celular

3.3.3.1 Determinação da viabilidade celular pelo método de coloração com azul de tripan

Soluções

PBS: 137 mM NaCl, 1,68 mM KCl, 1,47 mM Na_2HPO_4 , pH 7,0.

Azul de tripan: 0,4% de azul de tripan em água (p/v).

Este método se baseia no princípio de que células viáveis não adquirem coloração, enquanto as células não-viáveis adquirem (Patterson, 1979).

Após os tratamentos (item 3.3.2.2.a), as células ($\sim 1 \times 10^6$) foram lavadas 2 vezes com PBS e ressuspensas em 2 mL desse tampão. Em um tubo foram misturados 500 μL de solução de azul de tripan, 200 μL de PBS e 300 μL da suspensão de células. Após 5 min foi iniciada a contagem utilizando-se um hemocitômetro.

Cada quadrado do hemocitômetro, com a lamínula no local certo, representa um volume total de $0,1 \text{ mm}^3$ ou 10^{-4} cm^3 . Desde que 1 cm^3 equivale a aproximadamente 1 mL , a subsequente concentração de células por mL e o número total de células foram determinados usando-se os seguintes cálculos:

$$\text{células/mL} = \text{média das células contadas em cada quadrado} \times \text{fator de diluição} \times 10^4$$
$$\text{total de células} = \text{células/mL} \times \text{volume original da solução da qual a amostra de células foi removida}$$
$$\text{viabilidade celular (\%)} = \frac{\text{células viáveis totais (não coradas)}}{\text{total de células (coradas e não coradas)}} \times 100$$

O gráfico de sobrevivência relativa foi feito dividindo-se a viabilidade das células tratadas pela viabilidade das células controles.

3.3.3.2 *Determinação da viabilidade celular pelo ensaio do brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT)*

Soluções

Solução de lise: 10% SDS em 1:1 dimetilformamida:água v/v, pH 4,8.

MTT: 5 mg/mL em PBS.

O método, originalmente descrito por Mosmann (1983), se baseia na conversão do sal tetrazólio (MTT) para o produto colorido formazan, cuja concentração pode ser medida espectrofotometricamente. Essa conversão ocorre, principalmente, em mitocôndrias intactas e, portanto, células viáveis (Hansen e col., 1989).

As células foram semeadas numa densidade de 5×10^5 células/poço em placas de 24 poços ($1,6 \text{ cm } \varnothing$) e incubadas por 16 horas a 37°C em meio de cultura suplementado com SFB. Para construção da curva padrão, foram plaqueadas de 1×10^4 a 6×10^5 células/poço (1×10^4 , 3×10^4 , 6×10^4 , 9×10^4 , 1×10^5 , 3×10^5 , 6×10^5) em duplicata e incubadas pelo mesmo período de tempo (16 horas).

Após esse período, as células foram incubadas como descrito nos itens 3.3.2.2.b,c,d. Paralelamente, células controle foram incubadas com concentração de etanol (0,13% v/v) equivalente à presente nas soluções de incubação com DDE. Ao final de cada incubação, o meio de cultura foi substituído por outro sem soro ao qual foram adicionados 300 µL de solução de MTT. Após duas horas de incubação a 37°C, o meio contendo MTT foi removido com cuidado para que não fosse aspirado o formazan precipitado no poço. Foi, então, adicionado 1 mL da solução de lise a cada poço. Após solubilização dos precipitados, foi feita a medida de absorbância a 595 nm.

3.3.4. Dosagem de sulfidrilas não proteicas (NPSH)

Soluções

PBS: 137 mM NaCl, 1,68 mM KCl, 1,47 mM Na₂HPO₄, pH 7,0.

Solução A: 2M HClO₄, 4mM EDTA.

Solução B: 2M NaOH.

Solução C: 300 mM tampão fosfato, pH 8.

DTNB: 3,5 mM DTNB em tampão fosfato 100 mM, pH 7.

Após os tratamentos (item 3.3.2.3), as células foram lavadas 2 vezes com 10 mL de PBS e ressuspensas em 10 mL de meio de cultura suplementado com SFB. As suspensões foram transferidas para tubos e centrifugadas a 1500 g por 5 min a 10°C. Os sobrenadantes foram removidos e os precipitados ressuspensos em 10 mL de PBS com auxílio de pipeta Pasteur. Foi feita nova centrifugação a 1500 g por 5 min a 10°C, o sobrenadante removido e o precipitado ressuspenso em 250 µL de PBS.

Em seguida, as células foram lisadas e desproteinizadas com adição de 250 µL da solução A. As suspensões foram centrifugadas a 8000 g por 5 min a 10°C e os sobrenadantes foram utilizados para dosagem de NPSH, enquanto os precipitados foram utilizados para dosagem de proteínas.

Para a dosagem de NPSH, 200 µL de sobrenadante foram neutralizados pela adição de 62 µL da solução B e 800 µL da solução C. O volume de 1 mL dessa solução foi transferido para uma cubeta e foram adicionados 7 µL da solução de DTNB. A absorbância

a 412 nm, devida à formação de 5-tio-2-nitrobenzoato (TNB), foi verificada 1 minuto após a adição de DTNB: $2\text{GSH} + \text{DTNB} \rightarrow \text{GSSG} + 2\text{TNB}$.

A concentração de NPSH foi determinada utilizando-se um coeficiente de extinção molar de $13600\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Ellman, 1959). A concentração proteica do precipitado foi determinada pelo método de Bradford. A concentração de NPSH foi expressa por μg de proteína.

3.3.5. Dosagem de proteínas - método de Bradford

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 final de 1 litro.

Solução A: 0,15 M NaCl.

Solução B: 300 mM NaOH.

O método se baseia na observação de que o azul brilhante de coomassie G-250 se converte da forma vermelha para a azul após ligação à proteína. O complexo é formado rapidamente (2 minutos), permanece disperso em solução por um tempo relativamente longo (1 hora) e tem um alto coeficiente de extinção, o que permite grande sensibilidade na dosagem das proteínas (Bradford, 1976).

A curva padrão para dosagem das proteínas foi construída utilizando-se albumina de soro bovino (10 a 100 μg de albumina em 100 μL de solução). As soluções de proteína foram preparadas na solução A. Aos tubos contendo 100 μL de solução de proteína foram adicionados 5 mL da solução para dosagem. Após agitação, a absorbância a 595 nm foi medida em cubetas de 3 mL contra o branco contendo 100 μL da solução A e 5 mL da solução para dosagem. A massa de proteína foi, então, plotada contra a absorbância correspondente, resultando na curva padrão para determinação do conteúdo de proteínas em amostras desconhecidas.

Para a dosagem de proteínas nas amostras, os precipitados foram ressuspensos em 400 μL da solução B. As soluções de proteínas foram preparadas juntando-se 20 μL de

cada amostra com 80 μ L da solução A. Às soluções resultantes foram adicionados 5 mL da solução para dosagem e a leitura da absorbância feita como descrito acima.

3.3.6. Medida de fragmentação do DNA

Soluções

PBS: 137 mM NaCl, 1,68 mM KCl, 1,47 mM Na_2HPO_4 , pH 7,0.

Tripsina: 0,05% (p/v) de tripsina em PBS (pH 7,0) contendo 1 mM de EDTA.

Meio de lise: 2% SDS, 10 mM Tris, 10 mM EDTA, 50 mM NaOH.

Solução A: 0,12 M KCl.

Solução B: 0,1 N HCl.

Solução C: 5% TCA.

O método se baseia no princípio de que o DNA intacto, de alto peso molecular, precipita associado a nucleoproteínas, na presença de SDS, enquanto o DNA fragmentado é liberado no sobrenadante (Olive, 1988).

As células foram semeadas numa densidade de 3×10^5 células/poço em placas de 24 poços (1,6 cm \varnothing) e incubadas por 24 horas a 37°C. Após esse período, foi feita marcação do DNA das células com [^3H] timidina (0,5 $\mu\text{Ci/mL}$) em meio de cultura suplementado com SFB por 20 horas, seguida por um período de recuperação de 2 horas em meio frio. Esse procedimento assegura a não existência de radioatividade incorporada em pequenos fragmentos resultantes da replicação do DNA. Em seguida, as células foram lavadas com PBS e incubadas com DDE ou etanol como descrito no item 3.3.2.4.

Ao final de cada incubação, as células foram lavadas 2 vezes com PBS gelado e a cada poço foram adicionados 300 μL de solução de tripsina. As células foram transferidas para tubos Eppendorf aos quais foram adicionados 300 μL do meio de lise. Em seguida, foram adicionados 300 μL da solução A gelada. Os tubos foram transferidos para banho-maria a 65°C por 10 minutos e, em seguida, resfriados em banho de gelo por 5 minutos.

Após a formação do complexo nucleoproteico, os tubos foram submetidos a uma centrifugação a 1500 g, 4°C, por 10 minutos, para a separação deste. Os sobrenadantes obtidos foram neutralizados pela adição de 70 μL da solução B e secos a vácuo até que

restassem 100 μ L de solução. Os precipitados foram ressuspensos em água deionizada e aquecidos a 65°C. Ambos foram transferidos para pequenos quadrados de papel absorvente Whatmann nº 17. O material ácido-insolúvel foi precipitado nos filtros com a solução C. Posteriormente esses papéis foram lavados com etanol e acetona. Após secos, foram transferidos para frascos de contagem de cintilação contendo 10 mL de líquido de cintilação e a radioatividade presente em cada amostra foi medida em contador de cintilação líquida.

O cálculo da porcentagem de DNA fragmentado foi feito da seguinte forma:
%DNA fragmentado = [cpm sobrenadante \div (cpm sobrenadante+cpm precipitado)] x 100.

3.3.7. Extração do DNA

Soluções

Solução A: 0,2% de SDS em DES (5 mM CDTA, 1M de LiCl, 50 mM Tris/HCl pH 8,0 e 1M uréia)

Solução B: 1 mM CDTA e 10 mM de Tris/HCl, pH = 7,5.

RNase livre de DNase: 10 mg de RNase em 1 mL de tampão acetato de sódio 10 mM, pH 5,2. Aquecer a 100°C por 15 min.

O DNA genômico foi extraído por adição de 2 mL da solução A a cada placa contendo cerca de 3×10^7 células. A solução contendo as células foi transferida para um tubo e, a esta mistura, foram adicionados 100 μ g/mL de proteinase K. Após incubação (*overnight*) a 37°C, o DNA foi precipitado com 0,5 volume de isopropanol e transferido com um fino bastão de vidro para um tubo contendo volume da solução B suficiente para dissolvê-lo. A solução foi então incubada com 50 μ g/mL de RNase livre de DNase por 2 horas a 37°C. Em seguida, foram realizadas duas extrações (1500g, 5 min, 25°C) com igual volume de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1) e a fase aquosa foi transferida para outro tubo onde o DNA foi precipitado com igual volume de etanol (10000 g, 30 min, 4°C). O DNA obtido foi lavado 2x com etanol 70%, seco ao ar e redissolvido em água. Sua concentração foi determinada espectrofotometricamente por leitura da absorbância a 260 nm e sua pureza verificada pela relação $A_{260}/A_{280} > 1,8$. Em média foi possível conseguir 150 μ g de DNA a partir de cada placa de células.

3.3.8. Hidrólise do DNA

O DNA extraído das células foi hidrolisado enzimaticamente para subsequente análise por HPLC. Para a hidrólise, foi utilizado o procedimento descrito abaixo.

Um total de 1 mg de DNA foi dissolvido em 1 mL de tampão acetato de sódio 20 mM, pH 4,8. Em seguida, foi adicionada nuclease P1 (10 unidades para cada 100 µg de DNA) e a amostra foi incubada a 37°C por 4 horas. Então, foram adicionados 150 µL de tampão Tris-HCl 1M, pH 7,4 para cada 1 mL de solução e 15 unidades de fosfatase alcalina para cada 1 mg de DNA. A amostra foi incubada a 37°C por 2 horas, filtrada e alíquotas do DNA hidrolisado foram submetidas à análise por HPLC.

3.3.9. Análise da presença de diferentes produtos em DNA de células incubadas com DDE por HPLC-UV/fluorescência e HPLC-EC

Para as análises foram utilizados dois sistemas de HPLC da Shimadzu (Shimadzu, Kyoto, Japão):

Sistema 3.3.9.A: duas bombas LC-10 AD, um injetor Rheodyne (Cotati, CA), um detector de absorvância, modelo SPD-10 AV, e um detector de fluorescência, modelo RF-535, controlados por um módulo de comunicação CBM-10A e o software Class LC-10AWS;

Sistema 3.3.9.B: duas bombas LC-10 AD/VP, um injetor Rheodyne (Cotati, CA), um detector de absorvância, modelo SPD-10 AV/VP, e um detector eletroquímico amperométrico digital Antec Decade (Antec, Leyden, Holanda), controlados por um módulo de comunicação SCL-10A/VP e o software Class-VP.

Foram utilizadas as seguintes condições de cromatografia de alta performance em fase reversa:

Condição 3.3.9.1: uma coluna analítica Shim-pack CLC-ODS (150 mm x 6 mm i.d., 10 µm) da Shimadzu foi eluída com um gradiente de formiato de amônio (25 mM, pH 5,5) e acetonitrila (de 0 a 30 min, 5 a 30% de acetonitrila; de 30 a 50 min, 30 a 50% de acetonitrila; de 50 a 55 min, 50 a 100% de acetonitrila; e de 55 a 65 min, 100 a 5% de acetonitrila) a um fluxo de 1 mL/min. A absorvância foi monitorada a 260 nm para

análise dos nucleosídeos não modificados e quantificação de 2'-desoxiguanosina, e a fluorescência emitida foi monitorada a 420 nm ($\lambda_{exc.} = 300$ nm).

Condição 3.3.9.2: uma coluna analítica Shim-pack CLC-ODS (250 mm x 4,6 mm i.d., 5 μ m) da Shimadzu foi eluída com um gradiente de formiato de amônio (25 mM, pH 5,5) e acetonitrila (de 0 a 30 min, 5 a 20% de acetonitrila; de 30 a 50 min, 20 a 40% de acetonitrila; de 50 a 55 min, 40 a 100% de acetonitrila; e de 55 a 65 min, 100 a 5% de acetonitrila) a um fluxo de 1 mL/min. A absorbância foi monitorada a 225 nm para análise dos nucleosídeos não modificados e quantificação de 2'-desoxiguanosina, e a fluorescência emitida foi monitorada a 420 nm ($\lambda_{exc.} = 300$ nm).

Condição 3.3.9.3: uma coluna analítica Spherex 5 C18 (250 mm x 4,6 mm i.d., 5 μ m) da Phenomenex (Torrance, CA) foi eluída com uma solução de fosfato de potássio (50 mM KH_2PO_4 , pH 5,5) contendo 10% de metanol e 1,2 mM de EDTA a um fluxo de 1 mL/min. A absorbância foi monitorada a 285 nm para análise dos nucleosídeos não modificados e quantificação de 2'-desoxiguanosina. Foi feita detecção eletroquímica em potencial de + 600 mV.

Todos os solventes utilizados foram previamente filtrados e degaseificados. A estimativa da quantidade de DNA em cada injeção foi obtida a partir da quantificação de 2'-desoxiguanosina em cada amostra. Foi utilizado o seguinte cálculo: μ mol dG x 324,5 (média da massa molecular dos nucleotídeos) x 4 = μ g de DNA. Para essas quantificações, foram construídas curvas de calibração de 2'-desoxiguanosina utilizando-se as mesmas condições de HPLC em que foram injetadas as amostras de DNA.

3.3.10. Tratamento estatístico dos dados

A análise estatística dos dados foi feita através do teste t para comparação entre duas populações. Foram consideradas significativas as diferenças com $p < 0,05$.

3.4. Análise da formação de adutos entre 2'-desoxiguanosina e DDE in vitro

3.4.1. Condições para separação e purificação dos diferentes produtos por HPLC

Para as análises foi utilizado um sistema de HPLC da Shimadzu (Shimadzu, Kyoto, Japão) incluindo duas bombas LC-10 AD, um injetor Rheodyne (Cotati, CA), um detector de absorvância, modelo SPD-10 AV, e um detector de fluorescência, modelo RF-535, controlados por um módulo de comunicação CBM-10A e o software Class LC-10AWS.

Foram utilizadas as seguintes condições de cromatografia de alta performance em fase reversa:

Condição 3.4.1.1: uma coluna analítica Shim-pack CLC-ODS (250 mm x 4,6 mm i.d., 5 μ m) da Shimadzu foi eluída com um gradiente de formiato de amônio (25 mM, pH 5,5) e acetonitrila (de 0 a 30 min, 5 a 20% de acetonitrila; de 30 a 50 min, 20 a 40% de acetonitrila; de 50 a 55 min, 40 a 100% de acetonitrila; e de 55 a 65 min, 100 a 5% de acetonitrila) a um fluxo de 1 mL/min. A absorvância foi monitorada a 254 nm e a fluorescência emitida foi monitorada a 420 nm ($\lambda_{exc.} = 300$ nm).

Condição 3.4.1.2: uma coluna semi preparativa Luna 10 C8(2) (250 mm x 10 mm i.d., 10 μ m) da Phenomenex foi eluída com um gradiente de formiato de amônio (25 mM, pH 5,5) e acetonitrila (de 0 a 30 min, 5 a 20% de acetonitrila; de 30 a 50 min, 20 a 40% de acetonitrila; de 50 a 55 min, 40 a 100% de acetonitrila; e de 55 a 65 min, 100 a 5% de acetonitrila) a um fluxo de 4,7 mL/min. A absorvância foi monitorada a 254 nm e a fluorescência emitida foi monitorada a 420 nm ($\lambda_{exc.} = 300$ nm).

Condição 3.4.1.3: uma coluna semi preparativa Luna 10 C18(2) (250 mm x 10 mm i.d., 10 μ m) da Phenomenex foi eluída com um gradiente de formiato de amônio (25 mM, pH 5,5) e acetonitrila (de 0 a 5 min, 5% de acetonitrila; de 5 a 30 min, 5 a 20% de acetonitrila; de 30 a 50 min, 20 a 40% de acetonitrila; de 50 a 55 min, 40 a 100% de acetonitrila; e de 55 a 65 min, 100 a 5% de acetonitrila) a um fluxo de 4,7 mL/min. A absorvância foi monitorada a 225 nm.

Condição 3.4.1.4: uma coluna analítica Luna C18(2) (250 mm x 4,6 mm i.d., 5 μ m) da Phenomenex foi eluída com um gradiente de água e acetonitrila (de 0 a 5 min, 5% de acetonitrila; de 5 a 30 min, 5 a 20% de acetonitrila; de 30 a 50 min, 20 a 40% de acetonitrila; de 50 a 55 min, 40 a 100% de acetonitrila; e de 55 a 65 min, 100 a 5% de acetonitrila) a um fluxo de 1 mL/min. A absorvância foi monitorada a 225 nm.

Condição 3.4.1.5: uma coluna analítica Luna C18(2) (250 mm x 4,6 mm i.d., 5 μ m) da Phenomenex foi eluída com um gradiente de água e acetonitrila (de 0 a 5 min, 5 a 25% de acetonitrila; de 5 a 10 min, 25 a 30% de acetonitrila; de 10 a 25 min, 30 a 40% de acetonitrila; de 25 a 35 min, 40 a 100% de acetonitrila; e de 35 a 45 min, 100 a 5% de acetonitrila) a um fluxo de 1 mL/min. A absorvância foi monitorada a 280 nm.

Condição 3.4.1.6: uma coluna analítica Luna C18(2) (250 mm x 4,6 mm i.d., 5 μ m) da Phenomenex foi eluída com um gradiente de água e acetonitrila (de 0 a 5 min, 5 a 15% de acetonitrila; de 5 a 10 min, 15 a 20% de acetonitrila; de 10 a 35 min, 20 a 35% de acetonitrila; de 35 a 45 min, 35 a 40% de acetonitrila; de 45 a 55 min, 40 a 100% de acetonitrila; e de 55 a 60 min, 100 a 5% de acetonitrila) a um fluxo de 1 mL/min. A absorvância foi monitorada a 280 nm.

Condição 3.4.1.7: uma coluna analítica Luna C18(2) (250 mm x 4,6 mm i.d., 5 μ m) da Phenomenex foi eluída com um gradiente de água e acetonitrila (de 0 a 5 min, 5 a 15% de acetonitrila; de 5 a 10 min, 15 a 20% de acetonitrila; de 10 a 35 min, 20 a 30% de acetonitrila; de 35 a 45 min, 30 a 100% de acetonitrila; e de 45 a 55 min, 100 a 5% de acetonitrila) a um fluxo de 1 mL/min. A absorvância foi monitorada a 280 nm.

Todos os solventes utilizados foram previamente filtrados e degaseificados.

3.4.2. Síntese do padrão 1,N²-eteno-2'-desoxiguanosina

O padrão 1,N²- ϵ dGuo foi obtido a partir da reação de dGuo com cloroacetaldeído como descrito por Sattsangi e col. (1977), com algumas modificações. Em resumo, 300 μ L de uma solução aquosa 2M de cloroacetaldeído (0,6 mmol) foram adicionados a uma solução de dGuo (0,04 mmol em 10 mL de tampão fosfato 50 mM, pH 6,4). O controle

consistiu na incubação de dGuo em tampão fosfato (50 mM, pH 6,4) sem adição de cloroacetaldeído.

As incubações foram feitas por 4 dias sob agitação a 37°C. Posteriormente o aduto foi purificado por HPLC (condições 3.4.1.2, 3.4.1.3 e 3.4.1.4) e suas características espectroscópicas foram avaliadas por espectros de UV, ESI/MS e ¹H RMN.

3.4.3. Determinação da concentração de peróxidos no THF

Os experimentos na presença de peróxidos foram feitos utilizando-se tetraidrofurano que havia estado previamente exposto à luz, a qual induz a formação dos peróxidos. A concentração de peróxidos no THF utilizado foi determinada pelo ensaio do Fe²⁺/alaranjado de xilenol (Jiang e col., 1991). Este método se baseia na rápida oxidação de Fe²⁺, mediada por hidroperóxidos, sob condições ácidas ($\text{Fe}^{2+} + \text{ROOH} \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{RO}^{\bullet} + \text{OH}^-$). Fe³⁺ forma um cromóforo com o alaranjado de xilenol que absorve fortemente a 560 nm.

Para as medidas, foi preparada uma solução aquosa contendo 250 μM de Fe²⁺, 25 mM de H₂SO₄, 100 μM de alaranjado de xilenol e 4 mM de BHT (a solução original de Fe²⁺ foi preparada em H₂SO₄ para evitar a sua autooxidação e a solução mãe de BHT foi preparada em 90% de metanol). A um volume de 900 μL dessa solução foram adicionados 100 μL de diferentes soluções contendo diferentes concentrações de THF em água. A concentração de peróxidos no THF foi determinada pela medida da absorbância a 560 nm ($\epsilon = 4,3 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) multiplicada pela diluição.

3.4.4. Reação de 2'-desoxiguanosina com DDE na presença de peróxidos: síntese e purificação dos adutos

Diferentes condições de incubação foram testadas até chegarmos na condição 3.4.4.3 que proporcionou melhor rendimento ($\approx 0,5\%$) de cada um dos adutos:

Condição 3.4.4.1: DDE (0,34 mmol, 52 mg) dissolvido em 1 mL de THF contendo aproximadamente 800 μ moles de peróxidos foi adicionado à solução de dGuo (0,034 mmol, 9 mg) preparada em 1 mL de tampão fosfato (50 mM, pH 7,4). A incubação foi feita sob agitação a 37°C por 24 horas.

Condição 3.4.4.2: DDE (0,68 mmol, 104 mg) dissolvido em 1 mL de THF contendo aproximadamente 800, 1600, 3200, 4800, 5600, 6400, 8000 ou 11200 μ moles de peróxidos foi adicionado à solução de dGuo (0,068 mmol, 18 mg) preparada em 1 mL de tampão carbonato-bicarbonato (50 mM, pH 9,4). A incubação foi feita sob agitação a 37°C por 24 horas.

Condição 3.4.4.3: DDE (0,68 mmol, 104 mg) dissolvido em 1 mL de THF contendo aproximadamente 32 μ moles de peróxidos foi adicionado à solução de dGuo (0,068 mmol, 18 mg) preparada em 1 mL de tampão carbonato-bicarbonato (200 mM, pH 9,4). A incubação foi feita sob agitação a 50°C por 48 horas.

Os controles consistiram na incubação de 2'-desoxiguanosina nas mesmas condições sem adição de DDE.

Após o fim de cada incubação, o excesso de aldeído foi removido por 2 extrações com igual volume de clorofórmio. Foi, então, feita a cromatografia líquida da fase aquosa resultante, utilizando-se, primeiramente, a condição de HPLC 3.4.1.2 e, posteriormente, a condição 3.4.1.3 para a separação e primeira purificação dos adutos. As frações correspondentes aos adutos A1 e A2 foram liofilizadas e repurificadas através das condições de HPLC 3.4.1.4 e 3.4.1.7, respectivamente, após terem sido testadas as condições 3.4.1.5 e 3.4.1.6. Os outros adutos que apresentaram tempo de retenção intermediário também foram coletados e concentrados para posterior caracterização química (**figura 4.19**).

3.4.5. Pré-purificação de amostras através de tubos de fase sólida Supelclean LC-18

Em alguns casos, para a separação dos adutos mais hidrofóbicos resultantes da reação de dGuo com DDE na presença de peróxidos, em relação aos nucleosídeos não

modificados, foram feitas pré-purificações utilizando-se tubos de fase sólida *Supelclean* LC-18. Esse procedimento teve a finalidade de facilitar a purificação desses produtos.

A coluna foi equilibrada com 2 mL de acetonitrila e, em seguida, com 4 mL de uma solução 10% de acetonitrila em tampão formiato de amônio (25 mM, pH 5,5). Um volume de 2 mL de amostra foi colocado em contato com a coluna e a eluição dos produtos mais polares foi feita com 3 mL da solução 10% de acetonitrila em tampão formiato de amônio (25 mM, pH 5,5). Em seguida, a coluna foi lavada com 4 mL de acetonitrila para eluir os produtos menos polares, os quais foram, posteriormente, analisados por HPLC.

3.4.6. Caracterização química dos adutos

Os adutos, após serem purificados em massa suficiente (≈ 5 mg), foram caracterizados pela análise de espectros de UV, ^1H RMN, ^{13}C RMN e ESI/MS.

3.4.6.1. Espectros de absorvância (UV)

Soluções

Solução A: HCl/KCl 50 mM, pH 1

Solução B: tampão fosfato 50 mM, pH 7

Solução C: tampão carbonato-bicarbonato 50 mM, pH 11

Os espectros de absorvância em UV (210 a 350 nm) foram obtidos em pH 1, pH 7 e pH 11. Para isso, alíquotas de mesmo volume da solução de cada aduto foram adicionadas a volumes iguais de três soluções diferentes (A, B e C), totalizando volumes finais de 1 mL.

3.4.6.2. Espectros de ressonância magnética nuclear (RMN)

Após completamente secos, os adutos foram solubilizados em aproximadamente 700 μL de $\text{DMSO-}d_6$. Após obtenção dos espectros em $\text{DMSO-}d_6$, foram adicionados 100 μL de D_2O a cada tubo e feitos novos espectros de ^1H RMN para que se pudesse confirmar a

presença de prótons que sofrem rápida troca química (prótons ligados a átomos de oxigênio ou nitrogênio) nas estruturas.

No caso do aduto **A1** foi necessária a obtenção de apenas espectros de ^1H RMN para confirmação da sua estrutura. A estrutura dos adutos **A2-1** e **A2-2** só foi confirmada após terem sido obtidos espectros de ^1H RMN, ^1H - ^1H COSY, ^{13}C RMN, DEPT, correlações heteronucleares a curta distância ^1H - ^{13}C (HMQC) e correlações heteronucleares a longa distância ^1H - ^{13}C (HMBC). Os espectros foram obtidos nos espectrômetros DPX-300 e DRX-500 MHz da central analítica do Instituto de Química da USP e foram registrados com e sem supressão do pico de água. Os picos dos solventes foram usados como referências.

3.4.6.3. Espectros de massas (ESI/MS)

Os espectros de massas foram obtidos com ionização por *electrospray* no modo positivo em um espectrômetro com triplo quadrupolo Quattro II da Micromass. Uma bomba LC-10AD da Shimadzu conectada a um divisor de fluxo (*splitter*) foi utilizada para bombear o eluente, uma mistura de água e acetonitrila (50:50), diretamente para o espectrômetro a um fluxo de 7 $\mu\text{L}/\text{min}$. As amostras dissolvidas em soluções aquosas contendo 0,2% de ácido fórmico (v/v) foram injetadas na fase móvel através de um injetor Rheodyne conectado a um *loop* de 10 ou 20 μL . Foi utilizado o intervalo de relação massa/carga (m/z) de 100 a 600 Da para obtenção dos espectros em MS_1 , com diferentes voltagens de cone. Os espectros em MS_2 foram obtidos no mesmo intervalo com a voltagem do cone em 15 V, pressão do gás de colisão (argônio) na célula de colisão em $6,7 \times 10^{-7}$ mbar e energia de colisão em 10 eV. Em ambos os casos, a temperatura da fonte foi mantida em 100°C e os fluxos dos gases de secagem e nebulização (nitrogênio) foram ajustados para 350 e 10 L/h, respectivamente. O potencial do capilar foi ajustado para 3,10 kV e do eletrodo HV para 0,3 kV. Os dados foram processados com o software MassLynx da Micromass.

3.4.7. Determinação dos coeficientes de extinção molar (ϵ) dos adutos

Os coeficientes de extinção molar dos adutos **A1**, **A2-1** e **A2-2**, para serem utilizados nos experimentos de quantificação, foram determinados através de uma metodologia que envolveu medidas de ^1H RMN e absorvância em UV.

Primeiramente foram determinadas as concentrações dos adutos solubilizados em D_2O por ^1H RMN utilizando-se DSS como padrão interno. Três tubos de RMN com concentrações diferentes de DSS e de cada aduto foram preparados como descrito abaixo:

Tubo 1: 0,1 mg DSS + 200 μL da solução do aduto **A1** ($V_{\text{final}} = 650 \mu\text{L}$)

Tubo 2: 0,2 mg DSS + 400 μL da solução do aduto **A1** ($V_{\text{final}} = 650 \mu\text{L}$)

Tubo 3: 0,5 mg DSS + 600 μL da solução do aduto **A1** ($V_{\text{final}} = 850 \mu\text{L}$)

Tubo 4: 0,1 mg DSS + 150 μL da solução do aduto **A2-1** ($V_{\text{final}} = 650 \mu\text{L}$)

Tubo 5: 0,2 mg DSS + 400 μL da solução do aduto **A2-1** ($V_{\text{final}} = 650 \mu\text{L}$)

Tubo 6: 0,5 mg DSS + 600 μL da solução do aduto **A2-1** ($V_{\text{final}} = 850 \mu\text{L}$)

Tubo 7: 0,1 mg DSS + 150 μL da solução do aduto **A2-2** ($V_{\text{final}} = 650 \mu\text{L}$)

Tubo 8: 0,2 mg DSS + 400 μL da solução do aduto **A2-2** ($V_{\text{final}} = 650 \mu\text{L}$)

Tubo 9: 0,5 mg DSS + 600 μL da solução do aduto **A2-2** ($V_{\text{final}} = 850 \mu\text{L}$)

A partir da relação entre a média das áreas dos prótons do DSS e a média das áreas dos prótons dos adutos em cada solução, foi possível determinar as concentrações de cada aduto nos diferentes tubos, uma vez que eram conhecidas as concentrações de DSS.

Posteriormente, alíquotas de cada uma das amostras dos tubos de RMN foram diluídas com volumes apropriados das soluções para medidas de absorvância em pH 1, pH 7 e pH 11 (item 3.4.6.1). Após as medidas de absorvância das soluções em diferentes comprimentos de onda, os valores de ϵ foram determinados pelas razões entre os valores de absorvância e concentração em molaridade.

3.4.8. Reação de DNA de timo de bezerro com DDE na presença de peróxidos

Uma solução de DDE (61 mg, 0,4 mmol) preparada em 0,5 mL de THF contendo peróxidos na concentração de 32 mM foi adicionada ao DNA de timo de bezerro (5 mg) dissolvido em 1 mL de tampão carbonato-bicarbonato (200 mM, pH 9,4). A solução resultante foi incubada sob agitação a 50°C por 24 horas. Ao final do período de incubação, o excesso de aldeído foi removido através de duas extrações com igual volume de clorofórmio. A solução foi seca sob vácuo e o DNA foi ressuspensa em 500 µL de água. A precipitação do DNA foi obtida pela adição de 50 µL de tampão acetato de sódio 3 M (pH 5) e 1 mL de etanol. A suspensão foi resfriada a -20°C e centrifugada a 20000g por 10 min a 4°C. O precipitado resultante foi lavado com etanol 70% e dissolvido em 1,5 mL de água. A concentração de DNA na solução final foi determinada pela medida de absorbância a 260 nm.

Uma alíquota dessa solução, contendo 1 mg de DNA, foi ressuspensa em 1 mL de tampão acetato de sódio 20 mM (pH 4,8) e digerida com 50 unidades de nuclease P1 a 37°C durante uma noite. Em seguida, foram adicionados 120 µL de tampão Tris-HCl 1 M (pH 7,4) e 5 unidades de fosfatase alcalina e a solução incubada a 37°C por mais 2 horas. Após filtração, os hidrolisados foram analisados através da condição de HPLC 3.4.1.4 e as frações eluindo entre 13 e 17 min (contendo o aduto A1) e entre 39 e 43 min (contendo os adutos A2-1 e A2-2) foram coletadas e liofilizadas. As amostras concentradas resultantes foram analisadas por LC/ESI/MS-MS (item 3.5.2.4). O mesmo procedimento foi adotado para o DNA incubado na ausência de DDE (DNA controle).

3.4.9. Reação de 2'-desoxiguanosina com DDE sem adição de peróxidos

DDE (0,68 mmol, 104 mg) dissolvido em 1 mL de acetonitrila foi adicionado à solução de dGuo (0,068 mmol, 18 mg) preparada em 1 mL de tampão carbonato-bicarbonato (200 mM, pH 9,4). Após borbular N₂ na solução, a incubação foi feita sob agitação a 50°C por 48 horas.

O controle consistiu na incubação de 2'-desoxiguanosina nas mesmas condições sem adição de DDE.

Após o fim da incubação, o excesso de aldeído foi removido por 2 extrações com igual volume de clorofórmio. Foi, então, feita a cromatografia líquida da fase aquosa resultante, utilizando-se a condição de HPLC 3.4.1.4.

3.5. Padronização de metodologias para detecção dos adutos em sistemas biológicos

Para que adutos de DNA sejam inequivocamente detectados em sistemas biológicos, torna-se necessária a utilização de metodologias altamente sensíveis e específicas de modo a garantirem a identidade do produto detectado. Com essa finalidade, investimos na padronização de dois métodos que são correntemente utilizados na detecção de adutos: a detecção eletroquímica e a detecção por LC/ESI/MS-MS.

3.5.1. Detecção eletroquímica

3.5.1.1. Hidrólise ácida de 1,N²-eteno-2'-desoxiguanosina

Foram utilizados dois métodos de hidrólise ácida, como descrito abaixo.

Hidrólise com HF-piridina (70%): uma solução aquosa de 1,N²-εdGuo (11 µg) foi seca a vácuo e o resíduo resultante foi ressuspenso em 100 µL de uma solução 70% de fluoreto de hidrogênio em piridina. Após 2 horas à temperatura ambiente, a mistura de reação foi dissolvida em 500 µL de água e neutralizada pela adição de NaOH 2M. A amostra foi liofilizada e o resíduo obtido foi dissolvido em água. Após filtração através de membrana de 0,2 µm, alíquotas da solução foram analisadas por HPLC (item 3.5.1.2).

Hidrólise com HCl: uma solução aquosa de 1,N²-εdGuo (11 µg) foi seca a vácuo e o resíduo resultante foi ressuspenso em 1000 µL de uma solução de HCl 0,1 N. Após 2 horas de incubação a 90°C, a mistura de reação foi neutralizada pela adição de NaOH 2M. A amostra foi liofilizada e o resíduo obtido foi dissolvido em água. Após filtração através de membrana de 0,2 µm, alíquotas da solução foram analisadas por HPLC (item 3.5.1.2).

3.5.1.2. Detecção de 1,N²-etenoguanina e 1,N²-etenoguanina

Foi utilizado um sistema de HPLC da Shimadzu incluindo duas bombas LC-10 AD/VP, um injetor Rheodyne, um detector de absorvância, modelo SPD-10 AV/VP, e um detector eletroquímico amperométrico digital Antec Decade, controlados por um módulo de comunicação SCL-10A/VP e o software Class-VP.

A condição cromatográfica utilizada consistiu em uma coluna analítica Supelcosil LC-18 (250 mm x 4,6 mm i.d., 5 µm) da Supelco eluída com uma solução de fosfato de potássio (50 mM KH₂PO₄, pH 5,5) contendo 10% de metanol e 1,2 mM de EDTA a um fluxo de 1 mL/min. A absorvância foi monitorada a 280 nm e o potencial de detecção eletroquímico foi ajustado para + 800 mV.

3.5.1.3. Eletrovoltamograma de 1,N²-etenoguanina

Com o intuito de se determinar o melhor potencial para detecção do aduto 1,N²-etenoguanina, foi feito o seu eletrovoltamograma. Para isso, massas constantes do aduto foram injetadas na condição de HPLC do item 3.5.1.2. A razão entre as áreas dos picos do aduto na detecção eletroquímica e na detecção por absorvância em potenciais decrescentes foi plotada em função do potencial aplicado na célula de detecção eletroquímica (intervalo: 500 a 1000 mV).

3.5.1.4. Hidrólise ácida do DNA

DNA de timo de bezerro (2500 µg) foi seco sob vácuo e dissolvido em 100 µL da solução 70% de fluoreto de hidrogênio em piridina. Após 2 horas à temperatura ambiente, a mistura de reação foi dissolvida em 500 µL de água e neutralizada pela adição de NaOH 2 M. A amostra foi liofilizada e o resíduo obtido foi dissolvido em água. Após filtração através de membrana de 0,2 µm, a amostra foi analisada por HPLC (item 3.5.1.2).

3.5.2. Detecção por LC/ESI/MS-MS

3.5.2.1. Organização do sistema

A cromatografia líquida com detecção por espectrometria de massas operando com ionização por *electrospray* no modo positivo foi feita utilizando-se uma bomba LC-10AD da Shimadzu conectada a um divisor de fluxo (*splitter*) para bombear o eluente, uma mistura de água e acetonitrila (70:30 ou 50:50), através de uma coluna capilar Luna C18(2) (150 mm x 1 mm i.d., 3 μ m, Phenomenex) a um fluxo de 7 μ L/min para o interior do espectrômetro Quattro II da Micromass. No interior do espectrômetro, a amostra passa por um primeiro analisador onde é feita uma primeira seleção das moléculas a serem detectadas, daí para uma câmara de colisão onde ocorre a fragmentação das moléculas previamente selecionadas e esses fragmentos passam através de um segundo analisador onde ocorre uma segunda seleção das moléculas a serem detectadas no detector final.

3.5.2.2. Detecção no espectrômetro de massas

Os adutos dissolvidos em soluções aquosas contendo 0,2% de ácido fórmico (v/v) foram injetados na fase móvel através de um injetor Rheodyne conectado a um *loop* de 10 ou 20 μ L. Para a detecção foi utilizada a função de monitoramento de reação múltipla (MRM) do espectrômetro de massas, a qual permite monitorar a fragmentação de íons pais (no caso, m/z 292 e 297 ou m/z 434 e 439) para os correspondentes íons filhos (m/z 176 e 181 ou m/z 318 e 323, respectivamente) com grande sensibilidade (a nível de poucos fmoles), sendo, finalmente, detectadas apenas as moléculas que apresentarem o padrão específico de fragmentação selecionado.

Todos os parâmetros do espectrômetro de massas foram ajustados para que se obtivesse a melhor transição $[M+H]^+/[M+H]^+$ – 2-D-*eritro*-pentose. Os íons $[M+H]^+$ com m/z 292, 297, 434 e 439 foram monitorados com um *dwell time* de 1 segundo. A voltagem do cone foi mantida em 15 V, a pressão do gás de colisão (argônio) na célula de colisão em $6,7 \times 10^{-7}$ mbar e a energia de colisão em 10 eV. A temperatura da fonte foi ajustada para 100°C e os fluxos dos gases de secagem e nebulização (nitrogênio) para 350 e 10 L/h,

respectivamente. O potencial do capilar foi ajustado para 3,10 kV e do eletrodo HV para 0,3 kV. Os dados foram processados com o software MassLynx da Micromass.

3.5.2.3. Síntese dos padrões internos [$^{15}\text{N}_5$]-1, N^2 -eteno-2'-desoxiguanosina e [$^{15}\text{N}_5$]A2

[$^{15}\text{N}_5$]-1, N^2 -edGuo e [$^{15}\text{N}_5$]A2 foram obtidos a partir da reação de [$^{15}\text{N}_5$]dGuo com cloroacetaldeído e DDE, respectivamente, seguida por purificação por HPLC.

Para a síntese de [$^{15}\text{N}_5$]-1, N^2 -edGuo, foram adicionados 90 μL (0,18 mmol) de uma solução aquosa de cloroacetaldeído 2 M a uma solução contendo 3 mg (0,011 mmol) de [$^{15}\text{N}_5$]dGuo em 3 mL de tampão fosfato 50 mM, pH 6,4. Após incubação por 4 dias sob agitação a 37°C, o aduto foi purificado através da condição de HPLC 3.4.1.4.

Para a síntese de [$^{15}\text{N}_5$]A2, uma solução de DDE (0,27 mmol, 41,3 mg) em 1 mL de THF contendo peróxidos na concentração de 32 mM foi adicionada a uma solução contendo 7 mg (0,026 mmol) de [$^{15}\text{N}_5$]dGuo em 1 mL de tampão carbonato-bicarbonato 200 mM, pH 9,4. Após incubação por 48 horas sob agitação a 50°C, os adutos [$^{15}\text{N}_5$]A2 foram purificados através da condição de HPLC 3.4.1.4.

A identidade dos adutos $^{15}\text{N}_5$ foi confirmada pelas análises dos seus espectros de massas.

3.5.2.4. Quantificação dos adutos A1 e A2 em DNA

Após hidrólise das amostras de DNA resultantes da reação com DDE *in vitro* (item 3.4.8) ou de células incubadas com o aldeído (item 3.3.2.5), foi feita a análise dos adutos por LC/ESI/MS-MS como descrito acima (item 3.5.2.2). Para a quantificação dos adutos por LC/ESI/MS-MS, foram construídas curvas de calibração plotando-se as razões entre as áreas dos picos dos adutos e respectivos padrões internos (A1/[$^{15}\text{N}_5$]-1, N^2 -edGuo ou A2/[$^{15}\text{N}_5$]A2) em função da quantidade injetada (em fentomoles) dos adutos A1 ou A2. A quantidade injetada dos padrões internos foi mantida constante em 1000 fmol. A concentração de dGuo nos hidrolisados foi determinada por HPLC com detecção por

absorbância (condição 3.4.1.4) através da utilização de curvas de calibração de dGuo obtidas na mesma condição em que as amostras foram injetadas.

Para as análises do aduto **A1** (m/z 292) em DNA incubado com DDE *in vitro*, cada injeção no sistema LC/ESI/MS-MS consistiu de uma solução contendo a região cromatográfica (13-17 min) coletada de 22 μg de DNA, 0,2% de ácido fórmico e 1000 fmol de [$^{15}\text{N}_5$]-1, N^2 - ϵ dGuo (m/z 297). Para as análises do aduto **A2** (m/z 434), cada injeção consistiu de uma solução contendo a região cromatográfica (39-43 min) coletada de 45 μg de DNA, 0,2% de ácido fórmico e 1000 fmol de [$^{15}\text{N}_5$]**A2** (m/z 439).

Para as análises dos aduto **A1** (m/z 292) e **A2** (m/z 434) em DNA extraído de células, cada injeção no sistema LC/ESI/MS-MS consistiu de uma solução contendo a região cromatográfica (13-17 min ou 39-43 min) coletada de aproximadamente 200 μg de DNA, 0,2% de ácido fórmico e 1000 fmol de [$^{15}\text{N}_5$]-1, N^2 - ϵ dGuo (m/z 297) ou [$^{15}\text{N}_5$]**A2** (m/z 439).

Os padrões internos foram adicionados às soluções de DNA antes de serem feitas as hidrólises.

Resultados

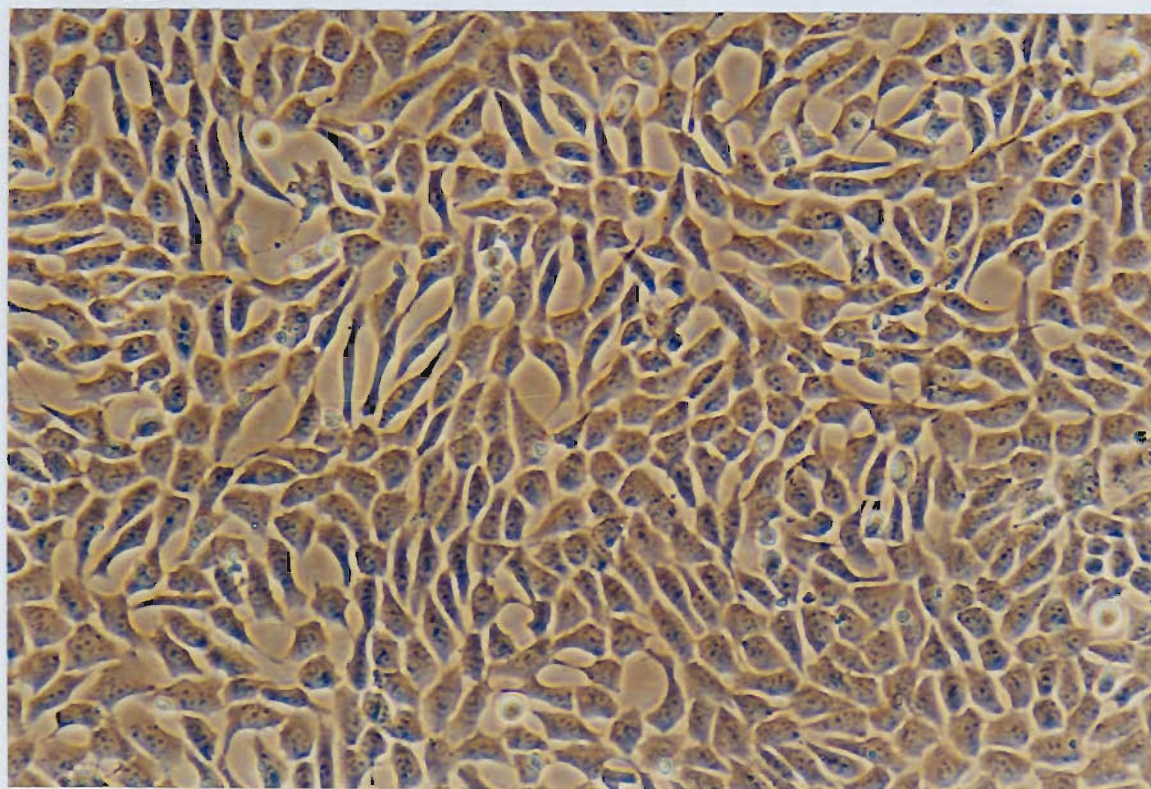
4. Resultados

4.1. Danos celulares induzidos por DDE

4.1.1. *Alteração do formato das células CV1-P após incubação com DDE*

No início dos nossos estudos observamos que as células CV1-P incubadas com DDE em concentrações entre 50 e 70 μM em meio de cultura sem soro (item 3.3.2) apresentavam rápida alteração em sua aparência, como pode ser observado na **figura 4.1**, perdendo o formato típico de fibroblastos e adquirindo um formato esférico. Tal alteração já era visível após os primeiros 30 minutos de incubação com o aldeído, mas as células se mantiveram aderidas às placas de cultura durante todos os períodos de tratamento a que foram submetidas. Tal observação nos levou a imaginar que muitas biomoléculas, como proteínas, lipídios, RNA e DNA poderiam estar reagindo com o aldeído ou com produtos resultantes do seu metabolismo intracelular, levando a essa alteração observável no formato das células.

A



B

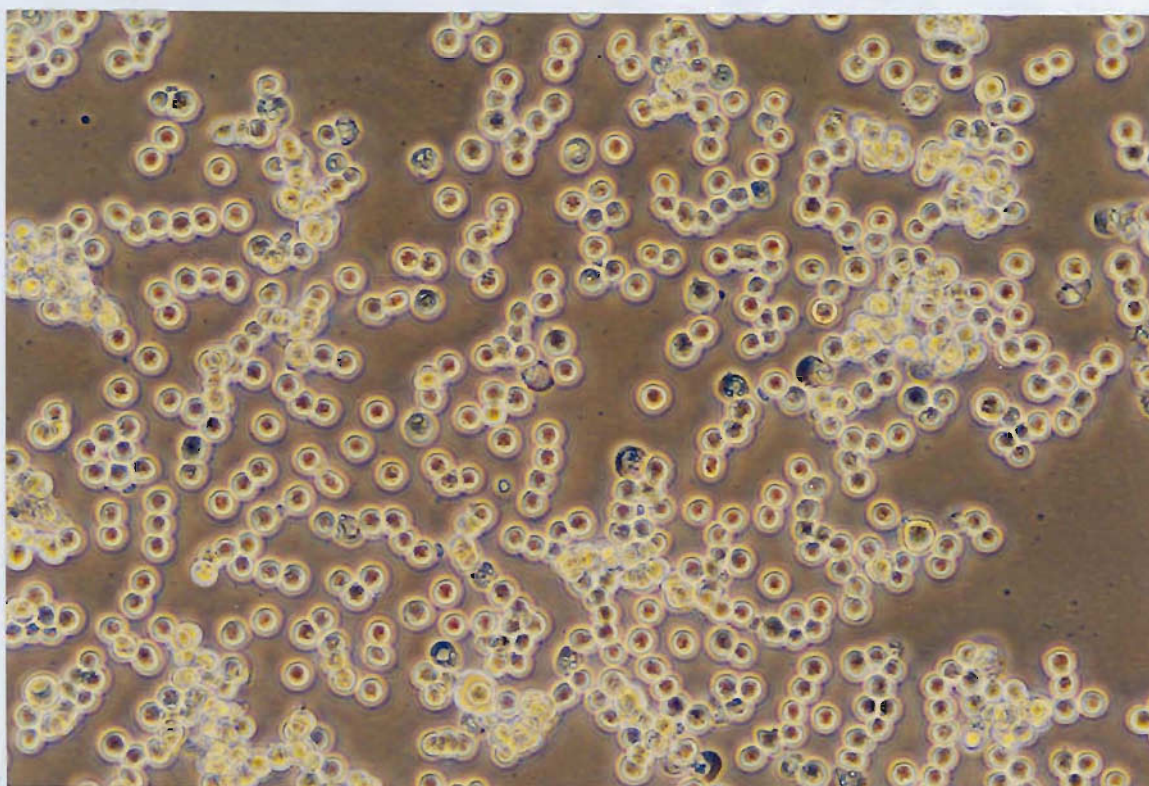


Figura 4.1: A) Células CV1-P controle (aumento = 50 x); B) Células CV1-P incubadas com DDE na concentração de 65 µM por 5 horas (aumento = 50 x).

O tratamento das células foi feito como descrito no item 3.3.2.5.c de *Materiais e Métodos*.

4.1.2. Medidas da viabilidade celular pelo método de coloração com azul de tripan e pelo ensaio do MTT

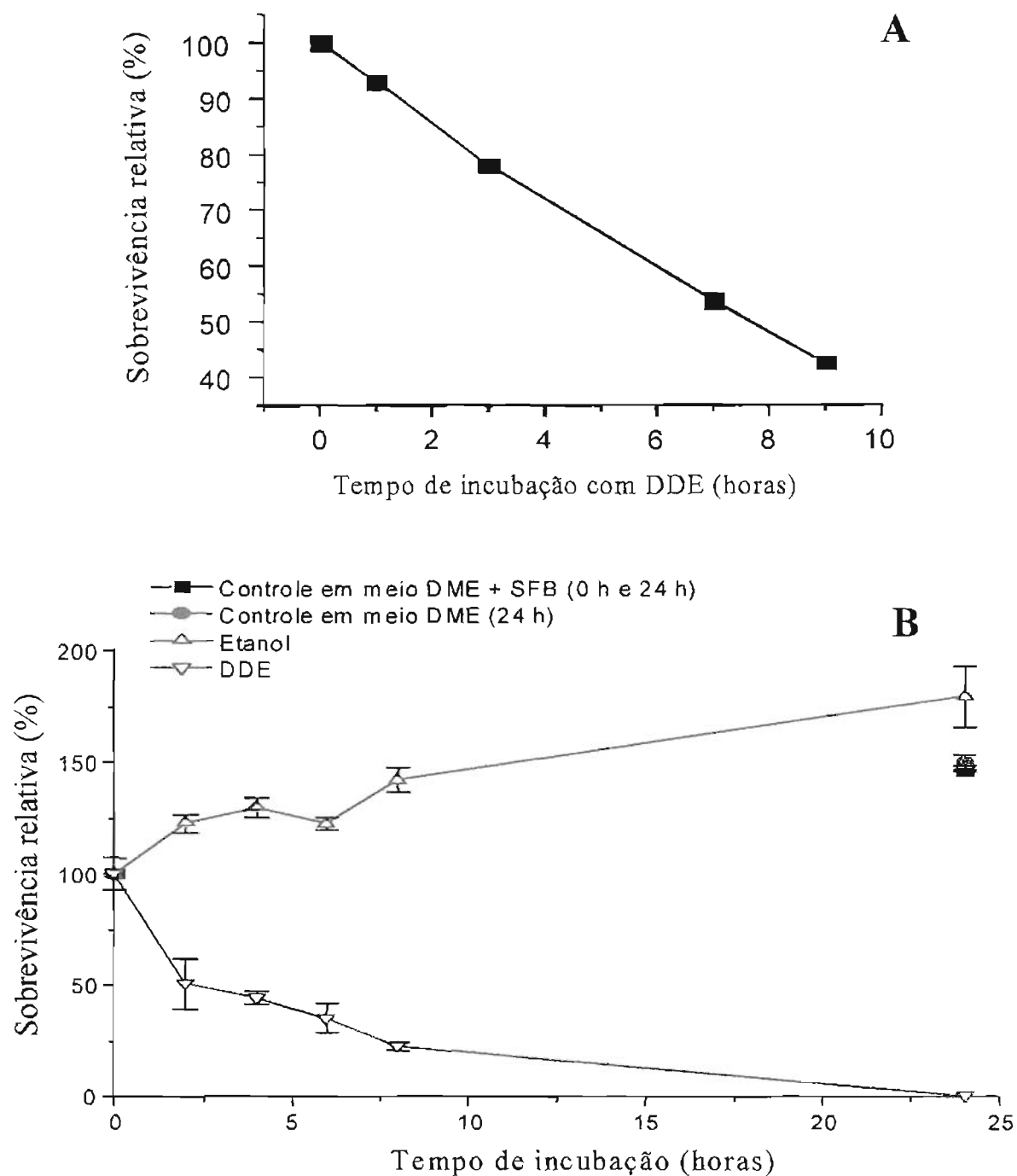
Com o objetivo de avaliarmos quantitativamente a toxicidade do DDE em células CV1-P e definirmos uma faixa de concentração de aldeído a ser utilizada nos estudos subseqüentes, fizemos medidas da viabilidade celular através de dois métodos: o método de exclusão por coloração com azul de tripan (item 3.3.3.1; **figura 4.2A**) e o ensaio do MTT (item 3.3.3.2; **figuras 4.2B e 4.2C**). Em ambos, a sobrevivência relativa foi usada como índice quantitativo de citotoxicidade, sendo definida como a razão entre o número de células viáveis nas culturas expostas ao aldeído ou ao etanol e o número de células viáveis em uma cultura controle.

No caso da viabilidade celular medida pela coloração com azul de tripan, as células ficaram expostas a 65 μ M de DDE por 1, 3, 7 ou 9 horas, podendo-se observar uma redução da sua sobrevivência relativa com o passar do tempo. Pode-se dizer que há 50% de células viáveis após 8 horas de incubação com o aldeído (**figura 4.2A**). A partir de uma comparação com a atividade da enzima lactato desidrogenase, foi demonstrado que essa medida de sobrevivência relativa é confiável para quantificação de citotoxicidade (Kaneko e col., 1987). Em virtude de a contagem das células ao microscópio ser demorada, ficou difícil determinar, com esse método, a viabilidade de células incubadas com etanol nos mesmos períodos de tempo, assim como fazer as medidas de cada ponto da curva em triplicata.

Para confirmar o dado de redução de viabilidade observado no experimento de exclusão por coloração com azul de tripan, fizemos medidas de viabilidade celular através do ensaio do MTT (**figuras 4.2B e 4.2C**). Com esse método foi possível fazer em triplicata as medidas de viabilidade das células incubadas com etanol correspondentes às medidas de viabilidade das células incubadas com DDE. Observamos, na **figura 4.2B**, uma redução da viabilidade celular com o aumento do tempo de incubação com 65 μ M de DDE (50,7 \pm 11,4%, 44,3 \pm 3,0% e 22,5 \pm 1,8% de células viáveis após 2 horas, 4 horas e 8 horas de incubação, respectivamente) e, na **figura 4.2C**, uma redução da viabilidade para 21,6 \pm 3,2% após a incubação das células por 5 horas com 100 μ M de DDE. Em uma outra repetição desse experimento, foram encontrados os índices de 65,5 \pm 12,5% ($p = 0,0127$ em

relação ao controle) e $13,7 \pm 7,7\%$ ($p = 0,00044$ em relação ao controle) de células viáveis após 5 horas de incubação com $50 \mu\text{M}$ e $100 \mu\text{M}$ de DDE, respectivamente.

Foi tomado o cuidado de fazer os experimentos com as células distribuídas em uma monocamada confluenta, como a apresentada na **figura 4.1A**. O grau de confluência das células influencia os resultados obtidos, sendo os danos observados maiores quando elas estão mais separadas umas das outras.



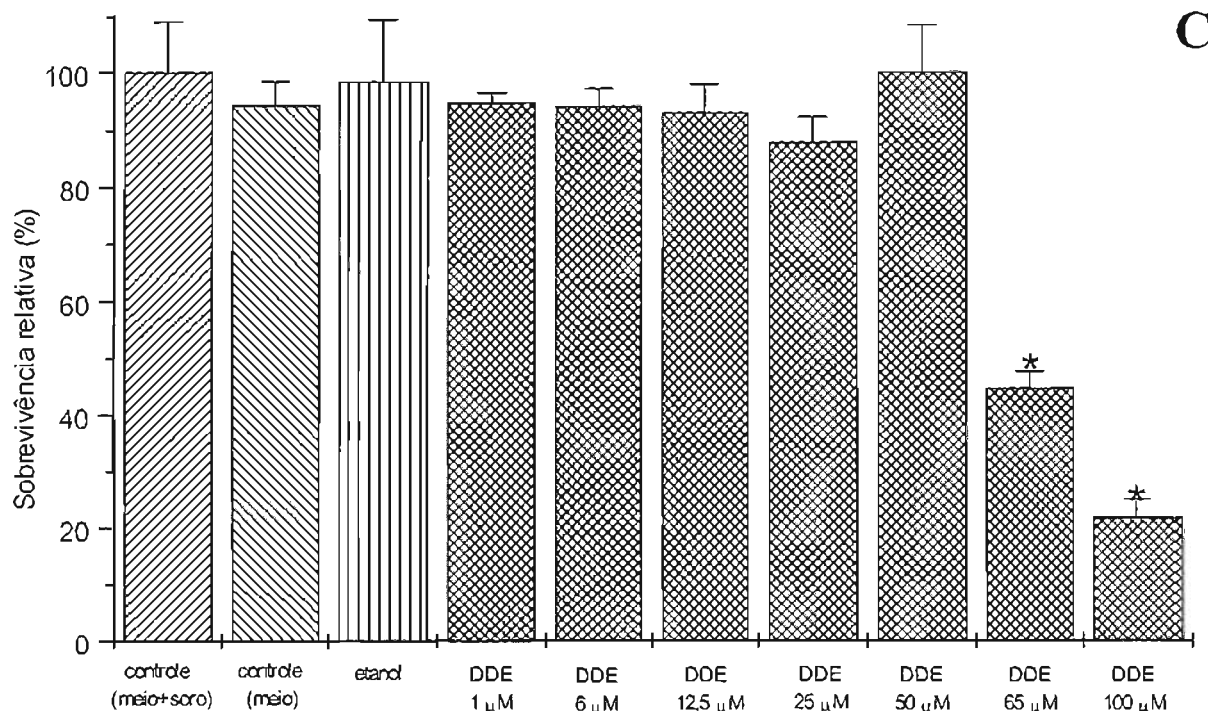


Figura 4.2: Medidas da sobrevivência relativa de células CV1-P incubadas com: **A)** DDE 65 µM por diferentes períodos de tempo (método de exclusão por coloração com azul de tripan); **B)** DDE 65 µM e etanol 0,13% (v/v) por diferentes períodos de tempo (ensaio do MTT; N = 3); **C)** diferentes concentrações de DDE por 5 horas (ensaio do MTT; N = 3), teste t: *p < 0,05 em relação ao controle (meio + soro). Concentração de etanol nas incubações: 0,13% (v/v).

Os tratamentos das células e as medidas de viabilidade foram feitos como descrito nos itens 3.3.2.2, 3.3.3.1 e 3.3.3.2 de *Materiais e Métodos*.

Os dados de viabilidade obtidos nos mostram que o DDE, em concentrações superiores a 50 µM, é citotóxico para as células CV1-P, levando a alterações das funções celulares normais, como por exemplo a respiração celular. Através do ensaio do MTT, pode-se observar que a capacidade redutora das mitocôndrias encontra-se diminuída em concentrações de DDE superiores a 50 µM.

4.1.3. Alteração do nível de sulfidrilas não proteicas (NPSH)

Sabendo-se que a conjugação de glutathiona (GSH) com aldeídos gerados durante a peroxidação lipídica, catalisada por glutathiona S-transferases, é uma importante via para

detoxificação dessas moléculas (Fujita e col., 1994; Eisenbrand e col., 1995; Spitz e col., 1991), resolvemos verificar o padrão de variação do nível de GSH nas células CV1-P incubadas com DDE. Como GSH representa mais que 90% do total de sulfidrilas não-proteicas intracelulares (Baruchel e col., 1995), fizemos a dosagem de NPSH como descrito no item 3.3.4 de *Materiais e Métodos*.

Os resultados obtidos, correspondentes a análises feitas em triplicata para cada ponto, estão apresentados nas tabelas 4.1, 4.2 e 4.3 e figura 4.3.

Tabela 4.1: Determinação da concentração de sulfidrilas não-proteicas (NPSH) (pmoles NPSH/ μ g proteína) em células CV1-P não submetidas a qualquer tratamento (controle), incubadas com 0,19% de etanol (v/v) por 4 h e incubadas com 65 μ M de DDE por 2,5 h, 3 h e 4 h (N = 3). O tratamento das células e dosagem de NPSH foram feitos como descrito nos itens 3.3.2.3a e 3.3.4 de *Materiais e Métodos*.

	*NPSH (pmol/ μ g proteína)	Desvio Padrão (\pm)
Controle	5,78	0,59
Etanol (4 h)	7,48	0,71
DDE (2,5 h)	12,68	0,32
DDE (3 h)	12,04	0,67
DDE (4 h)	14,17	0,59

Considerando significativamente diferentes os grupos em que $p < 0,05$, pode-se dizer que:

controle < etanol 4 h ($p = 0,034$), DDE 2,5 h ($p = 0,00006$), DDE 3 h ($p = 0,00027$) e DDE 4 h ($p = 0,00007$);

etanol 4 h < DDE 2,5 h ($p = 0,00032$), DDE 3 h ($p = 0,00127$) e DDE 4 h ($p = 0,00023$);

DDE 2,5 h = DDE 3 h ($p = 0,212$);

DDE 2,5 h < DDE 4 h ($p = 0,019$);

DDE 3 h < DDE 4 h ($p = 0,015$).

*valor médio dos experimentos realizados em triplicata.

Tabela 4.2: Determinação da concentração de sulfidrilas não-proteicas (NPSH) (pmoles NPSH/ μg proteína) em células CV1-P não submetidas a qualquer tratamento (controle), incubadas com 0,19% de etanol (v/v) por 8 h e 24 h e incubadas com 65 μM de DDE por 2 h, 3 h, 4 h, 5 h, 8 h e 24 h (N = 3). O tratamento das células e dosagem de NPSH foram feitos como descrito nos itens 3.3.2.3b e 3.3.4 de *Materiais e Métodos*.

	*NPSH (pmol/ μg proteína)	Desvio Padrão (\pm)
Controle	3,37	0,84
Etanol (8 h)	4,24	1,65
Etanol (24 h)	2,93	0,29
DDE (2 h)	5,36	0,52
DDE (3 h)	6,67	0,94
DDE (4 h)	5,42	0,33
DDE (5 h)	9,56	1,41
DDE (8 h)	0,79	0,59
DDE (24 h)	0,96	0,69

Considerando significativamente diferentes os grupos em que $p < 0,05$, pode-se dizer que:

controle < DDE 2 h ($p = 0,02$), DDE 3 h ($p = 0,01$), DDE 4 h ($p = 0,02$) e DDE 5 h ($p = 0,003$);

controle > DDE 8 h ($p = 0,01$) e DDE 24 h ($p = 0,02$);

controle = etanol 8 h ($p = 0,46$) e etanol 24 h ($p = 0,44$);

etanol 8 h > DDE 8 h ($p = 0,027$); etanol 24 h > DDE 24 h ($p = 0,01$).

*valor médio dos experimentos realizados em triplicata.

Tabela 4.3: Determinação da concentração de sulfidrilas não-proteicas (NPSH) (pmoles NPSH/ μg proteína) em células CV1-P não submetidas a qualquer tratamento (controle) e incubadas com 100 μM de DDE por 1,5 h, 2,5 h, 3,5 h e 4,5 h (N = 3). O tratamento das células e dosagem de NPSH foram feitos como descrito nos itens 3.3.2.3c e 3.3.4 de *Materiais e Métodos*.

	*NPSH (pmol/ μg proteína)	Desvio Padrão (\pm)
Controle	6,64	0,84
DDE (1,5 h)	9,77	1,64
DDE (2,5 h)	13,99	3,27
DDE (3,5 h)	12,39	1,25
DDE (4,5 h)	15,63	1,97

Considerando significativamente diferentes os grupos em que $p < 0,05$, pode-se dizer que:

controle < DDE 1,5 h ($p = 0,043$), DDE 2,5 h ($p = 0,02$), DDE 3,5 h ($p = 0,003$) e DDE 4,5 h ($p = 0,002$);

DDE 1,5 h = DDE 2,5 h ($p = 0,12$) e DDE 3,5 h ($p = 0,092$); DDE 1,5 h < DDE 4,5 h ($p = 0,017$).

*valor médio dos experimentos realizados em triplicata.

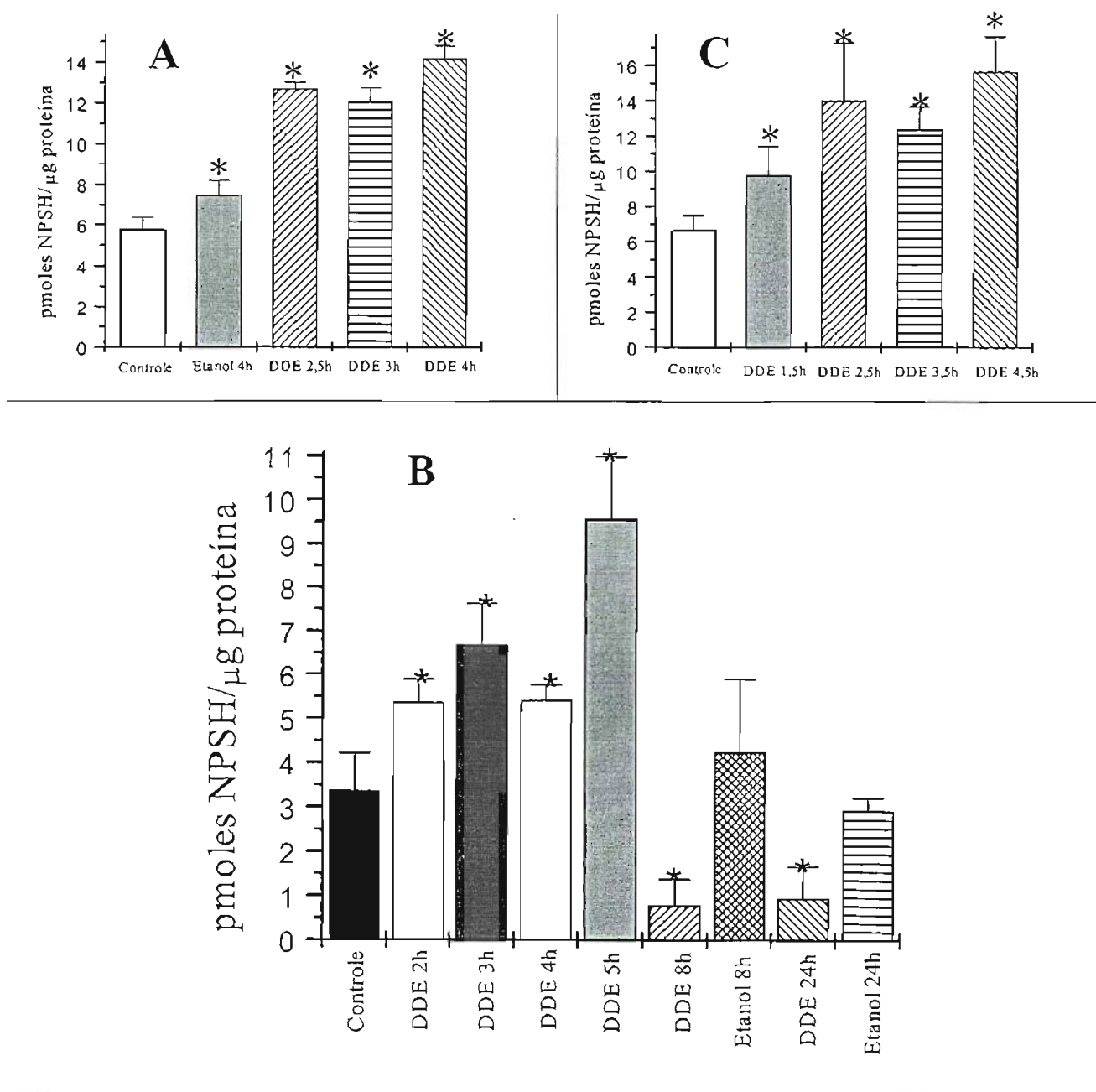


Figura 4.3: Determinação da concentração de sulfidrilas não-proteicas (NPSH) (pmoles NPSH/ μg proteína) em células CV1-P.

A) Apresentação gráfica dos dados da **tabela 4.1**. [Etanol] = 0,19% (v/v); [DDE] = 65 μM;

B) Apresentação gráfica dos dados da **tabela 4.2**. [Etanol] = 0,19% (v/v); [DDE] = 65 μM;

C) Apresentação gráfica dos dados da **tabela 4.3**. [Etanol] = 0,19% (v/v); [DDE] = 100 μM.

O tratamento das células e dosagem de NPSH foram feitos como descrito nos itens 3.3.2.3a,b,c e 3.3.4 de *Materiais e Métodos*. * $p < 0,05$ quando comparado com o controle.

Os dados dos três experimentos apresentados nos mostram que o DDE induz, inicialmente (até 5 horas de incubação), um grande aumento do nível intracelular de sulfidrilas não proteicas, seguido por grande depleção. O efeito observado foi o mesmo nas duas concentrações de DDE testadas (65 μM e 100 μM), indicando uma resposta celular ao estímulo tóxico. Comparando-se os níveis de sulfidrilas não-proteicas com os dados de viabilidade celular (item 4.1.2), observa-se que, quando as células são incubadas com 65 ou 100 μM de DDE, o aumento do nível de NPSH durante as primeiras 5 horas de incubação (**figura 4.3**) não impede que elas sofram os efeitos tóxicos desencadeados pelo aldeído durante esse período (**figura 4.2**).

Com o intuito de observarmos melhor o efeito do nível intracelular de GSH na viabilidade das células CV1-P incubadas com DDE, fizemos um experimento de viabilidade (MTT) após induzir a depleção de glutathiona com L-butionina-(*S,R*)-sulfoximina (BSO). BSO é um inibidor específico, irreversível e muito efetivo da γ -glutamylcisteína sintetase, a enzima que catalisa a reação que determina a velocidade da síntese de glutathiona. É usado tanto *in vitro* como *in vivo* para depletar glutathiona, tendo sido verificado que a sua administração torna as células mais sensíveis à quimioterapia e radiação (Agostinelli e col., 1996).

Inicialmente incubamos as células com diferentes concentrações de BSO durante 3 horas a fim de determinarmos a melhor concentração a ser utilizada nos demais experimentos. Os resultados obtidos estão na **tabela 4.4** e **figura 4.4**.

Tabela 4.4: Determinação da concentração de sulfidrilas não-proteicas (NPSH) (pmoles NPSH/ μg proteína) em células CV1-P não submetidas a qualquer tratamento (controle) e incubadas com diferentes concentrações de BSO por 3 horas em meio de cultura sem soro ($N = 3$). A solução de BSO foi preparada em água. A dosagem de NPSH foi feita como descrito no item 3.3.4 de *Materiais e Métodos*.

	*NPSH (pmol/ μg proteína)	Desvio Padrão (\pm)
Controle	7,80	0,72
BSO (100 μM)	2,06	0,08
BSO (200 μM)	1,61	0,14
BSO (300 μM)	1,01	0,10
BSO (400 μM)	1,47	0,25

Considerando significativamente diferentes os grupos em que $p < 0,05$, pode-se dizer que:

controle > BSO 100 μM ($p = 0,00016$), 200 μM ($p = 0,00013$), 300 μM ($p = 0,00009$) e 400 μM ($p = 0,00014$);

BSO 100 μM > BSO 200 μM ($p = 0,0096$), 300 μM ($p = 0,00013$) e 400 μM ($p = 0,018$);

BSO 200 μM > BSO 300 μM ($p = 0,0042$); BSO 200 μM = BSO 400 μM ($p = 0,45$);

BSO 400 μM > BSO 300 μM ($p = 0,041$).

*valor médio dos experimentos realizados em triplicata.

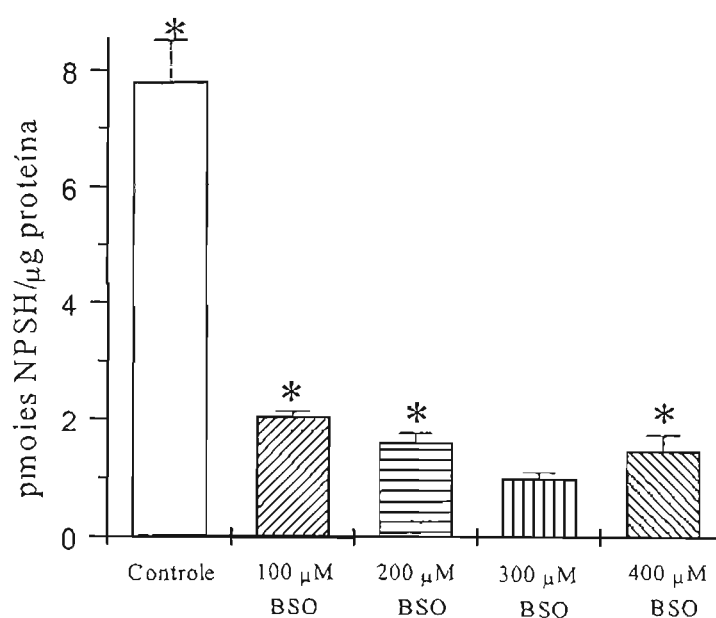


Figura 4.4: Apresentação gráfica dos dados da tabela 4.4. Determinação da concentração de sulfidrilas não-proteicas (NPSH) (pmoles NPSH/ μg proteína) em células CV1-P não submetidas a qualquer tratamento (controle) e incubadas com BSO em diferentes concentrações durante 3 horas em meio de cultura sem soro. A dosagem de NPSH foi feita como descrito no item 3.3.4 de *Materiais e Métodos*. * $p < 0,05$ quando comparado com BSO 300 μM .

Observamos que a incubação das células com 300 μM de BSO durante 3 horas depletou 87% das sulfidrilas não proteicas intracelulares, o que deve corresponder à fração de GSH. Para verificarmos se essa depleção aumenta a toxicidade do DDE, avaliamos a viabilidade das células CV1-P incubadas com 65 μM de DDE após prévia incubação com 300 μM de BSO (item 3.3.2.2c de *Materiais e Métodos*). O resultado obtido está apresentado na **figura 4.5** em comparação com as curvas de viabilidade das células controles e incubadas com 65 μM de DDE na presença de níveis normais de GSH.

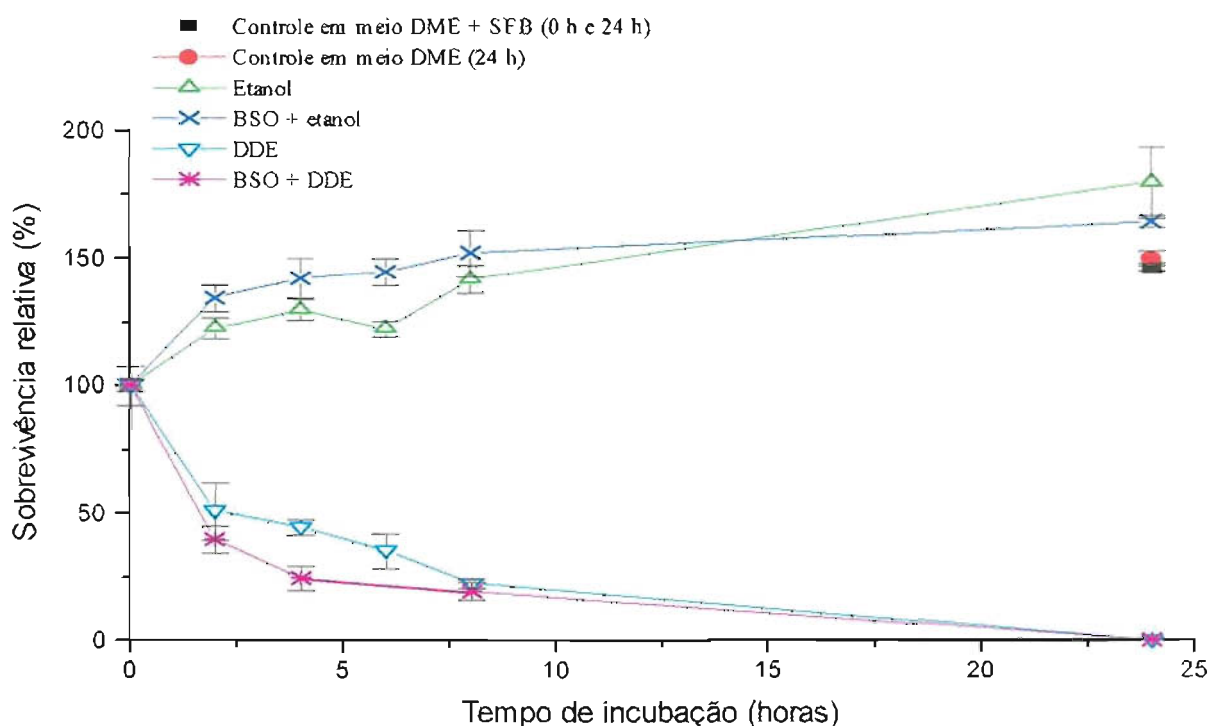
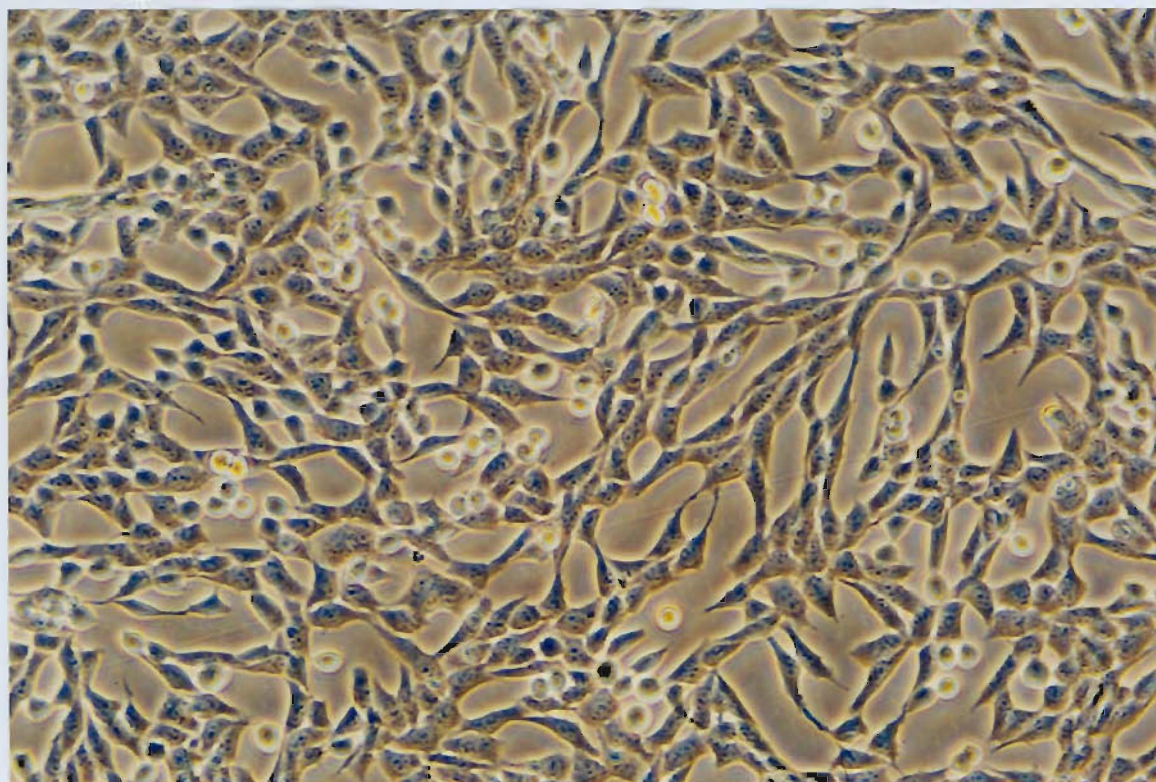


Figura 4.5: Efeito da depleção de GSH na sobrevivência relativa das células CV1-P incubadas com 65 μM de DDE. Concentração de etanol nas incubações: 0,13% (v/v). Os tratamentos das células e as medidas de viabilidade foram feitos como descrito nos itens 3.3.2.2b,c e 3.3.3.2 de *Materiais e Métodos*. As determinações de viabilidade das células controles em meio DME + SFB foram feitas no início das incubações (0 h) e no final (24 h). Após 24 h foi também determinada a viabilidade das células controles incubadas apenas em meio DME. Observar que existe uma diferença de aproximadamente 100 % de sobrevivência relativa entre as células incubadas apenas com DDE e as incubadas com BSO + DDE por 4 horas.

A análise da **figura 4.5** nos mostra um aumento da toxicidade do DDE quando o nível intracelular de glutathiona está inicialmente muito abaixo do normal ($44,3 \pm 3,0\%$ e $24,5 \pm 4,6\%$ de células viáveis após 4 horas de incubação com DDE e BSO + DDE, respectivamente), confirmando que nas condições de incubação utilizadas, GSH exerce um papel no processo de detoxificação. Na **figura 4.6** está apresentada a aparência das células incubadas com $300 \mu\text{M}$ de BSO durante 3 horas e das incubadas com $65 \mu\text{M}$ de DDE durante 5 horas após prévia depleção de GSH. Comparando-se com a **figura 4.1**, observa-se que as células estão muito mais danificadas após a depleção de glutathiona.

A



B

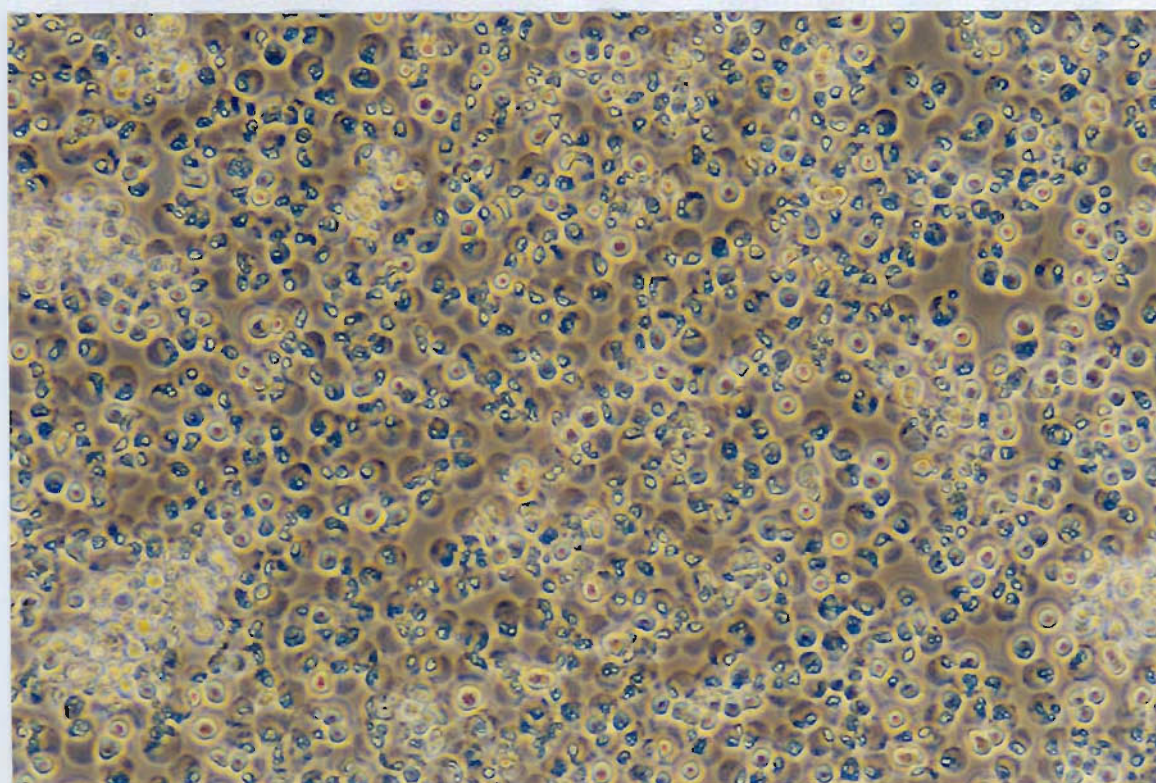


Figura 4.6: A) Células CV1-P incubadas com 300 μM de BSO durante 3 horas (aumento = 50 x);
B) Células CV1-P incubadas com 65 μM de DDE por 5 horas após a incubação com BSO (aumento = 50 x).

O conjunto de dados de viabilidade e níveis intracelulares de NPSH nos indicam que o aumento inicial do nível de sulfidrila não proteicas em células incubadas com DDE (65 μM) contribui para que elas se mantenham viáveis durante um certo período de incubação com o aldeído (aproximadamente 5 horas). Entretanto, a possível reação do DDE com várias biomoléculas, incluindo GSH, deve acabar comprometendo várias funções celulares, o que resulta em perda da viabilidade e depleção do nível de GSH em períodos de incubação maiores.

4.1.4. Análise da fragmentação do DNA

Com o objetivo de avaliarmos, de forma geral, a capacidade de o DDE danificar o DNA nuclear das células CV1-P, fizemos medidas da fragmentação dessa biomolécula. O método que utilizamos mede, em conjunto, as quebras de fita simples e os sítios apurínicos e apirimidínicos (sítios AP) gerados pela interação do aldeído, ou produtos do seu metabolismo, com o DNA (Tamir e col., 1996).

Primeiramente investigamos o efeito causado por diferentes concentrações de DDE (entre 6 μM e 50 μM) após 3 horas de incubação (**tabela 4.5 e figura 4.7**). Essa faixa de concentração e período de incubação não levam a perda de viabilidade das células (**figura 4.2**) e, como pode ser observado na **figura 4.7**, também não induzem fragmentação do DNA e/ou ocorrência de sítios AP. Apesar de haver uma diferença significativa do nível de fragmentação na presença de 25 μM e 50 μM de DDE em relação ao controle, a mesma diferença não existe em relação à incubação com etanol.

Tabela 4.5: Determinação da porcentagem de quebras de fita simples + sítios AP em DNA de células CV1-P não submetidas a qualquer tratamento (controle), incubadas com 0,5% de etanol (v/v) e com diferentes concentrações de DDE por 3 horas em meio de cultura sem soro. O tratamento das células e as medidas de fragmentação do DNA (N = 6) foram feitos como descrito nos itens 3.3.2.4a e 3.3.6 de *Materiais e Métodos*.

	*Fragmentação do DNA (%)	Desvio Padrão (±)
Controle	8,98	2,83
Etanol	15,86	7,25
DDE (6 μ M)	17,04	12,17
DDE (12,5 μ M)	16,66	8,88
DDE (25 μ M)	20,84	6,55
DDE (50 μ M)	17,28	8,4

Considerando significativamente diferentes os grupos em que $p < 0,05$, pode-se dizer que:

controle < DDE 25 μ M ($p = 0,002$) e 50 μ M ($p = 0,045$).

*valor médio dos experimentos realizados em sextuplicata.

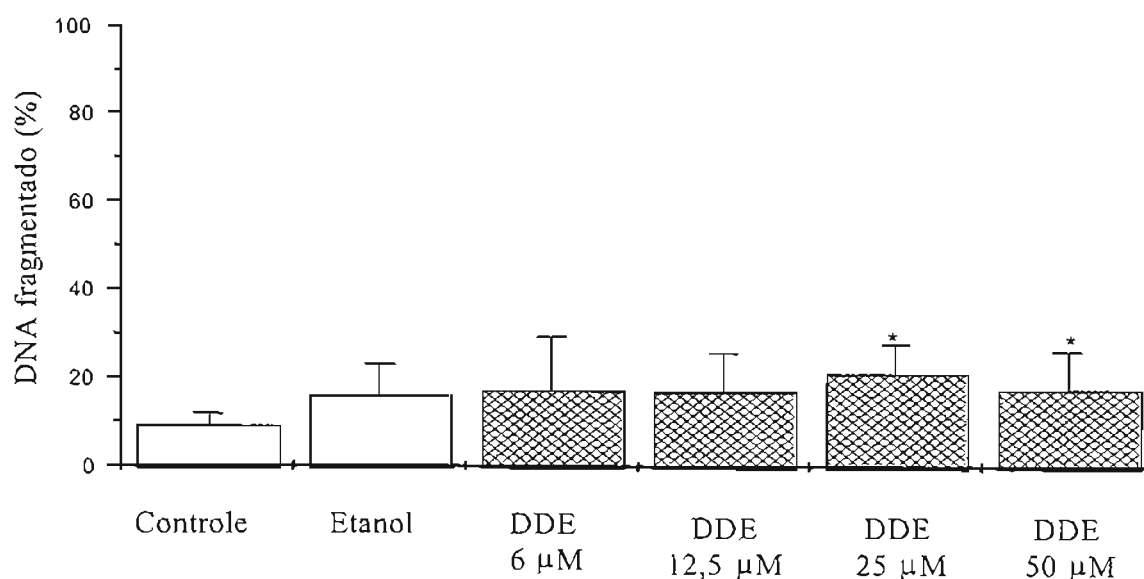


Figura 4.7: Apresentação gráfica dos dados da tabela 4.5. Determinação da porcentagem de quebras de fita simples + sítios AP em DNA de células CV1-P não submetidas a qualquer tratamento (controle), incubadas com 0,5% de etanol (v/v) e com diferentes concentrações de DDE durante 3 horas. O tratamento das células e as medidas de fragmentação do DNA foram feitos como descrito nos itens 3.3.2.4a e 3.3.6 de *Materiais e Métodos*. * $p < 0,05$ quando comparado com o controle.

Investigamos também o efeito de uma concentração mais citotóxica de DDE (100 μM) por diferentes períodos de tempo. Dados anteriores haviam nos mostrado que após 5 horas de incubação com essa concentração de DDE ocorrem aumento do nível de NPSH e grande perda de viabilidade celular (figuras 4.2 e 4.3). Na figura 4.8 observamos que até 8 horas de incubação com o aldeído não foi possível detectar a presença de quebras de fita simples e sítios AP no DNA, o que nos indica que, se esses danos estiverem ocorrendo, estão sendo, ainda, eficientemente reparados. Não analisamos o que ocorre no período entre 8 e 24 horas, mas pudemos detectar uma fragmentação significativa do DNA após 24 horas de incubação com o aldeído (tabela 4.6 e figura 4.8). A ocorrência de quebras de fita simples e sítios AP no DNA das células CV1-P tanto tempo após o início da incubação com o aldeído nos levou a pensar que esse efeito fosse uma consequência dos danos a várias biomoléculas acumulados durante as horas anteriores de incubação. De fato, essa fragmentação só foi detectada algum tempo após a observação da grande redução da viabilidade das células.

Tabela 4.6: Determinação da porcentagem de quebras de fita simples + sítios AP em DNA de células CV1-P não submetidas a qualquer tratamento (controle), incubadas com 0,5% de etanol (v/v) e com 100 μM de DDE por diferentes períodos de tempo. O tratamento das células e as medidas de fragmentação do DNA (N = 6) foram feitos como descrito nos itens 3.3.2.4b e 3.3.6 de *Materiais e Métodos*.

	*Fragmentação do DNA (%)	Desvio Padrão (\pm)
Controle	25,23	6,03
Etanol (3 h)	14,37	3,70
Etanol (5 h)	24,84	4,20
Etanol (8 h)	26,05	12,33
Etanol (24 h)	17,61	4,91
DDE (3 h)	24,84	10,67
DDE (5 h)	23,29	4,53
DDE (8 h)	22,40	7,54
DDE (24 h)	73,03	16,47

Considerando significativamente diferentes os grupos em que $p < 0,05$, pode-se dizer que:

controle > etanol 3 h ($p = 0,004$) e etanol 24 h ($p = 0,037$);

DDE 24 h > controle ($p = 0,00006$) e etanol 24 h ($p = 0,00001$);

DDE 3 h > etanol 3 h ($p = 0,037$).

*valor médio dos experimentos realizados em sextuplicata.

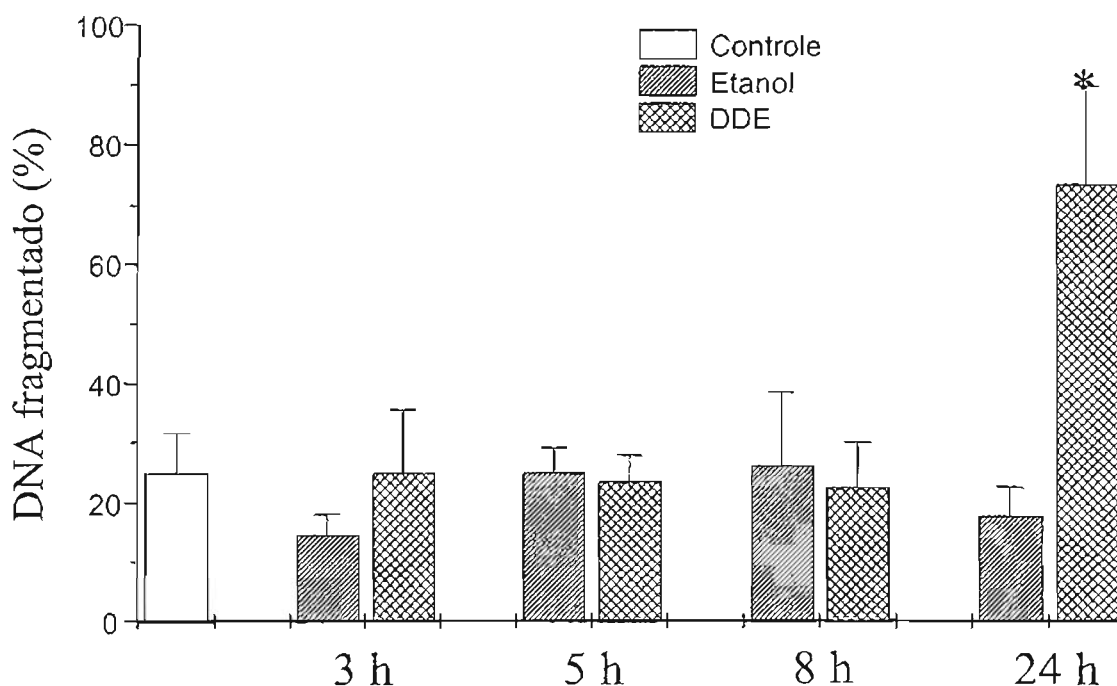


Figura 4.8: Apresentação gráfica dos dados da **tabela 4.6**. Determinação da porcentagem de quebras de fita simples + sítios AP em DNA de células CV1-P não submetidas a qualquer tratamento (controle), incubadas com 0,5% de etanol (v/v) e com 100 μ M de DDE por diferentes períodos de tempo. O tratamento das células e as medidas de fragmentação do DNA foram feitos como descrito nos itens 3.3.2.4b e 3.3.6 de *Materiais e Métodos*. * $p < 0,05$ quando comparado com o controle e o respectivo controle com etanol.

4.1.5. Análise da presença de produtos fluorescentes no DNA das células

Alguns estudos realizados anteriormente ao início deste trabalho (Hasegawa e col., 1988 e 1989; Medeiros e col., 1992) haviam mostrado que a reação de DDE com DNA *in vitro* levava à formação de adutos fluorescentes com emissão máxima a 420 nm quando excitados a 335 nm. Tais adutos, que hoje sabemos serem resultantes da reação de produtos do metabolismo do DDE (epoxi-aldeídos) com 2'-desoxiadenosina, foram recentemente completamente caracterizados em nosso laboratório (Carvalho e col., 1998 e 2000).

Assim, com o conhecimento que tínhamos no início do nosso trabalho (1995), resolvemos investigar a interação do DDE (ou produtos do seu metabolismo) com o DNA das células através da análise da formação de adutos fluorescentes. Essas análises foram feitas em condições que não levavam à perda de viabilidade celular e fragmentação

detectável do DNA. Inicialmente, a formação dos adutos fluorescentes foi monitorada pela análise de espectros de emissão de fluorescência do DNA extraído das células fixando-se o comprimento de excitação em 335 nm.

Em um primeiro experimento, as células foram incubadas com 60 μM de DDE durante 50 minutos em meio de cultura sem soro (item 3.3.2.1 de *Materiais e Métodos*) e o DNA foi extraído. Seu espectro de fluorescência (emissão) não apresentou diferença em relação ao do DNA de células controles (dado não apresentado). Resolvemos, portanto, fazer as medidas após tempos maiores de incubação com o aldeído. Com o objetivo de não prejudicar a viabilidade celular, em um dos experimentos as células ficaram expostas ao DDE (70 μM) por 50 minutos em meio de cultura sem soro e, em seguida, o meio contendo DDE foi substituído por outro com soro. Assim, apenas o aldeído que penetrou nas células durante esse período de incubação poderia, subsequente, reagir com as biomoléculas. Foram, então, feitas extrações do DNA 3 horas, 6 horas e 8 horas após a troca do meio de cultura. Observamos uma maior emissão de fluorescência em 420 nm ($\lambda_{\text{exc.}} = 335$ nm) do DNA extraído das células 3 horas após a troca do meio. Nos períodos de incubação subsequentes houve redução da intensidade de fluorescência emitida, igualando-se ao controle 8 horas após a troca do meio (**figura 4.9A**). O mesmo efeito foi observado quando as células foram incubadas com 50 μM de DDE durante 1h 45min, o meio de cultura foi trocado e o DNA extraído 2 horas, 6 horas e 22 horas após a troca do meio (**figura 4.9B**).

Esses resultados nos indicaram que o DDE, ao entrar nas células, não reage imediatamente com o DNA. De fato, muitas barreiras protetoras precisam ser vencidas, como por exemplo o nível aumentado de sulfidrilas não proteicas nas células incubadas com DDE. Entretanto, algumas moléculas acabam atingindo o núcleo e reagindo com o DNA. Dado o tempo necessário para observarmos o aumento na intensidade de emissão de fluorescência, também consideramos muito provável que ela fosse devida à reação de produtos do metabolismo do DDE gerados intracelularmente. Além disso, a redução da intensidade de fluorescência emitida com o passar do tempo foi sugestiva de que os danos detectados estivessem sendo reparados.

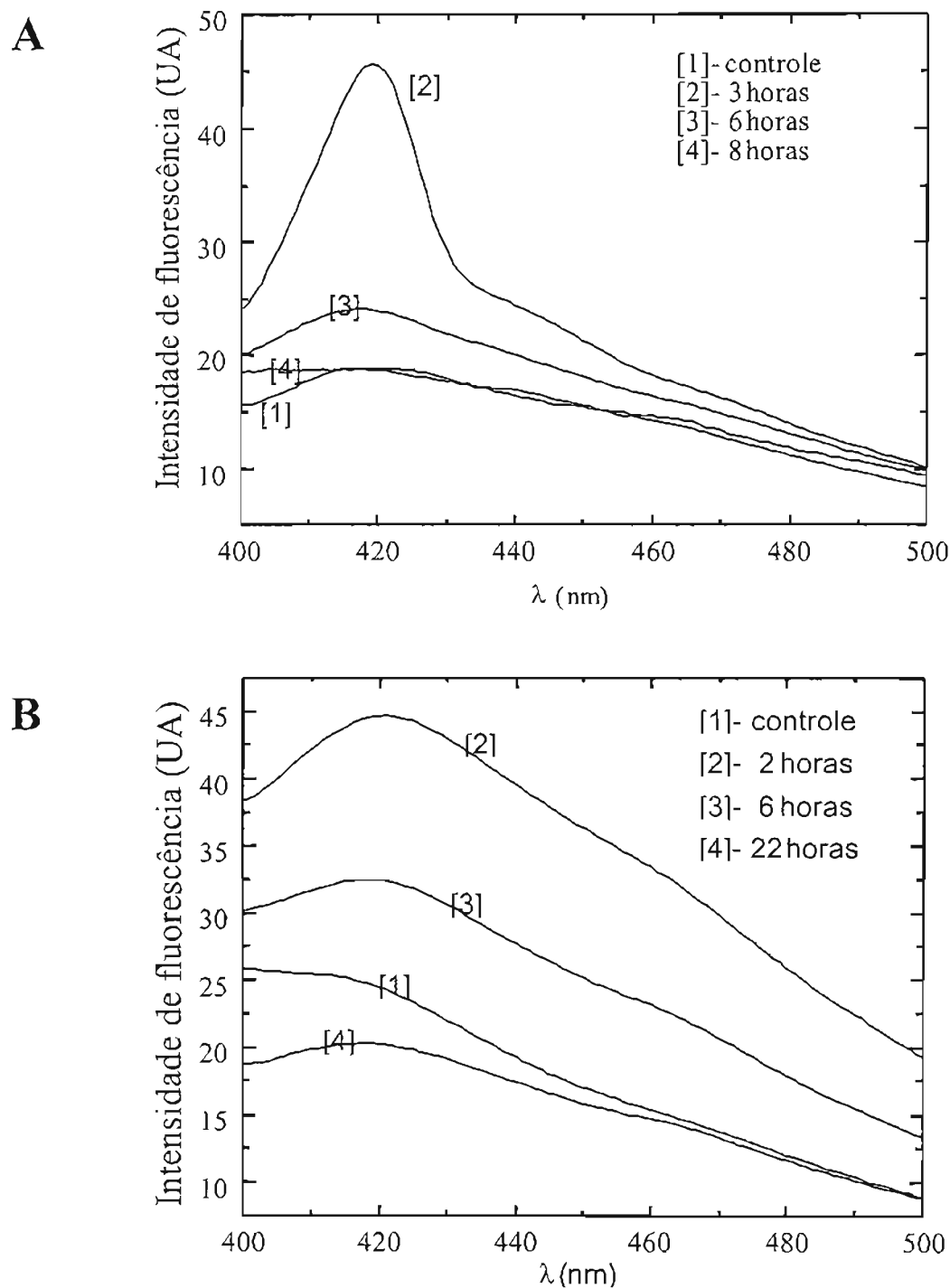


Figura 4.9: Espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc.} = 335$ nm) do DNA extraído das células CV1-P. A) As células foram incubadas com $70 \mu\text{M}$ de DDE por 50 min, o meio de cultura foi trocado e as células incubadas por mais 3 h, 6 h e 8 h antes de ser extraído o DNA; B) As células foram incubadas com $50 \mu\text{M}$ de DDE por 1h 45min, o meio de cultura foi trocado e as células incubadas por mais 2 h, 6 h e 22 h antes de ser extraído o DNA. Concentração de etanol nas incubações: $\approx 0,2\%$ (v/v). A concentração de DNA em todas as amostras foi ajustada para $5 \mu\text{g/mL}$ antes de serem feitas as medidas de fluorescência. Os tratamentos das células e a extração do DNA foram feitos como descrito nos itens 3.3.2.1 e 3.3.7 de *Materiais e Métodos*. UA: unidades arbitrárias.

4.1.6. Análise da presença de diferentes produtos em DNA de células incubadas com DDE por HPLC-UV/fluorescência e HPLC-EC

Analizamos também o DNA das células, após hidrólise enzimática (item 3.3.8 de *Materiais e Métodos*), por HPLC acoplado a um detector de fluorescência ($\lambda_{exc.} = 300$ nm; $\lambda_{em.} = 420$ nm). Foram utilizados o sistema de HPLC 3.3.9.A e a condição cromatográfica 3.3.9.1 descritos em *Materiais e Métodos*. Para essas análises as células foram incubadas com 65 μ M de DDE por 50 minutos em meio de cultura sem soro, em seguida o meio contendo DDE foi trocado por outro com soro e, após mais 2-3 horas de incubação, o DNA foi extraído (item 3.3.2.5b de *Materiais e Métodos*). Essa incubação foi repetida três vezes, sendo utilizadas cerca de 2×10^8 células em cada vez para que se pudesse obter quantidade suficiente de DNA para fazer as análises (~ 1 mg/incubação). Os cromatogramas obtidos estão na **figura 4.10**.

Observamos que diferentes produtos fluorescentes, ausentes no DNA de células controles, são formados no DNA de células incubadas com DDE. Aqueles indicados com setas apareceram nas três repetições, sendo que os produtos 1, 3 e 4 estavam presentes em concentração proporcional à concentração de DNA.

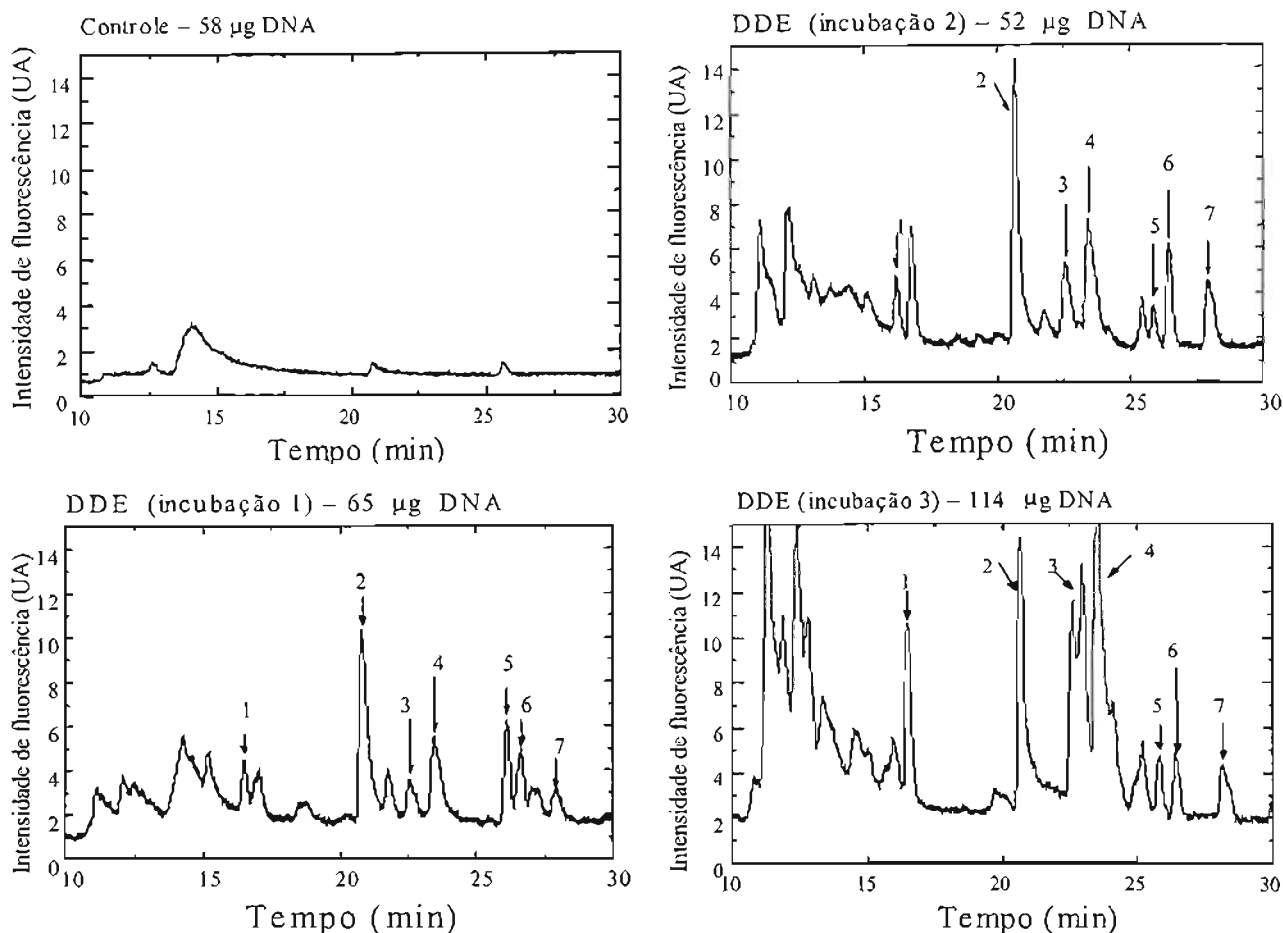


Figura 4.10: Cromatogramas obtidos com detecção por fluorescência ($\lambda_{exc.} = 300$ nm; $\lambda_{em.} = 420$ nm) do DNA extraído das células CV1-P não submetidas a qualquer tratamento (controle) e incubadas com 65 μ M de DDE. A massa de DNA em cada análise, calculada como descrito no item 3.3.9 de *Materiais e Métodos*, está indicada. O tratamento das células, extração e hidrólise do DNA foram feitos como descrito nos itens 3.3.2.5b, 3.3.7 e 3.3.8 de *Materiais e Métodos*. A condição de análise por HPLC está descrita no item 3.3.9 (sistema 3.3.9.A e condição 3.3.9.1) de *Materiais e Métodos*. UA: unidades arbitrárias.

Em um outro experimento, no qual as células foram incubadas com 65 μ M de DDE por 5 horas em meio de cultura sem soro (item 3.3.2.5c de *Materiais e Métodos*) e o DNA extraído e hidrolisado, observamos, além da presença de produtos fluorescentes ($\lambda_{exc.} = 300$ nm; $\lambda_{em.} = 420$ nm), produtos que foram detectados por absorvância a 225 nm e estavam ausentes no DNA de células controles (sistema de HPLC 3.3.9.A e condição cromatográfica 3.3.9.2 de *Materiais e Métodos*). Esses cromatogramas estão apresentados na **figura 4.11**.

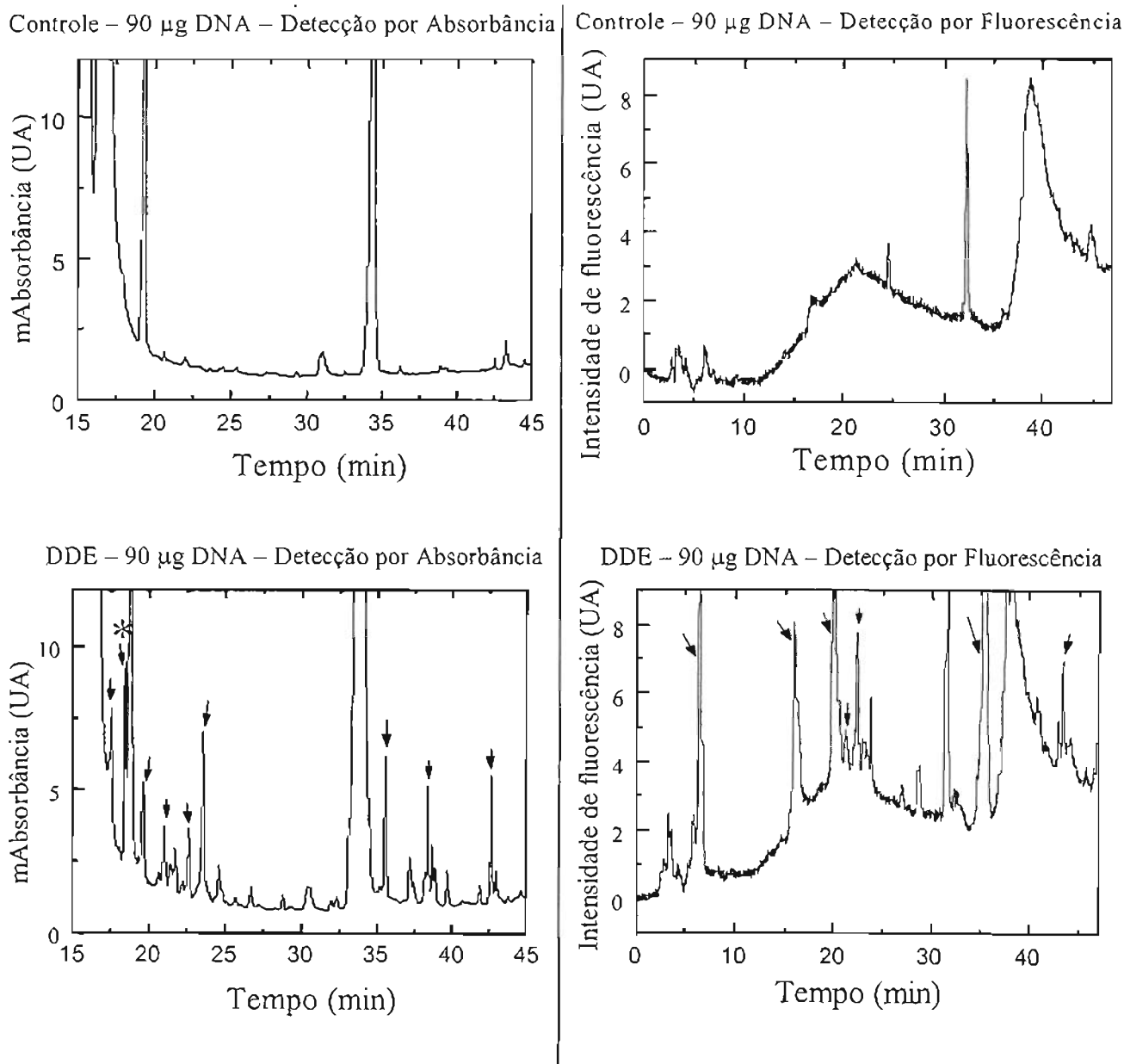


Figura 4.11: Cromatogramas obtidos com detecção por absorvância ($\lambda = 225$ nm) e fluorescência ($\lambda_{exc.} = 300$ nm; $\lambda_{em.} = 420$ nm) do DNA extraído das células CV1-P incubadas com etanol (0,2% v/v) (controle) e com DDE (65 μ M, 5 horas). A massa de DNA em cada análise, calculada como descrito no item 3.3.9 de *Materiais e Métodos*, está indicada. O tratamento das células, extração e hidrólise do DNA foram feitos como descrito nos itens 3.3.2.5c, 3.3.7 e 3.3.8 de *Materiais e Métodos*. A condição de análise por HPLC está descrita no item 3.3.9 (sistema 3.3.9.A e condição 3.3.9.2) de *Materiais e Métodos*. UA: unidades arbitrárias.

Fizemos também a análise da presença de produtos eletroativos no DNA de células incubadas com DDE. O sistema combinando a resolução da cromatografia líquida de alta performance com a seletividade e sensibilidade da detecção eletroquímica (HPLC-EC) é

bastante utilizado para a detecção de 8-oxodG em DNA. Entretanto, outros adutos também são eletroquimicamente ativos, podendo ser detectados ao nível de 1 em 10^5 - 10^6 bases normais em alguns μg de DNA, enquanto as bases normais, com exceção da guanina, não o são (Park e col., 1989). Douki e Ames desenvolveram um ensaio de detecção eletroquímica acoplada com HPLC para a análise da formação de adutos 1,*N*²-propano-2'-desoxiguanosina induzidos por 4-hidroxi-2-nonenal e outros aldeídos α,β -insaturados, produtos da peroxidação lipídica (Douki e Ames, 1994).

Resolvemos, portanto, utilizando o sistema de HPLC 3.3.9.B e a condição cromatográfica 3.3.9.3 descritos em *Materiais e Métodos*, analisar as mesmas amostras de DNA que forneceram os cromatogramas da **figura 4.10**. Os cromatogramas obtidos estão na **figura 4.12**. Pode-se observar a presença de produtos eletroativos no DNA das células incubadas com DDE, que estão ausentes no controle.

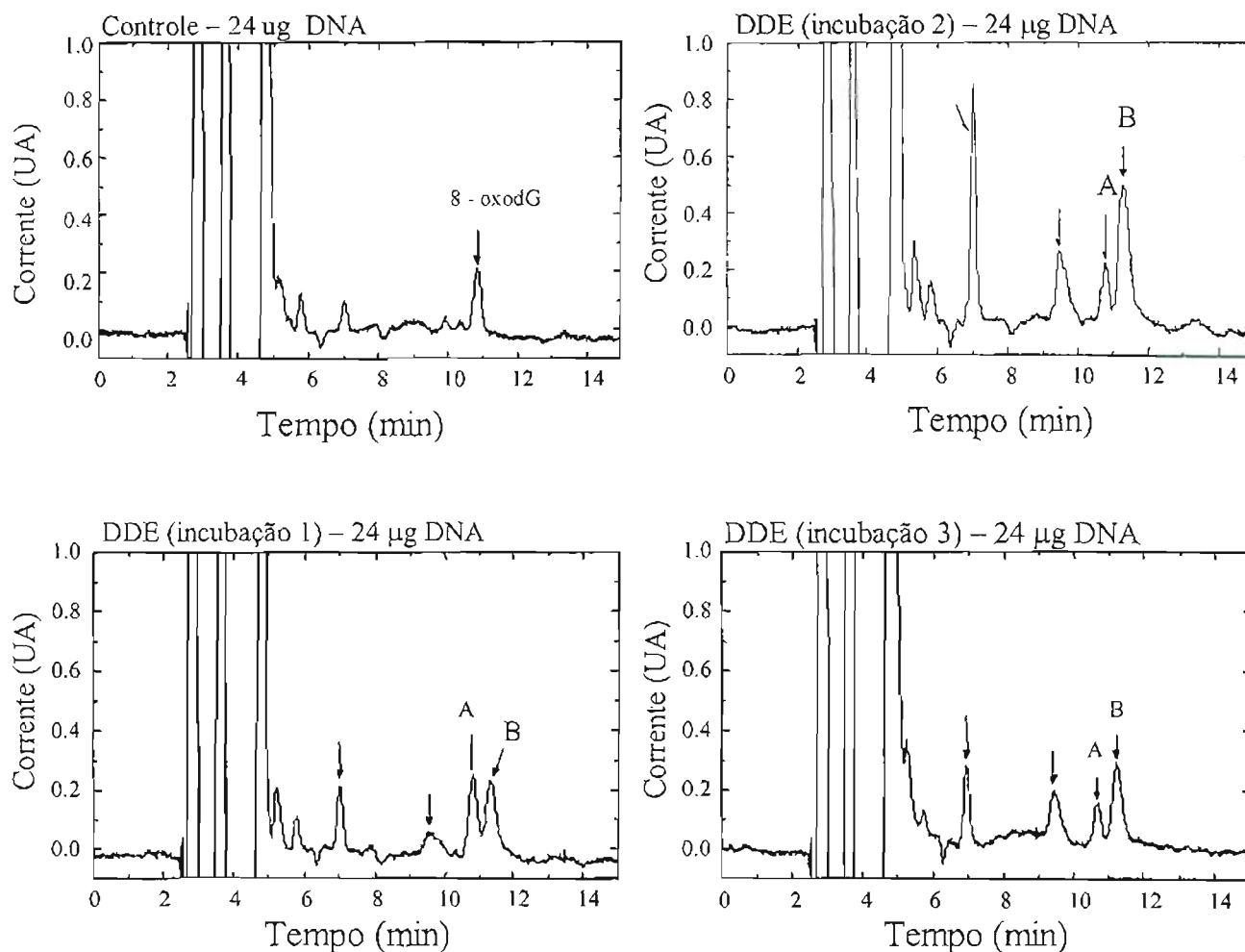


Figura 4.12: Cromatogramas obtidos com detecção eletroquímica (potencial = +600 mV) do DNA extraído das células CV1-P não submetidas a qualquer tratamento (controle) e incubadas com 65 μ M de DDE. A massa de DNA em cada análise, calculada como descrito no item 3.3.9 de *Materiais e Métodos*, está indicada. O tratamento das células, extração e hidrólise do DNA foram feitos como descrito nos itens 3.3.2.5b, 3.3.7 e 3.3.8 de *Materiais e Métodos*. A condição de análise por HPLC está descrita no item 3.3.9 (sistema 3.3.9.B e condição 3.3.9.3) de *Materiais e Métodos*. UA: unidades arbitrárias.

Os produtos eletroativos **A** e **B** acima indicados foram purificados e concentrados para que se pudessem obter seus espectros de absorvância. Assim, teríamos uma primeira indicação do tipo de modificação e/ou nucleosídeo que estaria sendo alterado pela reação com DDE no núcleo das células. Os espectros obtidos estão na **figura 4.13** e nos levaram a acreditar que esses produtos eram resultantes da reação de 2'-desoxiguanosina com DDE.

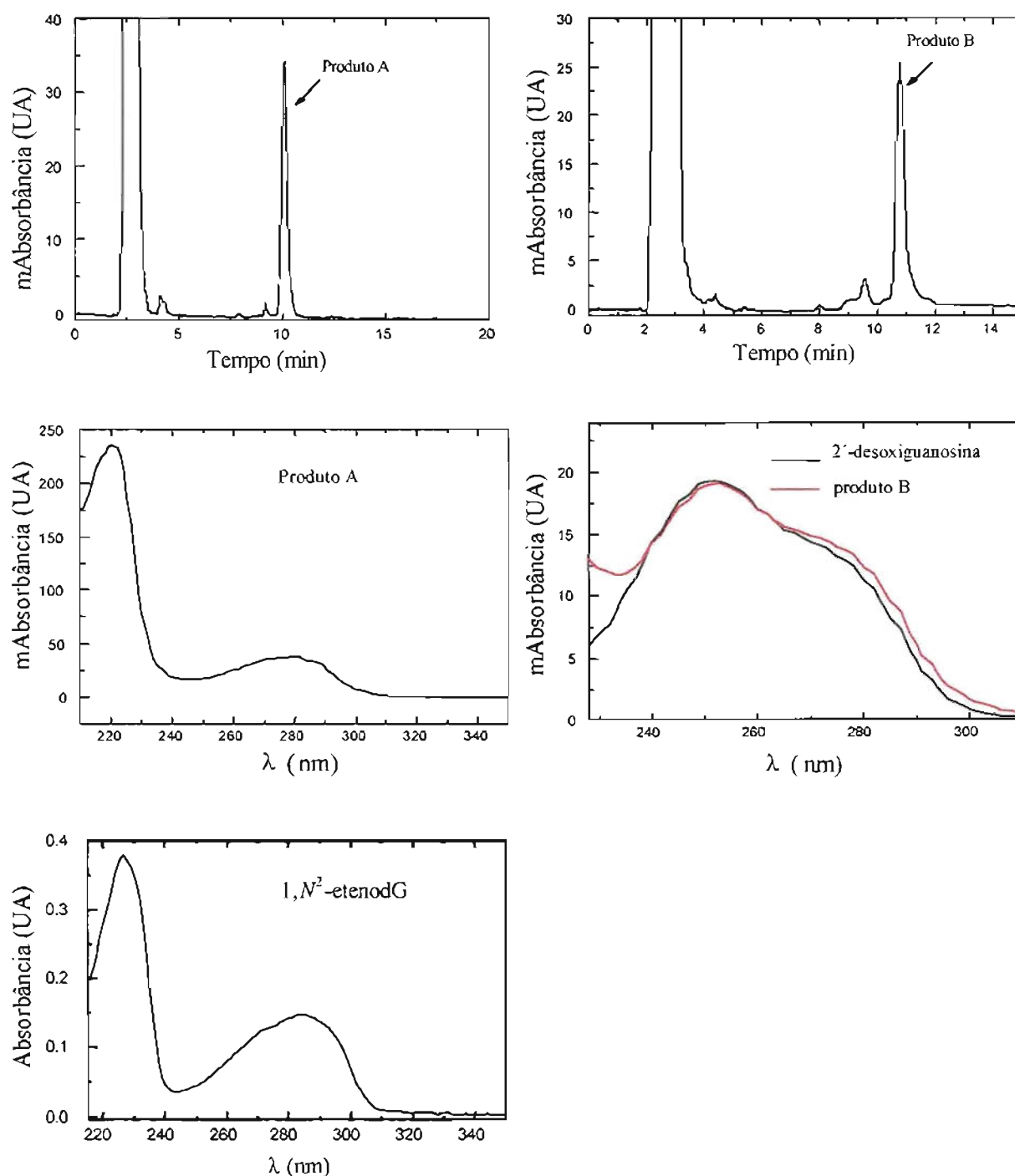


Figura 4.13: Cromatogramas com detecção por absorvância ($\lambda = 285$ nm) e espectros de absorvância dos produtos A e B (figura 4.12) purificados do DNA das células CV1-P incubadas com DDE. Esses espectros foram obtidos em um detector com fotodiodos acoplado ao HPLC (sistema 3.3.9.A). A condição de análise por HPLC está descrita no item 3.3.9.3 de *Materiais e Métodos*. Para comparação, foram apresentados os espectros de 2'-desoxiguanosina e aduto 1,N²-etenodG. O espectro deste último foi obtido em espectrofotômetro. UA: unidades arbitrárias.

Devido à semelhança entre os espectros de absorvância do produto A e do aduto 1,*N*²-eten-2'-desoxiguanosina descrito na literatura como um produto da reação *in vitro* de 2'-desoxiguanosina com cloroacetaldeído, óxido de cloroetileno ou epóxidos da acroleína, crotonaldeído ou *trans*-4-hidroxi-2-nonenal (HNE) (Sattsangi e col., 1977; Goldschmidt e col., 1968; Nair e Offerman, 1985; Sodum e Chung, 1991), resolvemos sintetizar este aduto, uma vez que o mesmo não é comercialmente disponível, para servir como um padrão nas análises cromatográficas do DNA celular.

4.1.6.1. Síntese e caracterização química do aduto 1,*N*²-eten-2'-desoxiguanosina (1,*N*²-etenodG)

Sabíamos que cloroacetaldeído, um produto de rearranjo do óxido de cloroetileno resultante da oxidação metabólica do cloreto de vinila pelas monooxigenases microsossomais dependentes de citocromo P450 (Fedtke e col., 1990a,b), reagia com guanosina, *in vitro*, levando à formação de 1,*N*²-etenoguanosina, 1,*N*²-etenoguanina e *N*²,3-etenoguanina (Sattsangi e col., 1977), entre outros produtos. Resolvemos, portanto, incubar cloroacetaldeído com 2'-desoxiguanosina, como descrito no item 3.4.2 de *Materiais e Métodos*, isolar os produtos resultantes dessa reação em quantidade suficiente para as análises espectroscópicas e obter o aduto 1,*N*²-etenodG. A **figura 4.14** mostra os cromatogramas obtidos com detecção por absorvância e fluorescência do resultado da reação.

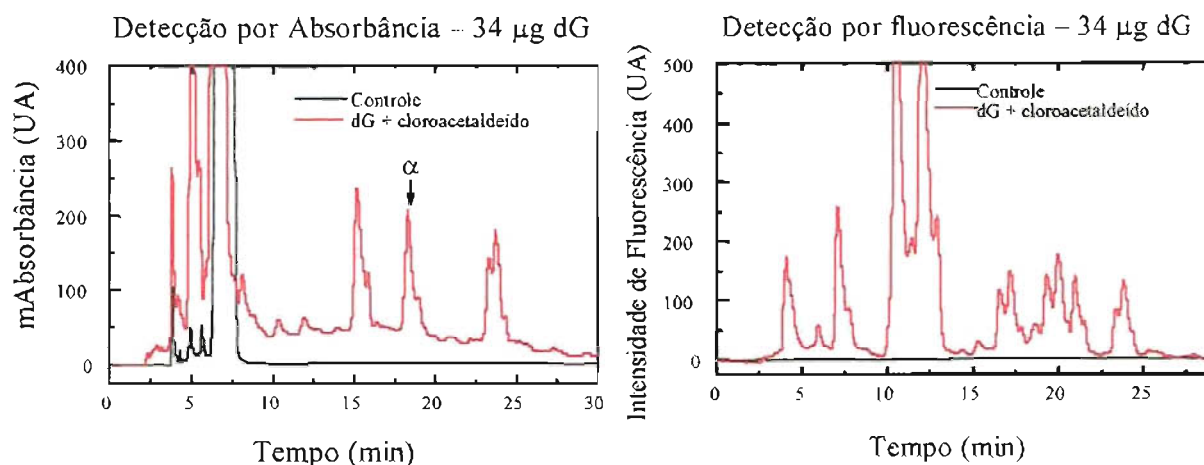


Figura 4.14: Cromatogramas obtidos com detecção por absorvância ($\lambda = 254 \text{ nm}$) e fluorescência ($\lambda_{\text{exc}} = 300 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em.}} = 420 \text{ nm}$) do resultado da incubação de 2'-desoxiguanosina com cloroacetaldeído e respectivo controle. A massa de 2'-desoxiguanosina em cada análise está indicada. As condições de incubação e análise por HPLC estão descritas, respectivamente, nos itens 3.4.2 e 3.4.1.1 de *Materiais e Métodos*. UA: unidades arbitrárias.

Podemos observar que diferentes produtos, alguns fluorescentes e outros não, são formados a partir da reação de 2'-desoxiguanosina com cloroacetaldeído. Pela análise dos espectros de absorvância em pH 1, pH 7 e pH 11 (**figura 4.15** e **tabela 4.7**), ^1H RMN (em $\text{DMSO-}d_6$ ou D_2O) (**figura 4.16** e **tabela 4.8**) e massas (**figura 4.17**), concluímos que o produto indicado (α) correspondia ao aduto $1,N^2$ -etenodG.

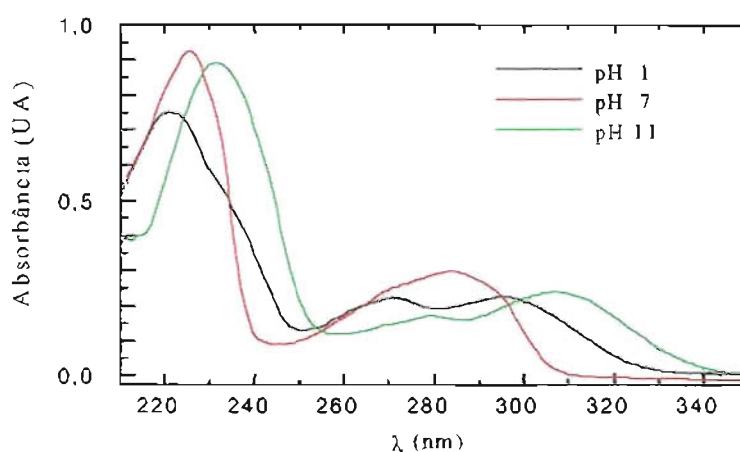


Figura 4.15: Espectros de absorvância do produto α em diferentes pHs (item 3.4.6.1 de *Materiais e Métodos*): pH 1, 50 mM HCl/KCl; pH 7, tampão fosfato 50 mM; pH 11, tampão carbonato-bicarbonato 50 mM. UA: unidades arbitrárias.

Tabela 4.7: Valores de $\lambda_{m\acute{a}x.}$ e coeficientes de extinção molar (ϵ) do produto α nos diferentes pHs indicados na **figura 4.16**. Os valores de ϵ foram determinados como descrito no item 3.4.7 de *Materiais e Métodos*.

	$\lambda_{m\acute{a}x.}$ (nm)	ϵ ($M^{-1} cm^{-1}$)
PH 1	222	40 570
	271	10 971
	295	11 912
PH 7	226	49 937
	285	16 785
pH 11	233	42 764
	280	8 643
	307	11 687

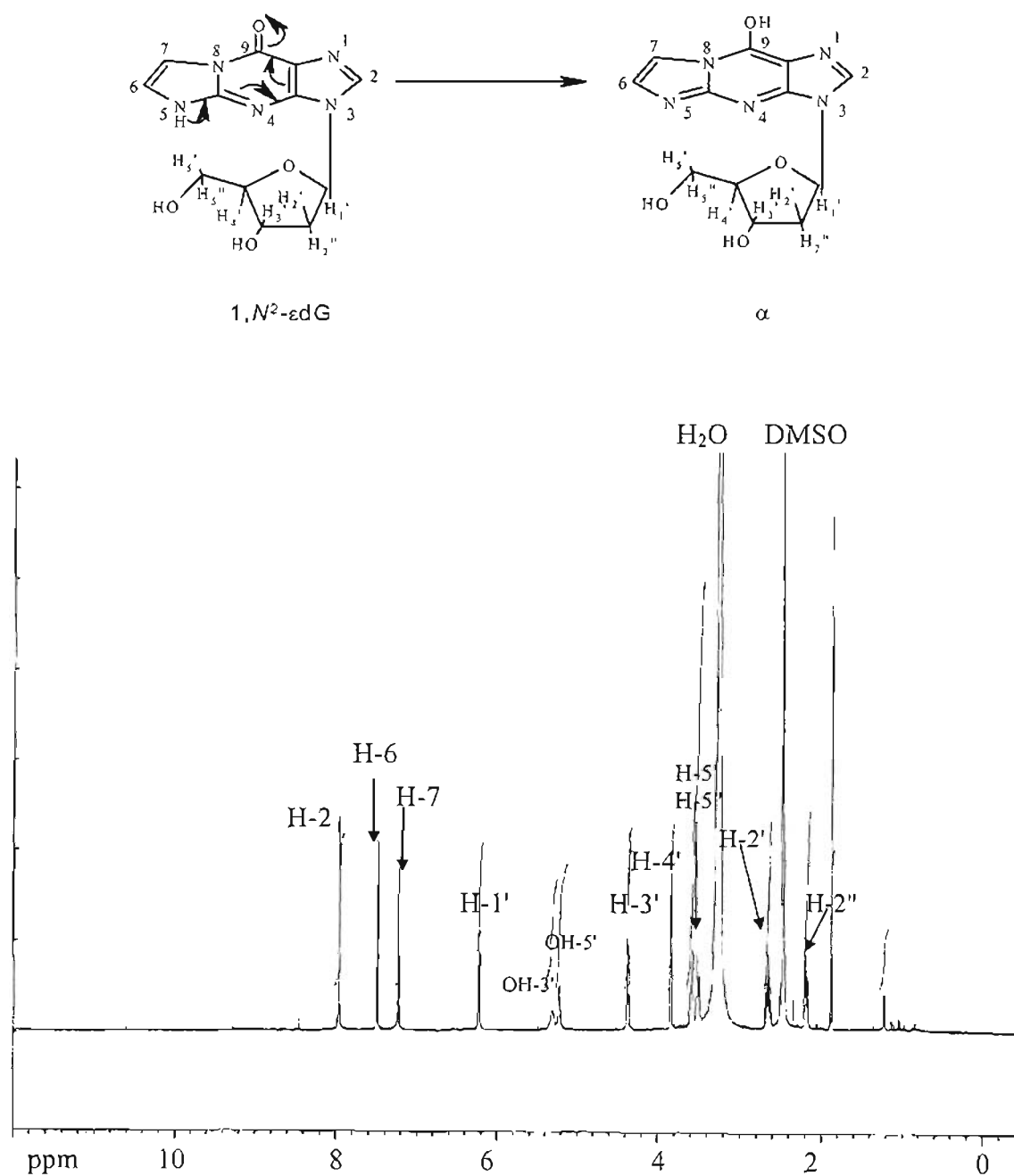


Figura 4.16: Espectro de ¹H RMN do produto α obtido em um equipamento de 500 MHz em DMSO-*d*₆, como descrito no item 3.4.6.2 de *Materiais e Métodos*.

Tabela 4.8: Deslocamentos químicos no espectro de ^1H RMN do produto α em $\text{DMSO-}d_6$ apresentado na figura 4.16^a.

	δ (ppm)		Tipo	$J(\text{Hz})$
H-1'	6,22-6,25	t	$\text{N}-\underline{\text{CH}}-\text{O}$	$J_{6.7} = 2,5$
H-2'	2,64-2,69	m	$\text{CH}_2-\underline{\text{C}}$	
H-2''	2,17-2,21	m	$\text{CH}_2-\underline{\text{C}}$	
H-3'	4,37	m	$\text{HO}-\underline{\text{CH}}$	
H-4'	3,83-3,86	m	$\text{O}-\underline{\text{CH}}$	
H-5'	3,58-3,60	m	$\text{HO}-\underline{\text{CH}}_2$	
H-5''	3,49-3,52	m	$\text{HO}-\underline{\text{CH}}_2$	
OH-3'	5,32	s	$\underline{\text{HO}}-\underline{\text{CH}}$	
OH-5'	5,23	s	$\underline{\text{HO}}-\underline{\text{CH}}_2$	
H-2	7,97	s	$\text{N}=\underline{\text{CH}}-\text{N}$	
H-6	7,49	d	$\text{C}=\underline{\text{CH}}-\text{N}$	
H-7	7,24	d	$\text{C}=\underline{\text{CH}}-\text{N}$	

^a m, multiplete; t, triplete; d, dublete; s, singleto. Espectro obtido em um espectrômetro de RMN DRX 500.

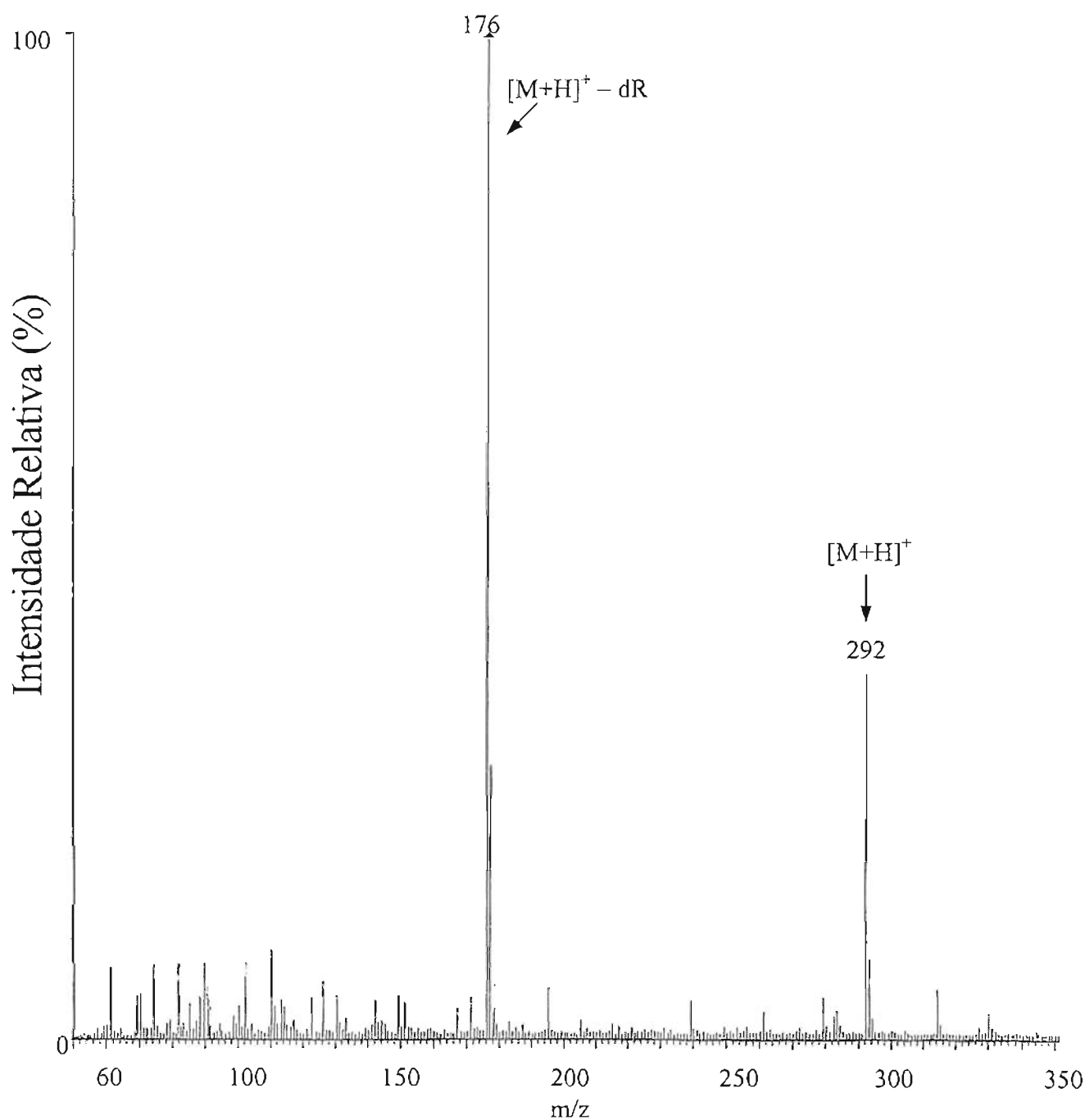


Figura 4.17: Espectro de massas (ESI/MS) do produto α . Voltagem do cone: 25 V. As condições estão descritas no item 3.4.6.3 de *Materiais e Métodos*.

Os espectros de absorvância obtidos nos diferentes pHs são muito semelhantes aos descritos na literatura para 1, N^2 -eteno-2'-desoxiguanosina e 1, N^2 -etenoguanosina (Sodum e Chung, 1988; Sattsangi e col., 1977). Algumas diferenças observadas foram um pequeno deslocamento batocrômico das bandas de menor energia (pH 1, 291 \rightarrow 295; pH 7, 283 \rightarrow 285; pH 11, 277 \rightarrow 280) em comparação com os espectros de 1, N^2 -etenodG descritos

por Sodum e Chung (1988), e valores de coeficientes de extinção molar (ϵ) maiores para todos os comprimentos de onda em comparação com os valores descritos por Sattsangi e colaboradores (1977) para 1, N^2 -etenoguanosina. Neste último caso, as maiores diferenças foram observadas para as bandas de maior energia (220 – 235 nm).

No espectro de ^1H RMN observamos, além dos prótons do açúcar e do próton H-2 da guanina, dois prótons aromáticos que aparecem como dubletos em 7,24 e 7,49 ppm, indicando a adição de $-\text{HC}=\text{CH}-$ à 2'-desoxiguanosina. Os prótons em 5,23 e 5,32 ppm não apareceram quando os espectros foram adquiridos após a adição de D_2O às amostras, mostrando serem os prótons trocáveis OH-3' e OH-5'. A única diferença em relação ao espectro descrito por Sodum e Chung (1988) para 1, N^2 -etenodG foi o fato de não observarmos o próton H-5 no espectro obtido em $\text{DMSO}-d_6$. A confirmação da estrutura do aduto foi obtida pelo seu espectro de massas (ESI/MS), o qual apresentou o íon molecular $[\text{M} + \text{H}]^+$ em m/z 292 e o íon correspondente a $[\text{M} + \text{H}]^+ - 2\text{-D-eritro-pentose}$ em m/z 176.

As alterações nos espectros de absorvância e ^1H RMN em relação aos dados da literatura nos levaram a concluir que o aduto α é um tautômero (**figura 4.16**) do aduto 1, N^2 -etenodG previamente descrito (Sodum e Chung, 1988).

4.1.6.2. Uso do padrão 1, N^2 -eteno-2'-desoxiguanosina para análise preliminar da sua presença em DNA de células incubadas com DDE

A análise do DNA das células, após hidrólise enzimática, por HPLC acoplado à detecção por absorvância a 225 nm, segundo a condição 3.3.9.2 descrita em *Materiais e Métodos*, nos permitiu observar um produto (indicado com * na **figura 4.11**) que estava ausente no controle e apresentava tempo de retenção próximo ao do aduto 1, N^2 -etenodG (**figura 4.14**). Uma nova cromatografia feita após adição do aduto 1, N^2 -etenodG a uma amostra do DNA das células revelou coeluição entre os dois produtos, como pode ser observado na **figura 4.18**. Tal coeluição foi um indício de que o produto presente no DNA das células incubadas com DDE poderia ser o aduto 1, N^2 -etenodG.

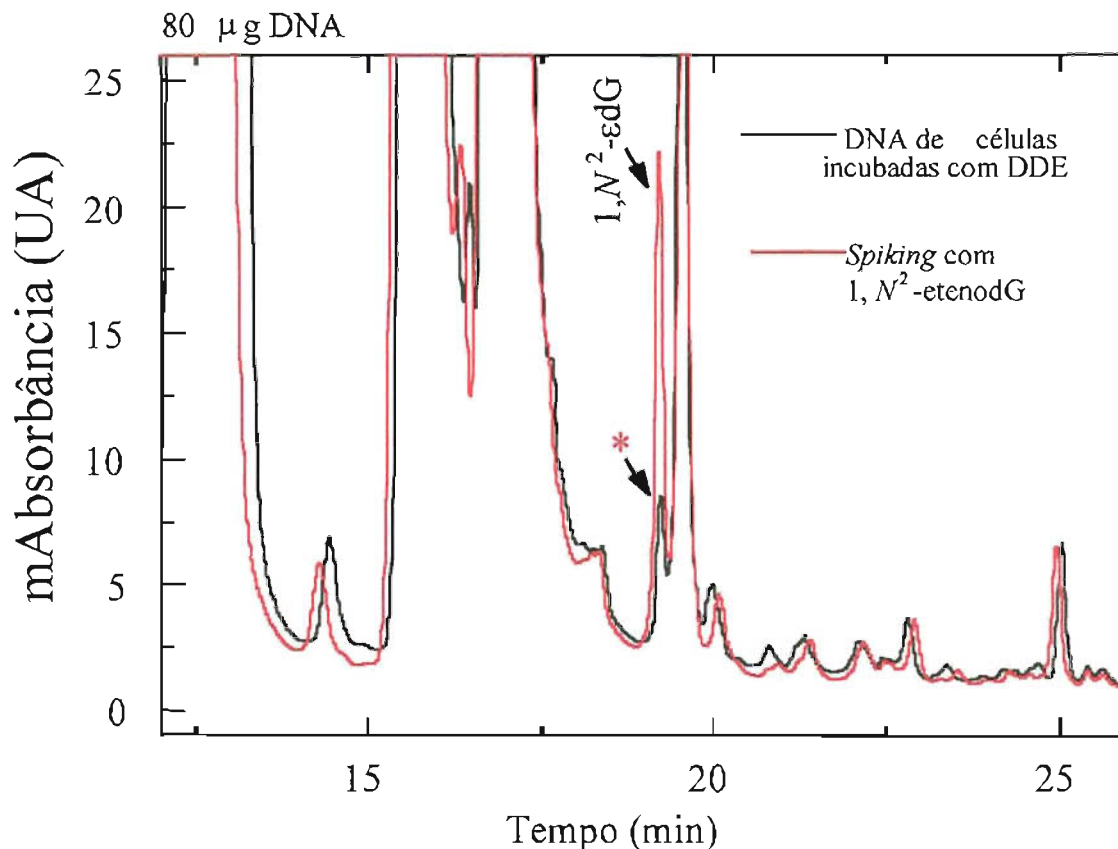


Figura 4.18: Cromatogramas obtidos com detecção por absorvância ($\lambda = 225$ nm) do DNA extraído das células CV1-P incubadas com DDE ($65 \mu\text{M}$, 5 horas). Os cromatogramas foram feitos sem adição e com adição (*spiking*) de $1, N^2$ -etenodG à amostra de DNA. A massa de DNA, calculada como descrito no item 3.3.9 de *Materiais e Métodos*, está indicada. O tratamento das células, extração e hidrólise do DNA foram feitos como descrito nos itens 3.3.2.5c, 3.3.7 e 3.3.8 de *Materiais e Métodos*. A condição de análise por HPLC está descrita no item 3.3.9 (**sistema 3.3.9.A e condição 3.3.9.2**) de *Materiais e Métodos*. UA: unidades arbitrárias.

Não tivemos sucesso na purificação desse produto para obtenção do seu espectro de absorvância e, com isso, a confirmação da sua estrutura. Assim, novas estratégias tiveram que ser adotadas para que se pudesse confirmar a formação de etenoadutos de 2'-desoxiguanosina a partir da reação desse nucleosídeo com DDE.

Todas as análises de DNA das células apresentadas nos itens 4.1.5 e 4.1.6 nos revelaram que, antes de haver perda de viabilidade celular e fragmentação do DNA e apesar do aumento do nível intracelular de sulfidrilas não proteicas nas incubações com DDE, o DNA celular é modificado pelas moléculas de aldeído que conseguem atingir o núcleo. Uma

vez que já se sabia que adutos formados entre adenina e DDE eram as principais espécies responsáveis pela fluorescência observada no DNA após reação com DDE *in vitro*, e a caracterização química dos adutos derivados de 2'-desoxiadenosina vinha sendo feita por outro estudante em nosso laboratório (Carvalho e col., 1998 e 2000), resolvemos nos concentrar na caracterização de alguns adutos formados a partir da reação de 2'-desoxiguanosina com DDE e na tentativa de detectá-los em DNA de células incubadas com o aldeído, tendo como base os dados acima apresentados.

4.2. Formação e caracterização química de adutos 1,N²-eteno-2'-desoxiguanosina a partir da reação de DDE com 2'-desoxiguanosina *in vitro*

4.2.1. Condições de incubação e detecção dos produtos formados

O estudo da reação do DDE com 2'-desoxiadenosina na presença de peróxidos *in vitro*, que vinha sendo desenvolvido paralelamente em nosso laboratório (Carvalho e col., 1998), e outros estudos presentes na literatura mostrando a reação de aldeídos α,β insaturados epoxidados na presença de peróxidos com as bases de nucleotídeos ou nucleosídeos (Nair e Offerman, 1985; Sodum e Chung, 1988; Chung e col., 1996) nos levaram a fazer as incubações de dGuo com DDE utilizando THF previamente exposto à luz como fonte dos peróxidos. A determinação da concentração de peróxidos no THF utilizado foi feita através do ensaio do Fe²⁺/alaranjado de xilenol descrito no item 3.4.3 de *Materiais e Métodos*.

Inicialmente testamos diferentes pHs e concentrações de tampão e peróxidos nas incubações (item 3.4.4 de *Materiais e Métodos*) e verificamos que concentrações mais altas de peróxidos levavam à formação de produtos diferentes dos que eram observados na presença de concentrações mais baixas. Tentamos purificar os produtos formados na presença das concentrações mais altas de peróxidos, mas os mesmos se mostraram instáveis após o primeiro passo da purificação. Decidimos, portanto, nos concentrar nas incubações contendo menores quantidades de peróxidos, até chegarmos à condição que nos proporcionou melhor rendimento dos adutos de nosso interesse (**condição 3.4.4.3** de *Materiais e Métodos*). Verificamos também que, na ausência de peróxidos (item 3.4.9 de

Materiais e Métodos), esses adutos não eram formados. A concentração e pH do tampão utilizado também foram importantes para o maior ou menor rendimento dos adutos. Sabemos que as adições nucleofílicas envolvendo 2'-desoxiguanosina e aldeídos ocorre preferencialmente em pH acima de 9,2, quando o N^2 da guanina se encontra desprotonado, facilitando o ataque nucleofílico (Nair e Offerman, 1985). O aduto 1, N^2 -etenodG não foi observado em incubações de 2'-desoxiguanosina com cloroacetaldeído em pH 5 (Nair e Offerman, 1985).

A reação de dGuo com DDE na presença de peróxidos, segundo a **condição 3.4.4.3** descrita em *Materiais e Métodos*, levou à formação de quatro produtos principais juntamente com outros aparentemente presentes em concentrações menores. Esses produtos foram separados utilizando-se as condições de HPLC **3.4.1.2** ou **3.4.1.3** descritas em *Materiais e Métodos* (**figura 4.19**). Nosso objetivo inicial foi a elucidação das estruturas dos adutos **A1** e **A2**, com tempos de retenção em 15 e 41 minutos, respectivamente (**condição 3.4.1.3**). Entretanto, os adutos com tempos de retenção intermediários (**A3**, **A4** e **A5**) também foram coletados e concentrados para posterior caracterização química.

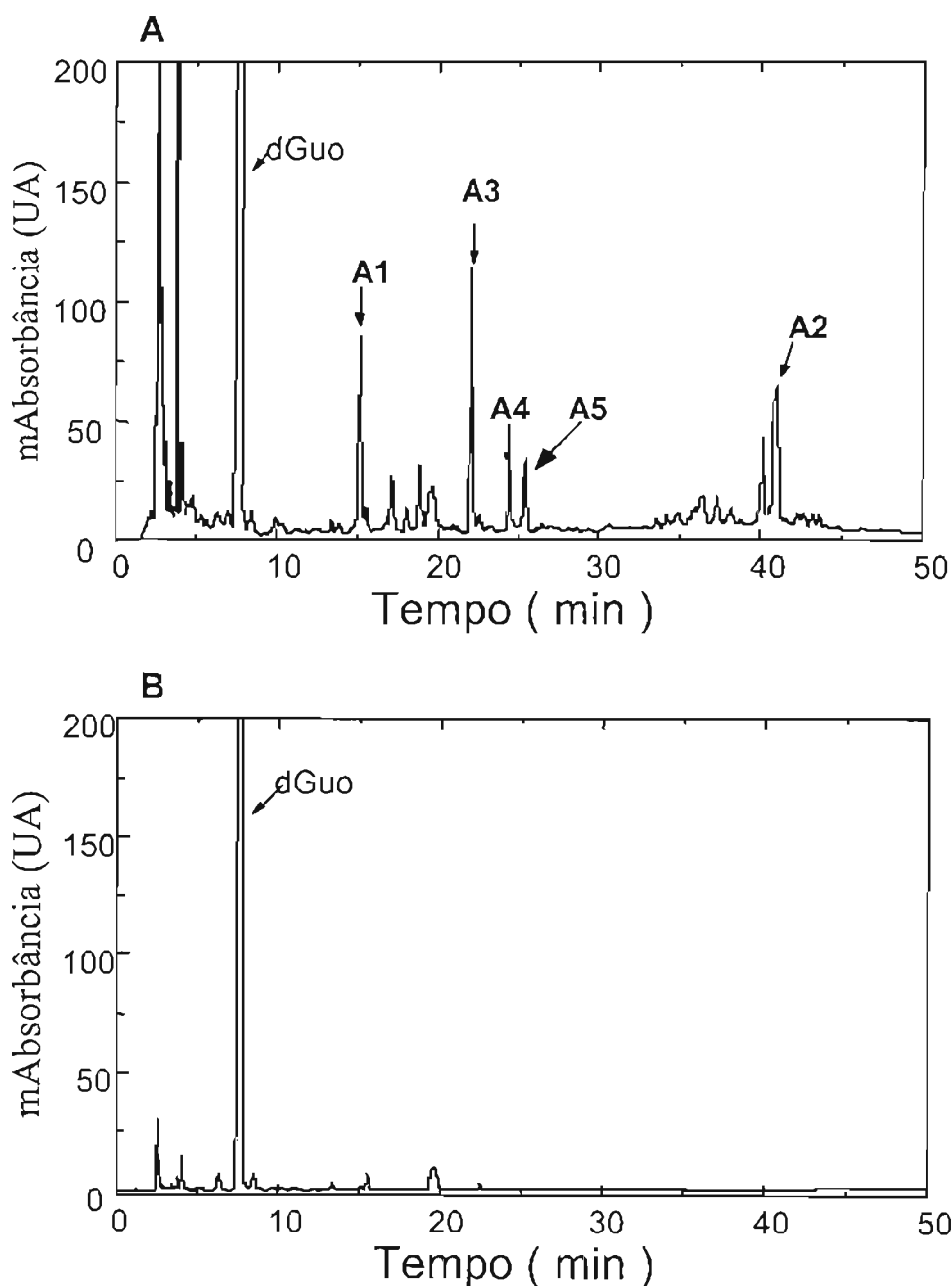


Figura 4.19: Cromatogramas obtidos com detecção por absorvância ($\lambda = 225$ nm). **A)** Resultado da reação de dGuo com DDE na presença de peróxidos; **B)** Controle. As condições de incubação e análise por HPLC estão descritas, respectivamente, nos itens 3.4.4.3 e 3.4.1.3 de *Materiais e Métodos*. UA: unidades arbitrárias.

Após a primeira separação dos produtos, o aduto **A1** foi repurificado através da condição de HPLC 3.4.1.4 e o aduto **A2** foi repurificado através da condição de HPLC 3.4.1.7, a qual permitiu a separação dos dois adutos, **A2-1** e **A2-2**, que estavam coeluinto na condição de HPLC 3.4.1.3 (figura 4.20).

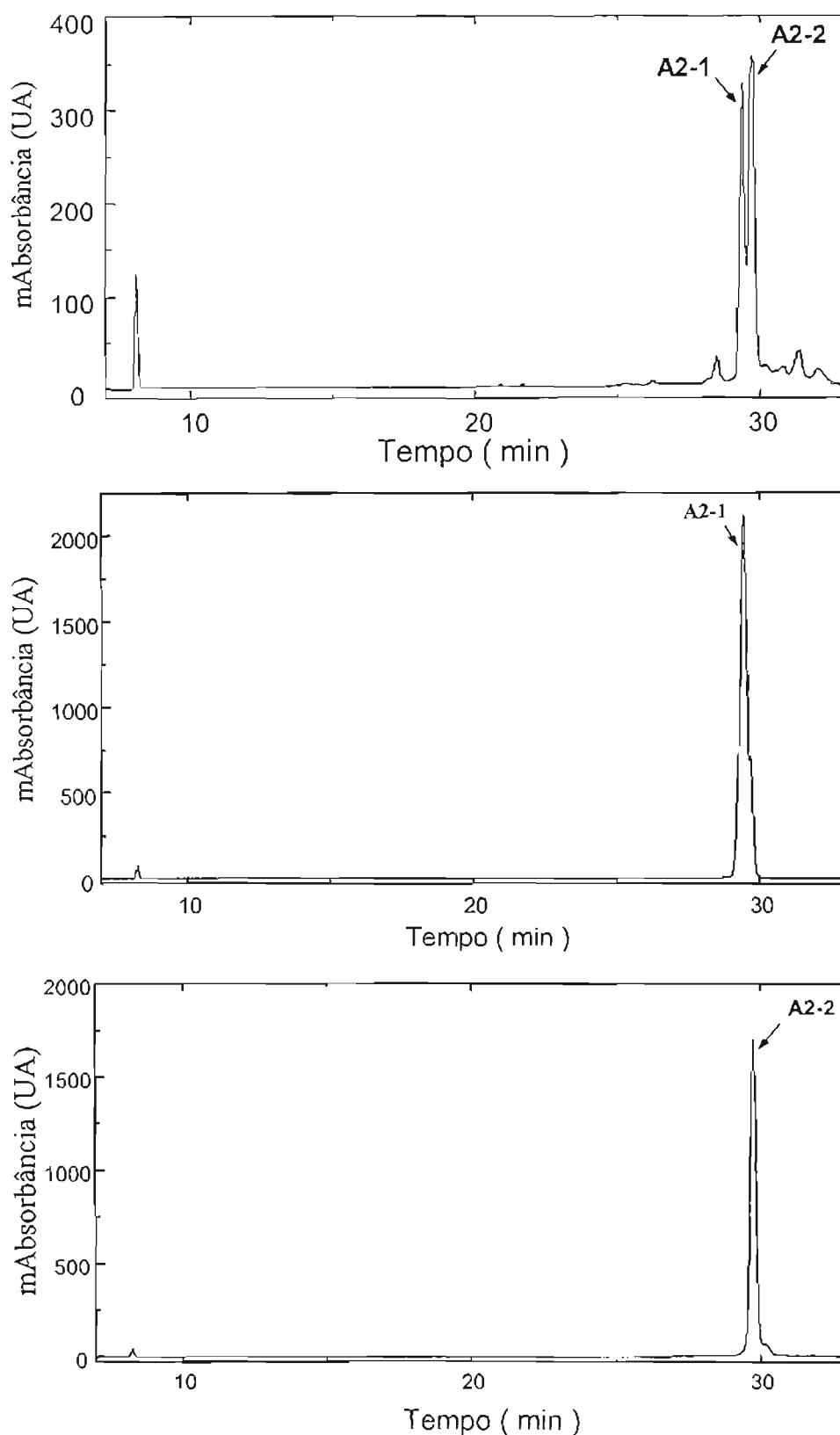


Figura 4.20: Cromatogramas obtidos com detecção por absorvância ($\lambda = 280$ nm) do aduto A2 pré-purificado. Foi utilizada a condição de HPLC 3.4.1.7 descrita em *Materiais e Métodos*. UA: unidades arbitrárias.

4.2.2. Caracterização química do aduto A1

Os espectros de absorvância do aduto A1 obtidos em diferentes pHs foram idênticos aos do aduto 1,*N*²-etenodG sintetizado anteriormente, com $\lambda_{\text{máx}}$ em 222, 271 e 295 nm (pH 1), 227 e 285 nm (pH 7) e 234, 279 e 307 nm (pH 11), como apresentado na **figura 4.21**. Além disso, ambos os adutos coeluíram cromatograficamente (**figura 4.22**).

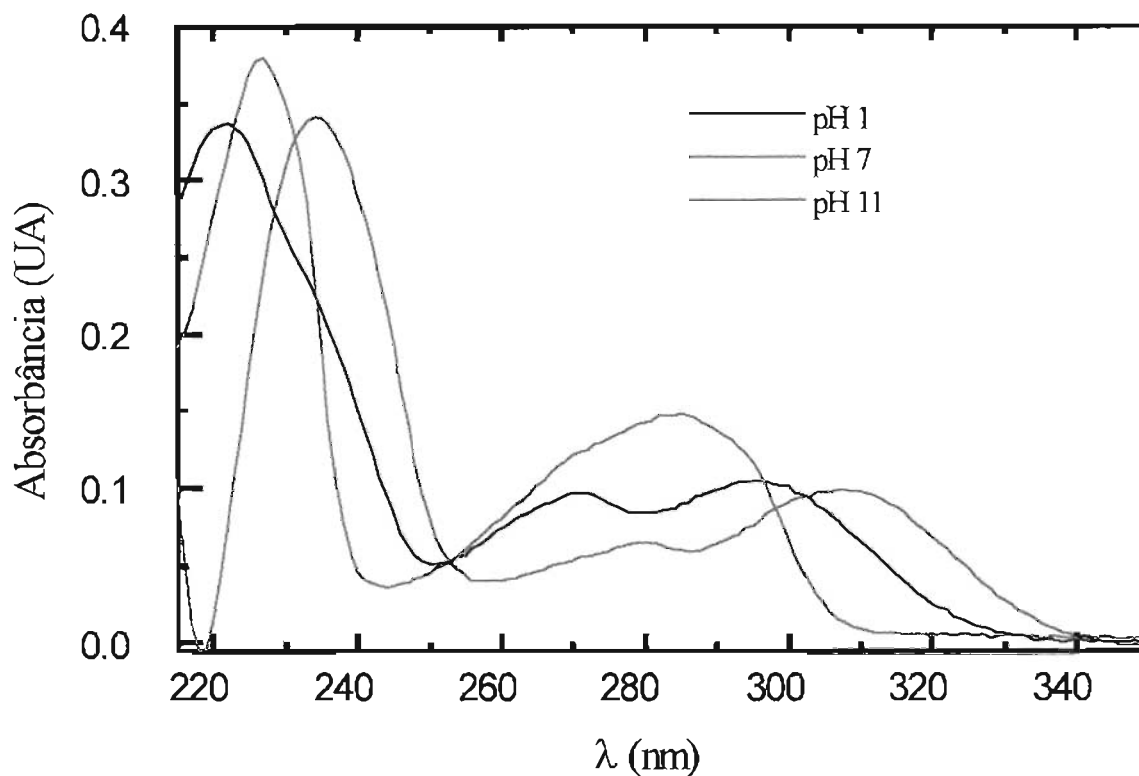


Figura 4.21: Espectros de absorvância do aduto A1 em diferentes pHs (item 3.4.6.1 de *Materiais e Métodos*): pH 1, 50 mM HCl/KCl; pH 7, tampão fosfato 50 mM; pH 11, tampão carbonato-bicarbonato 50 mM. UA: unidades arbitrárias.

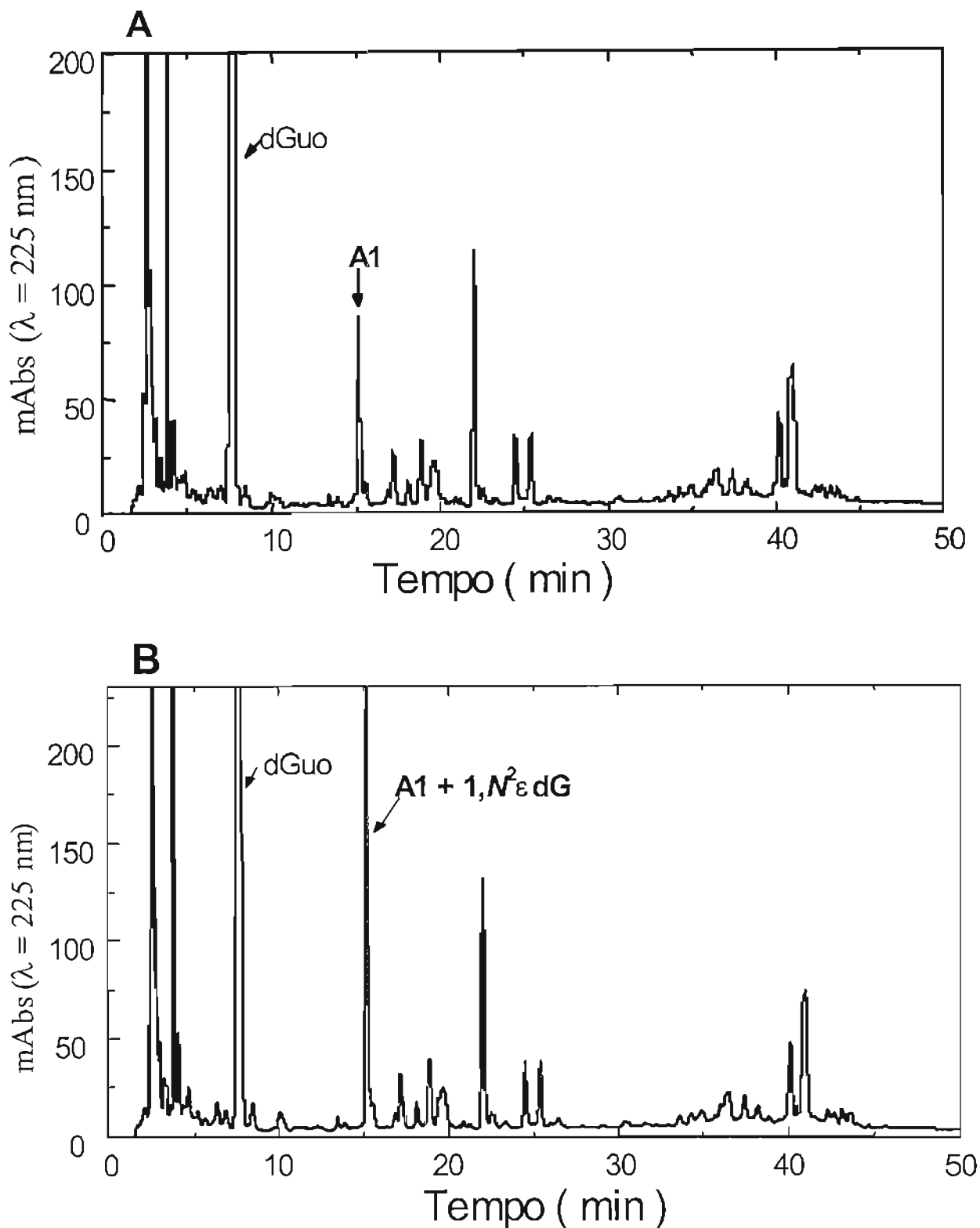


Figura 4.22: Cromatogramas obtidos com detecção por absorvância ($\lambda = 225 \text{ nm}$, UA). A) Resultado da reação de dGuo com DDE na presença de peróxidos; B) Mesma mistura de reação com adição de 1,N²-etenodG. As condições de incubação e análise por HPLC estão descritas, respectivamente, nos itens 3.4.4.3 e 3.4.1.3 de *Materiais e Métodos*. UA: unidades arbitrárias. Abs: absorvância.

O espectro de massas (ESI/MS) do aduto **A1** no modo positivo (**figura 4.23**) apresentou quatro sinais: m/z 291,85 ($[M + H]^+$, intensidade relativa 34%), 313,85 ($[M + Na]^+$, intensidade relativa 53%), 329,76 ($[M + K]^+$, intensidade relativa 40%) e 175,61 ($[M + H]^+ - 2\text{-D-eritro-pentose}$, intensidade relativa 95%), sendo consistente com a introdução de um grupo eteno à molécula de 2'-desoxiguanosina. Sua estrutura foi confirmada pela presença do par de dubletos correspondentes aos prótons H-6 e H-7 no espectro de ^1H RMN ($\delta = 7,60$ e $7,42$ ppm, respectivamente) e do singlete em $\delta = 8,13$ ppm correspondente ao próton H-2, além dos sinais correspondentes aos prótons do açúcar (**tabela 4.9**). Como neste caso o sinal correspondente ao próton H-5 também não apareceu no espectro obtido em $\text{DMSO-}d_6$, concluímos que o aduto **A1** é idêntico ao aduto 1, N^2 -etenodG que sintetizamos a partir da reação de dGuo com cloroacetaldeído (item 4.1.6.1), sendo ambos tautômeros do mesmo aduto descrito anteriormente na literatura (Sodum e Chung, 1988).

Tabela 4.9: Deslocamentos químicos no espectro de ^1H RMN do aduto **A1** em $\text{DMSO-}d_6$ ^a.

	δ (ppm)		Tipo	J (Hz)
H-1'	6,22-6,27	t	N- <u>CH</u> -O	$J_{6-7} = 2,6$
H-2'	2,55-2,64	m	<u>CH</u> ₂ -C	
H-2''	2,21-2,28	m	<u>CH</u> ₂ -C	
H-3'	4,35-4,37	m	HO- <u>CH</u>	
H-4'	3,81-3,84	m	O- <u>CH</u>	
H-5'	3,55-3,60	m	HO- <u>CH</u> ₂	
H-5''	3,50-3,54	m	HO- <u>CH</u> ₂	
OH-3'	5,30	d	<u>H</u> O-CH	
OH-5'	4,97	t	<u>H</u> O-CH ₂	
H-2	8,13	s	N= <u>CH</u> -N	
H-6	7,60	d	C= <u>CH</u> -N	
H-7	7,42	d	C= <u>CH</u> -N	

^a m, multipletto; t, triplete; d, dubleto; s, singlete. Espectro obtido em um espectrômetro de RMN DPX 300 como descrito no item 3.4.6.2 de *Materiais e Métodos*.

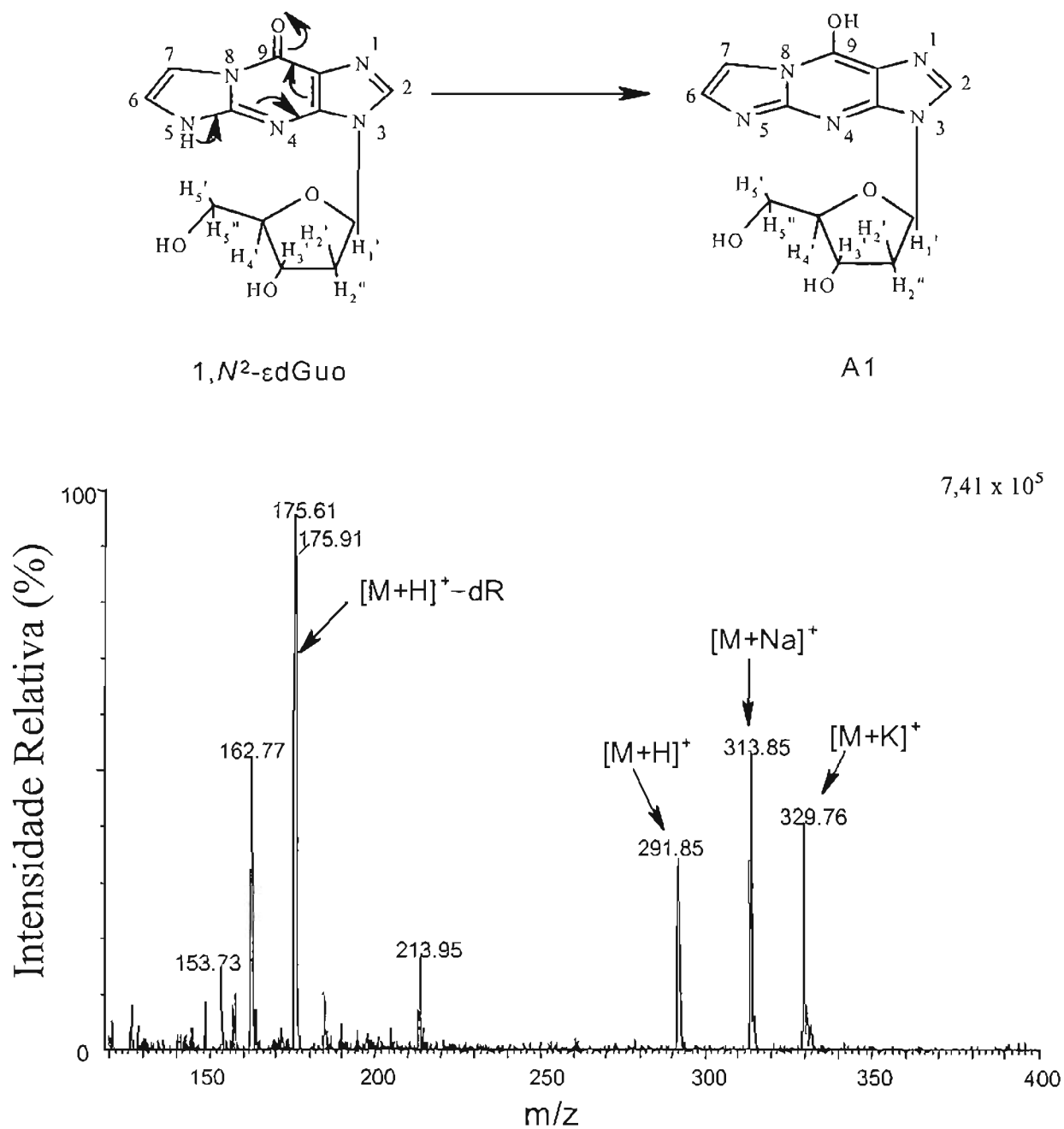


Figura 4.23: Espectro de massas (ESI/MS) do aduto A1. Voltagem do cone: 25 V. As condições estão descritas no item 3.4.6.3 de *Materiais e Métodos*.

4.2.3. Caracterização química dos adutos A2-1 e A2-2

Os adutos A2-1 e A2-2 (figuras 4.19 e 4.20) apresentaram espectros de absorvância idênticos entre si e semelhantes aos obtidos para o aduto 1, N^2 -eteno-2'-desoxiguanosina em diferentes pHs (figura 4.24 e tabela 4.10), com um deslocamento batocrômico, o que foi uma indicação de que eram derivados substituídos deste último.

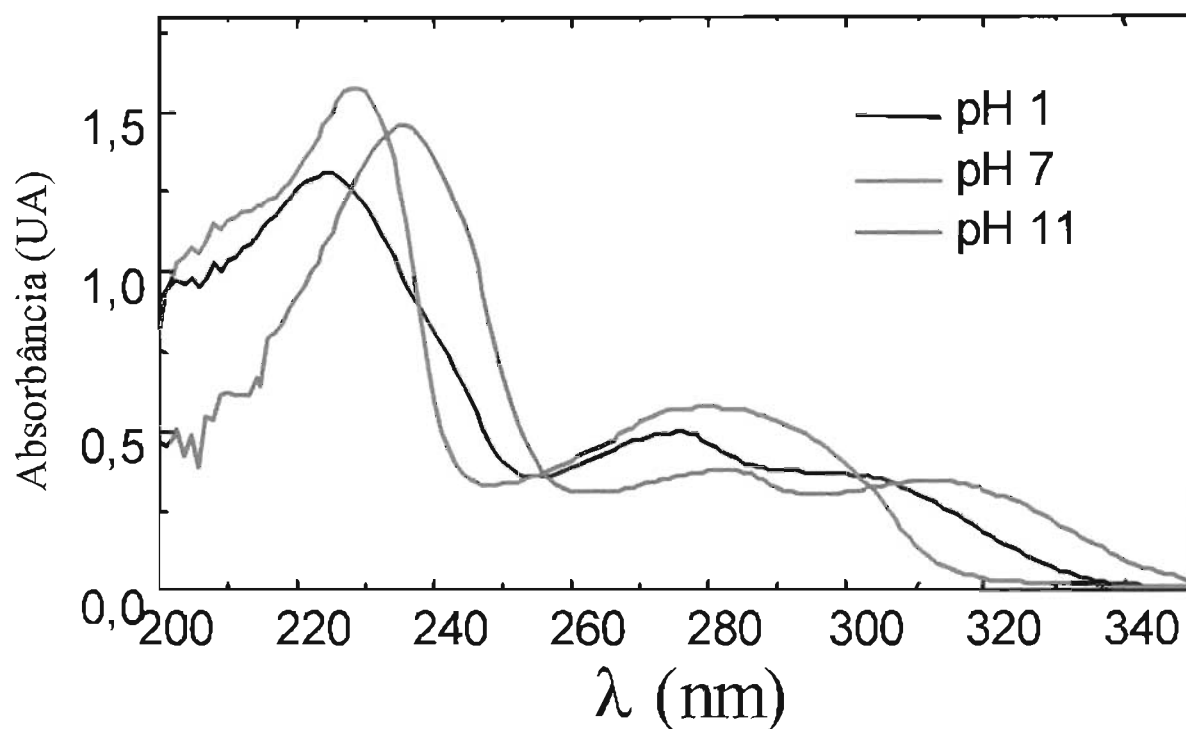


Figura 4.24: Espectros de absorvância dos adutos A2 em diferentes pHs (item 3.4.6.1 de *Materiais e Métodos*): pH 1, 50 mM HCl/KCl; pH 7, tampão fosfato 50 mM; pH 11, tampão carbonato-bicarbonato 50 mM. UA: unidades arbitrárias.

Tabela 4.10: Valores de $\lambda_{\text{máx}}$ e coeficientes de extinção molar (ϵ) dos adutos A2-1 e A2-2 nos diferentes pHs indicados na **figura 4.24**. Os valores de ϵ foram determinados como descrito no item 3.4.7 de *Materiais e Métodos*.

	A2-1		A2-2		Média (A2)
	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	ϵ ($\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$)	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	ϵ ($\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$)	ϵ ($\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$)
pH 1	225	70 039	225	57 358	63 698
	274	26 810	275	23 202	25 006
pH 7	228	80 468	229	66 710	73 589
	275	30 182	276	27 951	29 066
pH 11	235	67 193	236	63 737	65 465
	281	22 117	280	19 654	20 885
	309	17 800	313	14 829	16 314

Os espectros de massas (ESI/MS) dos adutos A2-1 e A2-2, idênticos entre si, estão apresentados na **figura 4.25**. Podemos observar um íon molecular protonado $[M + H]^+$ em m/z 434, um fragmento predominante em m/z 318 ($[M + H]^+ - 2\text{-D-eritro-pentose}$) e os sinais correspondentes a $[M + Na]^+$ em m/z 456 e $[M + K]^+$ em m/z 472. Essas observações foram consistentes com o que seria esperado para um aduto formado entre dGuo e DDE (1:1), com ganho de dois átomos de oxigênio e perda de uma molécula de H_2O .

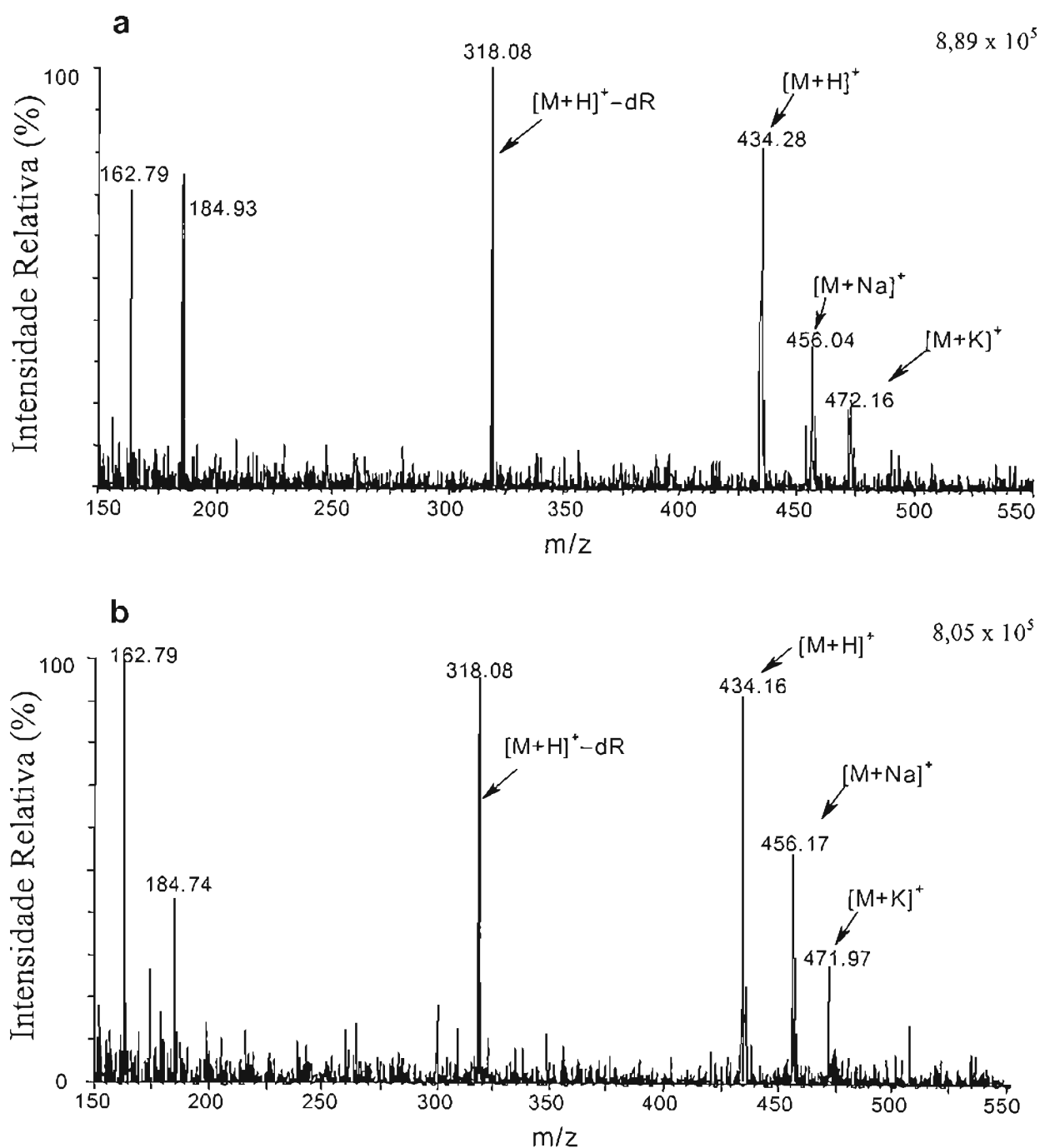


Figura 4.25: Espectros de massas (ESI/MS) dos adutos (a) A2-1 e (b) A2-2. Voltagem do cone: 35 V. As condições estão descritas no item 3.4.6.3 de *Materiais e Métodos*.

A partir da observação desses espectros foi possível concluir que os adutos **A2-1** e **A2-2** são diastereoisômeros. Sua estrutura molecular foi confirmada pela análise de espectros de ^1H RMN (figuras 4.26 e 4.27; tabelas 4.11 e 4.12), COSY (figuras 4.28 e 4.29), ^{13}C RMN (figuras 4.30 e 4.31; tabela 4.13), DEPT (figuras 4.32 e 4.33), ^1H - ^{13}C HMQC (figuras 4.34 e 4.35) e ^1H - ^{13}C HMBC (figuras 4.36 e 4.37).

O espectro de ^1H -RMN do aduto **A2-1** em $\text{DMSO}-d_6$ apresenta, além dos prótons do açúcar, dois prótons aromáticos, H-6 e H-2, em $\delta = 7.14$ e 8.05 ppm respectivamente; 11 prótons de parte da cadeia lateral distribuídos em um grupo metila e quatro grupos metilênicos que podem ser observados na região de campo alto do espectro ($0,85 \text{ ppm} < \delta < 1,73 \text{ ppm}$); um próton, H-12, em $4,04$ – $4,08$ ppm, que aparece como multiplete devido aos acoplamentos com os prótons em C-13 e OH-12; dois prótons, 2H-10, em $4,3$ ppm, que aparecem como singlete por não acoplarem entre si ou com outros prótons; e um próton, OH-12, em $5,38$ – $5,39$ ppm, que aparece como dublete por acoplar unicamente com H-12 (figura 4.26, tabela 4.11). Os sinais em $4,91$ – $4,93$ (OH-5'), $5,26$ – $5,27$ (OH-3') e $5,38$ – $5,39$ ppm (OH-12), referentes aos prótons trocáveis de grupos hidroxila, não apareceram quando o espectro de ^1H RMN foi obtido em D_2O , confirmando a atribuição desses sinais. A diferença entre os diastereoisômeros **A2-1** e **A2-2** está na constante de acoplamento entre os prótons em C-10. Enquanto esses prótons aparecem como um singlete no aduto **A2-1** (são equivalentes), a constante de acoplamento entre eles é grande no aduto **A2-2** ($J = 18,5 \text{ Hz}$), aparecendo como dubletos (figura 4.27; tabelas 4.11 e 4.12). Os acoplamentos entre os prótons podem ser melhor visualizados nas figuras 4.28 e 4.29 (COSY – espectroscopia de correlação bidimensional ^1H - ^1H).

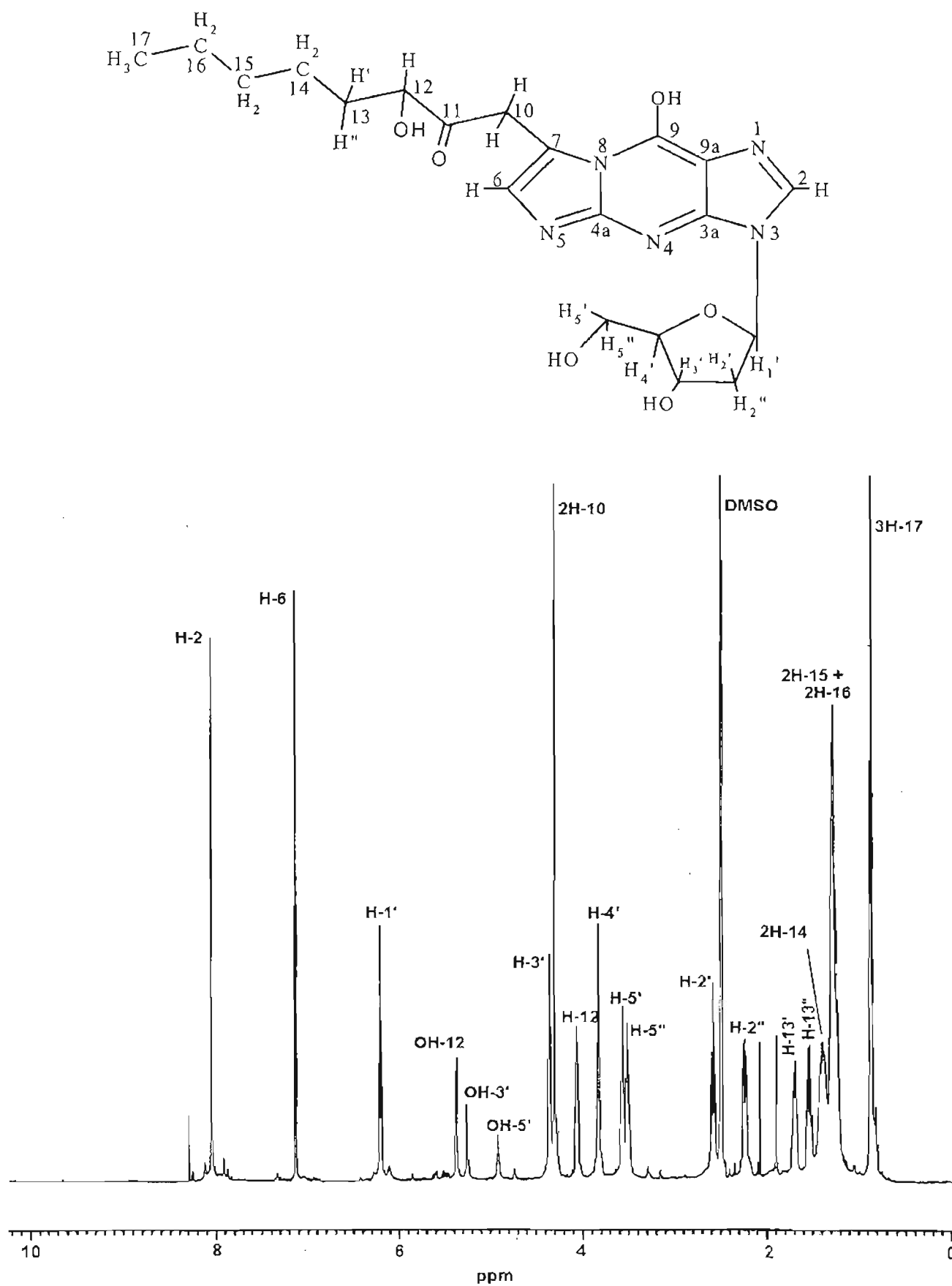


Figura 4.26: Espectro de ^1H RMN do aduto A2-1 obtido em um equipamento de 500 MHz em $\text{DMSO-}d_6$, como descrito no item 3.4.6.2 de *Materiais e Métodos*.

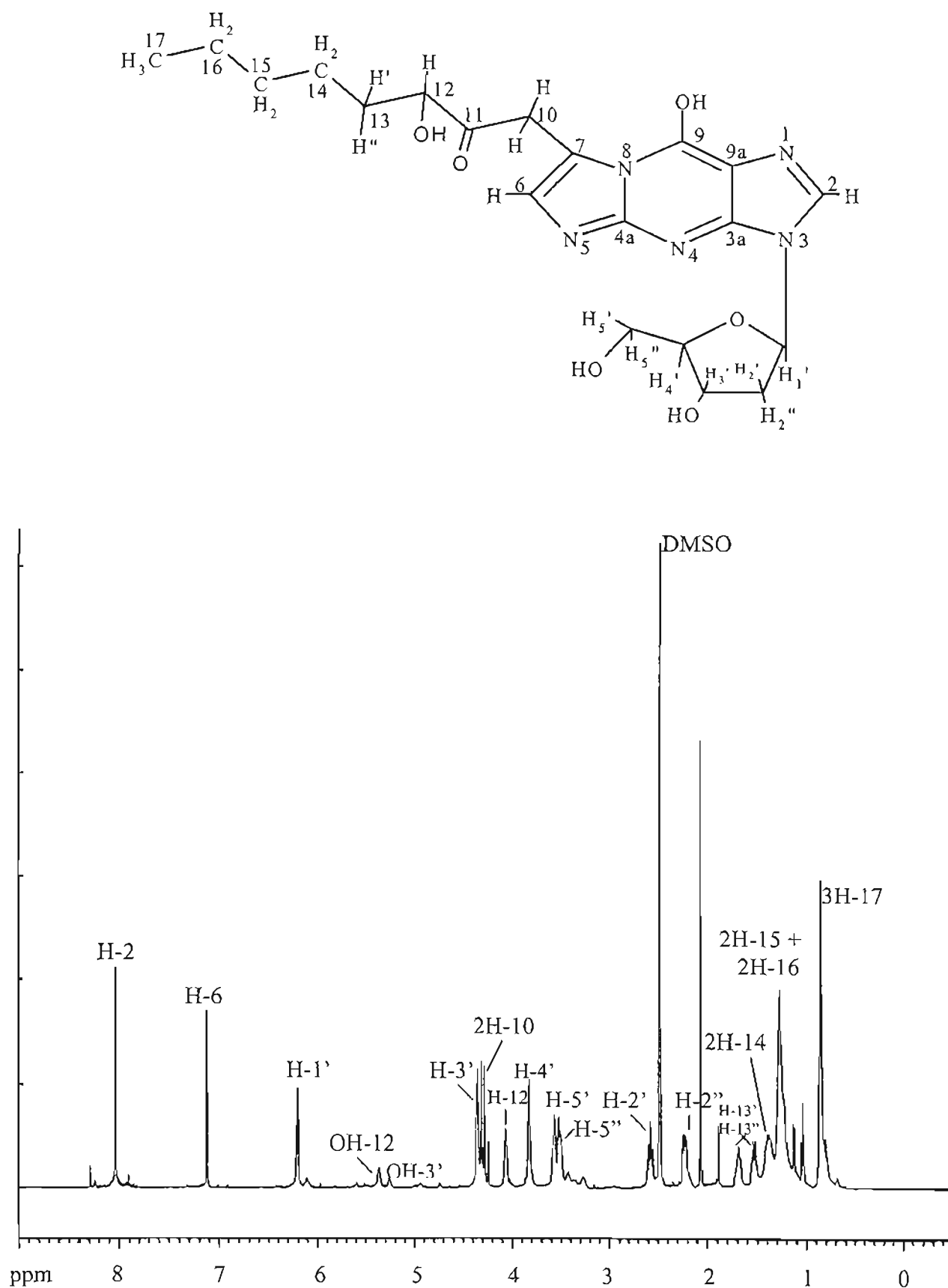


Figura 4.27: Espectro de ^1H RMN do aduto A2-2 obtido em um equipamento de 500 MHz em $\text{DMSO}-d_6$, como descrito no item 3.4.6.2 de *Materiais e Métodos*.

Tabela 4.11: Deslocamentos químicos no espectro de ^1H RMN do aduto A2-1 em $\text{DMSO}-d_6$ ^a

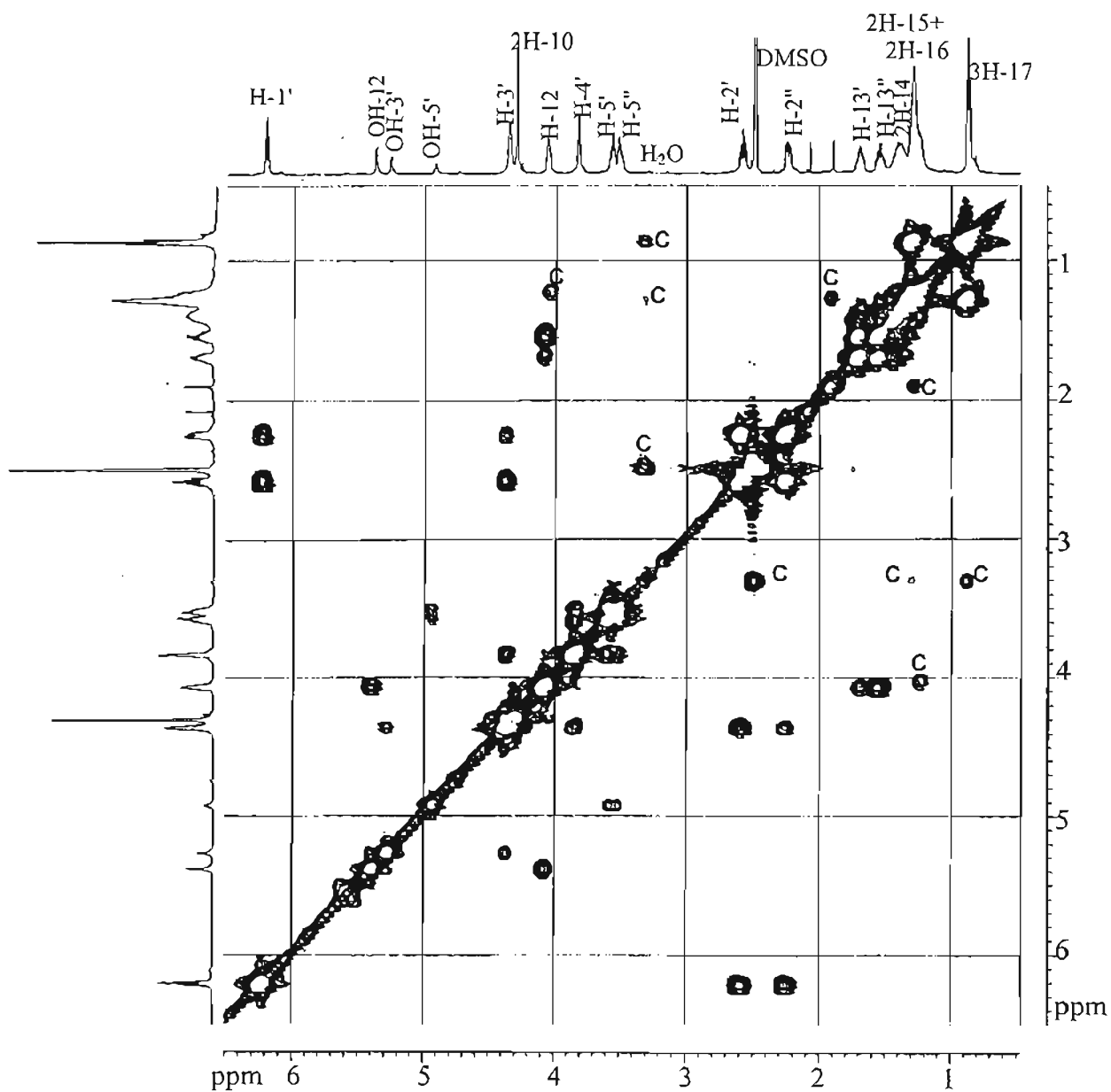
	δ (ppm)		Tipo	$J(\text{Hz})$	
H-1'	6,19-6,22	t	N- <u>CH</u> -O	$J_{12-13'}$	3,9
H-2'	2,55-2,62	m	<u>CH</u> ₂ -C	$J_{12-13''}$	9,0
H-2''	2,21-2,26	m	<u>CH</u> ₂ -C	$J_{12-\text{OH}12}$	6,0
H-3'	4,35-4,36	m	HO- <u>CH</u>	$J_{13'-13''}$	18,0
H-4'	3,81-3,84	m	O- <u>CH</u>	$J_{13'-14}$	5,0
H-5'	3,55-3,59	m	HO- <u>CH</u> ₂	$J_{13''-14}$	4,6
H-5''	3,49-3,53	m	HO- <u>CH</u> ₂		
OH-5'	4,91-4,93	t	<u>H</u> O-CH ₂		
OH-3'	5,26-5,27	d	<u>H</u> O-CH		
H-2	8,05	s	N= <u>CH</u> -N		
H-6	7,14	s	C= <u>CH</u> -N		
2H-10	4,30	s	OC- <u>CH</u> ₂ -C		
H-12	4,04-4,08	m	HO- <u>CH</u> -C=O		
OH-12	5,38-5,39	d	<u>H</u> O-CH-C=O		
H-13'	1,66-1,73	m	HOC- <u>CH</u> ₂ -C		
H-13''	1,50-1,58	m	HOC- <u>CH</u> ₂ -C		
2H-14	1,36-1,41	m	C- <u>CH</u> ₂ -C		
2H-15 + 2H-16	1,21-1,30	m	C- <u>CH</u> ₂ -C		
3H-17	0,85-0,88	t	<u>CH</u> ₃ -CH ₂		

^a m, multipletto; t, tripleto; d, dubleto; s, singletto. Espectro obtido em um espectrômetro de RMN DRX 500 como descrito no item 3.4.6.2 de *Materiais e Métodos*.

Tabela 4.12: Deslocamentos químicos no espectro de ^1H RMN do aduto A2-2 em $\text{DMSO}-d_6$ ^a

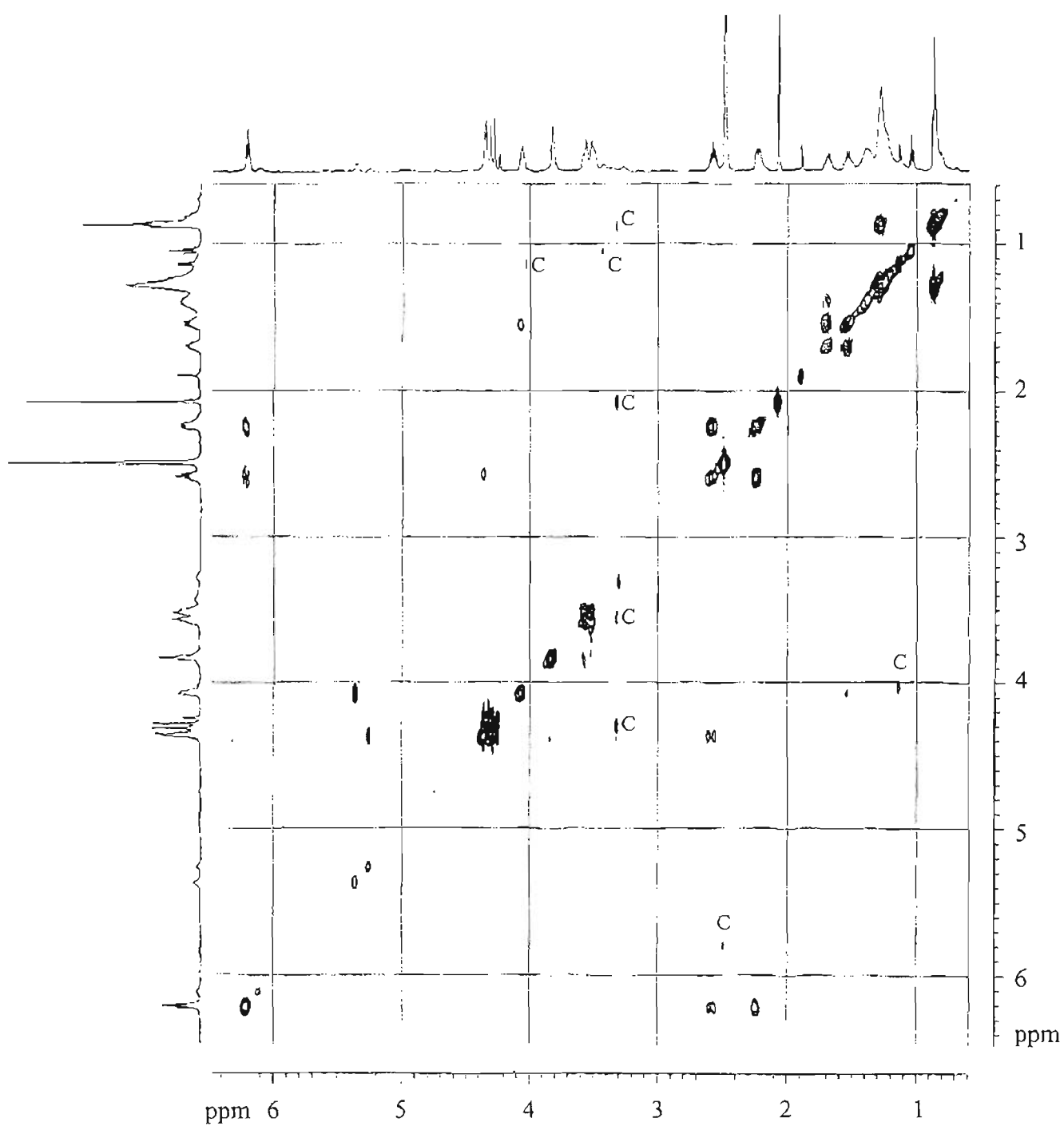
	δ (ppm)		Tipo	J (Hz)	
H-1'	6.19-6.22	t	N- <u>CH</u> -O	$J_{12-13'}$	4.0
H-2'	2.55-2.61	m	<u>CH</u> ₂ -C	$J_{12-13''}$	9.0
H-2''	2.21-2.26	m	<u>CH</u> ₂ -C	$J_{12-OH12}$	5.8
H-3'	4.35	m	HO- <u>CH</u>	$J_{13'-13''}$	18.2
H-4'	3.82-3.84	m	O- <u>CH</u>	$J_{13'-14}$	4.9
H-5'	3.56-3.59	m	HO- <u>CH</u> ₂	$J_{13''-14}$	4.5
H-5''	3.50-3.52	m	HO- <u>CH</u> ₂	$J_{10'-10''}$	18.5
OH-5'	4.93	t	<u>H</u> O-CH ₂		
OH-3'	5.26	d	<u>H</u> O-CH		
H-2	8.04	s	N= <u>CH</u> -N		
H-6	7.12	s	C= <u>CH</u> -N		
H-10'	4.32-4.35	d	OC- <u>CH</u> ₂ -C		
H-10''	4.25-4.28	d	OC- <u>CH</u> ₂ -C		
H-12	4.04-4.09	m	HO- <u>CH</u> -C=O		
OH-12	5.36	d	<u>H</u> O-CH-C=O		
H-13'	1.68-1.71	m	HOC- <u>CH</u> ₂ -C		
H-13''	1.52-1.55	m	HOC- <u>CH</u> ₂ -C		
2H-14	1.37-1.40	m	C- <u>CH</u> ₂ -C		
2H-15 + 2H-16	1.23-1.30	m	C- <u>CH</u> ₂ -C		
3H-17	0.85-0.88	t	<u>CH</u> ₃ -CH ₂		

^a m, multipletto; t, triplete; d, dubleto; s, singletto. Espectro obtido em um espectrômetro de RMN DRX 500 como descrito no item 3.4.6.2 de *Materiais e Métodos*.



*C = Contaminante

Figura 4.28: Espectro de RMN de correlação bidimensional ^1H - ^1H (COSY) do aduto A2-1 obtido em um equipamento de 500 MHz em $\text{DMSO-}d_6$, como descrito no item 3.4.6.2 de *Materiais e Métodos*.



*C = contaminante

Figura 4.29: Espectro de RMN de correlação bidimensional ^1H - ^1H (COSY) do aduto A2-2 obtido em um equipamento de 500 MHz em $\text{DMSO}-d_6$, como descrito no item 3.4.6.2 de *Materiais e Métodos*.

Os espectros de ^{13}C RMN dos adutos A2-1 e A2-2 apresentaram 20 sinais (**figuras 4.30 e 4.31; tabela 4.13**) correspondentes a 20 diferentes carbonos. A atribuição dos sinais aos respectivos carbonos não quaternários foi possível através da análise de espectros DEPT, nos quais os carbonos em CH_3 e CH aparecem como sinais voltados para cima e aqueles em CH_2 aparecem como sinais voltados para baixo (**figuras 4.32 e 4.33**), e de espectros de correlação heteronuclear bidimensional ^1H - ^{13}C (HMQC) (**figuras 4.34 e 4.35**), nos quais é possível observar os acoplamentos entre um ^1H e um ^{13}C distantes um do outro por uma ligação (1J). Os carbonos quaternários aparecem apenas nos espectros de ^{13}C RMN e a atribuição correta desses sinais aos respectivos carbonos (carbonos 3a, 4a, 7, 9, 9a e 11) foi feita através da análise de espectros de correlação heteronuclear bidimensional ^1H - ^{13}C a longa distância (HMBC) (**figuras 4.36 e 4.37**) e com base em um trabalho desenvolvido por Rindgen e colaboradores (1999). A **figura 4.37** (aduto A2-2) mostra que o próton H-2 acopla com os sinais em 116,05 e 149,87 ppm (acoplamentos $^3J(\text{C,H})$), enquanto que H-1' está envolvido em acoplamentos $^3J(\text{C,H})$ com os carbonos ressonantes em 136,92 e 149,87 ppm. Assim, o sinal em 116,05 ppm foi atribuído ao C-9a e aquele em 149,87 ppm ao C-3a. A existência dos acoplamentos dos prótons H-6 e H-10 com o sinal em 117,82 ppm permitiu a atribuição do C-7, enquanto o acoplamento de H-6 com o carbono ressonante em 147 ppm permitiu a atribuição do C-4a. O outro carbono quaternário que apareceu em 153,80 ppm foi atribuído ao C-9. O sinal que aparece em 209 ppm foi atribuído ao grupo $\text{C}=\text{O}$ da cadeia lateral do aduto, estando envolvido em acoplamentos $^2J(\text{C,H})$ com os prótons H-10 e OH-12. A mesma interpretação foi feita para o aduto A2-1 (**figura 4.36**), sendo que neste caso não foi possível observar o acoplamento $^2J(\text{C,H})$ entre C-11 e OH-12. Praticamente não há diferença entre os dois diastereoisômeros no que se refere aos deslocamentos químicos dos carbonos (**tabela 4.13**).

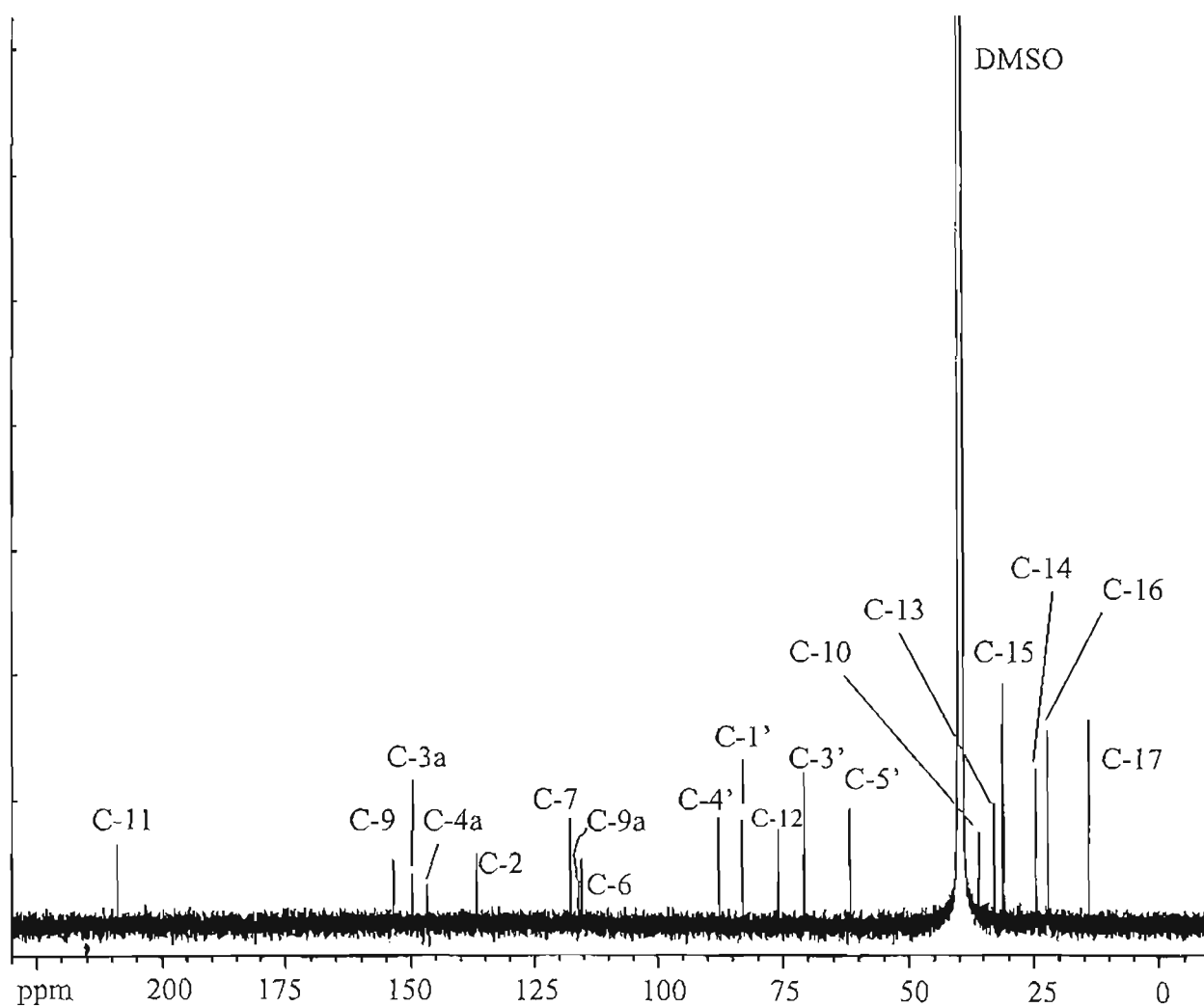


Figura 4.30: Espectro de ^{13}C RMN do aduto **A2-1** obtido em um equipamento de 500 MHz em $\text{DMSO-}d_6$, como descrito no item 3.4.6.2 de *Materiais e Métodos*.

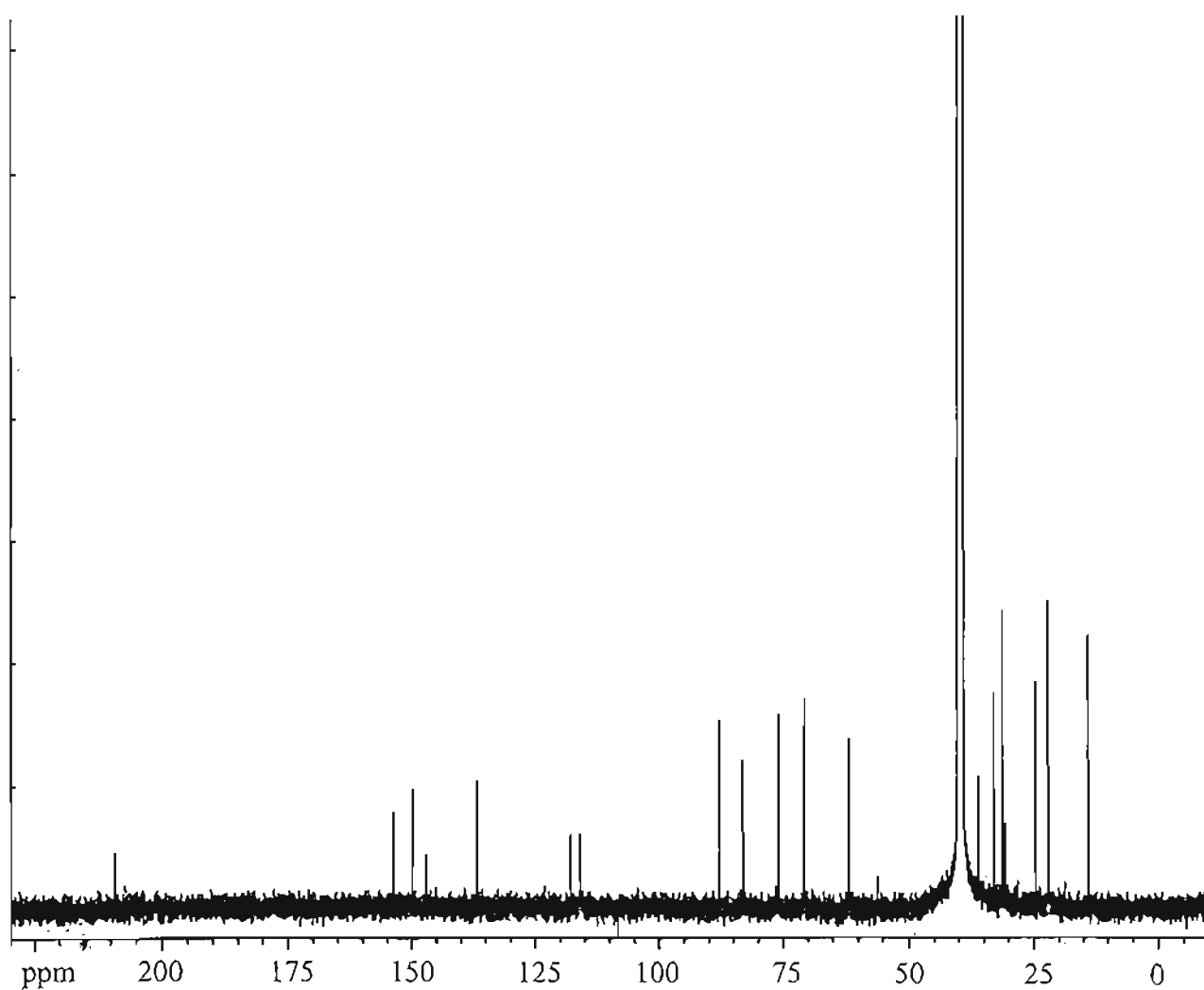


Figura 4.31: Espectro de ^{13}C RMN do aduto A2-2 obtido em um equipamento de 500 MHz em $\text{DMSO-}d_6$, como descrito no item 3.4.6.2 de *Materiais e Métodos*.

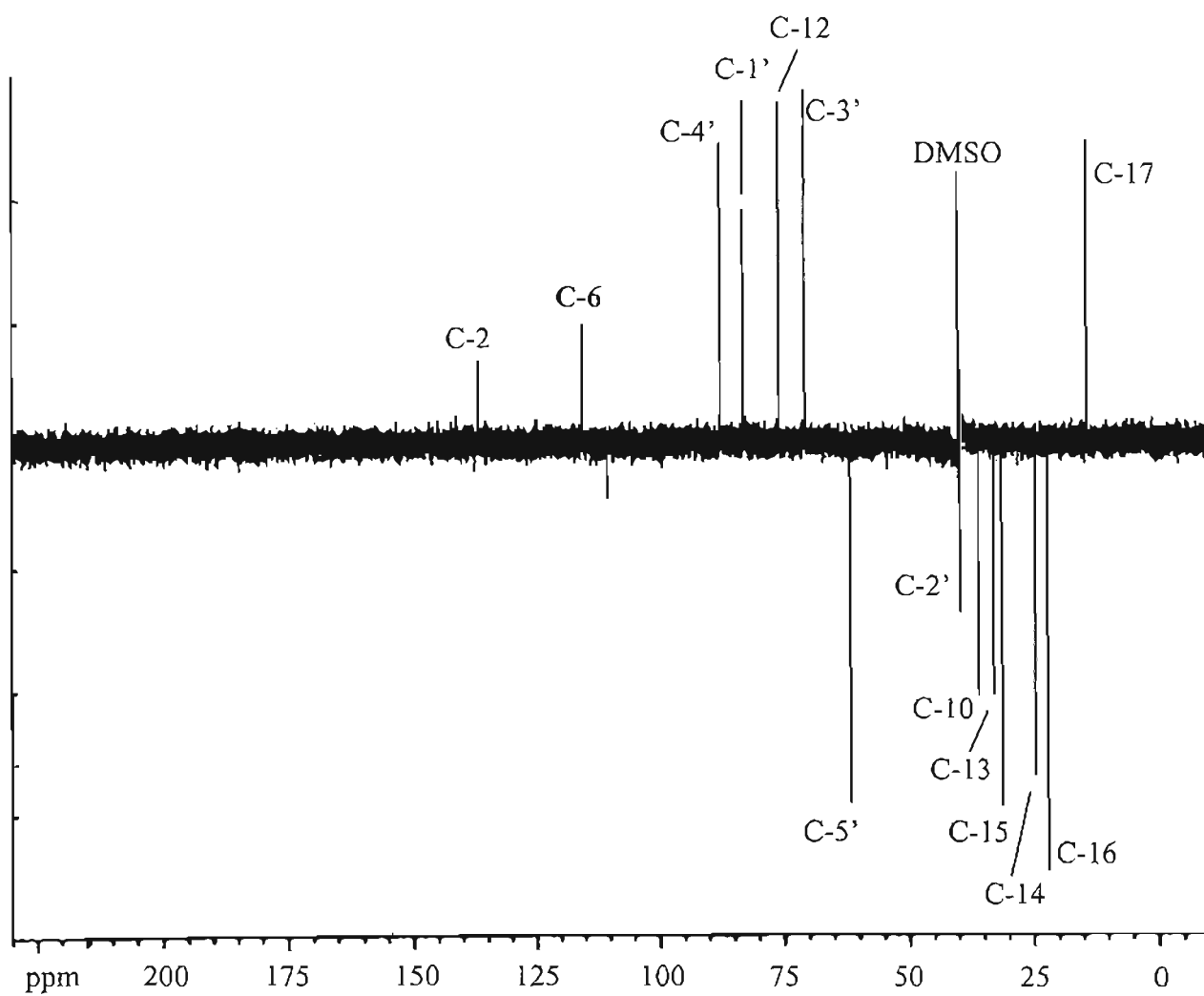


Figura 4.32: Espectro de RMN DEPT do aduto A2-1 obtido em um equipamento de 500 MHz em DMSO- d_6 , como descrito no item 3.4.6.2 de *Materiais e Métodos*.

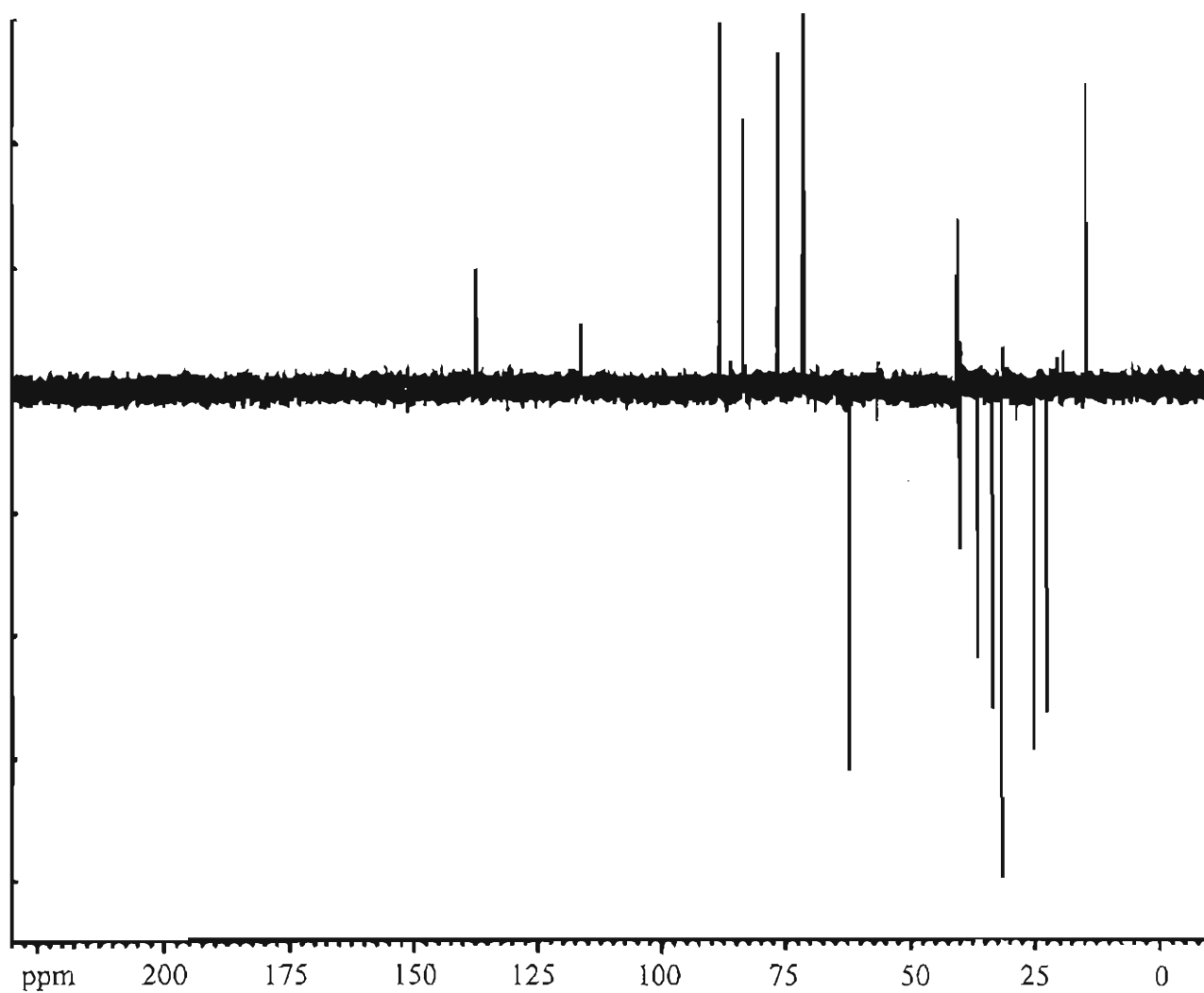


Figura 4.33: Espectro de RMN DEPT do aduto A2-2 obtido em um equipamento de 500 MHz em DMSO- d_6 , como descrito no item 3.4.6.2 de *Materiais e Métodos*.

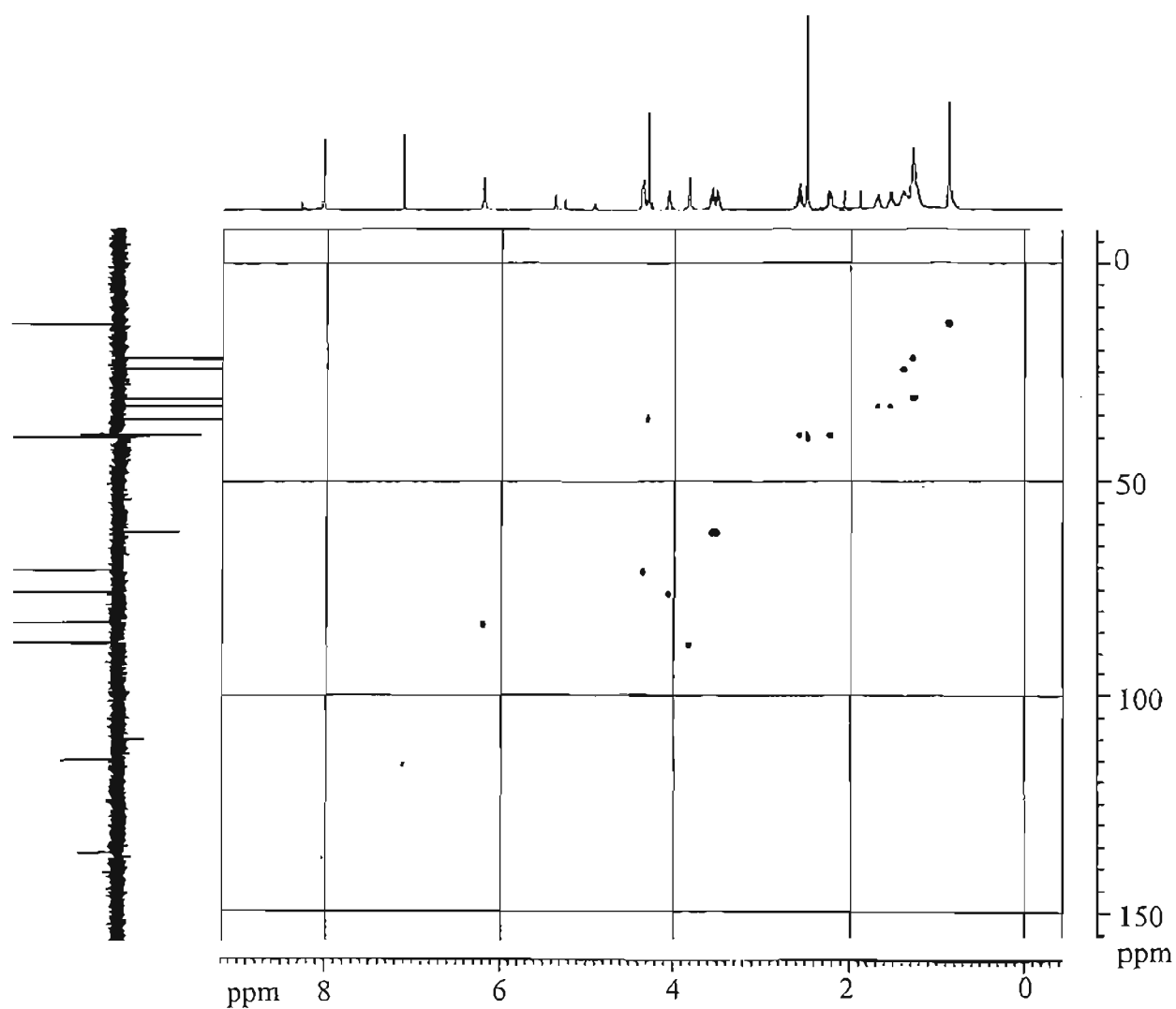


Figura 4.34: Espectro de RMN de correlação heteronuclear bidimensional $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ (HMQC) do aduto A2-1 obtido em um equipamento de 500 MHz em $\text{DMSO}-d_6$, como descrito no item 3.4.6.2 de *Materiais e Métodos*.

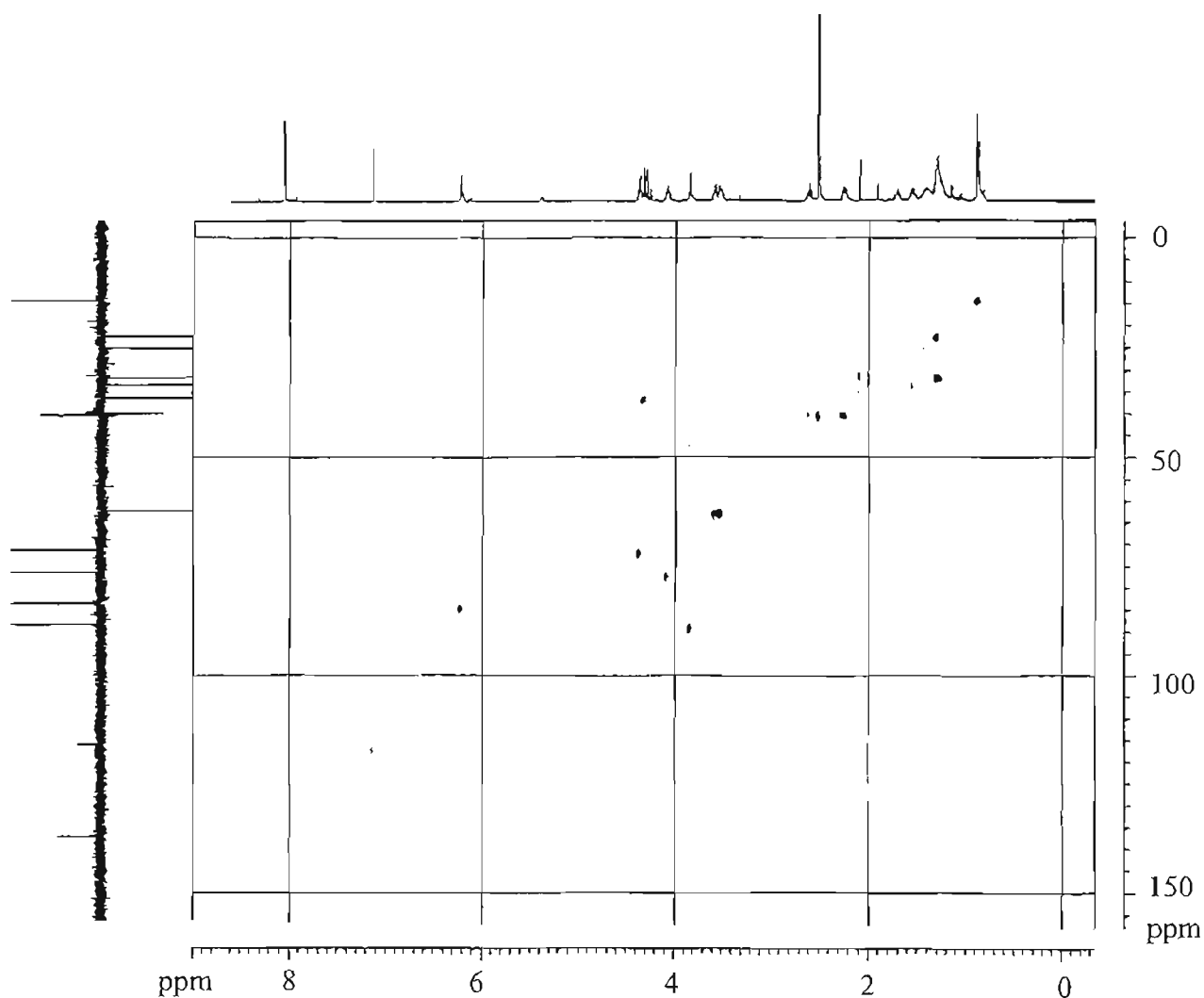
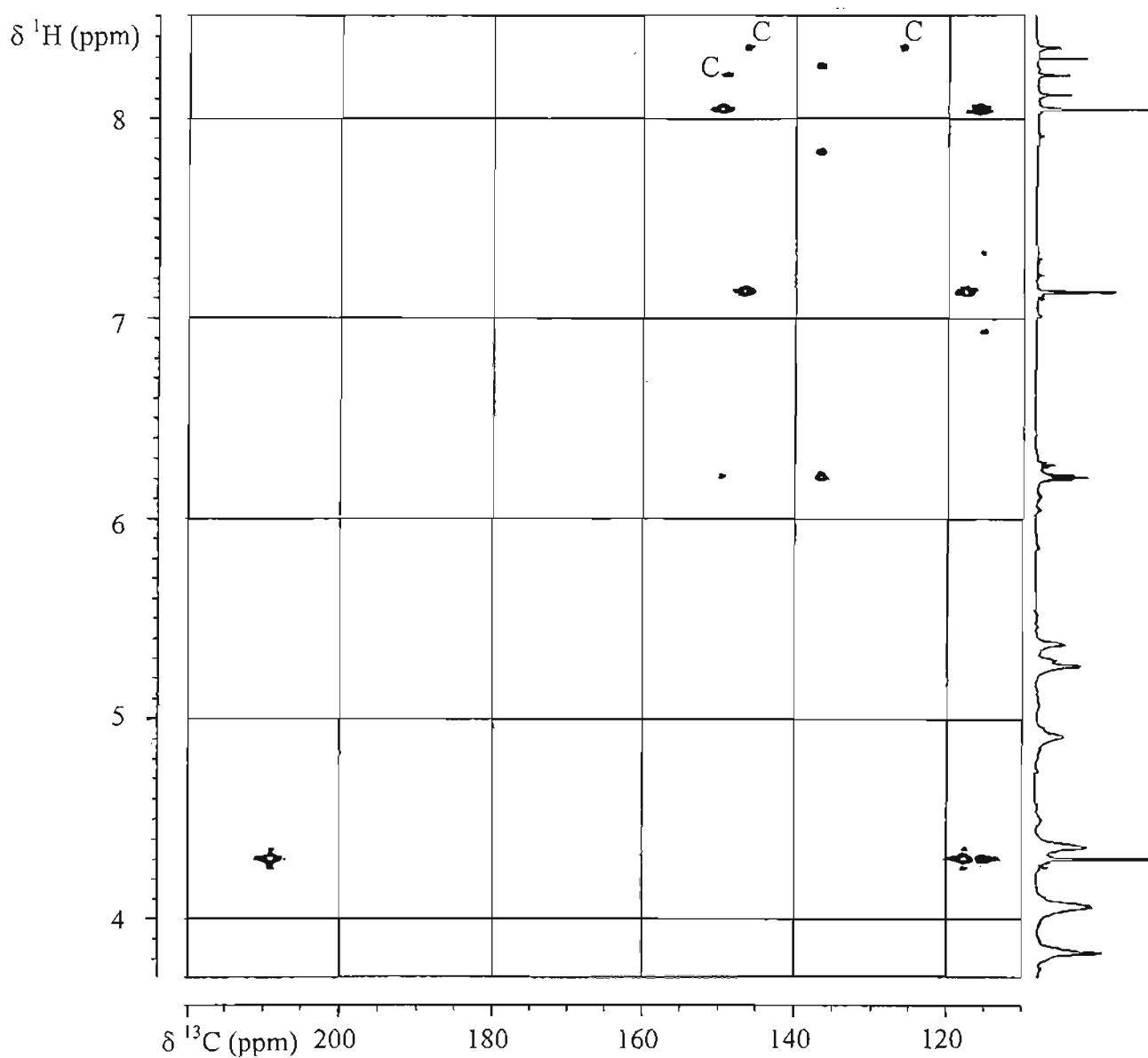


Figura 4.35: Espectro de RMN de correlação heteronuclear bidimensional ^1H - ^{13}C (HMQC) do aduto A2-2 obtido em um equipamento de 500 MHz em $\text{DMSO-}d_6$, como descrito no item 3.4.6.2 de *Materiais e Métodos*.



*C = contaminante

Figura 4.36: Espectro de RMN de correlação heteronuclear bidimensional ^1H - ^{13}C a longa distância (HMBC) do aduto A2-1 obtido em um equipamento de 500 MHz em $\text{DMSO-}d_6$, como descrito no item 3.4.6.2 de *Materiais e Métodos*.

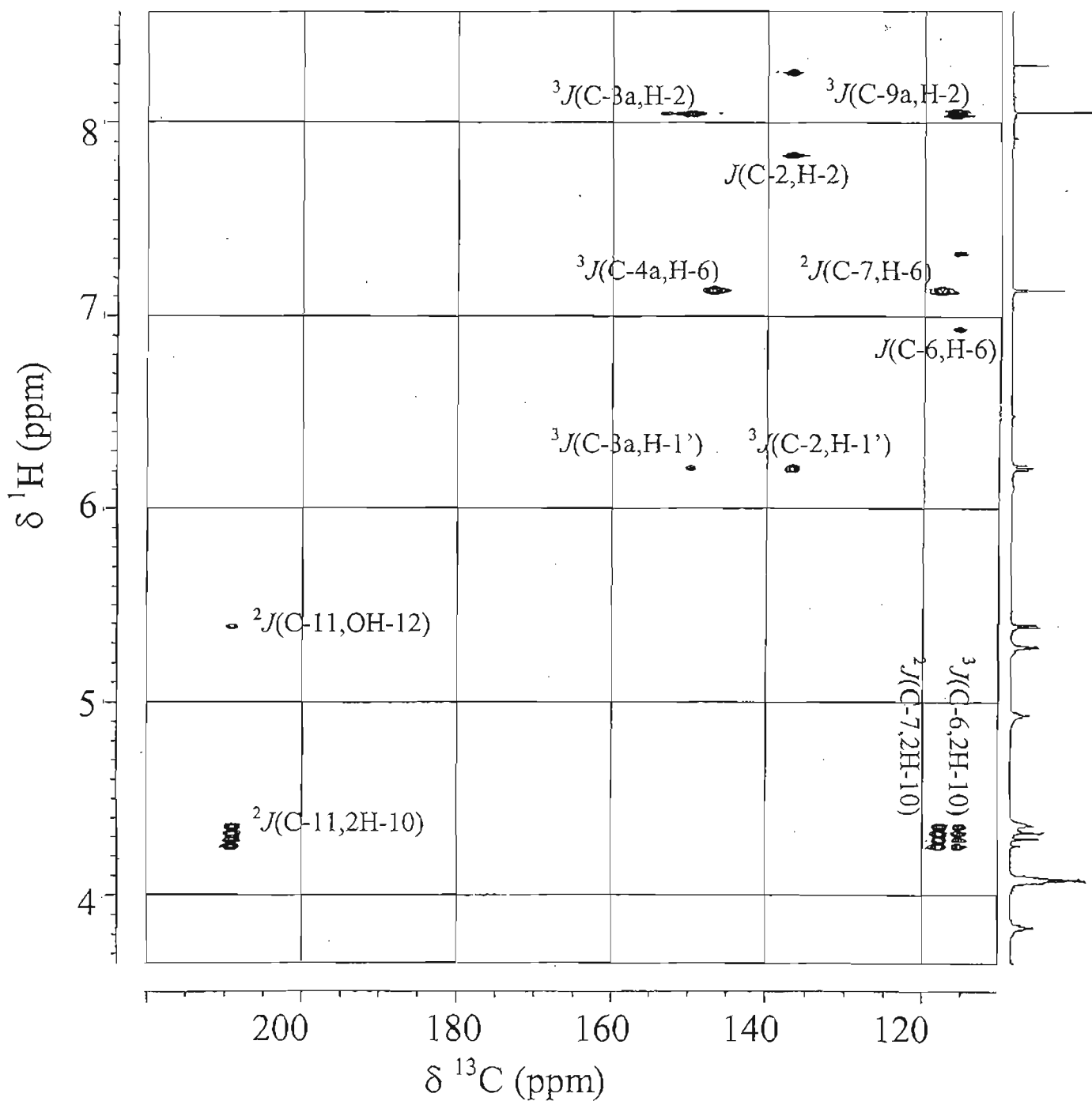


Figura 4.37: Espectro de RMN de correlação heteronuclear bidimensional $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ a longa distância (HMBC) do aduto A2-2 obtido em um equipamento de 500 MHz em $\text{DMSO}-d_6$, como descrito no item 3.4.6.2 de *Materiais e Métodos*.

Tabela 4.13: Deslocamentos químicos nos espectros de ^{13}C RMN dos adutos A2-1 e A2-2 em $\text{DMSO-}d_6$ ^a

	Aduto A2-1 (ppm)	Aduto A2-2 (ppm)	Tipo
C-2	136,89	136,92	$\text{N}=\underline{\text{C}}\text{H}-\text{N}$
C-3a	149,83	149,87	$\text{N}=\underline{\text{C}}-\text{N}$
C-4a	146,86	147,00	$\text{N}=\underline{\text{C}}-\text{N}$
C-6	115,52	115,86	$\text{N}-\underline{\text{C}}\text{H}=\text{C}$
C-7	117,87	117,82	$\text{C}=\underline{\text{C}}-\text{N}$
C-9	153,72	153,80	$\text{N}-\underline{\text{C}}\text{OH}=\text{C}$
C-9a	116,07	116,05	$\text{C}=\underline{\text{C}}-\text{N}$
C-10	36,02	36,09	$\underline{\text{C}}\text{H}_2$
C-11	209,07	209,13	$\underline{\text{C}}=\text{O}$
C-12	75,96	75,98	$\text{H}-\underline{\text{C}}-\text{OH}$
C-13	33,03	33,05	$\underline{\text{C}}\text{H}_2$
C-14	24,65	24,71	$\underline{\text{C}}\text{H}_2$
C-15	31,24	31,30	$\underline{\text{C}}\text{H}_2$
C-16	22,14	22,19	$\underline{\text{C}}\text{H}_2$
C-17	14,01	14,07	$\underline{\text{C}}\text{H}_3$
C-1'	83,07	83,13	$\text{N}-\underline{\text{C}}\text{H}-\text{O}$
C-2'	39,51	39,88	$\underline{\text{C}}\text{H}_2$
C-3'	70,82	70,88	$\text{H}-\underline{\text{C}}-\text{OH}$
C-4'	87,75	87,79	$\text{H}-\underline{\text{C}}-\text{O}$
C-5'	61,82	61,87	$\text{H}_2\underline{\text{C}}-\text{OH}$

^a Espectros obtidos em um espectrômetro de RMN DRX 500 como descrito no item 3.4.6.2 de *Materiais e Métodos*.

Os dados espectroscópicos apresentados nos permitiram concluir que os adutos A2-1 e A2-2 têm uma estrutura do tipo eteno substituído, possuindo uma cadeia lateral de oito carbonos na qual estão presentes um grupo carbonila em C-11 e um grupo hidroxila em C-12 (figuras 4.26 e 4.27). Ambos diferem entre si pela configuração espacial dos átomos

ligados ao C-12, o qual é centro quiral. Possíveis mecanismos para formação desses etenoadutos estão esquematizados no *Capítulo 5 (Discussão)*.

4.3. Padronização de metodologias sensíveis para detecção da formação dos adutos 1,N²-eteno-2'-desoxiguanosina em sistemas biológicos

Após a observação de que o DDE, na presença de peróxidos, levava à formação de etenoadutos de 2'-desoxiguanosina *in vitro*, resolvemos investir na padronização de metodologias mais sensíveis e específicas que a detecção por absorvância para que pudéssemos investigar a formação desses adutos em DNA de células incubadas com DDE. Os resultados obtidos estão descritos a seguir.

4.3.1. Detecção eletroquímica

Inicialmente investigamos a eletroatividade do aduto 1,N²-eteno-2'-desoxiguanosina (A1) em potencial de detecção de + 800 mV utilizando o sistema de HPLC e a condição cromatográfica descritos no item 3.5.1.2 de *Materiais e Métodos*. Resolvemos utilizar esse potencial porque a estabilização do detector é mais difícil em potenciais mais altos. Além disso, quanto maior o potencial utilizado, menor é a seletividade do método.

Como pode ser observado na **figura 4.38**, esse etenoaduto pode ser detectado eletroquimicamente. Entretanto, a sensibilidade obtida foi apenas 1,3 vezes maior que a da detecção por absorvância a 280 nm.

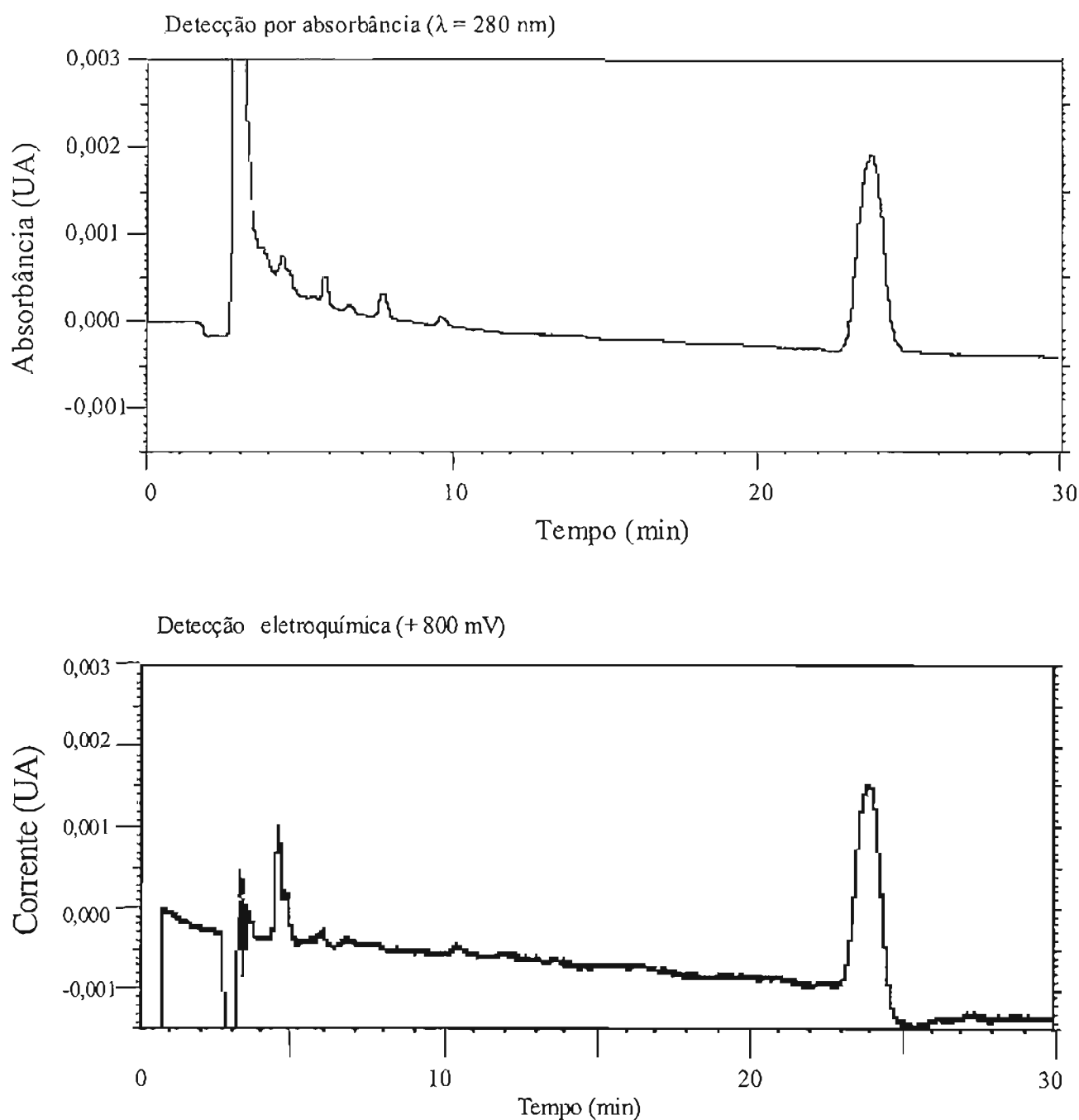
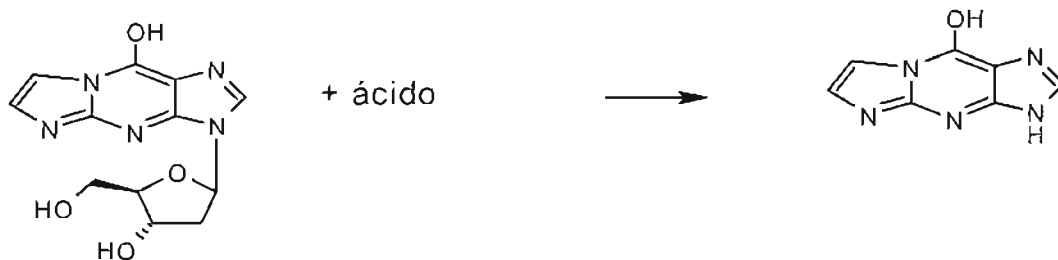


Figura 4.38: Cromatogramas obtidos com detecção por absorbância ($\lambda = 280 \text{ nm}$) e detecção eletroquímica (potencial = +800 mV) do aduto 1, N^2 -eteno-2'-desoxiguanosina (A1). A condição de análise por HPLC está descrita no item 3.5.1.2 de *Materiais e Métodos*. UA: unidades arbitrárias.

Resolvemos, portanto, com base em um trabalho desenvolvido por Douki e Ames (1994), verificar se o aduto 1, N^2 -etenoguanina, resultante da hidrólise ácida de 1, N^2 -eteno-2'-desoxiguanosina, podia ser detectado eletroquimicamente com maior sensibilidade. Douki e Ames desenvolveram um ensaio para detecção eletroquímica de adutos 1, N^2 -

propano-2'-desoxiguanosina no qual o produto da hidrólise ácida desses adutos (1,N²-propanoguanina) era detectado com maior sensibilidade, em baixos potenciais de oxidação, em comparação com o aduto original. Para ser eletroativo, o produto analisado deve possuir grupos oxidáveis. Na hidrólise ácida ocorre quebra da ligação glicosídica, o que gera um sítio oxidável adicional, como mostrado abaixo, permitindo a detecção eletroquímica em potenciais mais baixos.

1,N²-eteno-2'-desoxiguanosina1,N²-etenoguanina

A hidrólise ácida de 1,N²-eteno-2'-desoxiguanosina foi feita com uma solução de HF-piridina ou HCl como descrito no item 3.5.1.1 de *Materiais e Métodos* e os produtos resultantes foram analisados por HPLC acoplado aos detectores de absorvância e eletroquímico (item 3.5.1.2 de *Materiais e Métodos*). Os cromatogramas obtidos estão na **figura 4.39**.

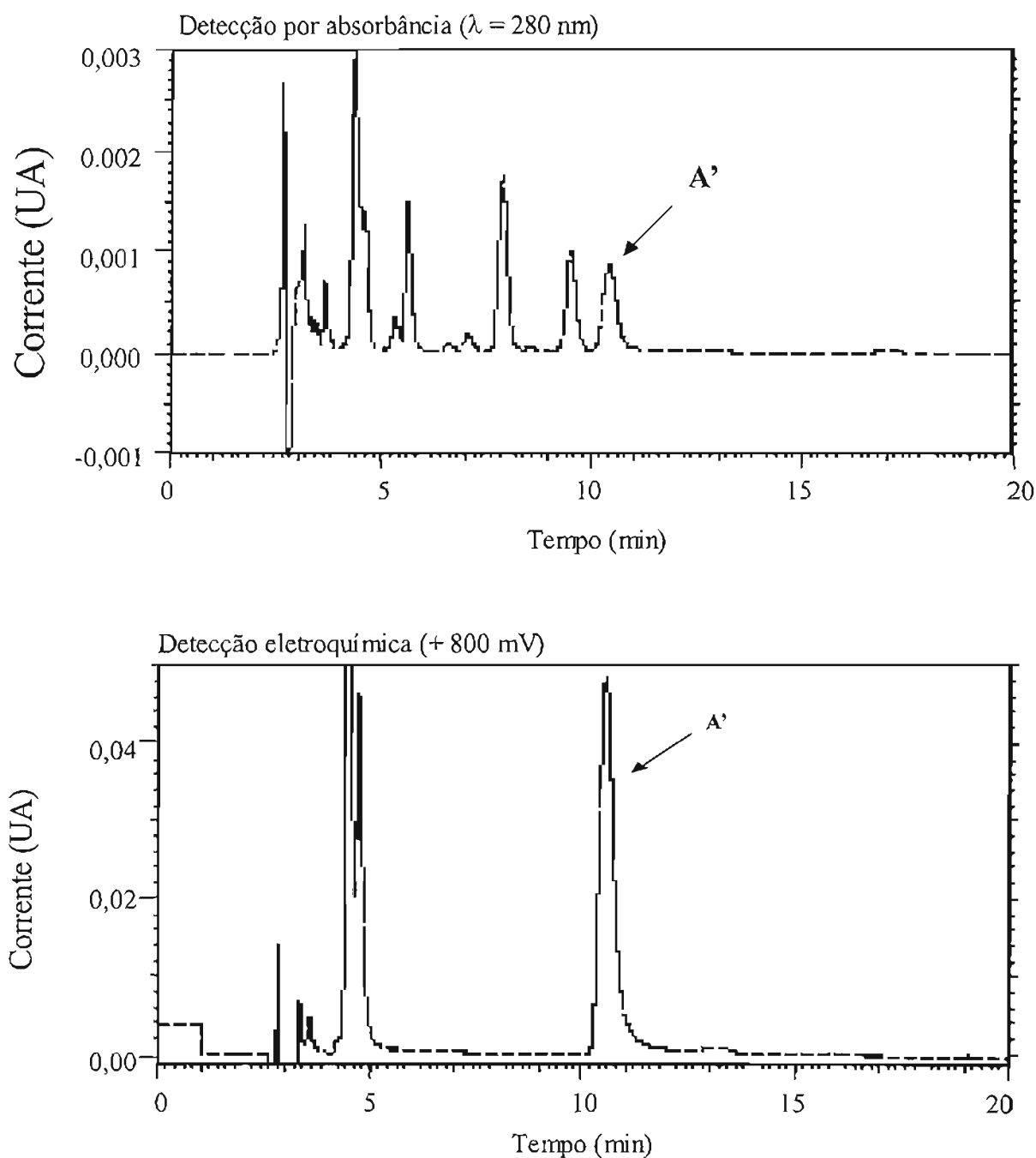


Figura 4.39: Cromatogramas obtidos com detecção por absorvância ($\lambda = 280 \text{ nm}$) e detecção eletroquímica (potencial = +800 mV) dos produtos da hidrólise ácida de 1,N²-eteno-2'-desoxiguanosina (A1). A condição de análise por HPLC está descrita no item 3.5.1.2 de *Materiais e Métodos*. UA: unidades arbitrárias.

Observamos um produto eletroativo com tempo de retenção de 10,5 minutos. A análise dos seus espectros de absorvância e massas após sua purificação nos mostrou que ele era o aduto 1,N²-etenoguanina (figuras 4.40 e 4.41).

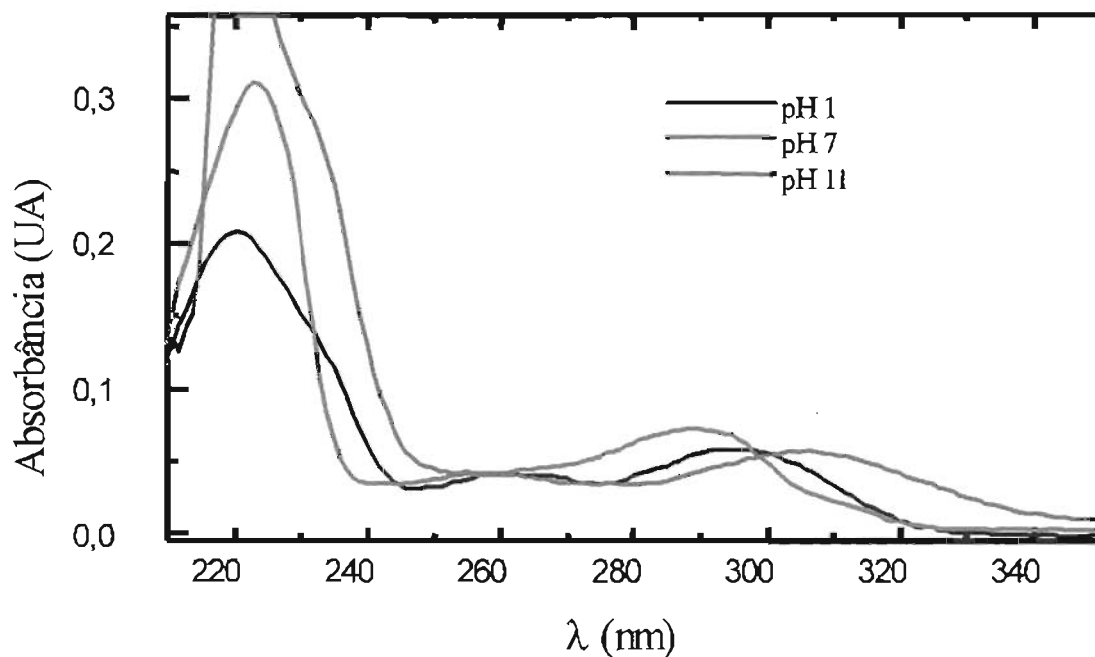


Figura 4.40: Espectros de absorvância do produto A' em diferentes pHs (item 3.4.6.1 de *Materiais e Métodos*): pH 1, 50 mM HCl/KCl; pH 7, tampão fosfato 50 mM; pH 11, tampão carbonato-bicarbonato 50 mM. UA: unidades arbitrárias. Os espectros correspondem aos obtidos por Sattangi e colaboradores (1977) para o aduto 1,*N*²-etenoguanina.

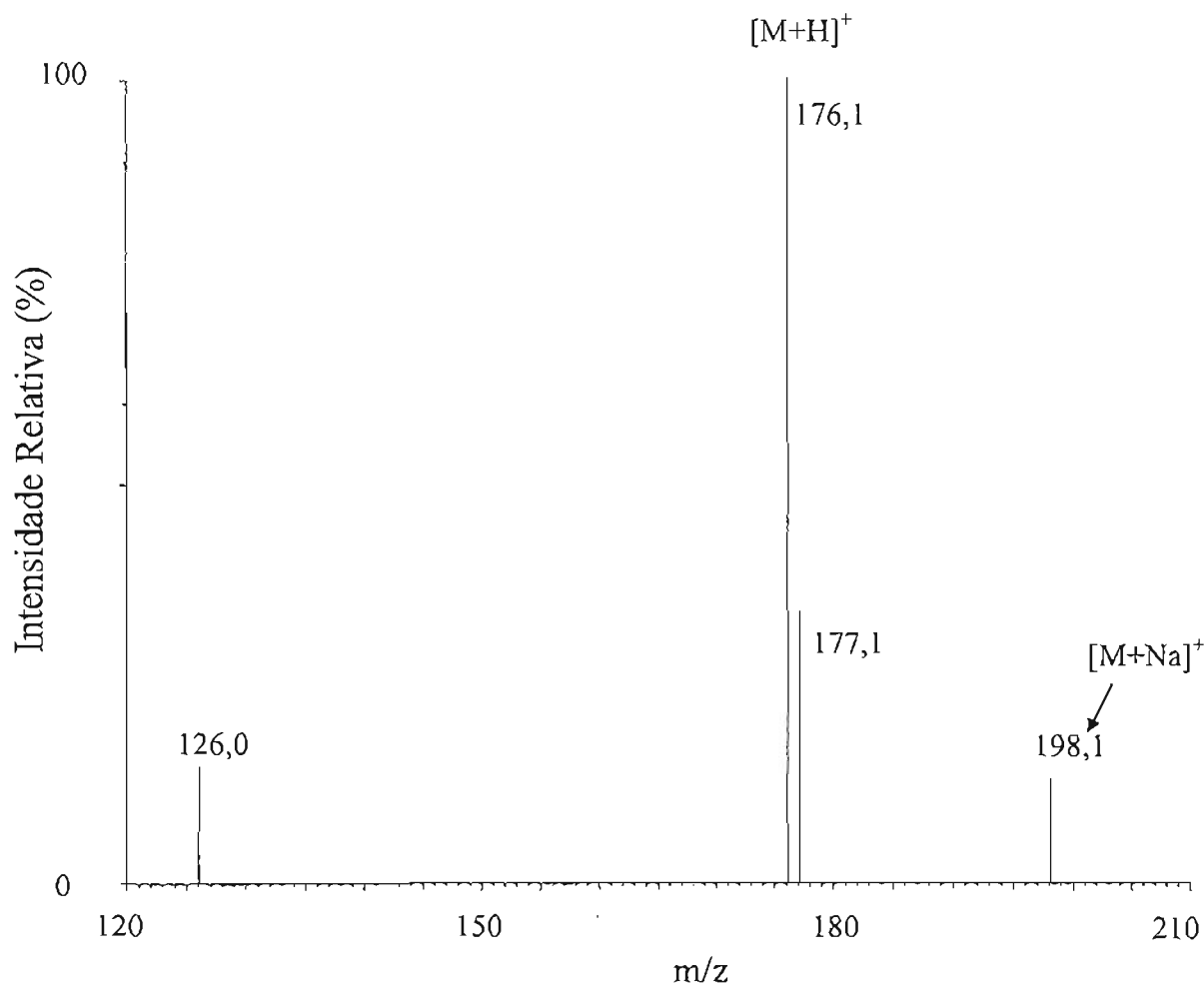


Figura 4.41: Espectro de massas (ESI/MS) do produto A'. Voltagem do cone: 25 V. As condições estão descritas no item 3.4.6.3 de *Materiais e Métodos*.

A detecção eletroquímica de 1,*N*²-etenoguanina em + 800 mV chegou a ser 66 vezes mais sensível que a sua detecção por absorvância ($\lambda = 280$ nm). Seu eletrovoltamograma, determinado na faixa de 500 a 1000 mV como descrito no item 3.5.1.3 de *Materiais e Métodos*, nos mostrou que estávamos trabalhando no potencial adequado (figura 4.42).

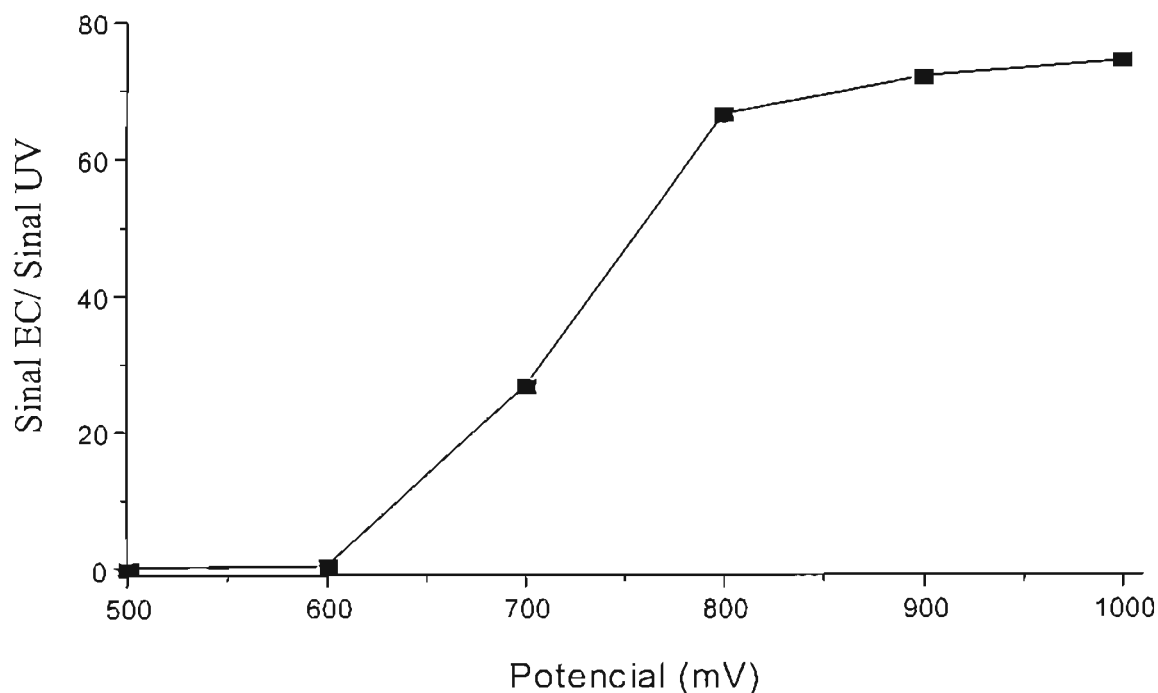


Figura 4.42: Eletrovoltamograma de 1, N^2 -etenoguanina. As condições de análise estão descritas no item 3.5.1.3 de *Materiais e Métodos*. EC: detecção eletroquímica. UV: detecção por absorvância a 280 nm.

Como o eletrovoltamograma de um composto depende da sua eletroatividade, a qual é um reflexo da sua estrutura, este pode auxiliar na identificação de compostos com atividade eletroquímica. Foi atingido o limite de detecção de 6 pmol de 1, N^2 -etenoguanina ao se utilizar o potencial de + 800 mV. Entretanto, acreditamos que a utilização de um detector eletroquímico mais sensível tivesse permitido a detecção de concentrações muito menores desse aduto. Para comparação, o equipamento que utilizamos detectava, na época, uma massa mínima de 3 pmol de 8-oxodG, sendo que o ideal seria detectar em torno de 100 fmol dessa base oxidada (potencial de + 600 mV). O limite de sensibilidade alcançado com o equipamento que utilizamos não foi mais vantajoso que o observado para a detecção do aduto 1, N^2 -eteno-2'-desoxiguanosina por absorvância a 225 nm utilizando-se a condição cromatográfica 3.3.9.1 descrita em *Materiais e Métodos* (3 pmol). No caso, a vantagem em relação à detecção por absorvância estaria na seletividade. A hidrólise ácida de DNA de timo de bezerro após reação com DDE na presença de peróxidos *in vitro* (condição de incubação como a descrita no item 3.4.8 e hidrólise como a descrita no item 3.5.1.4 de *Materiais e Métodos*) revelou a presença de produtos com atividade eletroquímica, sendo que um deles eluiu juntamente com o padrão 1, N^2 -etenoguanina (figura 4.43).

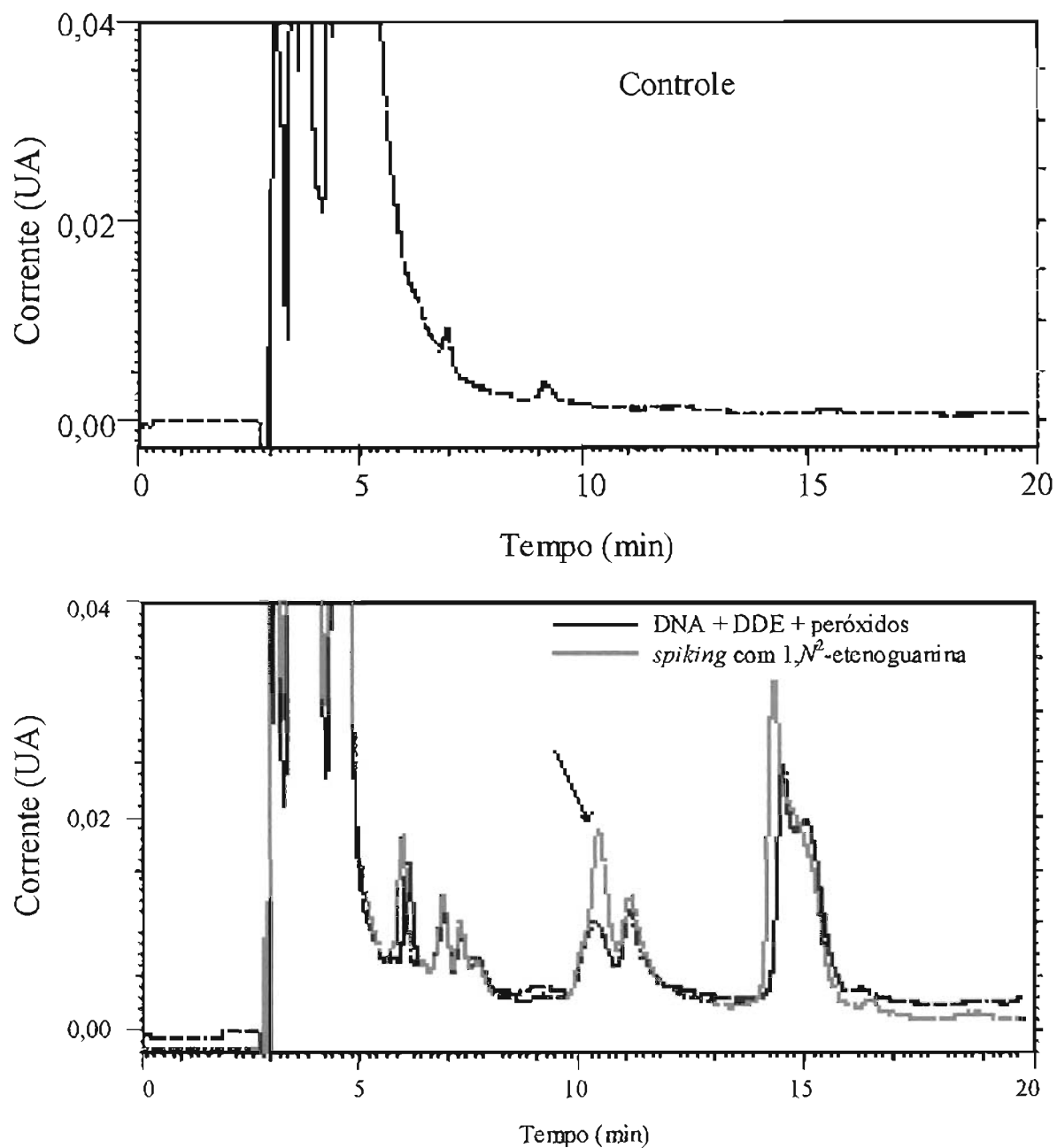


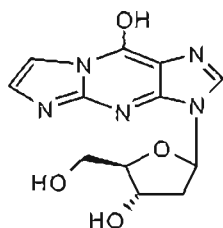
Figura 4.43: Cromatogramas obtidos com detecção eletroquímica (potencial = +800 mV) dos produtos da hidrólise ácida do DNA incubado com DDE na presença de peróxidos *in vitro*, do respectivo controle e da amostra de DNA com adição de 1,N²-etenoguanina (*spiking*). As condições de incubação, hidrólise e análise por HPLC estão descritas nos itens 3.4.8, 3.5.1.4 e 3.5.1.2 de *Materiais e Métodos*. UA: unidades arbitrárias.

A identidade do produto que eluiu juntamente com o padrão 1,N²-etenoguanina poderia ter sido confirmada pelo seu eletrovoltamograma. Entretanto, como o principal

objetivo era a detecção inequívoca desse aduto em DNA de células, e alguns problemas desse método, como a pequena sensibilidade devida ao equipamento utilizado e o fato de que sempre há RNA contaminante ao se extrair DNA das células e a hidrólise ácida não permitiria distinguir entre 1,N²-etenoguanosina e 1,N²-eteno-2'-desoxiguanosina, resolvemos nos concentrar na padronização da detecção dos etenoadutos por LC/ESI/MS-MS descrita abaixo.

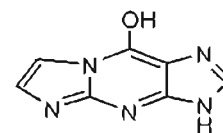
4.3.2. Detecção por LC/ESI/MS-MS

Após uma série de experimentos chegamos nas condições hoje padronizadas para detecção dos etenoadutos em sistemas biológicos. Inicialmente, investigamos o limite de detecção para 1,N²-edGuo quando esse aduto era injetado diretamente no espectrômetro de massas e era feita a aquisição do espectro total no intervalo de 50 a 400 *m/z* com diferentes voltagens de cone (as condições utilizadas estão descritas no item 3.4.6.3 de *Materiais e Métodos*). Conseguimos observar que o íon do aduto sem a desoxirribose (1,N²-etenoguanina → [M+H]⁺ = 176 *m/z*) era mais facilmente detectável que o íon do aduto com o açúcar (1,N²-eteno-2'-desoxiguanosina → [M+H]⁺ = 292 *m/z*). Isso ocorria porque a ligação glicosídica era facilmente quebrada quando utilizávamos a voltagem de cone que permitia melhor ionização da molécula. Por exemplo, ao se utilizar voltagem de cone igual a 5 ou 10 V não havia fragmentação da molécula, mas o pico em *m/z* 292 aparecia muito baixo. Ao aumentarmos a voltagem para 25 V, a intensidade do sinal em *m/z* 292 aumentava, mas já aparecia um sinal mais intenso em *m/z* 176. Aumentando ainda mais a voltagem, o sinal em *m/z* 176 se tornava predominante, com total desaparecimento do sinal em *m/z* 292 ao utilizarmos 40 V. Esse modo de aquisição permitiu a detecção de, no mínimo, 9 pmol do aduto.



1,*N*²-eteno-2'-desoxiguanosina

M = 291 Da



1,*N*²-etenoguanina

M = 175 Da

Sabíamos, a partir de dados da literatura, que a cromatografia líquida através de uma coluna com diâmetro muito pequeno, com utilização de fluxo muito baixo, combinada à espectrometria de massas por *electrospray* com monitoramento de um único íon (SIR ou SIM) permitia um grande aumento da sensibilidade de detecção em comparação com a sensibilidade obtida na aquisição do espectro total (Yen e col., 1996; Apruzzese e Vouros, 1998). Resolvemos, portanto, através da utilização dessa metodologia, investigar o limite de detecção para o aduto 1,*N*²-εdGuo. Utilizamos inicialmente um fluxo constante de 20 μL/min através de uma coluna capilar com diâmetro interno de 1 mm (fase móvel: 30% de acetonitrila em água). O aduto 1,*N*²-εdGuo (solubilizado em água com 0,2% de ácido fórmico) foi injetado em diferentes concentrações na coluna. A detecção do aduto foi feita utilizando-se a voltagem do cone igual a 50 V e a função SIR para monitoramento do íon [M+H]⁺ em *m/z* 176. A razão para se ter escolhido monitorar esse íon está explicada no parágrafo anterior. Conseguimos, assim, alcançar o limite de sensibilidade de 25 fmol para detecção desse aduto. Entretanto, alguns problemas ainda existiam. Como era utilizado apenas o primeiro analisador do espectrômetro, a detecção não era tão específica, aparecendo outros picos mesmo nos cromatogramas dos padrões. Isso acontecia porque todas as moléculas com relação *m/z* 176, após serem ionizadas, passavam pelo analisador e eram detectadas, mesmo não sendo moléculas do aduto.

Sendo assim, resolvemos ajustar as condições para o monitoramento dos íons dos etenoadutos através da utilização dos dois analisadores do espectrômetro (MS-MS/MRM). Esse tipo de monitoramento permite uma detecção muito mais específica do que a obtida quando é utilizado apenas um analisador (MS/SIR), uma vez que são detectadas apenas as

moléculas que apresentam um padrão específico de fragmentação selecionado. As condições estabelecidas para essas análises estão descritas no item 3.5.2 de *Materiais e Métodos*.

Para melhorar ainda mais a especificidade da detecção e quantificar esses etenoadutos em DNA utilizamos os padrões isotópicos $[^{15}\text{N}_5]\text{-1,}N^2\text{-}\epsilon\text{dGuo}$ e $[^{15}\text{N}_5]\text{A2}$ sintetizados como descrito no item 3.5.2.3 de *Materiais e Métodos*. A utilização dessas moléculas como padrões internos é importante porque a resposta do espectrômetro varia muito entre uma injeção e outra, sendo o uso das mesmas a saída encontrada para corrigir essas variações. Tais padrões apresentam o mesmo comportamento cromatográfico e são ionizados da mesma forma que os adutos correspondentes, mas são monitorados em diferentes m/z . Assim, obtêm-se dois cromatogramas simultâneos ao se fazer a análise no espectrômetro de massas: em um deles aparece o pico correspondente ao padrão interno e no outro aparece o pico correspondente ao aduto de interesse, ambos com o mesmo tempo de retenção (figuras 4.46 e 4.47). Nas figuras 4.44 e 4.45 estão os espectros de massas dos padrões isotópicos sintetizados.

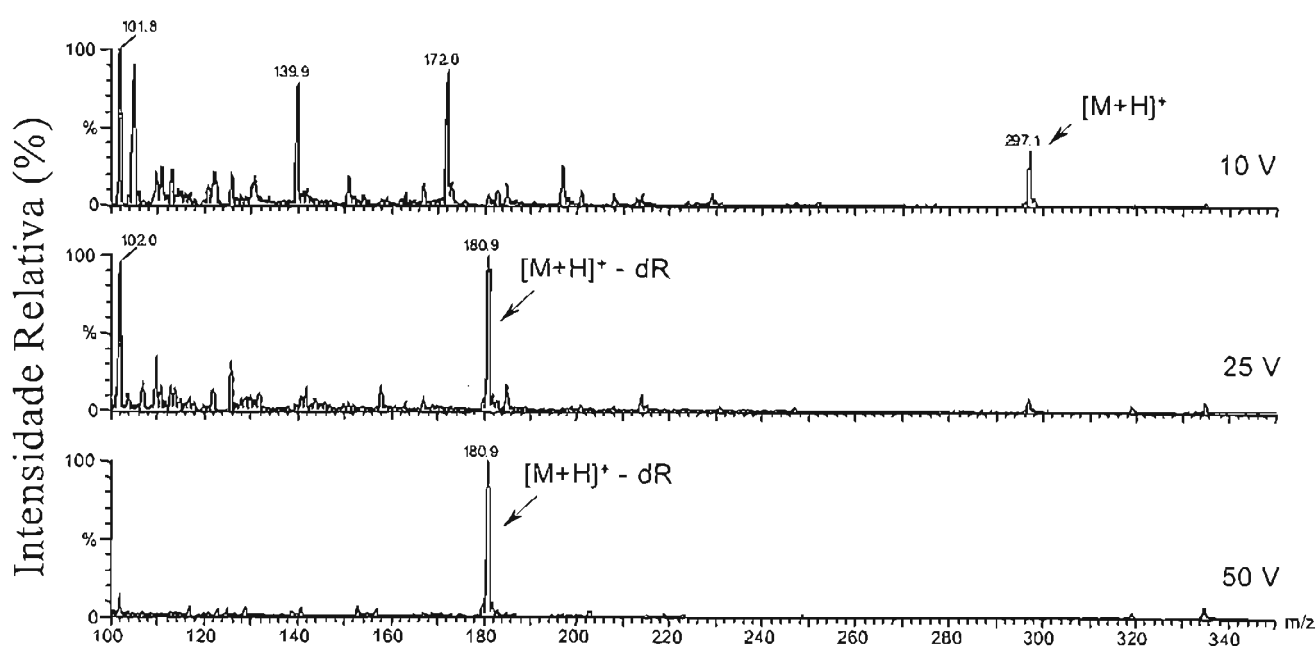


Figura 4.44: Espectros de massas (ESI/MS) do aduto $[^{15}\text{N}_5]\text{-1,}N^2\text{-}\epsilon\text{dGuo}$ em diferentes voltagens de cone. As condições estão descritas no item 3.4.6.3 de *Materiais e Métodos*.

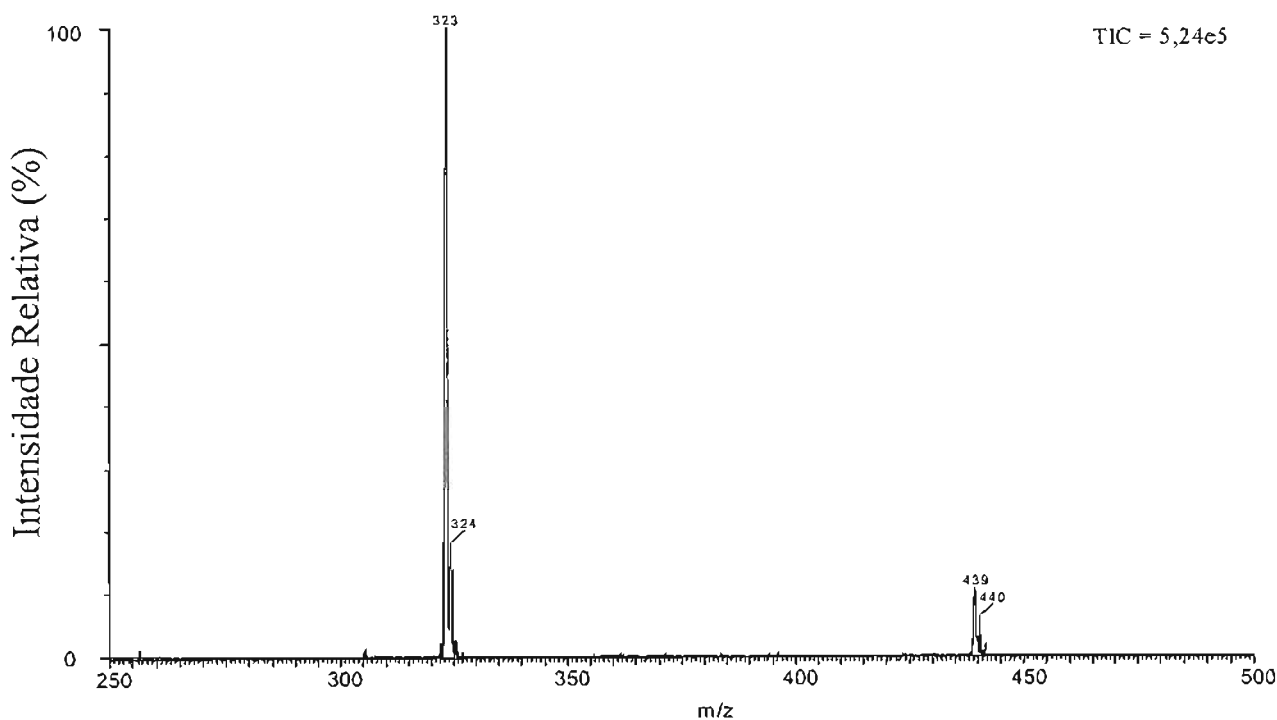


Figura 4.45: Espectro de massas (ESI/MS-MS) do aduto $[^{15}\text{N}_5]\text{A}2$. As condições de análise em MS_2 estão descritas no item 3.4.6.3 de *Materiais e Métodos*.

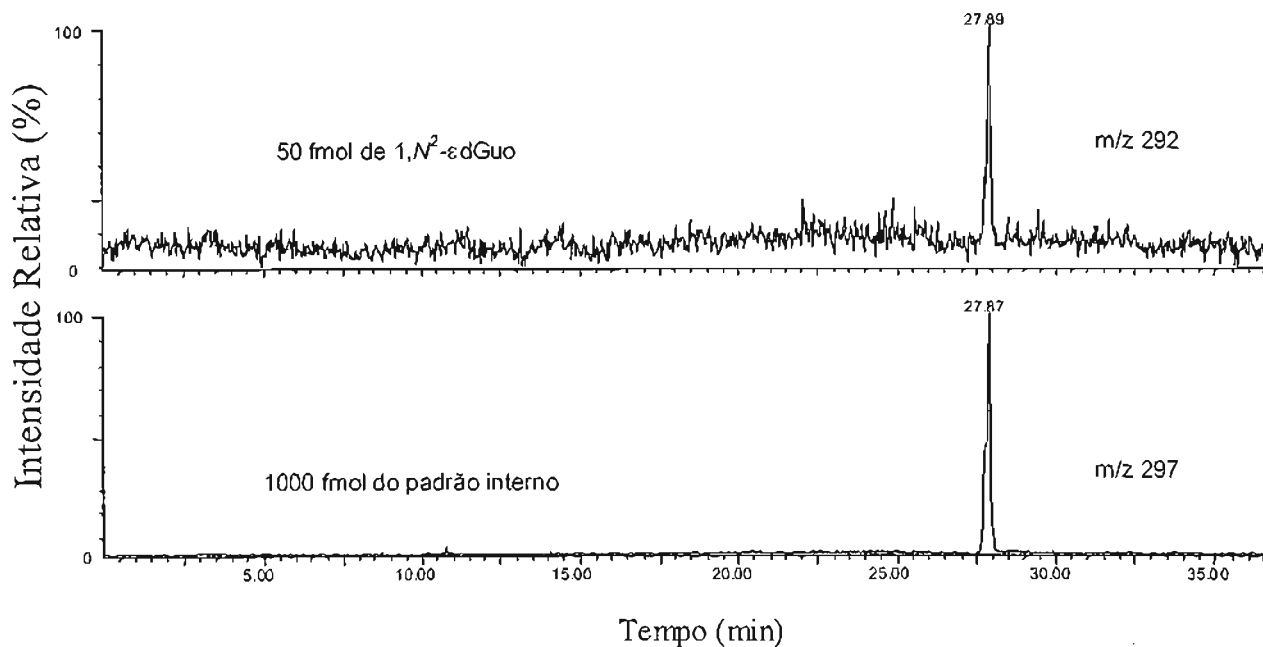


Figura 4.46: Cromatogramas obtidos após injeção de uma solução contendo 50 fmol do aduto 1,N²-εdGuo (5 fmol/μL) e 1000 fmol do padrão interno $[^{15}\text{N}_5]\text{-1,N}^2\text{-}\epsilon\text{dGuo}$ (100 fmol/μL) no sistema LC/ESI/MS-MS. As condições de análise estão descritas nos itens 3.5.2.1 e 3.5.2.2 de *Materiais e Métodos*. Fase móvel: 30% de acetonitrila em água.

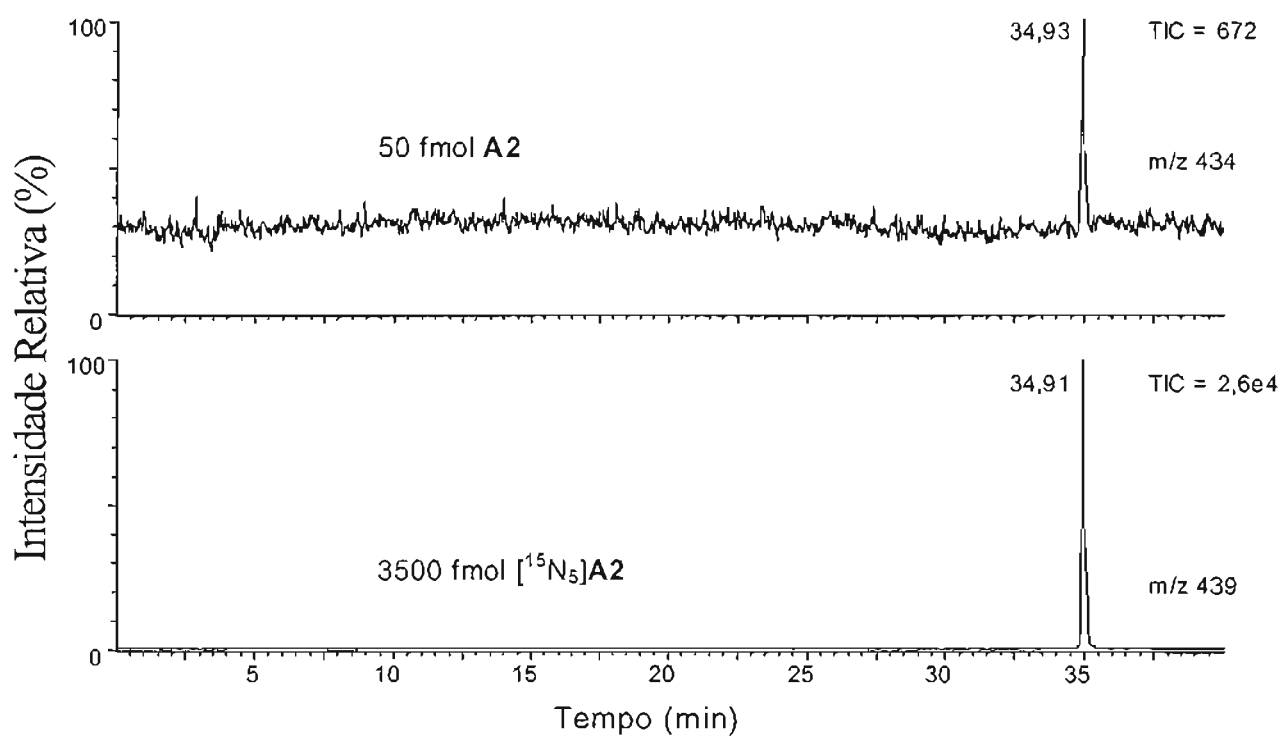


Figura 4.47: Cromatogramas obtidos após injeção de uma solução contendo 50 fmol da mistura dos adutos A2 (2,5 fmol/ μ L) e 3500 fmol do padrão interno [¹⁵N₅]A2 (175 fmol/ μ L) no sistema LC/ESI/MS-MS. As condições de análise estão descritas nos itens 3.5.2.1 e 3.5.2.2 de *Materiais e Métodos*. Fase móvel: 50% de acetonitrila em água.

As curvas de calibração para quantificação dos etenoadutos nas amostras de DNA foram construídas como descrito no item 3.5.2.4 de *Materiais e Métodos* e estão apresentadas na **figura 4.48**.

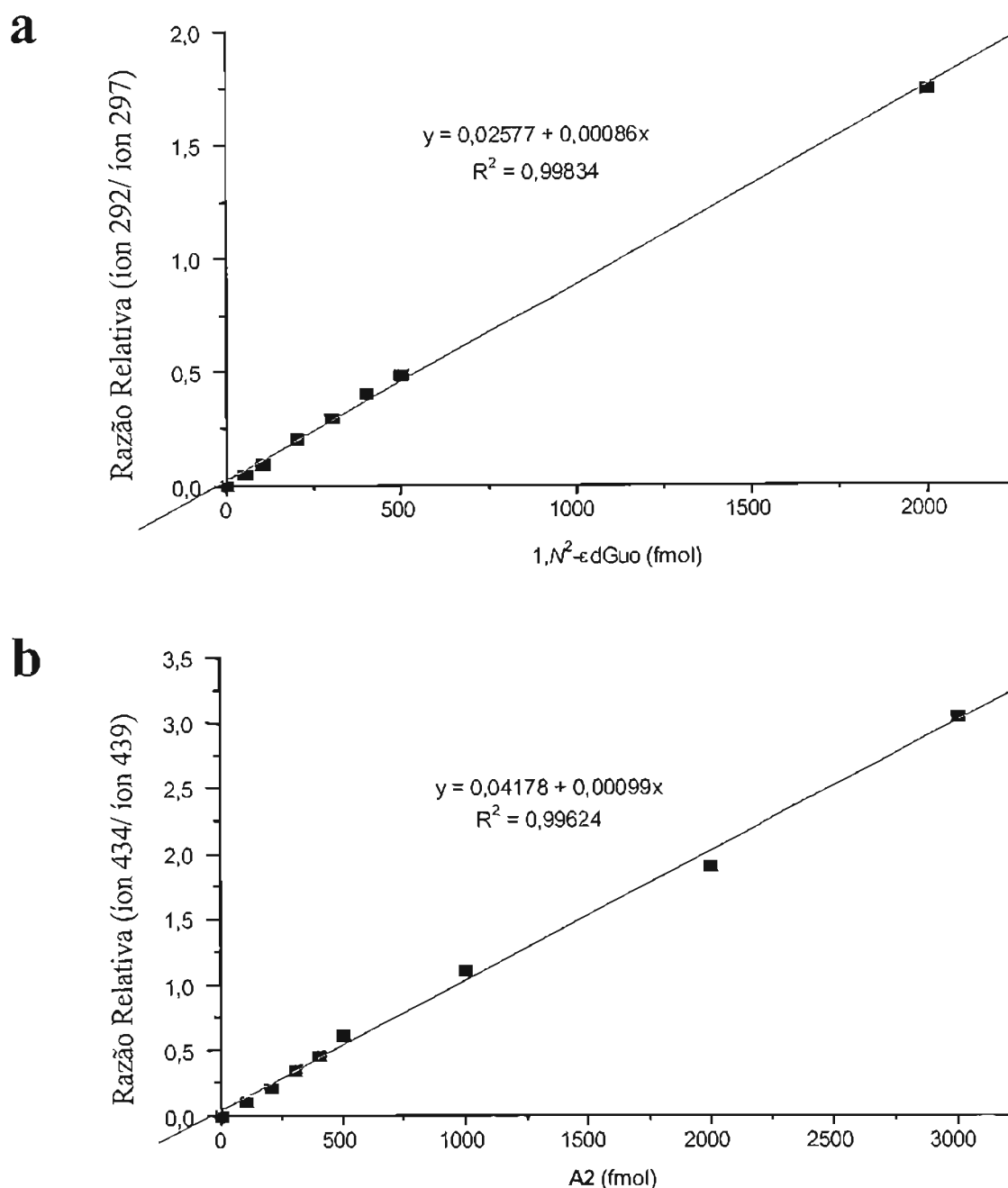


Figura 4.48: Curvas de calibração para quantificação dos etenoadutos: (a) 1,N²-εdGuo; (b) A2. As condições de análise estão descritas nos itens 3.5.2.1, 3.5.2.2 e 3.5.2.4 de *Materiais e Métodos*.

4.3.2.1. Detecção e quantificação dos adutos A1 e A2 em DNA de timo de bezerro incubado com DDE na presença de peróxidos *in vitro*

Após hidrólise enzimática do DNA incubado com DDE na presença de peróxidos *in vitro* e respectivo controle (segundo as condições descritas no item 3.4.8 de *Materiais e Métodos*), as regiões correspondentes aos tempos de eluição dos adutos foram coletadas

utilizando-se a condição cromatográfica 3.4.1.4 descrita em *Materiais e Métodos*, liofilizadas, analisadas e quantificadas pelo sistema LC/ESI/MS-MS como descrito no item 3.5.2.4 de *Materiais e Métodos*. As figuras 4.49 e 4.50 mostram o comportamento cromatográfico dos produtos resultantes no sistema LC/ESI/MS-MS. Na tabela 4.14 estão os níveis dos adutos encontrados em DNA controle e tratado. As análises foram feitas em triplicata ou quadruplicata.

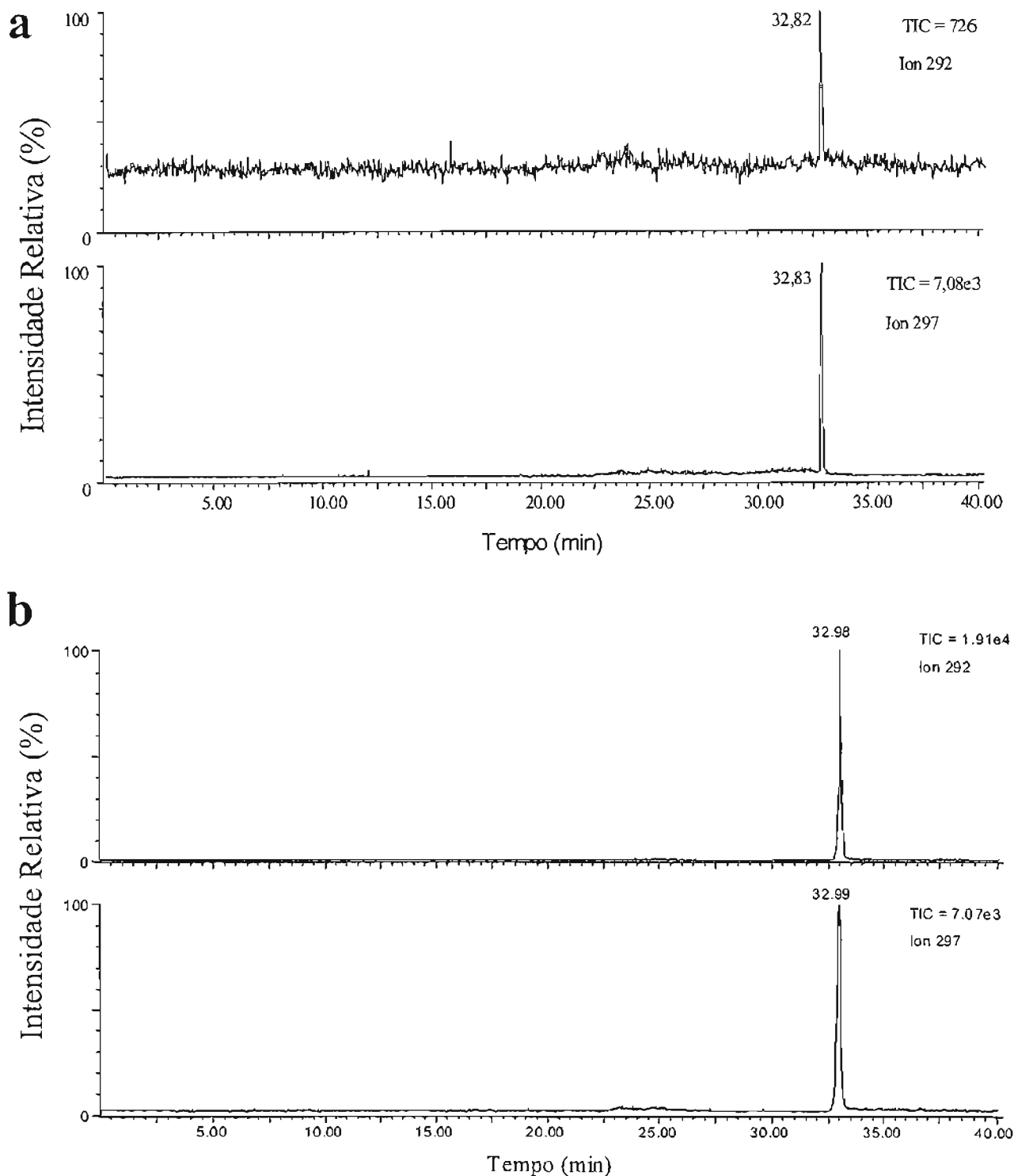


Figura 4.49: Detecção do aduto A1 em DNA de timo de bezerro através do sistema LC/ESI/MS-MS. As condições de análise estão descritas nos itens 3.5.2.1, 3.5.2.2 e 3.5.2.4 de *Materiais e Métodos*. Fase móvel: 30% de acetonitrila em água. (a) DNA controle; (b) DNA incubado com DDE na presença de peróxidos.

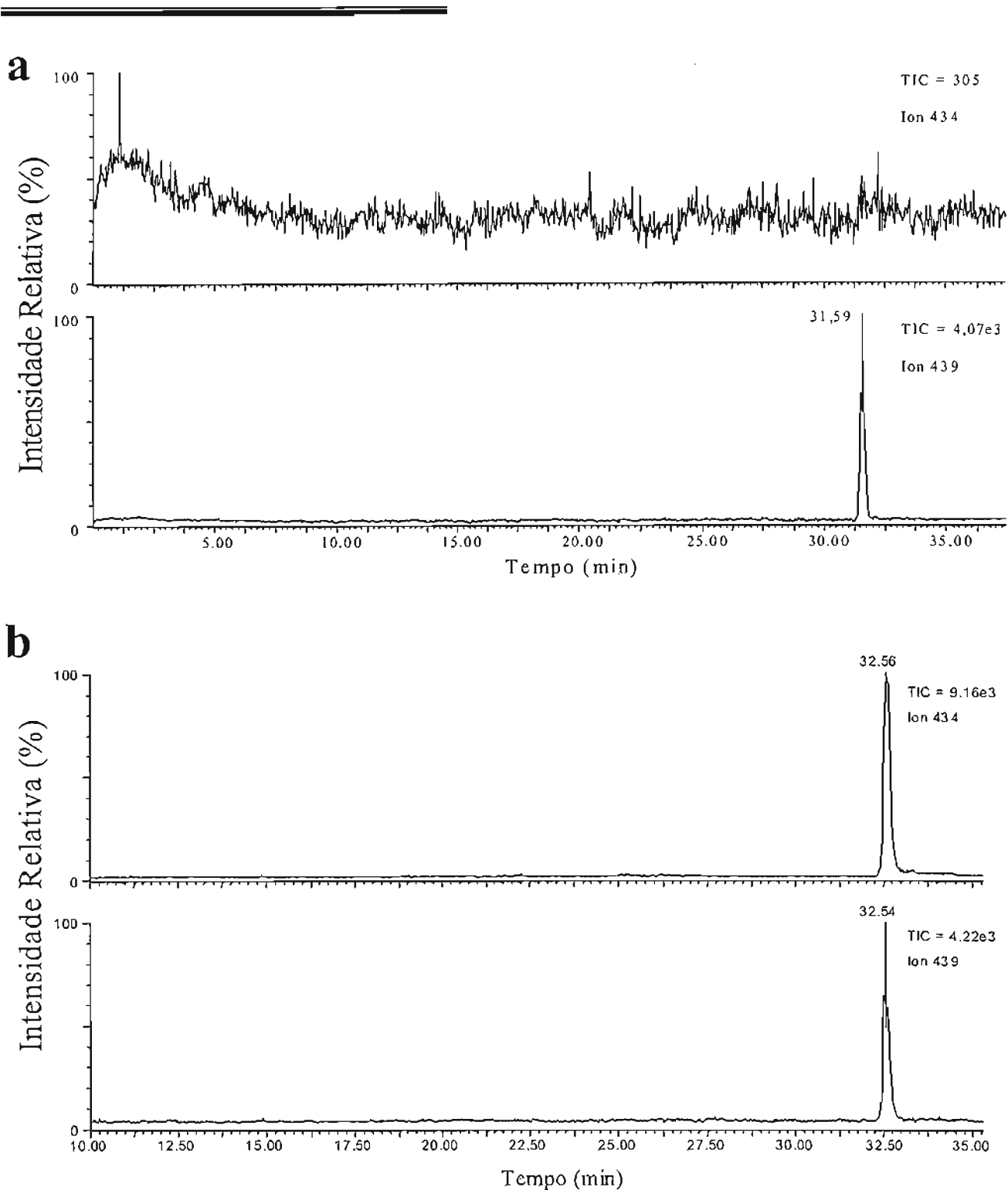


Figura 4.50: Detecção dos adutos A2 em DNA de timo de bezerro através do sistema LC/ESI/MS-MS. As condições de análise estão descritas nos itens 3.5.2.1, 3.5.2.2 e 3.5.2.4 de *Materiais e Métodos*. Fase móvel: 50% de acetonitrila em água. (a) DNA controle; (b) DNA incubado com DDE na presença de peróxidos.

Tabela 4.14: Níveis dos adutos detectados em DNA controle e DNA incubado com DDE na presença de peróxidos *in vitro*.

	Nível dos adutos (adutos/10 ⁷ dGuo)	
	A1	A2
DNA Controle	27,9 ± 3,4	Não detectado
DNA tratado com DDE	1110,2 ± 57,3	854,3 ± 24,2

4.3.2.2. Detecção e quantificação dos adutos A1 e A2 em DNA de células

Da mesma forma que para a detecção e quantificação dos adutos em DNA incubado com DDE na presença de peróxidos *in vitro*, o DNA das células incubadas com DDE (item 3.3.2.5 a de *Materiais e Métodos*) e respectivos controles foi analisado. As figuras 4.51 e 4.52 mostram o comportamento cromatográfico dos produtos resultantes no sistema LC/ESI/MS-MS. Nas tabelas 4.15 e 4.16 estão os níveis dos adutos encontrados em DNA de células controles e tratadas. Para cada amostra de DNA foram feitas três injeções a partir das quais foi obtido um valor médio. Nos casos em que foi possível analisar três amostras distintas, estão apresentadas as médias e desvios padrões. Quando foram analisadas menos que três amostras distintas, estão apresentados os níveis médios de adutos encontrados em cada uma.

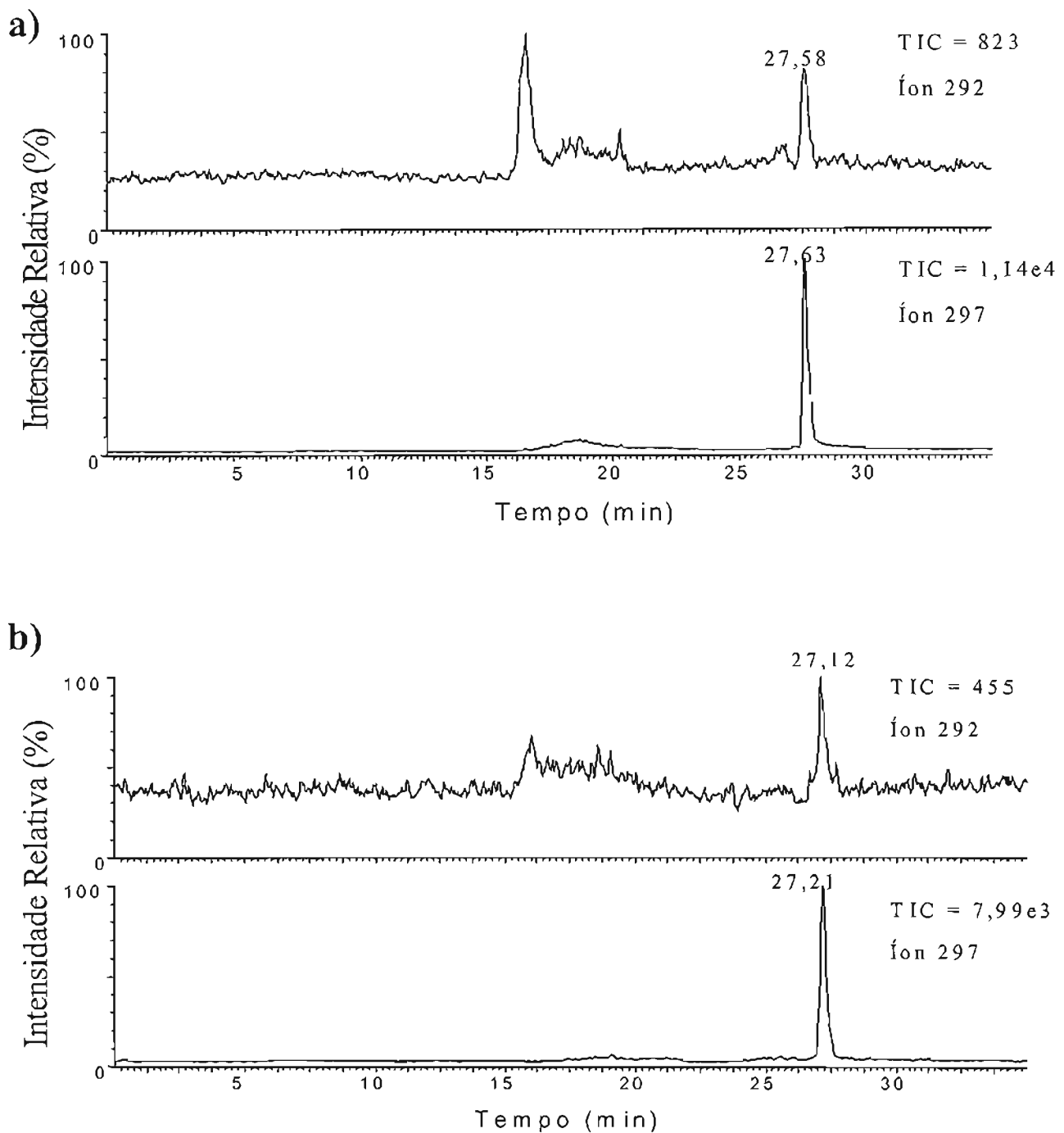


Figura. 4.51: Detecção do aduto A1 em DNA de células CV1-P através do sistema LC/ESI/MS-MS. As condições de análise estão descritas nos itens 3.5.2.1, 3.5.2.2 e 3.5.2.4 de *Materiais e Métodos*. Fase móvel: 30% de acetonitrila em água. (a) células incubadas com etanol (0,2% v/v) (controle); (b) células incubadas com 50 μ M de DDE por 5 horas.

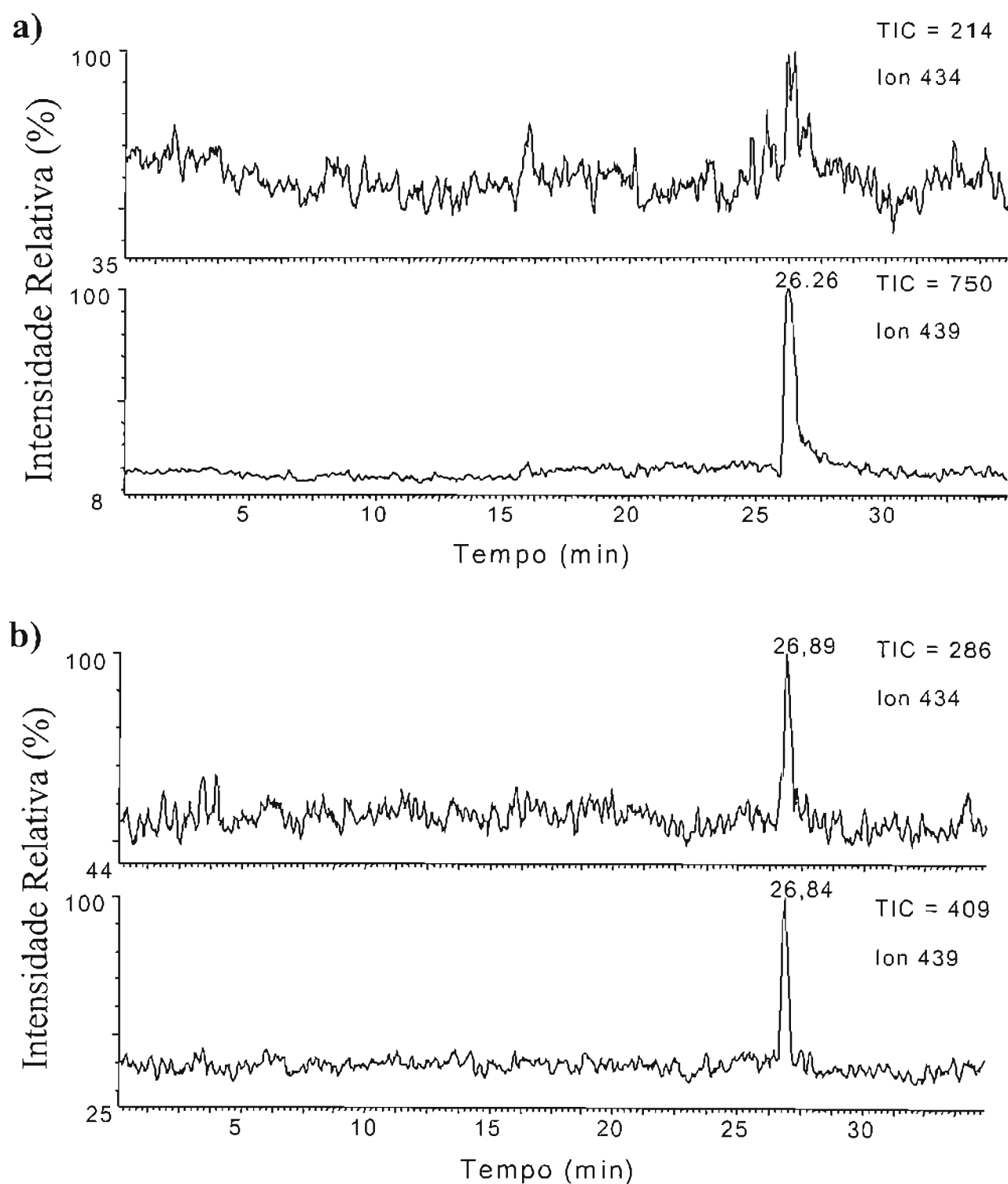


Figura 4.52: Detecção dos adutos A2 em DNA de células CV1-P através do sistema LC/ESI/MS-MS. As condições de análise estão descritas nos itens 3.5.2.1, 3.5.2.2 e 3.5.2.4 de *Materiais e Métodos*. Fase móvel: 50% de acetonitrila em água. (a) células incubadas com etanol (0,2% v/v) (controle); (b) células incubadas com 50 μ M de DDE por 5 horas.

Tabela 4.15: Níveis do aduto **A1** detectado em DNA de células.

	Nível do aduto A1 (adutos/ 10^7 dGuo)
Controle	1,17 ± 0,69
Células + DDE	1,79 ± 0,37

Tabela 4.16: Níveis dos adutos **A2** detectados em DNA de células.

	Nível do aduto A2 (adutos/ 10^7 dGuo)
Controle 1	Não detectado
Controle 2	Não detectado
Células + DDE 1	5,45
Células + DDE 2	20,06

Podemos observar que a incubação das células com DDE nas condições utilizadas (item 3.3.2.5 a de *Materiais e Métodos*) levou à formação dos adutos diastereoisoméricos **A2** em seu DNA. Não houve aumento do nível do aduto **A1** em relação ao controle. Entretanto, um nível basal do mesmo pôde ser observado, sendo esta a primeira constatação da sua presença em sistemas biológicos. Foram feitas análises paralelas de soluções dos padrões internos que passaram pelos mesmos processos de separação e nos serviram como brancos para que pudéssemos eliminar a possibilidade de estarmos detectando adutos contaminantes.

Discussão

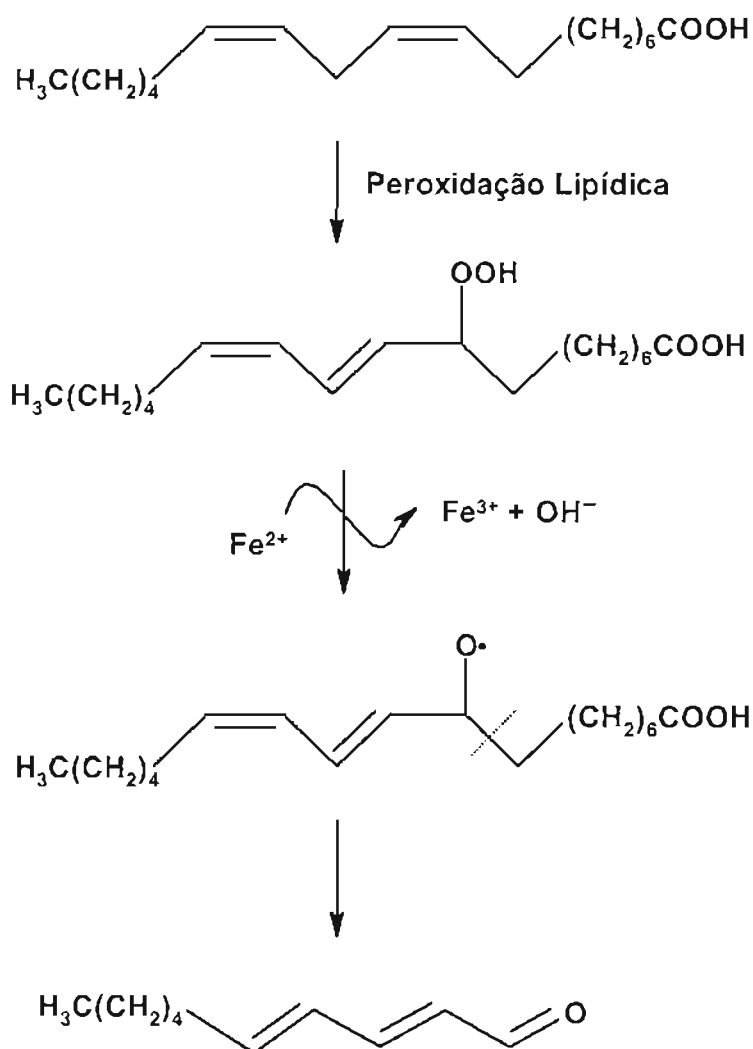
5. Discussão

5.1. Ocorrência do *trans,trans*-2,4-decadienal e estudos de citotoxicidade

Existem vários estudos mostrando a ocorrência do *trans,trans*-2,4-decadienal nos alimentos que consumimos. Sua presença foi detectada em achocolatados (Schnermann e Schieberle, 1997), óleo de semente de gergelim (Shimoda e col., 1997), óleo de peixe, como o de arenque (Grün e col., 1996), em peixes, como salmão e bacalhau estocados a baixas temperaturas (18 µg/kg de salmão após 14 semanas a -13°C) (Milo e Grosch, 1996), em carne bovina (Brewer e Vega, 1995; Konopka e col., 1995), carne de galinha cozida sob pressão a alta temperatura (Farkas e col., 1997; Kerler e Grosch, 1997) e pão (Schieberle e Grosch, 1991). Em geral ele contribui para o aroma gorduroso agradável dos alimentos quando presente em concentração na ordem de partes por bilhão (ppb), ou para o aroma rançoso desagradável dos mesmos quando presente em concentração na ordem de partes por milhão (ppm) (Brewer e Vega, 1995). É também um produto das atividades acopladas de lipoxigenase e ácido graxo liase presentes em uma única proteína em certas plantas (ex.: *Vicia sativa*), com a atividade lipoxigenase agindo sobre o ácido linoleico e formando o radical peroxila intermediário que pode ser metabolizado pela via clássica da lipoxigenase para o ácido 9-hidroperoxioctadecadienóico ou pela atividade liase para 2,4-decadienal (Andrianarison e col., 1991; Liagre e col., 1996). Devido à sua citotoxicidade, foi sugerido que a formação de DDE por essa via em certas plantas poderia estar envolvida em proteção contra o ataque de patógenos (Andrianarison e col., 1991).

Além de estarmos constantemente ingerindo este aldeído ao consumirmos lipídios oxidados, ele pode também ser gerado naturalmente nos nossos organismos como resultado da ocorrência da peroxidação de ácidos graxos poliinsaturados dos lipídios que constituem as nossas células e lipoproteínas (Esterbauer, 1985; Buffinton e col., 1988; Thomas e col., 1994; Girona e col., 1997). Foi detectada a formação de DDE a partir da decomposição térmica de hidroperóxidos resultantes da autoxidação do metil linoleato, tendo sido a sua origem atribuída à cisão-β do radical alcoxila resultante da decomposição do hidroperóxido na posição 9 (**esquema 5.1**) (Frankel e col., 1981). Dentre as substâncias voláteis analisadas nesse estudo, 34,5% foram aldeídos, sendo que DDE correspondeu a

40,6%, hexanal a 43,5% e acetaldeído, pentanal, 2-heptenal, 2-octenal, 2-nonenal e 2,4-nonadienal juntos corresponderam a 15,9% dos aldeídos analisados (Frankel e col., 1981).



Esquema 5.1: Formação de 2,4-decadienal a partir ácido linoleico.

Foi observada a formação de 2,6 nmol de DDE/mg de LDL, nível comparável com o de um dos mais importantes produtos da peroxidação lipídica, HNE (2,7 nmol/mg LDL), em um estudo em que foi induzida a oxidação de LDL (0,5 mg/mL) pela sua incubação com 6 μM de CuSO_4 em PBS por 18 horas *in vitro* (Thomas e col., 1994). Nesse mesmo estudo, o nível total de 2,4-heptadienal, 2-octenal e 2,4-decadienal chegou a 6,93 nmol/mg de proteína, correspondendo a aproximadamente 5 mM na lipoproteína (Thomas e col., 1994). Em outro estudo, a oxidação de LDL, HDL₂ e HDL₃ induzida pela incubação dessas lipoproteínas com 10 μM de CuCl_2 em PBS por 12 horas e 24 horas levou à

formação dos seguintes níveis de DDE/mg de apolipoproteína: 15,33 nmol (ox-LDL 12 h), 22,15 nmol (ox-LDL 24 h), 19,84 nmol (ox-HDL₂ 12 h), 17,33 nmol (ox-HDL₂ 24 h) e 74,75 nmol (ox-HDL₃ 12 h). No caso de HDL₃ oxidada por 12 horas, DDE foi o mais abundante aldeído gerado dentre os aldeídos insaturados investigados (2,4-heptadienal, 2-octenal, 2-nonenal e 2,4-decadienal) (Girona e col., 1997).

Em um estudo *in vitro* em que hemácias de camundongo infectadas com o parasita da malária (*Plasmodium vinckei*) foram submetidas a estresse oxidativo por incubação com *t*-butil hidroperóxido, o qual tem *in vivo* atividade parasiticida, foi observado aumento significativo dos níveis de HNE (2,3 nmol/10⁹ células), DDE (0,5 nmol/10⁹ células) e hexanal (4,0 nmol/10⁹ células) em comparação com os níveis encontrados nas células não infectadas ou não submetidas ao estresse oxidativo (Buffinton e col., 1988). Uma vez já tendo sido verificado que a peroxidação lipídica está envolvida na morte oxidativa dos parasitas da malária; que DDE e HNE inibem o crescimento de *P. falciparum in vitro* (Clark e col., 1987); e que a injeção intravenosa de uma mistura de aldeídos (incluindo HNE, DDE e hexanal) em camundongos infectados com *P. vinckei* leva a alterações no formato dos parasitas no interior das hemácias, foi sugerido que a geração desses aldeídos citotóxicos durante o curso de infecção por malária pode ter implicações nos mecanismos que estão por trás da morte do parasita no interior das células sanguíneas e nos danos aos tecidos associados com a doença (Buffinton e col., 1988).

Entretanto, as atividades biológicas do DDE foram até hoje pouco investigadas. Um trabalho mostrou que ele inibe significativamente a produção do fator de necrose de tumor (TNF- α) por macrófagos derivados de monócitos humanos THP-1 *in vitro*, embora o nível de inibição obtido (80,08 \pm 4,70%, $p < 0,0001$, [DDE] = 50 μ M, 2 horas) não possa ser considerado em virtude de ter sido verificada redução da viabilidade das células (Girona e col., 1997). Outro estudo também *in vitro* mostrou que o DDE nas concentrações de 20 μ M (1 h, 2 h e 24 h), 50 μ M (30 min) e 80 μ M (5 min, 15 min, 30 min, 1 h, 2 h e 24 h) induz significativa liberação de interleucina-1- β de células mononucleares de sangue humano, sendo esse efeito também observado quando essas células são incubadas na presença de LDL oxidada (Thomas e col., 1994). Ambos os estudos mostraram que o DDE exerce um papel importante na resposta inflamatória dessas células, podendo, através de seus efeitos sobre a secreção de citocinas, contribuir para a aterogênese. Não foram,

entretanto, investigados os mecanismos pelos quais o DDE estaria levando a essas alterações. Mais recentemente um estudo mostrou que o HNE, presente em LDL oxidada, é uma das substâncias inibidoras da ativação do fator de transcrição NF- κ B por lipopolissacarídeo de *E. coli* (LPS) em células monocíticas humanas, inibindo conseqüentemente a produção de TNF. Foi verificado que o HNE atua via inibição da degradação das proteínas inibidoras citosólicas I κ B- α , I κ B- β e I κ B- ϵ através da inibição da fosforilação das mesmas, o que impede a sua degradação pelo proteassomo (Page e col., 1999). Efeitos semelhantes com relação à expressão de TNF e degradação de proteínas inibidoras de NF- κ B foram observados quando células monocíticas foram incubadas na presença de LDL oxidada (Hamilton e col., 1990; Fong e col., 1991; Thai e col., 1995; Ares e col., 1995; Yoritaka e col., 1996; Ohlsson e col., 1996; Brand e col., 1997). A inibição da expressão de genes regulados por NF- κ B pode contribuir para o desenvolvimento de um estado de inflamação basal crônica, o que é uma característica da lesão aterosclerótica (Page e col., 1999) e de outras doenças degenerativas (ex.: doença de Parkinson) (Yoritaka e col., 1996).

Dois estudos realizados por Kaneko e colaboradores (1987 e 1988) mostraram os efeitos citotóxicos do DDE em fibroblastos humanos e células endoteliais da veia umbilical humana.

No estudo feito com fibroblastos foi verificado que o efeito letal dos aldeídos aumenta à medida em que aumenta o número de duplas ligações e o tamanho da molécula, aumentando também a sua lipofílicidade. Foi estabelecida a seguinte ordem de toxicidade para alguns aldeídos identificados como produtos da decomposição do ácido 13-hidroperoxi-9,11-octadecadienóico sintetizado a partir da ação da lipoxigenase-1 de soja sobre o ácido linoleico: *trans*-2-hexenal < *trans*-2-heptenal < *trans*-2-octenal < *trans*-2-nonenal < *trans,trans*-2,4-nonadienal < *trans,trans*-2,4-decadienal (\leq *trans*-4-hidroxi-2-nonenal). Os aldeídos mais lipofílicos ficam principalmente localizados nas membranas celulares, o que pode promover a inativação de enzimas ligadas às membranas e também protegê-los contra a rápida detoxificação pelas enzimas do citoplasma (Esterbauer e col., 1991). Foi observado o nível de 10% de sobrevivência relativa após 24 horas de incubação das células com 25 μ M de DDE em meio de cultura suplementado com SFB (Kaneko e col., 1987).

No estudo feito com células endoteliais humanas, a concentração de DDE que levou a 50% de morte das células foi 10 μM após 3 horas de incubação em solução de Earle. Comparativamente, as concentrações de *trans*-4-hidroxi-2-nonenal e *trans,trans*-2,4-nonadienal necessárias para a observação do mesmo efeito foram 25 μM e 21 μM , respectivamente. Foi também verificado que as células que permaneceram viáveis após a exposição a 10 μM de DDE perderam a capacidade proliferativa (Kaneko e col., 1988). Esse efeito tóxico exercido pelo DDE e outros aldeídos em células endoteliais humanas é importante devido às observações de que a administração de peróxidos lipídicos leva a danos em células endoteliais *in vivo* (Culter e Schneider, 1974; Sedar e col., 1978; Yagi e col., 1981), sendo que esses danos podem levar ao desenvolvimento de placas ateroscleróticas (Ross, 1993).

A incubação de células de eritroleucemia humana (linhagem HEL TIB 180) com diferentes concentrações de DDE (0,25 a 5 μM) em meio de cultura suplementado com SFB também revelou um grande efeito letal do DDE, com 100% de células mortas após 24 horas de incubação com 5 μM do aldeído. Entretanto, foi mencionado que a solução de aldeído foi adicionada à cultura de células de hora em hora durante as primeiras 10 horas de incubação, não ficando muito clara a concentração total de aldeído adicionada (Nappez e col., 1996).

Os dados de citotoxicidade que obtivemos a partir da incubação das células CV1-P com DDE nos mostraram que as células que utilizamos são mais resistentes aos efeitos tóxicos do DDE em comparação com as acima citadas. Obtivemos 100% de células viáveis após 5 horas de incubação com 50 μM de DDE e $44,3 \pm 3\%$ de células viáveis após 4 horas de incubação com 65 μM de DDE utilizando o ensaio do MTT, que mede a capacidade redutora das mitocôndrias. Com a utilização do método de exclusão por coloração com azul de tripan, obtivemos 50% de células viáveis após 8 horas de incubação com 65 μM do aldeído. É importante notar que apesar de ambos os métodos indicarem a ocorrência de danos celulares, a utilização do MTT permite a verificação da porcentagem de células metabolicamente ativas, enquanto que o azul de tripan nos fornece informação a respeito da porcentagem de células com a membrana plasmática intacta, uma vez que esse corante só penetra nas células que apresentam membranas plasmáticas danificadas, colorindo o citoplasma e o núcleo das mesmas.

Variações de citotoxicidade ocorrem de acordo com o sistema utilizado, sendo, portanto, importante avaliar esse parâmetro sempre que houver alterações nas condições experimentais, seja o tipo e densidade das células, o meio de incubação e condições de temperatura e umidade da estufa. Kaneko e colaboradores (1988) mostraram que quando aldeídos são administrados às células em um meio de cultura complexo, suas citotoxicidades podem estar sendo subestimadas. Isso ocorre porque eles podem reagir com grupos tióis e amino presentes em componentes do meio (Kaneko e col., 1988). Com a finalidade de reduzir essas perdas, fizemos as incubações com DDE na ausência de SFB. Entretanto, mantivemos o meio DME, ao invés de substituí-lo por uma solução salina, uma vez que soluções salinas por si só levam à perda de viabilidade após certos períodos de incubação (Kaneko e col., 1988), o que não era desejável para os nossos experimentos subsequentes.

Muitos estudos de citotoxicidade foram feitos com *trans*-4-hidroxi-2-nonenal (HNE), tendo sido encontradas diferentes concentrações que levaram a 50% de morte das células, dependendo do tipo celular estudado. Por exemplo, 50% de viabilidade foi observada após incubação de células de ovário de hamster chinês com 100 μ M de HNE por 1,5 h. O mesmo efeito só foi observado após 6 horas de incubação de células tumorais de ascite Ehrlich e 20 horas de incubação de hepatócitos de ratos com essa mesma concentração de aldeído (estudos revisados por Esterbauer e col., 1991).

Além de poderem ser causadas por diferenças nas condições experimentais para a determinação de citotoxicidade entre diferentes laboratórios, as diferenças de resistência aos efeitos tóxicos dos aldeídos podem ser devidas a diferentes capacidades de metabolismo e detoxificação dessas substâncias pelos diferentes tipos celulares. No caso dos experimentos feitos com HNE, aqueles nos quais houve maior citotoxicidade apresentavam menor densidade de células. A densidade de células determina a capacidade de metabolismo do aldeído pelo sistema teste (Esterbauer e col., 1991). A importância do metabolismo celular foi também evidenciada por estudos com fibroblastos de hamster chinês resistentes a H_2O_2 (Spitz e col., 1990). Essas células adaptadas e/ou selecionadas para um ambiente altamente oxidante são significativamente mais resistentes ao HNE e *trans*-2-nonenal que os fibroblatos normais. As células resistentes a H_2O_2 apresentaram um aumento significativo no nível intracelular de glutathione ($23,4 \pm 2,3$ e $19,9 \pm 2,0$ pmol GSH/ μ g proteína) em

relação às células não resistentes ($7,8 \pm 0,3$ pmol GSH/ μ g proteína) e uma capacidade 2-3 vezes maior de remover os aldeídos, provavelmente através do mecanismo de conjugação com glutathione, via glutathione transferase (Spitz e col., 1990). Também há variação de citotoxicidade entre os experimentos feitos com células que estão se proliferando e aquelas cuja proliferação foi interrompida. Por exemplo, fibroblastos em crescimento logarítmico são menos sensíveis aos efeitos tóxicos do HNE (18μ M, 20 h, 50% de células viáveis) do que aqueles que pararam de crescer (5μ M, 20 h, 50% de células viáveis) (Kaneko e col., 1987).

Foram observados vários efeitos que precedem ou acompanham a morte celular nos estudos feitos com 4-hidroxi-alquenoais em células de mamífero, tais como depleção de glutathione (Cadenas e col., 1983; Poot e col., 1987; Griffin e Segall, 1987), depleção de tióis proteicos (Dogterom e col., 1989), indução de peroxidação lipídica (Cadenas e col., 1983; Haenen e col., 1987; Dogterom e col., 1989), distúrbio da homeostase de cálcio (Griffin e Segall, 1987), inibição da síntese de DNA, RNA e proteínas (Benedetti e col., 1981; Hauptlorenz e col., 1985; Wawra e col., 1986; Clark e col., 1987; Poot e col., 1988a), inibição da respiração e glicólise (Esterbauer e col., 1991), liberação de lactato (Griffin e Segall, 1987) e alterações morfológicas (Eckl e Esterbauer, 1989; Esterbauer e col., 1990).

No início dos nossos estudos, ao incubarmos as células CV1-P com concentrações de DDE variando entre 50 e 70 μ M, observamos que elas perdiam rapidamente o formato típico de fibroblastos, adquirindo um formato esférico (**figura 4.1**). Existem relatos de que hepatócitos em cultura, após serem expostos a 100 μ M de HNE, apresentam alterações morfológicas, adquirindo um formato esférico e uma estrutura granular intensa (Eckl e Esterbauer, 1989; Esterbauer e col., 1990). Uma vez que o HNE provoca distúrbio da homeostase de cálcio (Benedetti e col., 1984a; Griffin e Segall, 1987) e inibe a polimerização dos microtúbulos (Gabriel e col., 1985), tais alterações podem ser explicadas como consequência de um desarranjo das proteínas do citoesqueleto induzido pela redistribuição do cálcio intracelular. Inicialmente esse dano pode ser revertido em alguma extensão, mas com o seu progresso torna-se irreversível e leva inevitavelmente à lise das células (Esterbauer e col., 1991). Apesar de não existirem trabalhos mostrando o mecanismo de ação do DDE neste sentido, podemos esperar que o efeito que observamos

sobre o formato das células seja decorrente de um mecanismo semelhante ao que ocorre na presença de HNE.

Observamos também, como mencionado anteriormente, um distúrbio das funções mitocondriais e danos à membrana plasmática das células incubadas com DDE. Um estudo desenvolvido por Richter e Meier (1990) mostrou que o HNE inibe, de uma maneira dose-dependente (10 a 50 μM), a liberação de Ca^{2+} , induzida por prooxidantes, da mitocôndria. Essa liberação de Ca^{2+} requer a oxidação de NADH para NAD^+ , hidrólise de NAD^+ para nicotinamida e mono(ADP-ribose) e uma ligação transiente de mono(ADP-ribose) às proteínas intramitocondriais. A inibição exercida pelo HNE ocorre sobre a hidrólise do nucleotídeo (Richter e Meier, 1990). A consequência seria uma sobrecarga das mitocôndrias com Ca^{2+} e inibição das enzimas mitocondriais dependentes de Ca^{2+} , com conseqüente distúrbio das funções mitocondriais levando à citotoxicidade (Richter e Meier, 1990). Não podemos dizer que o DDE atua segundo esse mesmo mecanismo, mas nos nossos estudos de citotoxicidade com esse aldeído, pudemos observar a seguinte seqüência de eventos: i) alteração do formato das células; ii) distúrbio das funções mitocondriais; iii) danos à membrana plasmática e morte das células. Essa seqüência, de acordo com os dados que temos referentes à ação do HNE, nos parece lógica.

Em experimentos com fibroblastos normais de pele humana, Poot e colaboradores (1987, 1988a,b) verificaram que a exposição a 40 μM de HNE não era tóxica (as células sobreviviam por 1 semana), mas a mesma dose era letal para fibroblastos de pele humana deficientes em glutatona sintetase (Poot e col., 1988b). Eles verificaram que a exposição dos fibroblastos normais ao HNE, um potente eletrófilo, levava a uma perda transiente da glutatona intracelular (cerca de 70%), que era então restaurada em poucas horas e, após 24 horas, correspondia ao dobro do nível encontrado em células não tratadas (Poot e col., 1987; Poot e col., 1988a). O mesmo efeito de depleção inicial de glutatona (2 horas) seguida por recuperação do seu nível normal e elevação até acima do seu nível basal após 24 horas foi observado em células epiteliais de fígado de rato incubadas com 25 μM de HNE. Acompanhando a depleção de glutatona, foram observadas nesse estudo modificações de proteínas da membrana plasmática por HNE durante os primeiros 30 minutos de incubação, com a localização das proteínas modificadas sendo gradativamente transferida para o citosol com o aumento do tempo de incubação (Uchida e col., 1999).

Como GSH está envolvida em diversos processos metabólicos (Barhoumi e col., 1993; Pedersen e col., 1996; Hanna e Mason, 1992; Thornalley, 1996) e de detoxificação (Spitz e col., 1991; Fugita e col., 1994; Meister, 1994; Eisenbrand e col., 1995; Agostinelli e col., 1996), a depleção inicial de GSH induzida por HNE pode levar a um aumento da susceptibilidade celular a danos oxidativos induzidos por esse aldeído, ao mesmo tempo em que protege as demais biomoléculas contra o seu ataque (Uchida e col., 1999). Em outro estudo, células de ovário de hamster chinês expostas a 200 μM de acroleína por 1 hora também apresentaram significativa depleção do nível de glutathiona, não tendo sido avaliado o que ocorre com esse nível em períodos de incubação subseqüentes. A prévia incubação das células com L-BSO, induzindo severa depleção do nível de GSH, aumentou a sensibilidade das mesmas aos efeitos tóxicos devidos à exposição a acroleína (Agostinelli e col., 1996).

Reações de conjugação com glutathiona, via adição de Michael ou catalisadas por glutathiona *S*-transferases, foram sugeridas como uma das principais vias para detoxificação de HNE e outros aldeídos α,β -insaturados, tais como *trans*-2-alcenais e *trans,trans*-2,4-alcadienais, sendo esses conjugados subseqüentemente metabolizados para os correspondentes ácidos mercaptúricos e excretados (Alin e col., 1985; Brophy e Barrett, 1990; Berhane e Mannervik, 1990; Spitz e col., 1990; Spitz e col., 1991; Tsuchida e Sato, 1992; Fujita e col., 1994; Eisenbrand e col., 1995; Agostinelli e col., 1996). Metabólitos de ácido mercaptúrico foram detectados em urina de ratos tratados com crotonaldeído e acroleína (Gray e Barnsley, 1971; Kaye, 1973; Draminski e col., 1983).

Considerando os dados acima apresentados, esperávamos também observar, no caso das células CV1-P incubadas com DDE, uma depleção pelo menos inicial do nível de GSH intracelular, o que nos indicaria que as células estariam utilizando sua reserva de glutathiona para se protegerem contra a ação tóxica do aldeído. Entretanto, o que observamos mesmo em períodos iniciais (1,5 – 2,5 h) de incubação com DDE (65 e 100 μM) foi um aumento significativo do nível de GSH em relação ao controle, chegando a um nível 3 vezes maior após 5 horas (65 μM) com subseqüente grande depleção após 8 horas de incubação com o aldeído (**figura 4.3**), contrariamente aos dados presentes na literatura para os efeitos de HNE sobre os níveis de GSH. Um trabalho desenvolvido por Nappez e colaboradores (1996) mostrou que a incubação de células de eritroleucemia humana (linhagem HEL TIB

180) com DDE numa concentração muito inferior a que utilizamos (0,25 – 5 μM) leva a alterações semelhantes às que observamos no nível de GSH, com indução inicial e subsequente depleção. Acreditamos que a depleção de GSH após as 8 horas de incubação com DDE possa ser explicada por uma redução da sua síntese ao mesmo tempo em que continua sendo utilizada nos processos de detoxificação. Verificamos que após esse período de incubação as células já sofreram um grande distúrbio da sua atividade metabólica (figura 4.2), o que pode eventualmente prejudicar a expressão de vários genes.

A capacidade de as células manterem o nível de GSH em resposta a um estímulo tóxico é importante para evitar a perda de função e integridade celular. O nível de GSH celular é largamente mantido pela redução de GSSG por NADPH via glutathione redutase. Além da redução de GSSG, as células podem elevar o nível de GSH através da síntese *de novo* em um processo de duas etapas catalisadas pelas enzimas γ -glutamylcysteine sintetase e GSH sintetase. Foi verificado que a enzima γ -glutamylcysteine sintetase normalmente opera a uma velocidade substancialmente mais baixa que a sua velocidade máxima devido à inibição realimentada por GSH (Richman e Meister, 1975). Assim, a síntese aumentada de GSH tem sido sugerida como uma resposta adaptativa a agentes que depletam GSH (Poot e col., 1987; Uchida e col., 1999). Também tem sido sugerida como uma resposta à indução de estresse oxidativo (Shi e col., 1994; Uchida e col., 1999), uma vez que existem evidências de que proteínas quinases são ativadas por H_2O_2 (Konishi e col., 1997), podendo levar à ativação de vias de sinalização de estresse com conseqüente ativação da expressão de genes de enzimas detoxificantes de fase II, como glutathione *S*-transferases (Okuda e col., 1989; Rushmore e col., 1990; Fukuda e col., 1997) e γ -glutamylcysteine sintetase (Shi e col., 1994; Uchida e col., 1999). Outro fator importante para a regulação do nível de GSH intracelular é a disponibilidade dos aminoácidos substratos para síntese de GSH (Bannai e col., 1989; Roberts e Francetic, 1991; Baruchel e col., 1995).

Não existem trabalhos que mostrem que o DDE ativa, diretamente ou através da indução de estresse oxidativo, a expressão do gene da γ -glutamylcysteine sintetase, a enzima que determina a velocidade de síntese de GSH pela via *de novo*. No entanto, existem estudos demonstrando que substâncias eletrofílicas (Ohno e Hirata, 1990; Uchida e col., 1999) e/ou indutoras de estresse oxidativo (Woods e col., 1992; Shi e col., 1994; Uchida e col., 1999) levam a um aumento da atividade dessa enzima, com subsequente elevação do

nível intracelular de GSH. Níveis elevados de GSH e atividade aumentada da γ -glutamilcisteína sintetase foram correlacionados com aumento de resistência a irradiação- γ (Moore e col., 1989) e agentes quimioterapêuticos (Lee e col., 1989; Godwin e col., 1992; Bailey e col., 1992; Mulcahy e col., 1994). Investigações da atividade da γ -glutamilcisteína sintetase, bem como da expressão dos genes que codificam essa enzima e de vias de sinalização provavelmente envolvidas com essa expressão (ex.: ativação de proteínas quinases e expressão de fatores de transcrição) precisam ser realizadas na presença de DDE para que se possa saber como esse aldeído leva ao aumento do nível de GSH. Provavelmente o seu mecanismo de ação deve apresentar diferenças em relação ao mecanismo de ação do HNE, uma vez que ambos têm capacidades eletrofílicas distintas e efeitos distintos sobre o nível de GSH. Foi verificado que o HNE atua através da indução de estresse oxidativo, o qual leva à ativação de quinases que ativam a expressão de fatores de transcrição que levam a um aumento da expressão de genes de resposta a estresse (Uchida e col., 1999).

Ao incubarmos as células previamente depletadas em glutathiona (incubação com BSO) com DDE, verificamos uma redução da sua sobrevivência relativa no período entre 2 e 8 horas em comparação com as células não previamente depletadas (**figura 4.5**). Essa observação nos indicou que, apesar de não observarmos depleção inicial do nível de GSH quando as células CV1-P são incubadas com DDE, o nível intracelular de GSH no início da incubação é importante para a proteção, pelo menos em parte, contra os efeitos tóxicos desencadeados pelo aldeído. Outras vias importantes para detoxificação de aldeídos que podem estar também conferindo proteção neste caso são a sua oxidação para o ácido correspondente via aldeído desidrogenase e sua redução para álcool via álcool desidrogenase e aldeído redutase (Mitchell e Petersen, 1989; Brophy e Barrett, 1990; Leonarduzzi e col., 1995).

Não existem estudos na literatura mostrando níveis de DDE em plasma ou órgãos. Entretanto, os níveis de HNE são relatados em diversos trabalhos. Em plasma de cachorro que sofreu reperfusão após choque traumático hipovolêmico foi encontrada a concentração de 45 μ M de HNE (Lieners e col., 1989). Segundo os dados de citotoxicidade, essa é uma concentração que pode provocar danos celulares. Um outro estudo mostrou um aumento do nível plasmático de HNE durante a cirurgia cardíaca para colocação de ponte de

safena (de $8,5 \pm 2,4$ pmol HNE/mg proteína antes da cirurgia para $11,5 \pm 2,7$ pmol HNE/mg proteína após a cirurgia), concomitante com o aumento na porcentagem de saturação da transferrina e o aumento da peroxidação lipídica. O nível de HNE detectado em plasma de pessoas saudáveis foi $2,6 \pm 0,38$ pmol/mg proteína (Quinlan e col., 1994). Outros níveis fisiológicos de HNE encontrados em plasma humano foram $0,28 \pm 0,34$ μM (Esterbauer e col., 1991), $0,68 \pm 0,41$ μM (Selley e col., 1989) e $0,02$ μM (Rauli e col., 1998). Nesse último trabalho, após indução de oxidação do plasma por incubação com CuSO_4 (3 mM), foram encontrados os seguintes níveis de HNE: $0,06$ μM (após 1,5 h), $3,8$ μM (após 5 h) e $1,9$ μM (após 24 h) (Rauli e col., 1998). Concentrações plasmáticas de HNE também foram determinadas em pacientes com doença de Parkinson e infecção por HIV-1. No caso dos pacientes com doença de Parkinson foi verificado um aumento na concentração de HNE com o passar do tempo, sendo $0,71$ μM , $2,71$ μM , $5,01$ μM e $6,03$ μM respectivamente aos dois, três, seis e oito anos após o diagnóstico da doença (Selley, 1997). Em pacientes assintomáticos infectados com HIV-1, o nível de HNE plasmático encontrado foi $0,81 \pm 0,07$ μM , e no caso dos sintomáticos (AIDS) foi $1,24 \pm 0,18$ μM . O nível encontrado em pacientes saudáveis foi $0,66 \pm 0,06$ μM (Selley, 1997). Em tecido de mucosa de pacientes com doença inflamatória do intestino, a região inflamada apresentou maior concentração de HNE ($1,25 - 7,99$ nmol/mg proteína) em comparação com a região não inflamada ($0,02 - 0,23$ nmol/mg proteína) (Selley, 1997). Alguns níveis encontrados em fígado de ratos normais foram $0,48 \pm 0,17$ nmol/g (Esterbauer e col., 1991), $0,55 \pm 0,10$ nmol/g (Norsten-Höög e Cronholm, 1990) e $2,82 \pm 0,53$ nmol/g (Yoshino e col., 1986). Em fígado de ratos com deficiência de vitamina E foi encontrado o nível de $5,4$ nmol de HNE/g de tecido (Yoshino e col., 1986). A concentração de HNE medida em suspensão de hepatócitos incubados com CCl_4 foi de aproximadamente 7 μM (Poli e col., 1985) e em suspensão de células tumorais de ascite Ehrlich submetidas à peroxidação lipídica estimulada por Fe(II) -histidinato girou em torno de $0,1$ μM (Winkler e col., 1984).

Níveis de MDA também foram determinados em plasma humano através de diferentes metodologias, tendo sido encontrados valores que vão desde 0 a $47,2$ μM (Suematsu e col., 1977; Satoh, 1978; Santos e col., 1980; Lee, 1980; Maseki e col., 1981; Nishigaki e col., 1981; Yasaka e col., 1981; Aznar e col., 1983; Viinikka e col., 1984; Bull e Marnett, 1985; Francesco e col., 1985; Hunter e Mohamed, 1986; Ledwozyw e col., 1986;

Wong e col., 1987; Largilliere e Melancon, 1988; Lepage e col., 1991; Yeo e col., 1994; Rauli e col., 1998). Grandes variações dos níveis de MDA também foram encontradas em homogenatos de fígado de rato: 0,7 – 0,8 nmol/g de tecido (Yeo e col., 1994), 2 nmol/g de tecido (Lepage e col., 1991) e 11 $\mu\text{mol/g}$ de tecido (Csallany e col., 1984). Em esperma humano de não fumantes foi encontrado o nível de 0,4 – 3,9 pmol/mg de proteína, enquanto que em fumantes o nível encontrado foi 10 pmol/mg de proteína (Yeo e col., 1994). De acordo com o trabalho desenvolvido por Yeo e colaboradores (1994), os níveis mais confiáveis de MDA encontrados em plasma humano e fígado de ratos normais estão em torno de 0,03 μM e 0,7 – 0,8 nmol/g de tecido, respectivamente. Para a determinação desses níveis foi utilizada uma metodologia em que foram eliminadas as incubações a altas temperaturas, que podem favorecer a peroxidação lipídica, e a detecção e quantificação do aldeído foram feitas por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas com ionização química negativa e utilização de um padrão interno apropriado ($[^2\text{H}_2]\text{MDA}$) (Yeo e col., 1994).

De um modo geral, as concentrações de HNE livre observadas *in vivo*, como consequência da ocorrência natural ou estimulada da peroxidação lipídica, parecem ser muito baixas para que se possa pensar em danos às biomoléculas induzidas por esse e/ou outros aldeídos e considerar que esses danos sejam responsáveis por parte dos processos degenerativos associados ao estresse oxidativo. Entretanto, os aldeídos α,β -insaturados e principalmente os 4-hidroxicenais são agentes alquilantes potentes que reagem com uma variedade de sítios nucleofílicos em DNA e proteínas, gerando vários tipos de adutos. A formação desses adutos contribui para que grande concentração dos aldeídos gerados intracelularmente ou no plasma permaneça na forma não livre, estando portanto subestimada a concentração gerada *in vivo*. Um estudo desenvolvido por Salomon e colaboradores (2000) mostrou que os níveis de HNE livre *in vivo* são relativamente baixos quando comparados com os níveis de adutos HNE-proteína detectados como epítomos de HNE-pirrol (2-pentilpirrol derivado de HNE ligado à proteína) em sangue humano. Enquanto o nível mais alto de HNE livre em plasma relatado para indivíduos saudáveis está em torno de 0,7 μM , o nível de HNE em epítomos de HNE-pirrol encontrado em plasma de indivíduos saudáveis foi $8,0 \pm 1,6 \mu\text{M}$. Nesse mesmo estudo, pacientes com aterosclerose e em estágio final de doença renal apresentaram níveis de $15,2 \pm 6,2 \mu\text{M}$ e $24,3 \pm 7,0 \mu\text{M}$ de

HNE na forma HNE-pirrol, respectivamente. A imunorreatividade com HNE-pirrol foi também detectada em placas ateroscleróticas (Salomon e col., 2000). Considerando ainda que a reação de HNE com resíduos de lisina em proteínas, levando à formação de pirróis, representa apenas uma pequena fração do total das modificações geradas em proteínas por HNE, pode-se imaginar que seja gerada em nosso organismo concentração desse e outros aldeídos suficiente para danificar uma série de biomoléculas. Vários outros estudos mostram a presença de proteínas modificadas por HNE *in vivo* em diferentes amostras de tecido humano, incluindo aorta com lesões ateroscleróticas (Uchida e col., 1995), neurônios em doença de Parkinson (Yoritaka e col., 1996), carcinomas de célula renal (Okamoto e col., 1994), depósitos de amilóide em amiloidose sistêmica (Ando e col., 1997) e células trofoblásticas de placentas pré-eclâmpticas (Morikawa e col., 1997). Adutos de HNE e outros aldeídos com bases de DNA também foram detectados *in vivo*, como exposto no item 1.2.5 da *Introdução*.

5.2. Danos em DNA induzidos por trans,trans-2,4-decadienal

Nossas análises de fragmentação do DNA das células CV1-P incubadas com uma concentração citotóxica de DDE (100 μM ; $21,6 \pm 3,2\%$ de células viáveis após 5 horas) revelaram que, apesar de haver alteração no metabolismo celular durante esse período, o DNA não é fragmentado. A fragmentação observada após 24 horas deve ser decorrente da perda de viabilidade das células. Com a grande depleção do nível de glutathiona observada após 8 horas de incubação com DDE (65 μM e provavelmente também com 100 μM), o DNA deve ficar mais susceptível ao ataque por espécies oxidantes, ocorrendo quebras e formação de sítios abásicos por depurinação espontânea ou reparo das bases modificadas. Na presença de estresse oxidativo pode haver também a ativação de endonucleases pelo aumento da concentração intracelular de cálcio. A associação entre fragmentação do DNA e alterações na homeostase intracelular de cálcio foi demonstrada em vários modelos experimentais (Nicoitera e col., 1992). A incubação das células com concentrações não citotóxicas de DDE (6 μM , 12,5 μM , 25 μM e 50 μM) por 3 horas também não revelou a ocorrência de quebras e/ou formação de sítios abásicos. Tais observações nos levaram a pensar em duas hipóteses: i) alvos primários de ataque por DDE não se localizam no DNA,

não se podendo dizer que esse aldeído tem uma ação genotóxica; ii) o DDE ataca as bases do DNA levando à formação de adutos que são ou eficientemente reparados, ou não reparados e acumulados no DNA de modo a que não se possa detectar a presença dessas lesões através da formação de sítios abásicos (álcali-lábeis).

Napez e colaboradores (1996) observaram fragmentação do DNA induzida por DDE após 24 horas de incubação de células de eritroleucemia humana (linhagem HEL TIB 180) com uma concentração de aldeído muito inferior a que utilizamos (5 μM). Também nesse caso a fragmentação observada deve ter sido decorrente da perda de viabilidade das células, uma vez que após esse período não havia mais células viáveis (Napez e col., 1996).

Yang e Schaich (1996) verificaram indução de fragmentação do DNA após incubação do plasmídeo pBR 322 com DDE e outros aldeídos insaturados. O dano observado na presença de DDE foi maior que na dos outros aldeídos testados (2-hexenal, 2-heptenal, 2-octenal, 2-nonenal, 2,4-heptadienal e 2,4-nonadienal). Foi sugerido que essa fragmentação poderia ser decorrente do ataque dos radicais resultantes da oxidação de aldeídos insaturados ao DNA (Yang e Schaich, 1996).

Quebras de fita simples foram observadas em DNA de hepatócitos de ratos expostos a formaldeído ou 4-oxo-4-(3-pyridyl)-butanal por 4 horas, tendo sido observado um efeito protetor exercido por GSH (Demkowicz-Dobrzanski e Castonguay, 1992). Também foram detectadas essas quebras em DNA de hepatócitos de ratos e células linfoblastóides humanas (Namalva) expostas a acroleína, crotonaldeído e 2-hexenal por 1 hora, sendo que os danos em hepatócitos foram menores devido à maior capacidade de detoxificação dessas células (Eisenbrand e col., 1995). Em todos os casos, os aldeídos induziram grande depleção do nível de GSH intracelular e no último estudo foi verificado que para a detecção de quebras de fita simples era necessário haver uma redução do nível de GSH para valores menores que 20% do nível presente em células não incubadas. Nesse estudo não foi observada a indução de quebras de fita simples por 2,6-nonadienal (Eisenbrand e col., 1995).

Apesar de não observarmos fragmentação do DNA, detectamos a presença de produtos fluorescentes ($\lambda_{\text{exc.}} = 300 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em.}} = 420 \text{ nm}$), produtos não fluorescentes que absorvem em 225 nm e produtos com atividade eletroquímica (potencial = +600 mV) no DNA das células incubadas com DDE, os quais estavam ausentes no DNA das células

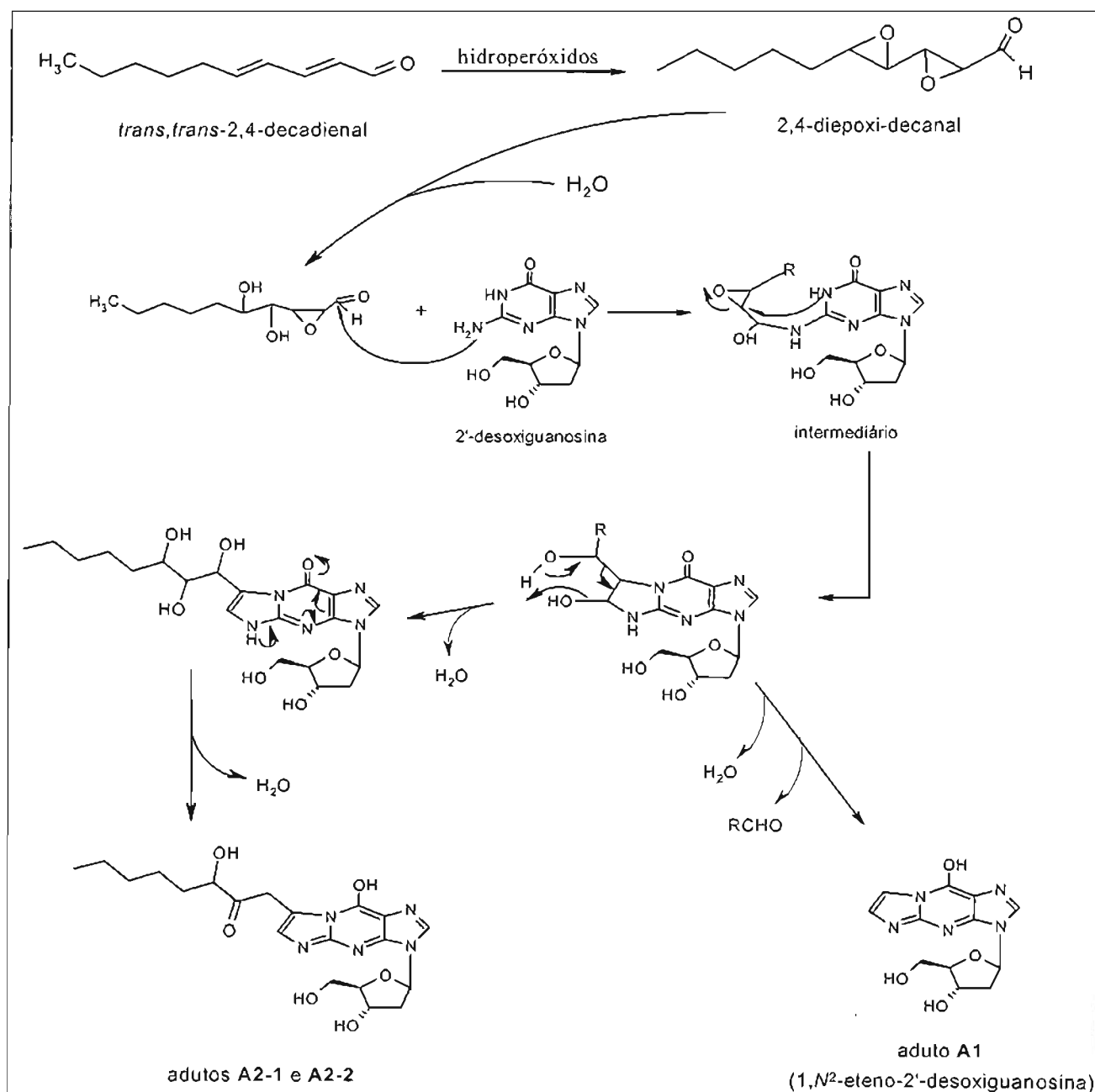
controles (**figuras 4.9 – 4.13**). As incubações foram feitas com concentrações de DDE e por períodos de tempo que não levavam à perda de viabilidade celular. Desta forma, pudemos constatar que esse aldeído, ou algum produto do seu metabolismo, reage com o DNA, possuindo além de uma ação citotóxica, também uma ação genotóxica.

Os espectros de fluorescência que obtivemos a partir do DNA das células incubadas com DDE apresentaram um pico de emissão em 420 nm quando a excitação foi feita em 335 nm, estando de acordo com o que já havia sido observado para a reação de DDE com DNA *in vitro* (Hasegawa e col., 1988 e 1989; Medeiros e col., 1992 e 1995). De fato, cinco etenoadutos fluorescentes ($\lambda_{exc.} = 310$ nm; $\lambda_{em.} = 420$ nm) resultantes da reação de epóxidos do DDE com 2'-desoxiadenosina *in vitro*, correspondendo a ϵ Ado sem e com diferentes cadeias laterais substituintes, foram recentemente caracterizados em nosso laboratório (Carvalho e col., 1998 e 2000). Considerando que enzimas microsossomais e oxidantes biológicos, tais como hidroperóxidos de ácidos graxos e H_2O_2 , podem epoxidar aldeídos α,β -insaturados (Patel e col., 1980; Chen e Chung, 1996), é possível que a formação desses etenoadutos no DNA das células incubadas com DDE contribua para a fluorescência que observamos. Não existem estudos de reparo de etenoadutos com cadeias laterais substituintes, mas sabemos que ϵ A é substrato para a enzima de reparo alquilpurina-DNA-*N*-glicosilase de células de mamífero (Singer e Hang, 1999; Saporbaev e Laval, 1999). Em experimentos feitos com oligonucleotídeos *in vitro*, a velocidade de remoção de ϵ A pela enzima 3-metiladenina-DNA-glicosilase humana girou em torno de 200 fmol/min. Como outros mecanismos de reparo, por exemplo por excisão de nucleotídeos, também devem atuar sobre essas lesões (Langouët e col., 1998), a redução na intensidade de fluorescência do DNA que observamos com o passar do tempo após a remoção do meio de cultura contendo o aldeído, pode ser decorrente do reparo desses etenoadutos.

Ao observarmos os espectros de absorbância de dois produtos isolados do DNA das células incubadas com DDE (ausentes nas células controles), verificamos que o DDE poderia estar reagindo também com 2'-desoxiguanosina (**figura 4.13**). De fato, nossos dados de incubação *in vitro* de 2'-desoxiguanosina com DDE na presença de peróxidos nos revelaram que esse aldeído, quando oxidado, reage com dGuo levando à formação de vários produtos. Seis desses produtos foram isolados (**A1, A2-1, A2-2, A3, A4 e A5**), dentre os quais três (**A1, A2-1 e A2-2**) foram caracterizados com base em extensiva análise

espectroscópica. Verificamos que o aduto **A1** corresponde a um tautômero do já conhecido 1,*N*²-eteno-2'-desoxiguanosina, 3-(2'-desoxi-β-D-eritro-pentafuranosil)-5,9-dihidro-9H-imidazo[2,1-*i*]purina-9-hidroxi, descrito na literatura como sendo formado a partir da reação *in vitro* de dGuo com epóxidos da acroleína, crotonaldeído e HNE (Goldschmidt e col., 1968; Nair e Offerman, 1985; Sodum e Chung, 1988). Os adutos **A2-1** e **A2-2** são dois novos etenoadutos diastereoisoméricos possuindo uma cadeia lateral com um grupo carbonila e um grupo hidroxila, 1-{{[3-(2'-desoxi-β-D-eritro-pentafuranosil)-5,9-dihidro-9H-imidazo[2,1-*i*]purina-9-hidroxi]-7-yl}-2-one-3-octanol.

Uma das possíveis vias para formação desses adutos é o mecanismo já descrito para reações de compostos carbonílicos epoxidados com bases de ácidos nucleicos (Nair e Offerman, 1985; Sodum e Chung, 1988; Carvalho e col., 2000). Para a formação do aduto **A1** poderia haver a epoxidação inicial das duas duplas ligações do aldeído ou apenas da dupla ligação em C2. Para a formação dos adutos **A2-1** e **A2-2** seria necessária a epoxidação inicial das duas duplas ligações com subsequente hidrólise do grupo epóxido em C4. A hidrólise seletiva desse grupo epóxido foi proposta com base no trabalho de caracterização de um dos etenoadutos de 2'-desoxiadenosina com cadeia lateral feito pelo estudante Valdemir Carvalho em nosso laboratório (Carvalho e col., 2000). Ele verificou que o aduto que apresenta o grupo epóxido na cadeia lateral não pode ser convertido para o aduto que apresenta o diol resultante da hidrólise desse epóxido. Portanto, o diol só poderia ser formado a partir da hidrólise do epóxido antes de haver a reação com a base. O ataque do grupo amino exocíclico do nucleosídeo ao carbono da carbonila do epoxi-aldeído, seguido por ciclização via ataque nucleofílico ao carbono interno do grupo epóxido em C2 pelo N-1 e eliminação de água, através do rearranjo de pinacol envolvendo os átomos ligados aos carbonos 10 e 11, levaria à formação dos etenoadutos **A2-1** e **A2-2**. A eliminação adicional da cadeia lateral levaria à formação do aduto **A1** (esquema 5.2).



Esquema 5.2: Mecanismo 1 proposto para a formação de adutos 1,N²-eteno-2'-desoxiguanosina por DDE.

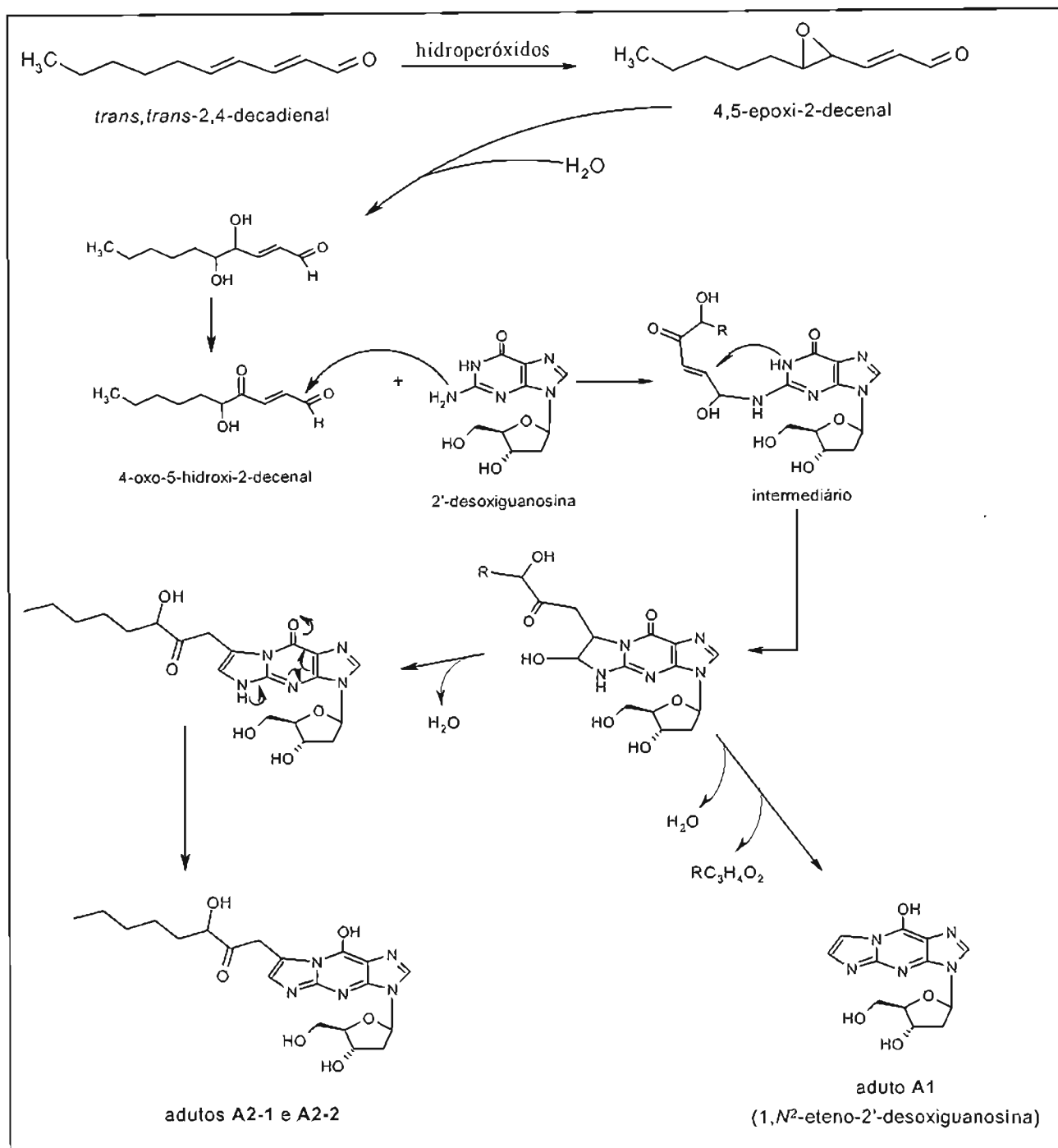
Recentemente foi identificado um novo produto da peroxidação lipídica: 4-oxo-2-nonenal (Rindgen e col., 1999). A reação desse produto diretamente com 2'-desoxiguanosina (Rindgen e col., 1999) e 2'-desoxiadenosina (Lee e col., 2000) levou à formação de etenoadutos substituídos contendo um grupo carbonila na cadeia lateral na posição correspondente a que encontramos nos adutos A2-1 e A2-2. Uma reação análoga ocorre entre 4-oxo-2-pentenal (produto da degradação atmosférica de tolueno, da solvólise

de α -acetoxi-*N*-nitrosopiperidina e metabólito de 2-metilfurano) e 2'-desoxiguanosina, levando à formação do etenoaduto correspondente (Hecht e col., 1992; Liu e col., 1996). Em um trabalho anteriormente realizado, em que foi investigada a formação de adutos entre proteínas e produtos da peroxidação lipídica, utilizando *n*-butilamina e 4-hidroxi-2-nonenal, foi descrita a formação de um produto que parecia surgir a partir da oxidação de 4-hidroxi-2-nonenal para o seu análogo 4-oxo-2-nonenal. A formação do produto era acelerada quando 4-hidroxi-2-nonenal e *n*-butilamina reagiam na presença de Cu^{2+} e não detectada na ausência de oxigênio. A reação foi reproduzida a partir da incubação de *n*-butilamina com 4-oxo-2-nonenal (Xu e Sayre, 1998). Rindgen e colaboradores (1999) consideraram que, além da possível formação de 4-oxo-2-nonenal a partir da oxidação de 4-hidroxi-2-nonenal, mediada por metais de transição ou hidroperóxidos presentes no solvente, esse produto poderia também ser formado diretamente a partir de um intermediário da decomposição de hidroperóxidos lipídicos. Essa via para a formação de 4-hidroxi-2-nonenal a partir de ácidos graxos poliinsaturados ω -6 foi originalmente proposta por Pryor e Porter (1990).

Um outro aldeído identificado como produto da peroxidação de lipídios microssomais de fígado induzida por NADPH-Fe^{2+} é o 4,5-dihidroxi-2-decenal (Benedetti e col., 1984b), podendo ser formado a partir da hidrólise do 4,5-epoxi-2-decenal detectado em diferentes sistemas (Grosch, 1993) e identificado como um dos produtos da decomposição do ácido 12,13(*E*)-epoxi-9-hidroperoxi-10-octadecenoico, um intermediário da oxidação do ácido linoleico (ω -6) (Gardner e Selke, 1984). Analogamente, 4,5-epoxi-2-heptenal foi identificado como produto da oxidação de ácidos graxos poliinsaturados ω -3 (Frankel e col., 1981). Existem trabalhos mostrando que os 4,5-epoxi-2-alcenais são capazes de modificar aminoácidos rapidamente e que essas reações podem contribuir para a produção *in vivo* de pigmentos macromoleculares marrons com características fluorescentes do tipo lipofucsina (Hidalgo e Zamora, 1993; Zamora e Hidalgo, 1995; Hidalgo e Zamora, 2000).

Considerando os dados acima apresentados, nos parece também concebível uma outra via para formação dos etenoadutos que caracterizamos. Segundo esse outro mecanismo (**esquema 5.3**), teríamos inicialmente apenas a epoxidação, catalisada por peróxidos, da dupla ligação em C4, obtendo-se o 4,5-epoxi-2-decenal. Dependendo das condições utilizadas, a monoepoxidação pode ocorrer especificamente apenas na dupla ligação envolvendo o carbono C4 (Zamora e Hidalgo, 1995). A subsequente hidrólise desse

epóxido levaria à formação do 4,5-dihidroxi-2-decenal. Como ocorre com o 4-hidroxi-2-nonenal (Xu e Sayre, 1998; Rindgen e col., 1999), teríamos a oxidação do álcool em C4 para cetona, obtendo-se um novo produto de oxidação do DDE, que seria o 4-oxo-5-hidroxi-2-decenal. Este produto reagiria então com 2'-desoxiguanosina segundo o mecanismo descrito para a reação de 4-oxo-2-nonenal com dGuo (Rindgen e col., 1999). O ataque do grupo amino exocíclico do nucleosídeo ao carbono da carbonila do 4-oxo-5-hidroxi-2-decenal, seguido por ciclização via ataque nucleofílico do N-1 ao C2 e eliminação de água levaria à formação dos etenoadutos **A2-1** e **A2-2**. A eliminação adicional da cadeia lateral levaria à formação do aduto **A1** (**esquema 5.3**). Investigações para a comprovação desse mecanismo podem ser feitas incubando-se diretamente 2'-desoxiguanosina com 4,5-dihidroxi-2-decenal e analisando-se os produtos formados.



Esquema 5.3: Mecanismo 2 proposto para a formação de adutos 1,N²-eteno-2'-desoxiguanosina por DDE.

Observamos as mesmas modificações em 2'-desoxiguanosina quando DNA de timo de bezerro foi incubado com DDE na presença de peróxidos *in vitro*. Para as análises de formação e quantificação dos adutos em DNA desenvolvemos um ensaio sensível e seletivo consistindo em purificação prévia dos adutos por HPLC na presença de padrões internos isotópicos ($[^{15}\text{N}_5]\text{A1}$ e $[^{15}\text{N}_5]\text{A2}$) seguida por detecção por espectrometria de

massas com monitoramento de reação múltipla. Com a sensibilidade que obtivemos conseguimos detectar 4 adutos A1/10⁸ dGuo e 5 adutos A2/10⁷ dGuo (relação sinal/ruído = 3), os quais são bons limites para a detecção desses adutos em sistemas biológicos (Poirier e col., 2000). Acreditamos que esse limite de sensibilidade possa ser ainda melhorado se reduzirmos o diâmetro da coluna acoplada ao espectrômetro de massas, como tem sido demonstrado em alguns trabalhos (Yen e col., 1996; Vanhoutte e col., 1997).

O aduto 1,N²-eteno-2'-desoxiguanosina foi sugerido por Sodem e Chung (1988) como um possível marcador de danos ao DNA induzidos por aldeídos α,β -insaturados epoxidados. No entanto, apesar de algumas tentativas de detecção desse etenoaduto em sistemas biológicos (Foiles e col., 1993), a mesma não foi possível, provavelmente devido ao limite de sensibilidade não tão adequado do método utilizado (1aduto/2,2 x 10⁵ bases). Em um trabalho realizado por Müller e colaboradores (1997) foi desenvolvida uma metodologia de HPLC acoplado à espectrometria de massas para detecção de 1,N²-etenoguanina em DNA incubado com 2-clorooxirano *in vitro*. Entretanto, o limite de detecção que eles obtiveram foi de 4 adutos/10⁶ bases (Müller e col., 1997), o qual também não era adequado para a investigação da sua presença em sistemas biológicos.

Os dados que obtivemos a partir da análise do DNA das células CV1-P incubadas com DDE nos mostram claramente que a formação dos adutos A2 é favorecida em detrimento da formação do aduto A1 (figuras 4.51 e 4.52; tabelas 4.15 e 4.16). Chen e Chung (1996) verificaram que o rendimento do etenoaduto não substituído (ϵ dAdo) formado a partir da reação de 2'-desoxiadenosina com o epóxido do 4-hidroxi-2-nonenal aumenta com o aumento da basicidade do meio de reação. Quando as reações foram feitas em pH 7,4, o principal etenoaduto formado foi o que apresentava a cadeia lateral substituinte. Com base nessas observações, eles predisseram que os etenoadutos substituídos seriam formados em DNA *in vivo* em um nível mais alto que os não substituídos (Chen e Chung, 1996). De fato, foi o que observamos com as células. No caso da incubação de DNA com DDE *in vitro* utilizamos pH 9,4, o que deve ter permitido a formação dos etenoadutos não substituídos em concentração bem próxima da dos etenoadutos substituídos (tabela 4.14). É preciso no entanto considerar que, apesar de não termos verificado um aumento do nível de 1,N²-eteno-2'-desoxiguanosina no DNA das células incubadas com DDE em relação ao controle, este é, do nosso conhecimento, o primeiro relato de ocorrência de um nível basal desse etenoaduto. O fato de termos detectado um nível basal do aduto A1 e não

dos adutos **A2** pode ser explicado pela possibilidade de formação do aduto **A1** por diferentes substâncias eletrofílicas geradas endogenamente, enquanto que os adutos **A2** são formados provavelmente apenas pela reação de epóxidos do DDE e/ou 4-oxo-5-hidroxi-2-decenal com dGuo.

Conclusão e Perspectivas

6. Conclusão e Perspectivas

Um número apreciável de agentes mutagênicos e carcinogênicos estruturalmente diversos podem formar adutos exocíclicos com bases dos ácidos nucleicos, havendo um acúmulo de evidências na literatura relacionando tais adutos com efeitos genotóxicos (Poirier e col., 2000).

O interesse crescente nos etenoadutos pró-mutagênicos como possíveis biomarcadores de risco de câncer associado com uma série de fatores, como ingestão de dieta rica em gordura, estresse oxidativo e processos inflamatórios/infecciosos crônicos, bem como em investigações do efeito protetor exercido por dietas ricas em antioxidantes, tem incentivado a caracterização química de vários deles para que possam servir como padrões para verificação de sua ocorrência *in vivo* (Bartsch, 2000; Poirier e col., 2000). Os mecanismos moleculares relacionados à mutagenicidade dos etenoadutos não substituídos, no que se refere à indução de mutações por substituição de pares de bases, são relativamente bem conhecidos. Dados de dosagem em roedores expostos a haletos de vinila e espectros de mutação em tumores induzidos por cloreto de vinila em humanos e ratos, e por uretano em camundongos, dão um forte suporte para a indicação de que os etenoadutos são potentes iniciadores da carcinogênese (Barbin, 2000).

Como relatamos, o DDE é um importante aldeído presente nos alimentos, além de ser gerado endogenamente como produto da peroxidação lipídica. Neste trabalho descrevemos: (I) a detecção e isolamento de 6 adutos resultantes da reação de DDE com 2'-desoxiguanosina; (II) a caracterização química completa de 3 desses adutos, sendo que dois deles são produtos diastereoisoméricos inteiramente novos descritos pela primeira vez na literatura; (III) dois possíveis mecanismos para formação desses adutos foram propostos; (IV) desenvolvemos um método baseado em LC/ESI/MS-MS para a detecção e quantificação ultrasensível dos adutos (< 20 fmol); (V) o método desenvolvido permitiu a detecção e quantificação dos adutos formados em DNA incubado com DDE *in vitro* e em DNA de células de mamífero expostas a esse aldeído; (VI) a exposição das células ao 2,4-decadienal, além de levar à formação de adutos, provoca alteração dos níveis de GSH acompanhada por perda de viabilidade celular e fragmentação do DNA após 24 horas.

Em resumo, os dados aqui apresentados contribuem para um melhor entendimento dos efeitos genotóxicos associados com a exposição a aldeídos α,β insaturados tanto por via exógena (por exemplo, em dieta rica em gordura) como por via endógena (peroxidação lipídica). Ressaltamos que os etenoadutos têm sido apontados como bons marcadores de exposição a esses compostos, muitos deles já comprovadamente com ação mutagênica. Entretanto, a relação entre estrutura química e função é essencial para que se possa estudar os seus efeitos biológicos.

Uma vez tendo caracterizadas diferentes lesões (etenoadutos) induzidas em DNA por DDE e tendo estabelecida uma metodologia bastante seletiva e sensível para a sua detecção (LC/ESI/MS-MS), a próxima etapa, fundamental para determinarmos a sua importância biológica, é a detecção e quantificação das mesmas em sistemas *in vivo* não expostos e expostos a situações que induzam oxidação (poluição, alimentação, infecções, etc). A verificação da ocorrência dessas lesões em DNA *in vivo* é o primeiro passo para que se possa considerá-las marcadores de exposição a produtos de peroxidação lipídica tanto de origem endógena como exógena. Além disso, investigar as possíveis propriedades mutagênicas das lesões com cadeia lateral substituinte é passo determinante para a avaliação do seu papel na etiologia de diversos tipos de câncer.

Precisamos ainda considerar que as substâncias eletrofílicas podem reagir com muitas moléculas em uma célula e podem induzir uma gama de respostas que não sejam necessariamente dependentes de danos ao DNA (Berlett e Stadtman, 1997). É sabido que radicais de oxigênio e 4-hidroxi-2-nonenal afetam vias de transdução de sinal e fatores de transcrição (por exemplo, NF κ B) e alteram a cinética do ciclo celular (Karin, 1999; Page e col., 1999). Alguns desses efeitos podem ser resultantes de sinalização induzida por danos ao DNA, mas outros podem não ser. Assim, um grande desafio para o futuro da pesquisa nesta área será a busca da integração do conhecimento existente sobre as moléculas indutoras de danos, os mecanismos de defesa contra as mesmas e as conseqüências do seu ataque ao genoma com as vias de transdução de sinal intra- e intercelular, de modo que sejam definidos os passos importantes na etiologia dos diversos tipos de câncer.

Referências Bibliográficas

7. Referências Bibliográficas

- Abernath, C.O., Philpot, R.M., Guthrie, F.E. e Hodgson, E. (1971) Inductive effects of 1,1,1-trichloro-2,2-bis(para chlorophenyl)ethane (DDT), phenobarbital, and benzpyrene on microsomal cytochrome P450, ethyl isocyanide spectra, and metabolism in-vivo of zoxazolamine and hexobarbital in mouse. *Biochem. Pharmacol.* **20**, 2395-&.
- Agostinelli, E., Przybytkowski, E. e Averill-Bates, D.A. (1996) Glucose, Glutathione, and cellular response to spermine oxidation products. *Free Rad. Biol. Med.* **20**, 649-656.
- Ahmad, S. (1995) *Oxidative stress and antioxidant defenses in biology*. ed.1, Chapman & Hall, New York.
- Aikens, J. e Dix, J.A. (1991) Perhydroxyl radical (HOO^{*}) initiated lipid peroxidation- the role of fatty-acid hydroperoxides. *J. Biol. Chem.* **266**, 15091-15098.
- Akasaka, S. e Guengerich, F.P. (1999) Mutagenicity of site-specifically located 1,N²-ethenoguanine in Chinese hamster ovary cell chromosomal DNA. *Chem. Res. Toxicol.* **12**, 501-507.
- Alarcon, R.A. (1970) Acrolein IV. Evidence for the formation of cytotoxic aldehyde acrolein from enzymatically oxidated spermine and spermidine. *Arch. Biochem. Biophys.* **137**, 365-372.
- Alin, P., Danielson, U.H. e Mannervik, B. (1985) 4-Hydroxyalk-2-enals are substrates for glutathione transferase. *FEBS Lett.* **179**, 267-270.
- Almosnino, A.M. e Belin, J.M. (1991) Apple pomace: An enzyme system for producing aroma compounds from polyunsaturated fatty acids. *Biotechnol. Lett.* **13**, 893-898.
- Alper, T. e Howard-Flanders, P. (1956) Role of oxygen in modifying the radiosensitivity of *E.coli* B. *Nature* **178**, 978-979.
- Ambs, S., Bennett, W.P., Merriam, W.G., Ogunfusika, M.O., Oser, S.M., Harrington, A.M., Shields, P.G., Felley-Bosco, E., Hussain, S.P. e Harris, C.C. (1999) Relationship between p53 mutations and inducible nitric oxide synthase expression in human colorectal cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **91**, 86-88.
- Ames, B.N. (1989) Endogenous DNA damage as related to cancer and aging. *Mutat. Res.* **214**, 41-46.
- Ando, Y., Nyhlin, N., Suhr, O., Holmgren, G., Uchida, K., El Sahly, M., Yamashita, T., Terasaki, H., Nakamura, M., Uchino, M. e Ando, M. (1997) Oxidative stress is found in amyloid deposits in systemic amyloidosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **232**, 497-502.
- Andrianarison, R.-H., Rabinovitch-Chable, H. e Beneytout, J.L. (1991) Oxodiene formation during the *Vicia sativa* lipoxygenase-catalysed reaction: occurrence of dioxygenase and fatty acid lyase activities associated in a single protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **180**, 1002-1009.

- Apruzzese, W.A. e Vouros, P. (1998) Analysis of DNA adducts by capillary methods coupled to mass spectrometry: a perspective. *J. Chromatogr. A* **794**, 97-108.
- Ares, M.P.S., Kallinn, B., Eriksson, P. e Nilsson, J. (1995) Oxidized LDL induces transcription factor activator protein-1 but inhibits activation of nuclear factor-kappa B in human vascular smooth-muscle cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **15**, 1584-1590.
- Augusto, O., Hix, S., Morais, M.S. e Vasquez-Vivar, J. (1995) Free radical reactions: formation of adducts with biomolecules and their biological significance. *Ciência e Cultura* **47**, 280-287.
- Aust, S.D., Roerig, D.L. e Pederson, T.C. (1972) Evidence for superoxide generation by NADPH-cytochrome c reductase of rat liver microsomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **47**, 1133-1137.
- Awad, J.A., Morrow, J.D., Takahashi, K. e Roberts, L.J.I. (1993) Identification of non-cyclooxygenase-derived prostanoid (F₂-isoprostane) metabolites in human urine and plasma. *J. Biol. Chem.* **268**, 4161-4169.
- Aznar, J., Santos, M.T., Valles, J. e Sala, J. (1983) Serum malondialdehyde-like material (MDA-LM) in acute myocardial infarction. *J. Clin. Pathol.* **36**, 712-715.
- Baccanari, D.P. (1978) Coupled oxidation of NADPH with thiols at neutral pH. *Arch. Biochem. Biophys.* **191**, 351-357.
- Bailey, H.H., Gipp, J.J., Ripple, M., Wilding, G. e Mulcahy, R.T. (1992) Increase in γ -glutamylcysteine synthetase activity and steady-state messenger RNA levels in melphalan-resistant DU-145 human prostate carcinoma cells expressing elevated glutathione levels. *Cancer Res.* **52**, 5115-5118.
- Ballou, D., Palmer, G. e Masev, V. (1969) Direct demonstration of superoxide anion production during the oxidation of reduced flavin and of its catalytic decomposition by erythrocyte. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **36**, 898-904.
- Balmain, A. e Harris, C.C. (2000) Carcinogenesis in mouse and human cells: parallels and paradoxes. *Carcinogenesis* **21**, 371-377.
- Bannai, S., Sato, H., Ishii, T. e Sugita, Y. (1989) Induction of cystine transport activity in human-fibroblasts by oxygen. *J. Biol. Chem.* **264**, 18480-18484.
- Bao, M.L., Barbieri, K., Burrini, D., Griffini, O. e Pantani, F. (1997) Determination of trace levels of taste and odor compounds in water by microextraction and gas chromatography ion trap detection mass spectrometry. *Water Res.* **31**, 1719-1727.
- Barber, D.J.W. e Thomas, J.K. (1978) Reactions of radicals with lecithin bilayers. *Radiat. Res.* **74**, 51-65.
- Barbin, A. (2000) Etheno-adduct-forming chemicals: from mutagenicity testing to tumor mutation spectra. *Mutat. Res.* **462**, 55-69.

- Barbin, A., Brésil, H., Croisy, A., Jacquignon, P., Malaveille, C., Montesano, R. e Bartsch, H. (1975) Liver-microsome-mediated formation of alkylating agents from vinyl bromide and vinyl chloride. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **67**, 596-603.
- Barhoumi, R., Bowen, J.A., Stein, L.S., Echols, J. e Burghardt, R.C. (1993) Concurrent analysis of intracellular GSH content and gap junctional intercellular communication. *Cytometry* **14**, 747-756.
- Barrera, G., Pizzimenti, S., Serra, A., Ferretti, C., Fazio, V.M., Saglio, G. e Dianzani, M.U. (1996) 4-Hydroxynonenal specifically inhibits c-myc but does not affect c-fos expressions in HL-60 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **227**, 589-593.
- Bartsch, H. (1996) DNA adducts in human carcinogenesis: etiological relevance and structure-activity relationship. *Mutat. Res.* **340**, 67-79.
- Bartsch, H. (1999) Keynote address: Exocyclic adducts as new risk markers for DNA damage in man. In: *Exocyclic DNA adducts in mutagenesis and carcinogenesis* (Singer, B. e Bartsch, H., eds), IARC Sci. Publ. **150**, Lyon, IARC, 1-16.
- Bartsch, H. (2000) Studies on biomarkers in cancer etiology and prevention: a summary and challenge of 20 years of interdisciplinary research. *Mutat. Res.* **462**, 255-279.
- Bartsch, H., Barbin, A., Marion, M.-J., Nair, J. e Guichard, Y. (1994) Formation, detection, and role in carcinogenesis of ethenobases in DNA. *Drug Metab. Rev.* **26**, 349-371.
- Baruchel, S., Wang, T., Farah, R., Jamali, M. e Batist, G. (1995) *In vivo* selective modulation of tissue glutathione in a rat mammary carcinoma model. *Biochem. Pharmacol.* **50**, 1505-1508.
- Basu, A.K. e Marnett, L.J. (1983) Unequivocal demonstration that malondialdehyde is a mutagen. *Carcinogenesis* **4**, 331-333.
- Basu, A.K., Wood, M.L., Niedernhofer, L.J., Ramos, L.A. e 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.
- Basu, S. (1998) Metabolism of 8-iso-prostaglandin F_{2α}. *FEBS Lett.* **428**, 32-36.
- Becker, D.A. (1999) Diagnostic and therapeutic applications of azulenyl nitrene spin traps. *Cell. Mol. Life Sci.* **56**, 626-633.
- Beckman, J.S. e Koppenol, W.H. (1996) NO^{*}, O₂^{•-} and ONOO⁻: the good, the bad, and the ugly. *Am. J. Physiol.* **271**, C1424.
- Beckman, J.S., Beckman, T.W., Chen, J., Marshall, P.A. e Freeman, B.E. (1990) Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 1620-1624.

- Beckman, K.B. e Ames, B.N. (1999) Endogenous oxidative damage of mtDNA. *Mutat. Res.* **424**, 51-58.
- Benamira, M., Johnson, K., Chaudhary, A., Bruner, K., Tibbetts, C. e Marnett, L.J. (1995) Induction of mutations by replication of malondialdehyde-modified M13 DNA in *Escherichia coli*: determination of the extent of DNA modification, genetic requirements for mutagenesis, and types of mutations induced. *Carcinogenesis* **16**, 93-99.
- Benamira, M., Singh, U. e Marnett, L.J. (1992) Site-specific frameshift mutagenesis by a propanodeoxyguanosine adduct positioned in the (CpG)₄ hot-spot of *Salmonella typhimurium* hisD3052 carried on an M13 vector. *J. Biol. Chem.* **267**, 22392-22400.
- Benedetti, A., Barbieri, L., Ferrali, M., Casini, A.F., Fulceri, R. e Comporti, M. (1981) Inhibition of protein synthesis by carbonyl compounds (4-hydroxyalkenals) originating from the peroxidation of liver microsomal lipids. *Chem. Biol. Interact.* **35**, 331-340.
- Benedetti, A., Comporti, M. e Esterbauer, H. (1980). Identification of 4-hydroxynonenal as a cyto-toxic product originating from the peroxidation of liver microsomal lipids. *Biochim. Biophys. Acta* **620**, 281-296.
- Benedetti, A., Comporti, M., Fulceri, R. e Esterbauer, H. (1984b) Cytotoxic aldehydes originating from the peroxidation of liver microsomal lipids. *Biochim. Biophys. Acta* **792**, 172-181.
- Benedetti, A., Fulceri, R. e Comporti, M. (1984a) Inhibition of calcium sequestration activity of liver microsomes by 4-hydroxyalkenals originating from the peroxidation of liver microsomal lipids. *Biochim. Biophys. Acta* **793**, 489-493.
- Berhane, K. e Mannervik, B. (1990) Inactivation of the genotoxic aldehyde acrolein by human glutathione transferases of classes alpha, mu, and pi. *Mol. Pharmacol.* **37**, 251-254.
- Berlett, B.S. e Stadtman, E.R. (1997) Protein oxidation in aging, disease and oxidative stress. *J. Biol. Chem.* **272**, 20313-20316.
- Bizub, D., Wood, A.W. e Skalka, A.M. (1986) Mutagenesis of the Ha-ras oncogene in mouse skin tumors induced by polycyclic aromatic hydrocarbons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 6048-6052.
- Boeve, J.L., Gfeller, H., Schlunegger, U.P. e Francke, W. (1997) The secretion of the ventral glands in *Hoplocampa* sawfly larvae. *Biochem. Syst. Ecol.* **25**, 195-201.
- Boilly, B. Vercoutter-Edouart, A.S., Hondermarck, H., Nurcombe, V. e Le Bourhis, X. (2000) FGF signals for cell proliferation and migration through different pathways. *Cytok. Growth Factor Rev.* **11**, 295-302.
- Boosfeld, J. e Vitzthum, O.G. (1995) Unsaturated aldehydes: identification from green coffee. *J. Food Sci.* **60**, 1092-1096.

- Boveris, A. (1977) Mitochondrial production of superoxide radical and hydrogen peroxide. *Adv. Exp. Med. Biol.* **78**, 67-82.
- Boveris, A. e Chance, B. (1973) The mitochondrial generation of hydrogen peroxide: general properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem. J.* **134**, 707-716.
- Boveris, A., Cadenas, E. e Stoppani, A.O.M. (1976) Role of ubiquinone in the mitochondrial generation of hydrogen peroxide. *Biochem. J.* **156**, 435-444.
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Brambilla, G., Bassi, A.M., Faggin, P., Ferro, M., Finollo, R., Martelli, A., Sciabà, L. e Marinari, U.M. (1985) Genotoxic effects of lipid peroxidation products. In *Free Radicals in Liver Injury* (Poli, G., Cheesman, K. H., Dianzani, M. U., and Slater, T. F., Eds.) pp 59-70, IRL Press, Oxford, U.K.
- Brambilla, G., Sciaba, L., Faggin, P., Maura, A., Marinari, U.M., Ferro, M. e Esterbauer, H. (1986) Cytotoxicity, DNA fragmentation and sister-chromatid exchange in Chinese hamster ovary cells exposed to the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal and homologous aldehydes. *Mutat. Res.* **171**, 169-176.
- Brand, K., Eisele, T., Kreusel, U., Page, M., Page, S., Haas, M., Gerling, A., Kaltschmidt, C., Neumann, F.-J., Mackman, N., Baeuerle, P.A., Walli, A.K. e Neumeier, D. (1997) Dysregulation of monocytic nuclear factor-kappa B by oxidized low-density lipoprotein. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **17**, 1901-1909.
- Breimer, L.H. e Lindahl, T. (1984) DNA glycosylase activities for thymine residues damaged by ring saturation, fragmentation, or ring contraction are functions of endonuclease III in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **259**, 5543-5548.
- Brent, J.A. e Rumack, B.H. (1993) Role of free radicals in toxic hepatic injury. II. Are free radicals the cause of toxin-induced liver injury? *Clin. Toxicol.* **31**, 173-196.
- Brewer, M.S. e Vega, J.D. (1995) Detectable odor thresholds of selected lipid oxidation compounds in a meat model system. *J. Food Sci.* **60**, 592-595.
- Brophy, P.M. e Barrett, J. (1990) Detoxification of secondary products of lipid peroxidation in the cytosol of a mouse fibroblast cell line. *Biochem. Cell Biol.* **68**, 1288-1291.
- Brown, K., Buchmann, A. e Balmain, A. (1990) Carcinogen-induced mutations in the mouse c-Ha-ras gene provide evidence of multiple pathways for tumour progression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 538-542.
- Brown, K., Kemp, C. Burns, P. e Balmain, A. (1994) Importance of genetic alterations in tumor development. *Arch. Toxicol. (Suppl.)* **16**, 253-260.

- Buettner, G.R. (1993) The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, α -tocopherol and ascorbate. *Arch. Biochem. Biophys.* **300**, 535-543.
- Buffinton, G.D., Hunt, N.H., Cowden, W.B. e Clark, I.A. (1988) Detection of short-chain carbonyl products of lipid peroxidation from malaria-parasite (*Plasmodium vinckei*)-infected red blood cells exposed to oxidative stress. *Biochem. J.* **249**, 63-68.
- Bull, A.W. e Marnett, L.J. (1985) Determination of malonaldehyde by ion-pairing high performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.* **149**, 284-290.
- Bull, L.B., Culvenor, C.C.J. e Dick, A.T. (1968) The pyrrolizidine alkaloids. *Front. Biol.* **9**, 1-19.
- Burcham, P.C. (1988) Genotoxic lipid peroxidation products: a review of their DNA-damaging properties and role in the formation of endogenous DNA adducts. *Mutagenesis* **13**, 287-305.
- Burcham, P.C. (1999) Internal hazards: baseline DNA damage by endogenous products of normal metabolism. *Mutat. Res.* **443**, 11-36.
- Burcham, P.C. e Marnett, L.J. (1994) Site-specific mutagenesis by a propanodeoxyguanosine adduct carried on an M13 genome. *J. Biol. Chem.* **269**, 28844-28850.
- Burcham, P.C., e Harkin, L.A. (1999) Mutations at G:C base-pairs predominate after replication of peroxy radical-damaged pSP189 plasmids in human cells. *Mutagenesis* **14**, 135-140.
- Bürger, F., Krieg, P., Kinzig, A., Schurich, B., Marks, F. e Fürstenberger, G. (1999) Constitutive expression of 8-lipoxygenase in papillomas and clastogenic effect of lipoxygenase-derived arachidonic acid metabolites in keratinocytes. *Mol. Carcinog.* **24**, 108-118.
- Burger, R.M., Berkowitz, A.R., Peisach, A.J. e Horwitz, S.B. (1980) Origin of malondialdehyde from DNA degraded by Fe(II) bleomycin. *J. Biol. Chem.* **255**, 11832-11838.
- Burney, S., Niles, J.C., Dedon, P.C. e Tannenbaum, S.R. (1999) DNA damage in deoxynucleosides and oligonucleotides treated with peroxynitrite. *Chem. Res. Toxicol.* **12**, 513-520.
- Cadenas, E. (1995) Mechanisms of oxygen activation and reactive oxygen species detoxification. In *Oxidative stress and antioxidant defenses in biology*. ed. Ahmad, S., p.1-61, Chapman & Hall, New York.
- Cadenas, E. e Davies, K.J.A. (2000) Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Rad. Biol. Med.* **29**, 222-230.
- Cadenas, E., Müller, A., Brigelius, R., Esterbauer, H. e Sies, H. (1983) Effects of 4-hydroxynonenal on isolated hepatocytes. *Biochem. J.* **214**, 479-487.
- Cadet, J., Delatour, T., Douki, T., Gasparutto, D., Pouget, J.-P., Ravanat, J.L. e Sauvaigo, S. (1999) Hydroxyl radicals and DNA base damage. *Mutat. Res. Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* **424**, 9-21.

- Cadet, J., Douki, T. e Ravanat, J.L. (1997) Artifacts associated with the measurement of oxidized DNA bases. *Environ. Health Perspect.* **105**, 1034-1039.
- Cajelli, E., Ferraris, A. e Brambilla, G. (1987) Mutagenicity of 4-hydroxynonenal in V79 Chinese hamster cells. *Mutat. Res.* **190**, 169-171.
- Canonero, R., Martelli, A., Marinari, U.M. e Brambilla, G. (1990) Mutation induction in Chinese hamster lung V79 cells by five alk-2-enals produced by lipid peroxidation. *Mutat. Res.* **244**, 153-156.
- Capdevila, J., Parkhill, L., Chacos, N., Okita, R., Masters, B.S.S. e Estabrook, R.W. (1981) The oxidative metabolism of arachidonic acid by purified cytochromes P₄₅₀. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **101**, 1357-1363.
- Carr, A.C., McCall, M.R. e Frei, B. (2000) Oxidation of LDL by myeloperoxidase and reactive nitrogen species – reaction pathways and antioxidant protection. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **20**, 1716-1723.
- Carvalho, V. M., Asahara, F., Di Mascio, P., Arruda-Campos, Cadet, J. e Medeiros, M. H. G. (2000) Novel 1,N⁶-etheno-2'-deoxyadenosine adducts from lipid peroxidation products. *Chem. Res. Toxicol.* **13**, 397-405.
- Carvalho, V. M., Di Mascio, P., Arruda-Campos, I. P., Douki, T., Cadet, J. e Medeiros, M. H. G. (1998) Formation of 1,N⁶-etheno-2'-deoxyadenosine adducts by *trans,trans*-2,4-decadienal. *Chem. Res. Toxicol.* **11**, 1042-1047.
- Cerutti, P.A. (1985) Prooxidant states and tumor promotion. *Science* **227**, 375-381.
- Cha, Y.J. e Cadwallader, K.R. (1998) Aroma-active compounds in skipjack tuna sauce. *J. Agric. Food Chem.* **46**, 1123-1128.
- Chance, B., Sies, H. e Boveris, A. (1979) Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol. Rev.* **59**, 527-605.
- Chaudhary, A.K., Nokubo, M., Oglesby, T.D., Marnett, L.J. e Blair, I.A. (1995) Characterization of endogenous DNA adducts by liquid chromatography/electrospray ionization/tandem mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **30**, 1157-1166.
- Chaudhary, A.K., Nokubo, M., Reddy, R.G., Yeola, S.N., Morrow, J.D., Blair, I.A. e Marnett, L.J. (1994) Detection of endogenous malondialdehyde-deoxyguanosine adducts in human liver. *Science* **265**, 1580-1582.
- Cheeseman, K.H. (1993) Mechanisms and effects of lipid peroxidation. *Molec. Aspects Med.* **14**, 191-197.
- Chen, H.-J. C. e Chung, F.-L. (1996) Epoxidation of *trans*-4-hydroxy-2-nonenal by fatty acid hydroperoxides and hydrogen peroxide. *Chem. Res. Toxicol.* **9**, 306-312.

- Cheng, K.C., Cahill, D.S., Kasai, H., Nishimura, S. e Loeb, L.A. (1992) 8-Hydroxyguanine, an abundant form of oxidative DNA damage, causes G→T and A→C substitutions. *J. Biol. Chem.* **267**, 166-172.
- Cheng, K.C., Preston, B.D., Cahill, D.S., Dosanjh, M.K., Singer, B. e Loeb, L.A. (1991) The vinyl chloride DNA derivative *N*²,3-ethenoguanine produces G→A transitions in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 9974-9978.
- Cheng, S.C., Prakash, A.S., Pigott, M., Hilton, B.D., Lee, H., Harvey, R.G. e Dipple, A. (1988) A metabolite of the carcinogen 7,12-dimethylbenz(α)anthracene that reacts predominantly with adenine residues in DNA. *Carcinogenesis* **9**, 1721-1723.
- Chignell, C.F. (1979) Spin labeling in pharmacology. In *Spin Labeling*, v.2, ed. Berliner, L.J., p.223, Academic Press, New York.
- Chisolm, G.M. e Chai, Y.C. (2000) Regulation of cell growth by oxidized LDL. *Free Rad. Biol. Med.* **28**, 1697-1707.
- Chisolm, G.M. e Steinberg, D. (2000) The oxidative modification hypothesis of atherogenesis: an overview. *Free Rad. Biol. Med.* **28**, 1815-1826.
- Chung, F.-L. e Hecht, S.S. (1983) Formation of cyclic 1,*N*²-adducts by reaction of deoxyguanosine with alpha-acetoxy-*N*-nitrosopyrrolidine, 4-(carbthoxy-nitroamino) butanal, or crotonaldehyde. *Cancer Res.* **43**, 1230-1235.
- Chung, F.-L., Chen, H.-J. C. e Nath, R. G. (1996) Lipid peroxidation as a potential endogenous source for the formation of exocyclic DNA adducts. *Carcinogenesis* **17**, 2105-2111.
- Chung, F.-L., Nath, R.G., Ocando, J.E., Nishikawa, A. e Zhang, L. (2000) Deoxyguanosine adducts of t-4-hydroxy-2-nonenal are endogenous DNA lesions in rodents and humans: detection and potential sources. *Cancer Res.* **60**, 1507-1511.
- Chung, F.-L., Tanaka, T. e Hecht, S.S. (1986) Induction of liver tumors in F344 rats by crotonaldehyde. *Cancer Res.* **46**, 1285-1289.
- Chung, F.-L., Young, R. e Hecht, S.S. (1984) Formation of cyclic 1,*N*²-propanodeoxyguanosine adducts in DNA upon reaction with acrolein or crotonaldehyde. *Cancer Res.* **44**, 990-995.
- Chung, F.-L., Zhang, L., Ocando, J.E. e Nath, R.G. (1999) Role of 1,*N*²-propanodeoxyguanosine adducts as endogenous DNA lesions in rodents and humans. In: *Exocyclic DNA adducts in mutagenesis and carcinogenesis* (Singer, B. e Bartsch, H., eds), IARC Sci. Publ. **150**, Lyon, IARC, 45-54.
- Ciroussel, F., Barbin, A., Eberle, G. e Bartsch, H. (1990) Investigations on the relationship between DNA ethenobase adduct levels in several organs of vinyl chloride-exposed rats and cancer susceptibility. *Biochem. Pharmacol.* **39**, 1109-1113.

- Clark, I.A., Butcher, G.A., Buffinton, G.D., Hunt, N.H. e Cowden, W.B. (1987) Toxicity of certain products of lipid peroxidation to the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Biochem. Pharmacol.* **38**, 543-546.
- Cohen, S.M., Garland, E.M., St.-John, M., Okamura, T. e Smith, R.A. (1992) Acrolein initiates rat urinary bladder carcinogenesis. *Cancer Res.* **52**, 3577-3581.
- Csallany, A.S., Der, G.M., Manwaring, J.D. e Addis, P.B. (1984) Free malonaldehyde determination in tissues by high performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.* **142**, 277-283.
- Culp, S.J., Gaylor, D.W., Sheldon, W.G., Goldstein, L.S. e Beland, F.A. (1998) A comparison of the tumors induced by coal tar and benzo[*a*]pyrene in a 2-year bioassay. *Carcinogenesis* **19**, 117-124.
- Culter, M.G. e Schneider, R. (1974) Linoleate oxidation products and cardiovascular lesions. *Atherosclerosis* **20**, 383-394.
- Curren, R.D., Yang, L.L., Conklin, P.M., Grafstrom, R.C. e Harris, C.C. (1988) Mutagenesis of xeroderma pigmentosum fibroblasts by acrolein. *Mutat. Res.* **209**, 17-22.
- Dainton, F.S. (1951) A review of the evidence for the production of free radicals in water consequent on the absorption of ionising radiation. *Brit. J. Radiol.* **24**, 428-452.
- Davis, M.D., Kaufman, S. e Milstien, S. (1988) The auto-oxidation of tetrahydrobiopterin. *Eur. J. Biochem.* **173**, 345-351.
- De Flora, S., Izzotti, A., Randerath, K., Randerath, E., Bartsch, H., Nair, J., Balansky, R., van Schooten, F., Degan, P., Fronza, G., Walsh, D. e Lewtas, J. (1996) DNA adducts and chronic degenerative diseases. Pathogenetic relevance and implications in preventive medicine. *Mutat. Res.* **366**, 197-238.
- De Groot, H. e Littauer, A. (1989) Hypoxia, reactive O₂ and cell injury. *Free Rad. Biol. Med.* **173**, 541-551.
- Dedon, P.C., Plastaras, J.P., Rouzer, C.A. e Marnett, L.J. (1998) Indirect mutagenesis by oxidative DNA damage: formation of the pyrimidopurinone adduct of deoxyguanosine by base propenal. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 11113-11116.
- Demkowicz-Dobrzanski, K. e Castonguay, A. (1992) Modulation by glutathione of DNA strand breaks induced by 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone and its aldehyde metabolites in rat hepatocytes. *Carcinogenesis* **13**, 1447-1454.
- Demple, B. e Harrison, L. (1994) Repair of oxidative damage to DNA. *Annu. Rev. Biochem.* **63**, 915-948.
- Dewey, D.L. (1960) Effect of oxygen and nitric oxide on the radiosensitivity of human cells in tissue culture. *Nature* **186**, 780.
- Diamantis, I.D., McGandy, C., Chen, T-J., Liaw, Y-F., Gudat, F. e Bianchi, L. (1994) A new mutation hot-spot in the p53 gene in human hepatocellular carcinoma. *J. Hepatol.* **20**, 553-556.

- DiGiovanni, J. (1992) Multistage carcinogenesis in mouse skin. *Pharmacol. Ther.* **54**, 63-128.
- Dionisi, O., Galeotti, T., Terranova, T. e Azzi, A. (1975) Superoxide radicals and hydrogen peroxide formation in normal and neoplastic tissues. *Biochim. Biophys. Acta* **403**, 292-300.
- Dipple, A. (1995) DNA adducts of chemical carcinogens. *Carcinogenesis* **16**, 437-441.
- Dipple, A., Pigott, M., Moschel, R.C. e Costantino, N. (1983) Evidence that binding of 7,12-dimethylbenz(α)anthracene to DNA in mouse embryo cell cultures results in extensive substitution of both adenine and guanine residues. *Cancer Res.* **43**, 4132-4135.
- Dix, T.A. e Aikens, J. (1993) Mechanism and biological relevance of lipid peroxidation initiation. *Chem. Res. Toxicol.* **6**, 2-18.
- Dizdaroglu, M. e Gajewski, E. (1990) Selected-ion mass spectrometry: assays of oxidative DNA damage. *Methods Enzymol.* **186**, 530-544.
- Dogterom, P., Mulder, G.J., Nagelkerke, J.F. (1989) Lipid peroxidation-dependent and -independent protein thiol modifications in isolated rat hepatocytes: differential effects of vitamin E and disulfiram. *Chem. Biol. Interact.* **71**, 291-306.
- Doss, M.O., Kuhnel, A. e Gross, U. (2000) Alcohol and porphyrin metabolism. *Alcohol and Alcoholism.* **35**, 109-125.
- Douki, T. e Ames, N. (1994) An HPLC-EC assay for 1, N^2 -propano adducts of 2'-deoxyguanosine with 4-hydroxynonenal and other α,β -unsaturated aldehydes. *Chem. Res. Toxicol.* **7**, 511-518.
- Douki, T., Delatour, T., Bianchini, F. e Cadet, J. (1996) Observation and prevention of an artifactual formation of oxidized DNA bases and nucleosides in the GC-EIMS method. *Carcinogenesis* **17**, 347-353.
- Draminski, W., Eder, E. e Henschler, D. (1983) A new pathway of acrolein metabolism in rats. *Arch. Toxicol.* **52**, 243-247.
- Eberle, G., Barbin, A., Laib, R. J., Ciroussel, F., Thomale, J., Bartsch, H. e Rajewsky, M. F. (1989) 1, N^6 -etheno-2'-deoxyadenosine and 3, N^4 -etheno-2'-deoxycytidine detected by monoclonal antibodies in lung and liver DNA of rats exposed to vinyl chloride. *Carcinogenesis* **10**, 209-212.
- Eckl, P. e Esterbauer, H. (1989) Genotoxic effects of 4-hydroxynonenals. *Adv. Biosci.* **76**, 141-157.
- Eder, E., Deininger, C., Neudecker, T. e Deininger, D. (1992) Mutagenicity of β -alkylsubstituted acrolein congeners in the *Salmonella typhimurium* strain TA 100 and genotoxicity testing in the SOS-chromotest. *Environ. Mol. Mutagen.* **19**, 338-345.
- Eder, E., Scheckenbach, S., Deininger, C. e Hoffman, C. (1993) The possible role of α,β -unsaturated carbonyl compounds in mutagenesis and carcinogenesis. *Toxicol. Lett.* **67**, 87-103.

- Ehrenberg, L., Osterman-Golkar, S., Segerbäck, D., Svensson, K. e Calleman, C.J. (1977) Evaluation of genetic risks of alkylating agents. III. Alkylation of haemoglobin after metabolic conversion of ethene oxide *in vivo*. *Mutat. Res.* **45**, 175-184.
- Eisenbrand, G., Schuhmacher, J. e Gölzer, P. (1995) The influence of glutathione and detoxifying enzymes on DNA damage induced by 2-alkenals in primary rat hepatocytes and human lymphoblastoid cells. *Chem. Res. Toxicol.* **8**, 40-46.
- el Ghissassi, F., Barbin, A., Nair, J. e Bartsch, H. (1995) Formation of 1,*N*⁶-ethenoadenine and 3,*N*⁴-ethenocytosine by lipid peroxidation products and nucleic acid bases. *Chem. Res. Toxicol.* **8**, 278-283.
- Ellman, G.L. (1959) Tissue sulphhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* **82**, 70-77.
- Esterbauer, H. (1985) Lipid peroxidation products: formation, chemical properties and biological activities. In *Free Radicals in Liver Injury* (Poli, G., Cheesman, K. H., Dianzani, M. U., and Slater, T. F., Eds.) pp 29-47, IRL Press, Oxford, U.K.
- Esterbauer, H., Cheesman, K.H., Dianzani, M.U., Poli, G. e Slater, T.F. (1982) Separation and characterization of the aldehydic products of lipid-peroxidation stimulated by ADP-Fe²⁺ in rat liver microsomes. *Biochem. J.* **208**, 129-140.
- Esterbauer, H., Eckl, P. e Ortner, A. (1990) Possible mutagens derived from lipid and lipid precursors. *Mutat. Res.* **238**, 223-233.
- Esterbauer, H., Jürgens, G., Quehenberger, O. e Koller, E. (1987) Autoxidation of human low-density lipoprotein: loss of polyunsaturated fatty acids and vitamin E and generation of aldehydes. *J. Lipid Res.* **28**, 495.
- Esterbauer, H., Schaur, R.J. e Zollner, H. (1991) Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Rad. Biol. Med.* **11**, 81-128.
- Fang, J.L., Vaca, C.E., Valsta, L.M. e Mutanen, M. (1996) Determination of DNA adducts of malonaldehyde in humans: effects of dietary fatty acid composition. *Carcinogenesis* **17**, 1035-1040.
- Farkas, P., Sadecka, J., Kovac, M., Siegmund, B., Leitner, E. e Pfannhauser, W. (1997) Key odourants of pressure-cooked hen meat. *Food Chem.* **60**, 617-621.
- Fazio, V.M., Barrera, G., Martinotti, S., Farace, M.G., Giglioni, B., Frati, L., Manzari, V. e Dianzani, M.U. (1992) 4-Hydroxynonenal, a product of cellular lipid-peroxidation, which modulates c-myc and globin gene-expression in K562 erythroleukemic cells. *Cancer Res.* **52**, 4866-4871.
- Fedtke, N., Boucheron, J.A., Turner, M.J.Jr. e Swenberg, J.A. (1990a) Vinyl chloride-induced DNA adducts. I: Quantitative determination of *N*²,3-ethenoguanine based on electrophore labeling. *Carcinogenesis* **11**, 1279-1285.

- Fedtke, N., Boucheron, J.A., Walker, V.E. e Swenberg, J.A. (1990b) Vinyl chloride-induced DNA adducts. II: Formation and persistence of 7-(2'-oxoethyl)guanine and $N^2,3$ -ethenoguanine in rat tissue DNA. *Carcinogenesis* **11**, 1287-1292.
- Feron, V.J., Til, H.P., de Vrijer, F., Woutersen, R.A., Cassee, F.R. e van Bladeren, P.J. (1991) Aldehydes: occurrence, carcinogenic potential, mechanism of action and risk assessment. *Mutat. Res.* **259**, 363-385.
- Fink, S.P., Reddy, G.R. e Marnett, L.J. (1997) Mutagenicity in *Escherichia coli* of the major DNA adduct derived from the endogenous mutagen malondialdehyde. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 8652-8657.
- Fisher, D.B. e Kaufman, S. (1973) Tetrahydropterin oxidation without hydroxylation catalyzed by rat liver phenylalanine hydroxylase. *J. Biol. Chem.*, **248**, 4300-4304.
- Floyd, R.A., Watson, J.J., Wong, P.K., Altmiller, D.H. e Rickard, R.C. (1986) Hydroxyl free radical adduct of deoxyguanosine: sensitive detection and mechanisms of formation. *Free Rad. Res. Commun.* **1**, 163-172.
- Foiles, P.G., Miglietta, L.M., Nishikawa, A., Kusmierek, J.T., Singer, B. e Chung, F.-L. (1993) Development of monoclonal antibodies specific for 1, N^2 -ethenodeoxyguanosine and $N^2,3$ -ethenodeoxyguanosine and their use for quantitation of adducts in G12 cells exposed to chloroacetaldehyde. *Carcinogenesis* **14**, 113-116.
- Fong, L.G., Fong, T.A.T. e Cooper, A.D. (1991) Inhibition of lipopolysaccharide-induced interleukin-1-beta messenger-RNA expression in mouse macrophages by oxidized low-density-lipoprotein. *J. Lipid Res.* **32**, 1899-1910.
- Forman, H.J. e Kennedy, J. (1976) Dihydroorotate-dependent superoxide production in rat brain and liver. *Arch. Biochem. Biophys.* **173**, 219-224.
- Francesco, V., Cesare, A., Luigi, I., Stefano, F., Andrea, G. e Francesco, B. (1985) Malondialdehyde-like material and beta-thromboglobulin plasma levels in patients suffering from transient ischemic attacks. *Stroke* **16**, 14-16.
- Frankel, E.N., Neff, W.E. e Selke, E. (1981) Analysis of autoxidized fats by gas chromatography-mass spectrometry: VII. Volatile thermal decomposition products of pure hydroperoxides from autoxidized and photosensitized oxidized methyl oleate, linoleate and linolenate. *Lipids* **16**, 279-285.
- Frankel, E.N., Neff, W.E. e Selke, E. (1983) Analysis of autoxidized fats by gas chromatography-mass spectrometry: VIII. Volatile thermal decomposition products of hydroperoxy cyclic peroxides. *Lipids* **18**, 353-357.
- Frankel, E.N., Neff, W.E., Brooks, D.D. e Fujimoto, K. (1987) Fluorescence formation from the interaction of DNA with lipid oxidation degradation products. *Biochim. Biophys. Acta* **919**, 239-244.

- Freeman, B.A. e Crapo, J.D. (1982) Biology of disease - free radicals and tissue injury. *Lab. Invest.* **17**, 412-426.
- Fridovich, I. (1970) Quantitative aspects of production of superoxide anion radical by milk xanthine oxidase. *J. Biol. Chem.* **245**, 4053-4057.
- Froment, O., Boivin, S., Barbin, A., Bancel, B., Trepo, C. e Marion, M.-J. (1994) Mutagenesis of *ras* protooncogenes in rat liver tumors induced by vinyl chloride. *Cancer Res.* **54**, 5340-5345.
- Fujimoto, K., Neff, W.E. e Frankel, E.N. (1984) The reaction of DNA with lipid oxidation products, metals and reducing agents. *Biochim. Biophys. Acta* **795**, 100-107.
- Fujita, M., Sano, M., Yoshino, K. e Tomita, I. (1994) Effects of aldehyde dehydrogenase and glutathione on the degradation of (*E*)-4-hydroxy-2-nonenal and N-hexanal in rat liver. *Biochem. Mol. Biol. Internat.* **32**, 429-434.
- Fukuda, A., Nakamura, Y., Ohigashi, H., Osawa, T. e Uchida, K. (1997) Cellular response to the redox active lipid peroxidation products: Induction of glutathione S-transferase P by 4-hydroxy-2-nonenal. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **236**, 505-509.
- Gabriel, L., Migletta, A. e Dianzani, M.U. (1985) 4-Hydroxy-alkenals interaction with purified microtubular protein. *Chem. Biol. Interact.* **56**, 201-212.
- Gardner, H.W. (1989) Oxygen radical chemistry of PUFAs. *Free Rad. Biol. Med.* **7**, 65-86.
- Gardner, H.W. e Selke, E. (1984) Volatiles from thermal decomposition of isomeric methyl (12*S*, 13*S*)-(*E*)-12,13-epoxy-9-hydroperoxy-10-octadecenoates. *Lipids* **19**, 375-380.
- Garner, B., Witting, P.K., Waldeck, A.R., Christison, J.K., Raftery, M. e Stocker, R. (1998) Oxidation of high density lipoproteins: I. Formation of methionine sulfoxide in apolipoproteins AI and AII is an early event that accompanies lipid peroxidation and can be enhanced by α -tocopherol. *J. Biol. Chem.* **273**, 6080-6087.
- Geacintov, N.E., Cosman, M., Hingerty, B.E., Amin, S., Broyde, S. e Patel, D.J. (1997) NMR solution structures of stereoisomeric covalent polycyclic aromatic carcinogen-DNA adduct: principles, patterns, and diversity. *Chem. Res. Toxicol.* **10**, 111-146.
- Gerschman, R., Gilbert, D.L., Nye, S.W., Dwyer, P. e Fenn, W.O. (1954) Oxygen poisoning and X-irradiation: a mechanism in common. *Science* **119**, 623-626.
- Gerwins, P., Skoldenberg, E. e Claesson-Welsh, L. (2000) Function of fibroblast growth factors and vascular endothelial growth factors and their receptors in angiogenesis. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **34**, 185-194.
- Giloni, L., Takeshita, M., Johnson, F., Iden, C. e Grollman, A.P. (1981) Bleomycin-induced strand scission of DNA. Mechanism of deoxyribose cleavage. *J. Biol. Chem.* **256**, 8608-8615.

- Girard, P.M. e Boiteux, S. (1997) Repair of oxidized DNA bases in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimie* **79**, 559-566.
- Girona, J., La Ville, A.E., Heras, M., Olivé, S. e Masana, L. (1997) Oxidized lipoproteins including HDL and their lipid peroxidation products inhibit TNF- α secretion by THP-1 human macrophages. *Free Rad. Biol. Med.* **23**, 658-667.
- Glassner, B.J., Posnick, L.M. e Samson, L.D. (1998) The influence of DNA glycosylases on spontaneous mutation. *Mutat. Res. Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* **400**, 33-44.
- Godwin, A.K., Meister, A., O'Dwyer, P.J., Huang, C.S., Hamilton, T.C. e Anderson, M.E. (1992) High resistance to cisplatin in human ovarian-cancer cells-lines is associated with marked increase of glutathione synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**, 3070-3074.
- Goeptar, A.R., Schrens, H. e Vermeulen, N.P.E. (1995) Oxygen and xenobiotic reductase activities of cytochrome P450. *Crit. Rev. Toxicol.* **25**, 25-65.
- Goldschmidt, B. M., Blazej, T. P. e Van Duuren, B. L. (1968) The reaction of guanosine and deoxyguanosine with glycidaldehyde. *Tetrahedron Lett.* **13**, 1583-1585.
- Gölzer, P., Janzowski, C., Pool-Zobel, B.L. e Eisenbrand, G. (1996) (*E*)-2-hexenal-induced DNA damage and formation of cyclic 1,*N*²-(1,3-propano)-2'-deoxyguanosine adducts in mammalian cells. *Chem. Res. Toxicol.* **9**, 1207-1213.
- Gómez-Sánchez, A., Hermosín, I., Lassaletta, J.-M. e Maya, I. (1993) Cleavage and oligomerization of malondialdehyde. *Tetrahedron* **49**, 1237-1250.
- Gorelick, N.J., Andrews, J.L., Gu, M. e Glickman, B.W. (1995) Mutational spectra in the *lacI* gene in skin from 7,12-dimethylbenz[α]anthracene-treated and untreated transgenic mice. *Mol. Carcinog.* **14**, 53-62.
- Götz-Schmidt, E.-M. e Schreier, P. (1986) Neutral volatiles from blended endive (*Cichorium endivia*, L.). *J. Agric. Food Chem.* **34**, 212-215.
- Graham, A., Hogg, N., Kalyanaraman, B., O'leary, V., Darleyusmar, V. e Moncada, S. (1993) Peroxynitrite modification of LDL leads to recognition by the macrophage scavenger receptor. *FEBS Lett.* **330**, 181-185.
- Gray, J.M. e Bamsley, E.A. (1971) The metabolism of crotyl phosphate, crotyl alcohol and crotonaldehyde. *Xenobiotica* **1**, 55-67.
- Gray, L.H. (1953) The initiation and development of cellular damage by ionizing radiations. *Brit. J. Radiol.* **26**, 609-618.

- Gray, L.H., Conger, A.D., Ebert, M., Hornsey, S. e Scott, O.C.A. (1953) The concentration of oxygen dissolved in tissues at the time of irradiation as a factor in radiotherapy. *Brit. J. Radiol.* **26**, 638-648.
- Green, C.E., Segall, H.J. e Byard, J.L. (1981) Metabolism, cytotoxicity, and genotoxicity of the pyrrolizidine alkaloid senecionine in primary cultures of rat hepatocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **60**, 176-185.
- Greenley, T.L. e Davies, M.J. (1994) Direct detection of radical generation in rat liver nuclei on treatment with tumour-promoting hydroperoxides and related compounds. *Biochim. Biophys. Acta* **1226**, 56-64.
- Griffin, D.S. e Segall, H.J. (1987) Role of cellular calcium homeostasis in toxic liver injury induced by the pyrrolizidine alkaloid senecionine and the alkenal trans-4-OH-2-hexenal. *J. Biochem. Toxicol.* **2**, 155-167.
- Grijalba, M.T., Vercesi, A.E. e Schreier, S. (1999) Ca²⁺-induced increased lipid packing and domain formation in submitochondrial particles. A possible early step in the mechanisms of Ca²⁺-stimulated generation of reactive oxygen species by the respiration chain. *Biochemistry* **38**, 13279-13287.
- Grollman, A.P., Takeshita, M., Pillai, K.M.R. e Johnson, F. (1985) Origin and cytotoxic properties of base propenals derived from DNA. *Cancer Res.* **45**, 1127-1131.
- Grosch, W. (1993) Detection of potent odorants in foods by aroma extract dilution analysis. *Trends Food Sci. Technol.* **4**, 68-73.
- Grün, I.U., Barbeau, W.E. e Crowther, J.B. (1996) Changes in headspace volatiles and peroxide values of undeodorized menhaden oil over 20 weeks of storage. *J. Agric. Food Chem.* **44**, 1190-1194.
- Grune, T, Siems, W. e Schneider, W. (1993) Accumulation of aldehydic lipid peroxidation products during postanoxic reoxygenation of isolated rat hepatocytes. *Free Rad. Biol. Med.* **15**, 125-132.
- Grune, T, Siems, W.G. Kowalewski, J. e Esterbauer, H. (1994) Postischemic accumulation of the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal in rat small intestine. *Life Sci.* **55**, 693-699.
- Guengerich, F.P., Kim, D.H. e Iwasaki, M. (1991) Role of human cytochrome-P-450-IIIE1 in the oxidation of many low-molecular-weight cancer suspects. *Chem. Res. Toxicol.* **4**, 168-179.
- Guichard, Y., el Ghissassi, F., Nair, J., Bartsch, H. e Barbin, A. (1996) Formation and accumulation of DNA ethenobases in adult Sprague-Dawley rats exposed to vinyl chloride. *Carcinogenesis* **17**, 1553-1559.
- Gupta, R.C. e Lutz, W.K. (1999) Background DNA damage from endogenous and unavoidable exogenous carcinogens: a basis for spontaneous cancer incidence? *Mutat. Res.* **424**, 1-8.
- Gupta, R.C., Reddy, M.V. e Randerath, K. (1982) ³²P-post-labeling analysis of non-radioactive aromatic carcinogen-DNA adducts. *Carcinogenesis* **3**, 1081-1092.
- Gutteridge, J.M.C. e Stocks, J. (1981) Caeruloplasmin: physiological and pathological perspectives. *CRC Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* **14**, 257-329.

- Hadley, H. e Draper, H.H. (1990) Isolation of a guanine-malondialdehyde adduct from rat and human urine. *Lipids* **25**, 82-85.
- Haenen, G.R.M.M., Tai Tin Tsoi, J.N.L., Vermeulen, N.P.E., Timmermann, H. e Bast, A. (1987) Hydroxy-2,3-*trans*-nonenal stimulates microsomal lipid peroxidation by reducing the glutathione-dependent protection. *Arch. Biochem. Biophys.* **259**, 449-456.
- Hales, B.F. (1982) Comparison of the mutagenicity and teratogenicity of cyclophosphamide and its active metabolites, 4-hydroxy- cyclophosphamide, phosphoramidate mustard, and acrolein. *Cancer Res.* **42**, 3016-3021.
- Halliwell, B. (1987) Oxidants and human disease: some new concepts. *FASEB J.* **1**, 358-364.
- Halliwell, B. (1996) Antioxidants in human health and disease. *Ann. Rev. Nutr.* **16**, 33-50.
- Halliwell, B. (1999) Oxygen and nitrogen are pro-carcinogens. Damage to DNA by reactive oxygen, chlorine and nitrogen species: measurement, mechanism and the effects of nutrition. *Mutat. Res. – Gen. Tox. Environ. Mut.* **443**, 37-52.
- Halliwell, B. (2000) Lipid peroxidation, antioxidants and cardiovascular disease: how should we move forward? *Cardiov. Res.* **47**, 410-418.
- Halliwell, B. e Gutteridge, J.M.C. (1990) Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease - an overview. *Methods Enzymol.* **186**, 1-85.
- Halliwell, B. e Gutteridge, J.M.C. (1992) Biologically relevant metal ion-dependent HO[•] generation. An update. *FEBS Lett.* **307**, 108-112.
- Halliwell, B. e Gutteridge, J.M.C. (1999) *Free radicals in biology and medicine*. ed.3, Oxford University Press, Oxford, New York.
- Hamilton, T.A., Ma, G. e Chisholm, G.M. (1990) Oxidized low-density-lipoprotein suppresses the expression of tumor necrosis factor- α messenger-RNA in stimulated murine peritoneal-macrophages. *J. Immunol.* **144**, 2343-2350.
- Hanna, P.M. e Mason, R.P. (1992) Direct evidence for inhibition of free radical formation from Cu(I) and H₂O₂ by GSH and other potential ligands using the EPR spin-trapping technique. *Arch. Biochem. Biophys.* **295**, 205-213.
- Hansen, M.B., Nielsen, S.E. e Berg, K. (1989) Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *J. Immunol. Methods* **119**, 203-210.
- Harkin, L.A. e Burcham, P.C. (1997) Formation of novel C¹-oxidised abasic sites in alkylperoxyl radical-damaged plasmid DNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **237**, 1-5.

- Hasegawa, K., Fugimoto, K., Kaneda, T. e Frankel, E.N. (1988) Characterization of fluorescent products from reaction of methyl linoleate hydroperoxides with adenine in the presence of Fe^{2+} and ascorbic acid. *Biochim. Biophys. Acta* **962**, 371-376.
- Hasegawa, K., Fugimoto, K., Kaneda, T., Neff, W.E. e Frankel, E.N. (1989) Formation of fluorescent products in the reaction of adenine and other bases with secondary oxidation products of methyl linoleate hydroperoxides. *Agric. Biol. Chem.* **53**, 1575-1581.
- Haugaard, N. (1968) Cellular mechanisms of oxygen toxicity. *Physiol. Rev.* **48**, 311-373.
- Hauptlorenz, S., Esterbauer, H., Moll, W., Pümpel, R., Schauenstein, E. e Puschendorf, B. (1985) Effects of the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal and related aldehydes on proliferation and viability of cultured Ehrlich ascites tumor cells. *Biochem. Pharmacol.* **34**, 3803-3809.
- Hazen, S.L., Hsu, F.F., D'Avignon, A. e Heinecke, J.W. (1998) Human neutrophils employ myeloperoxidases to convert α -amino acids to a battery of reactive aldehydes: a pathway for aldehyde generation at sites of inflammation. *Biochemistry* **37**, 6864-6873.
- Hecht, S.S., Young-Sciame, R. e Chung, F.-L. (1992) Reaction of α -acetoxy-*N*-nitrosopiperidine with deoxyguanosine: oxygen-dependent formation of 4-oxo-2-pentenal and a 1,*N*²-etheno-deoxyguanosine adduct. *Chem. Res. Toxicol.* **5**, 706-712.
- Hecker, M. e Ullrich, V. (1989) On the mechanism of prostacyclin and thromboxane A₂ biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **264**, 141-150.
- Hemminki, K. (1993) DNA adducts, mutations and cancer. *Carcinogenesis* **14**, 2007-2012.
- Hemminki, K., Dipple, A., Shuker, D.E.G., Kadlubar, F.F., Segerbäck, D. e Bartsch, H. (1994) *DNA adducts: identification and biological significance*. IARC Scientific Publications No.125, IARC, Lyon.
- Henle, E.S. e Linn, S. (1997) Formation, prevention and repair of DNA damage by iron/hydrogen peroxide. *J. Biol. Chem.* **272**, 19095-19098.
- Hidalgo, F.J. e Zamora, R. (2000) Modification of bovine serum albumin structure following reaction with 4,5(*E*)-epoxy-2(*E*)-heptenal. *Chem. Res. Toxicol.* **13**, 501-508.
- Hidalgo, F.J. e Zamorra, R. (1993) Fluorescent pyrrole products from carbonyl-amine reactions. *J. Biol. Chem.* **268**, 16190-16197.
- Holvoet, P., Perez, G., Zhao, Z., Brouwers, E., Bernar, H. e Collen, D. (1995) Malondialdehyde-modified low-density lipoproteins in patients with atherosclerotic disease. *J. Clin. Invest.* **95**, 2611-2619.
- Howard, J.A. (1973) Homogenous liquid -phase autoxidations. In Kochi, J.K. (ed.) *Free Radicals Volume II*. Wiley-Interscience, New York, pp. 3-62.

- Hunter, M.I.S. e Mohamed, J.B. (1986) Plasma antioxidants and lipid peroxidation products in duchenne muscular dystrophy. *Clin. Chim. Acta* **155**, 123-132.
- Hussain, S.P. e Harris, C.C. (1998) Molecular epidemiology of human cancer: contribution of mutation spectra studies of tumor suppressor genes. *Cancer Res.* **58**, 4023-4037.
- Iimuro, Y., Bradford, B.U., Gao, W.S., Kadiiska, M., Mason, R.P., Stefanovic, B., Brenner, D.A. e Thurman, R.G. (1996) Detection of α -hydroxyethyl free radical adducts in the pancreas after chronic exposure to alcohol in the rat. *Mol. Pharmacol.* **50**, 656-661.
- Izard, C. e Libermann, C. (1978) Acrolein. *Mutat. Res.* **47**, 115-138.
- Jamieson, D. (1989) Oxygen toxicity and reactive oxygen metabolites in mammals. *Free Rad. Biol. Med.* **7**, 87-108.
- Jenner, A., England, T.G., Aruoma, O.I. e Halliwell, B. (1998) Measurement of oxidative DNA damage by gas chromatography-mass spectrometry: ethanethiol prevents artefactual generation of oxidized DNA bases. *Biochem. J.* **331**, 365-369.
- Jiang, Z.-Y., Woollard, A.C.S. e Wolff, S.P. (1991) Lipid hydroperoxide measured by oxidation of Fe^{2+} in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and an iodometric method. *Lipids* **26**, 853-856.
- Johnson, K.A., Fink, S.P. e Marnett, L.J. (1997) Repair of propanodeoxyguanosine by nucleotide excision repair in vivo and in vitro *J. Biol. Chem.* **272**, 11434-11438.
- Johnson, K.A., Mierzwa, M.L., Fink, S.P. e Marnett, L.J. (1999) MutS recognition of exocyclic DNA adducts that are endogenous products of lipid peroxidation. *J. Biol. Chem.* **274**, 27112-27118.
- Jones, R.D., Hancock, J.T. e Morice, A.H. (2000) NADPH oxidase: a universal oxygen sensor? *Free Rad. Biol. Med.* **29**, 416-424.
- Kadlubar, F., Anderson, K., Lang, N., Thompson, P., MacLeod, S., Mikhailova, M., Chou, M., Plataras, J., Marnett, L.J., Haussermann, S. e Bartsch, H. (1998) Comparison of endogenous DNA adduct levels in human pancreas. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* **39**, 286.
- Kaneko, T., Honda, S., Nakano, S. e Matsuo, M. (1987) Lethal effects of a linoleic acid hydroperoxide and its autoxidation products, unsaturated aliphatic aldehydes, on human diploid fibroblasts. *Chem.-Biol. Interactions* **63**, 127-137.
- Kaneko, T., Kaji, K. e Matsuo, M. (1988) Cytotoxicities of a linoleic acid hydroperoxide and its related aliphatic aldehydes toward cultured human umbilical vein endothelial cells. *Chem.-Biol. Interactions*, **67**, 295-304.

- Karin, M. (1999) The beginning of the end: IkappaB kinase (IKK) and NF-kappaB activation. *J. Biol. Chem.* **274**, 27339-27342.
- Katcher, H.L. e Wallace, S.S. (1983) Characterization of the *Escherichia coli* X-ray endonuclease, endonuclease III. *Biochemistry* **22**, 4071-4081.
- Kautiainen, A., Vaca, C.E. e Granath, F. (1993) Studies on the relationship between hemoglobin and DNA adducts. *Carcinogenesis* **14**, 705-708.
- Kawanishi, M., Matsuda, T., Sasaki, G., Yagi, T., Matsui, S. e Takebe, H. (1998) A spectrum of mutations induced by crotonaldehyde in shuttle vector plasmids propagated in human cells. *Carcinogenesis* **19**, 69-72.
- Kaye, C.M. (1973) Biosynthesis of mercapturic acids from allyl alcohol, allyl esters and acrolein. *Biochem. J.* **134**, 1093-1101.
- Kellogg, E.W. e Fridovich, I. (1977) Liposome oxidation and erythrocyte lysis by enzymically generated superoxide and hydrogen peroxide. *J. Biol. Chem.* **252**, 6721-6728.
- Kensler, T.W. e Taffe, B.G. (1986) Free radicals in tumor promotion. *Adv. Free Rad. Biol. Med.* **2**, 347-387.
- Kensler, T.W., Groopman, J.D. e Wogan, G.N. (1996) Use of carcinogen-DNA and carcinogen-protein adduct biomarkers for cohort selection and as modifiable end points in chemoprevention trials. In Stewart, B.W., McGregor, D. e Kleihues, P. (eds) *Principles of chemoprevention*. IARC Scientific Publications 139, Lyon, p.237-248.
- Kerler, J. e Grosch, W. (1997) Character impact odorants of boiled chicken: changes during refrigerated storage and reheating. *Z. Lebensm.-Unters.-Forsch.* **205**, 232-238.
- Khullar, S., Varaprasad, C.V. e Johnson, F. (1999) Postsynthetic generation of a major acrolein adduct of 2'-deoxyguanosine in oligomeric DNA. *J. Med. Chem.* **42**, 947-950.
- Kikugawa, K. e Ido, Y. (1984) Studies on peroxidized lipids. V. Formation and characterization of 1,4-dihydropyridine-3,5-dicarbaldehydes as model of fluorescent components in lipofuscin. *Lipids* **19**, 600-608.
- Kinzler, K.W. e Vogelstein, B. (1996) Life (and death) in a malignant tumour. *Nature* **379**, 19-20.
- Kinzler, K.W. e Vogelstein, B. (1996) Lessons learned from hereditary colon cancer. *Cell* **87**, 159-170.
- Kissner, R., Nauser, T., Bugnon, P., Lye, P.G. e Koppenol, W.H. (1997) Formation of properties of peroxyxynitrite as studied by laser flash photolysis, high-pressure stopped-flow technique and pulse radiolysis. *Chem. Res. Toxicol.* **10**, 1285-1292.

- Konishi, H., Tanaka, M., Takemura, Y., Matsuzaki, H., Ono, Y., Kikkawa, U. e Nishizuka, Y. (1997) Activation of protein kinase C by tyrosine phosphorylation in response to H₂O₂. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**, 11233-11237.
- Konopka, U.C., Guth, H. e Grosch, W. (1995) Potent odorants formed by lipid peroxidation as indicators of the warmed-over flavor (WOF) of cooked meat. *Z. Lebensm.-Unters.-Forsch.* **201**, 339-343.
- Koppenol, W.H., Butler, J. e van Leeuwen, J.W. (1978) The Haber-Weiss cycle. *Photochem. Photobiol.* **28**, 655-660.
- Koppenol, W.H., Moreno, J.J. e Pryor, W.A. Ischiropoulos, H. e Beckman, J.S. (1992) Peroxynitrite: a cloaked oxidant from superoxide and nitric oxide. *Chem. Res. Toxicol.* **5**, 834-842.
- Kotani, K., Maekawa, M., Kanno, T., Kondo, A., Toda, N. e Manabe, M. (1994) Distribution of immunoreactive malondialdehyde-modified low-density lipoprotein in human serum. *Biochim. Biophys. Acta* **1215**, 121-125.
- Kreutzer, D.A. e Essigmann, J.M. (1998) Oxidized, deaminated cytosines are sources of C→T transitions *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 3578-3582.
- Krieg, P., Kinzig, A., Röss-Löschke, M., Vogel, S., Vanlandingham, B., Stephan, M., Lehmann, W.D., Marks, F. e Fürstenberger, G. (1995) 12-Lipoxygenase isoenzymes in mouse skin tumor development. *Mol. Carcinog.* **14**, 118-129.
- Kume, A. e Dinauer, M.C. (2000) Gene therapy for chronic granulomatous disease. *J. Lab. Clin. Med.* **135**, 122-128.
- Kuo, C.-L., Vaz, A.D.N. e Coon, M.J. (1997) Metabolic activation of trans-4-hydroxy-2-nonenal, a toxic product of membrane lipid peroxidation and inhibitor of P450 cytochromes. *J. Biol. Chem.* **272**, 22611-22616.
- Langouët, S., Mican, A. N., Müller, M., Fink, S. P., Marnett, L. J., Muhle, S. A. e Guengerich, F. P. (1998) Misincorporation of nucleotides opposite five-membered exocyclic ring guanine derivatives by *Escherichia coli* polymerases *in vitro* and *in vivo*: 1,N²-ethenoguanine, 5,6,7,9-tetrahydro-9-oxoimidazo[1,2-*a*]purine, and 5,6,7,9-tetrahydro-7-hydroxy-9-oxoimidazo[1,2-*a*]purine. *Biochemistry* **37**, 5184-5193.
- Largilliere, C. e Melancon, S.B. (1988) Free malondialdehyde determination in human-plasma by high-performance liquid-chromatography. *Anal. Biochem.* **170**, 123-126.
- Lawson, J.A., Rokach, J. e FitzGerald, G.A. (1999) Isoprostanes: formation, analysis and use as indices of lipid peroxidation *in vivo*. *J. Biol. Chem.* **274**, 24441-24444.

- Le Curieux, F., Pluskota, D., Munter, T., Sjöholm, R. e Kronberg, L. (1998) Formation of a fluorescent adduct in the reaction of 2'-deoxyadenosine with a malonaldehyde-acetaldehyde condensation product. *Chem. Res. Toxicol.* **11**, 989-994.
- Le Page, F., Margot, A., Grollman, A.P., Sarasin, A. e Gentil, A. (1995) Mutagenicity of a unique 8-oxoguanine in a human Ha-ras sequence in mammalian cells. *Carcinogenesis* **16**, 2779-2784.
- Ledwozyw, A., Michalak, J., Stepien, A. e Kadziolka, A. (1986) The relationship between plasma triglycerides, cholesterol, total lipid and lipid peroxidation products during human atherosclerosis. *Clin. Chim. Acta* **155**, 275-284.
- Lee, D.M. (1980) Malondialdehyde formation in stored plasma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **95**, 1633-1672.
- Lee, F.Y.F., Siemann, D.W. e Sutherland, R.M. (1989) Changes in cellular glutathione content during adriamycin treatment in human ovarian-cancer - a possible indicator of chemosensitivity. *Br. J. Cancer* **60**, 291-298.
- Lee, S.H., Rindgen, D., Bible Jr., R.H., Hajdu, E. e Blair, I.A. (2000) Characterization of 2'-deoxyadenosine adducts derived from 4-oxo-2-nonenal, a novel product of lipid peroxidation. *Chem. Res. Toxicol.* **13**, 565-574.
- Lehman, T.A. e Harris, C.C. (1994) Mutational spectra of protooncogenes and tumour suppressor genes: clues in predicting cancer etiology. In Hemminki, K., Dipple, A., Shuker, D.E.G., Kadlubar, F.F., Segerbäck, D. e Bartsch, H. (eds) *DNA adducts: identification and biological significance*. IARC Scientific Publications No.125, IARC, Lyon, p.399-412.
- Lehman, W.D., Stephan, M. e Fürstenberger, G. (1992) Profiling assay for lipoxygenase products of linoleic acid and arachidonic acid by gas chromatography-mass spectrometry. *Anal. Biochem.* **204**, 158-170.
- Lehninger, A.L., Nelson, D.L. e Cox, M.M. (1993) *Principles of biochemistry*. ed.2, Worth publishers, New York.
- Leonarduzzi, G., Parola, M., Muzio, G., Garramone, A., Maggiora, M., Robino, G., Poli, G., Dianzani, M.U. e Canuto, R.A. (1995) Hepatocellular metabolism of 4-hydroxy-2,3-nonenal is impaired in conditions of chronic cholestasis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **214**, 669-675.
- Leonarduzzi, G., Scavazza, A., Biasi, P., Chiarpotto, E., Camandola, S., Vogl, S., Durgel, R. e Poli, G. (1997) The lipid peroxidation end product 4-hydroxy-2,3-nonenal up-regulates transforming growth factor beta 1 expression in the macrophage lineage: a link between oxidative injury and fibrosclerosis. *FASEB J.* **11**, 851-857.
- Lepage, G., Munoz, G., Champagne, J. e Roy, C.C. (1991) Preparative steps necessary for the accurate measurement of malondialdehyde by high performance liquid. *Anal. Biochem.* **197**, 277-283.

- Lauratti, C., Singh, R., Lagneau, C., Farmer, P.B., Plastaras, J.P., Marnett, L.J. e Shuker, D.E.G. (1998) Determination of malondialdehyde-induced DNA damage in human tissues using an immunoslot blot assay. *Carcinogenesis* **19**, 1919-1924.
- Liagre, B., Battu, S., Rigaud, M. e Beneytout, J.L. (1996) Effectiveness of talc as adsorbent for stabilization and expression of *Pisum sativum hortense* Cv. Solara. *J. Agric. Food Chem.* **44**, 2057-2062.
- Lieners, C., Redl, H., Molnar, H., Fürst, W., Hallström, S. e Schlag, G. (1989) Lipid peroxidation in a canine model of hypovolemic-traumatic shock. *Progr. Clin. Biol. Res.* **308**, 345-350.
- Liu, Z., Young-Sciame, R. e Hecht, S.S. (1996) Liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometric detection of an ethenodeoxyguanosine adduct and its hemiaminal precursors in DNA reacted with α -acetoxy-*N*-nitrosopiperidine and *cis*-4-oxo-2-pentenal. *Chem. Res. Toxicol.* **9**, 774-780.
- Loft, S. e Poulsen, H. (1996) Cancer risk and oxidative DNA damage in men. *J. Mol. Med.* **74**, 297-312.
- Loidl-Stahlhofen, A., Hannemann, K. e Spiteller, G. (1994) Generation of α -hydroxyaldehydic compounds in the course of lipid peroxidation. *Biochim. Biophys. Acta* **1213**, 140-148.
- Lorrain-Smith, J. (1899) The pathological effects due to increase of oxygen tension in the air breathed. *J. Physiol.* **24**, 19-25.
- Luo, X., Evrovsky, Y., Cole, D., Trines, J., Benson, L.N., Lehotay, D.C. (1997) Doxorubicin-induced acute changes in cytotoxic aldehydes, antioxidant status and cardiac function in the rat. *Biochim. Biophys. Acta* **1360**, 45-52.
- Lymar, S.V. e Hurst, J.K. (1998) CO₂-catalyzed one-electron oxidations by peroxyxynitrite: properties of the reactive intermediate. *Inorg. Chem.* **37**, 294-301.
- Lymar, S.V., Jiang, Q. e Hurst, J.K. (1996) Mechanism of carbon dioxide-catalyzed oxidation of tyrosine by peroxyxynitrite. *Biochemistry* **35**, 7855-7861.
- Malins, D.C., Polissar, N.L. e Gunselman, S.J. (1996) Progression of human breast cancers to the metastatic state is linked to HO[•]-induced DNA damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 2557-2563.
- Malmstrom, B.G. (1998) Cytochrome oxidase: pathways for electron tunneling and proton transfer. *J. Biol. Inorg. Chem.* **3**, 339-343.
- Mao, H., Schnetz-Boutaud, N.C., Weisenseel, J.P., Marnett, L.J. e Stone, M.P. (1999) Duplex DNA catalyzes the chemical rearrangement of a malondialdehyde deoxyguanosine adduct. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 6615-6620.
- Marion, M.-J., Froment, O. e Trepo, C. (1991) Activation of *Ki-ras* gene by point mutation in human liver angiosarcoma associated with vinyl chloride exposure. *Mol. Carcinog.* **4**, 450-454.

- Marnett, L.J. (1994) Generation of mutagens during arachidonic acid metabolism. *Cancer Metastasis Rev.* **13**, 303-308.
- Marnett, L.J. (1999) Chemistry and biology of DNA damage by malondialdehyde. In: *Exocyclic DNA adducts in mutagenesis and carcinogenesis* (Singer, B. e Bartsch, H., eds), IARC Sci. Publ. **150**, Lyon, IARC, 17-27.
- Marnett, L.J. e Tuttle, M.A. (1980) Comparison of the mutagenicities of malonaldehyde and the side products formed during its chemical synthesis. *Cancer Res.* **40**, 276-282.
- Marnett, L.J., Basu, A.K., O'Hara, S.M., Weller, P.E., Rahman, A.F.M.M. e Oliver, J.P. (1986) Reaction of malondialdehyde with guanine nucleosides: formation of adducts containing oxadiazabicyclononene residues in the base-pairing region. *J. Am. Chem. Soc.* **108**, 1348-1350.
- Marnett, L.J., Hurd, H.K., Hollstein, M.C., Levin, D.E., Esterbauer, H. e Ames, B.N. (1985) Naturally occurring carbonyl compounds are mutagens in *Salmonella* tester strain TA104. *Mutat. Res.* **148**, 25-34.
- Maseki, M., Nishigaki, I., Hagihara, M., Tomoda, Y. e Yagi, K. (1981) Lipid peroxide levels and lipid content of serum lipoprotein fractions of pregnant subjects with or without pre-eclampsia. *Clin. Chim. Acta* **115**, 155-161.
- Masters, C. e Holmes, R. (1977) Peroxisomes: new aspects of cell physiology and biochemistry. *Physiol. Rev.* **57**, 816-882.
- McCord, J.M. e Day, E.D. (1978) Superoxide-dependent production of hydroxyl radical catalyzed by iron EDTA complex. *FEBS Lett.* **86**, 139-142.
- McCord, J.M. e Fridovich, I. (1969) Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein. *J. Biol. Chem.* **244**, 6049-6055.
- McCord, J.M. e Fridovich, I. (1970) The utility of superoxide dismutase in studying free radical reactions. *J. Biol. Chem.* **245**, 1374-1377.
- McGregor, D. e Lang, M. (1996) CCl₄: genetic effects and other modes of action. *Mutat. Res.* **366**, 181-195.
- McLean, E.K. (1970) The toxic actions of pyrrolizidine (*Senecio*) alkaloids. *Pharmacol. Rev.* **22**, 429-483.
- Medeiros, M.H.G., Carvalho, V.M., Farias, L.P. e Loureiro, A.P.M. (1995) DNA Damage induced by secondary lipid peroxidation products. *Ciência e Cultura* **47**, 336-339.
- Medeiros, M.H.G., Palkow, E.E. e Lima, A.S. (1992) Chemiluminescence and DNA strand breakage during horseradish peroxidase catalysed oxidation of DNA adducts with 2,4-decadienal. *Free Rad. Res. Commun.* **16**(Suppl): 19.13.
- Meister, A. (1994) Glutathione, ascorbate and cellular protection. *Cancer Res. Suppl.* **54**, 1969s-1975s.

- Meneghini, R. (1987) A toxicidade do oxigênio. *Ciência Hoje* 5, 57-62.
- Meneghini, R., Benfato, M.S., Bertoncini, C.R., Carvalho, H., Gurgueira, S.A., Robalinho, R.L., Teixeira, H.D., Wedel, C.M.A., Nascimento, A.L.T.O. (1995) Iron homeostasis and oxidative DNA-damage. *Cancer J.* 8, 109-113.
- Meneghini, R. (1997) Iron homeostasis, oxidative stress, and DNA damage. *Free Rad. Biol. Med.* 23, 783-792.
- Merkel, P.B. e Kearns, D.R. (1972) Radiationless decay of singlet molecular-oxygen in solution-experimental and theoretical study of electronic-to-vibrational energy-transfer. *J. Am. Chem. Soc.* 94, 7244-&.
- Michaels, M.L. e Miller, J.H. (1992) The GO system protects organisms from the mutagenic effect of the spontaneous lesion 8-hydroxyguanine (7,8-dihydro-8-oxoguanine). *J. Bacteriol.* 174, 6321-6325.
- Michaels, M.L., Tchou, J., Grollman, A.P. e Miller, J.H. (1992) A repair system for 8-oxo-7,8-dihydrodeoxyguanine. *Biochemistry* 31, 10964-10968.
- Milo, C. e Grosch, W. (1996) Changes in the odorants of boiled salmon and cod as affected by the storage of the raw material. *J. Agric. Food Chem.* 44, 2366-2371.
- Minotti, G. e Aust, S.D. (1992) Redox cycling of iron and lipid peroxidation. *Lipids* 27, 219-226.
- Misra, H.P. e Fridovich, I. (1972) The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* 247, 3170-3175.
- Mitchell, D.Y. e Petersen, D.R. (1989) Oxidation of aldehydic products of lipid peroxidation by rat liver microsomal aldehyde dehydrogenase. *Arch. Biochem. Biophys.* 269, 11-17.
- Mitra, S., Hazra, T.K., Roy, R., Ikeda, S., Biswas, T., Lock, J., Boldogh, I. e Izumi, T. (1997) Complexities of DNA base excision repair in mammalian cells. *Mol. Cell.* 7, 305-312.
- Mlakar, A. e Spiteller, G. (1994) Reinvestigation of lipid peroxidation of linolenic acid. *Biochim. Biophys. Acta* 1214, 209-220.
- Mlakar, A. e Spiteller, G. (1996) Previously unknown aldehydic lipid peroxidation compounds of arachidonic acid. *Chem. Phys. Lipids* 79, 47-53.
- Mo, J.Y., Maki, H. e Sekiguchi, M. (1992) Hydrolytic elimination of a mutagenic nucleotide, 8-oxodGTP, by human 18-kilodalton protein: sanitization of nucleotide pool. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 11021-11025.
- Møller, P. e Wallin, H. (1998) Adduct formation, mutagenesis and nucleotide excision repair of DNA damage produced by reactive oxygen species and lipid peroxidation product. *Mutat. Res.* 410, 271-290.

- Moncada, S. e Higgs, E.A. (1995) Molecular mechanisms and therapeutic strategies related to NO. *FASEB J.* **9**, 1319-1330.
- Moore, M., Thor, H., Moore, G., Nelson, S., Moldeus, P. e Orrenius, S. (1985) The toxicity of acetaminophen and *N*-acetyl-*p*-benzoquinone imine in isolated hepatocytes is associated with thiol depletion and increased cytosolic Ca²⁺. *J. Biol. Chem.* **260**, 3035-3040.
- Moore, W.R., Anderson, M.E., Meister, A., Murata, K. e Kimura, A. (1989) Increased capacity for glutathione synthesis enhances resistance to radiation in *Escherichia coli* - a possible model for mammalian-cell protection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **86**, 1461-1464.
- Morikawa, S., Kurauchi, O., Tanaka, M., Yomeda, M., Uchida, K., Itakura, A., Furugori, K., Kuno, N., Mirutani, S. e Tomoda, Y. (1997) Increased mitochondrial damage by lipid peroxidation in trophoblast cells of preeclamptic placentas. *Biochem. Mol. Biol. Int.* **41**, 767-775.
- Moriya, M. (1993) Single-stranded shuttle phagemid for mutagenesis studies in mammalian cells: 8-oxoguanine in DNA induces targeted G:C→T:A transversions in simian kidney cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 1122-1126.
- Moriya, M., Zhang, W., Johnson, F. e Grollman, A.P. (1994) Mutagenic potency of exocyclic DNA adducts: marked differences between *Escherichia coli* and simian kidney cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 11899-11903.
- Morrow, J.D. e Roberts, L.J. (1996) The isoprostanes-current knowledge and directions for future research. *Biochem. Pharmacol.* **51**, 1-9.
- Morrow, J.D., Awad, J.A., Kato, T., Takahashi, K., Badr, K.F., Roberts, L.J. e Burk, R.F. (1992) Formation of novel non-cyclooxygenase-derived prostanoids (F₂-isoprostanes) in CCl₄ hepatotoxicity. *J. Clin. Invest.* **90**, 2502-2507.
- Moshonas, M.G. e Shaw, P.E. (1979) Isolation of *trans,trans*-2,4-decadienal and intermedeol from cold-pressed citrus oils. *J. Agric. Food Chem.* **27**, 210-211.
- Mosmann, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* **65**, 55-63.
- Mroczkowska, M.M. e Kusmierk, J.T. (1991) Miscoding potential of *N*²,3-ethenoguanine studied in an *Escherichia coli* DNA-dependent RNA polymerase in vitro system and possible role of this adduct in vinyl chloride-induced mutagenesis. *Mutagenesis* **6**, 385-390.
- Mulcahy, R.T., Bailey, H.H. e Gipp, J.J. (1994) Up-regulation of γ -glutamylcysteine synthetase activity in melphalan-resistant human multiple myeloma cells expressing increased glutathione levels. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **34**, 67-71.

- Müller, M., Belas, F.J., Blair, I.A. e Guengerich, F.P. (1997) Analysis of 1,*N*²-ethenoguanine and 5,6,7,9-tetrahydro-7-hydroxy-9-oxoimidazo[1,2-*a*]purine in DNA treated with 2-chlorooxirane by high performance liquid chromatography/electrospray mass spectrometry and comparison of amounts to other DNA adducts. *Chem. Res. Toxicol.* **10**, 242-247.
- Müller-Decker, K., Scholz, K., Marks, F. e Fürstenberger, G. (1995) Differential expression of prostaglandin H synthase isozymes during multistage carcinogenesis in mouse epidermis. *Mol. Carcinog.* **12**, 31-41.
- Müller-Decker, K., Kopp-Schneider, A., Marks, F., Seibert, K. e Fürstenberger, G. (1998) Localization of prostaglandin H synthase isoenzymes in murine epidermal tumors: suppression of skin tumor promotion by inhibition of prostaglandin H synthase-2. *Mol. Carcinog.* **23**, 36-44.
- Nair, J. (1999) Lipid peroxidation-induced etheno-DNA adducts in humans. In: *Exocyclic DNA adducts in mutagenesis and carcinogenesis* (Singer, B. e Bartsch, H., eds), IARC Sci. Publ. **150**, Lyon, IARC, 55-61.
- Nair, J., Barbin, A., Velic, I. e Bartsch, H. (1999) Etheno DNA-base adducts from endogenous reactive species. *Mutat. Res.* **424**, 59-69.
- Nair, J., Carmichael, P.L., Fernando, R.C., Phillips, D.H., Strain, A.J. e Bartsch, H. (1998b) Lipid peroxidation-induced etheno-DNA adducts in liver of patients with the genetic metal storage disorders Wilson's disease and primary hemochromatosis. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **7**, 435-440.
- Nair, J., Fürstenberger, G., Bürger, F., Marks, F. e Bartsch, H. (2000) Promutagenic etheno-DNA adducts in multistage mouse skin carcinogenesis: correlation with lipoxygenase-catalyzed arachidonic acid metabolism. *Chem. Res. Toxicol.* **13**, 703-709.
- Nair, J., Gal, A., Tamir, S., Tannenbaum, S., Wogan, G. e Bartsch, H. (1998a) Etheno adducts in spleen DNA of SJL mice stimulated to overproduce nitric oxide. *Carcinogenesis* **19**, 2081-2084.
- Nair, J., Vaca, C.E., Velic, I., Mutanen, M., Valsta, L.M. e Bartsch, H. (1997) High dietary ω -6 polyunsaturated fatty acids drastically increase the formation of etheno-DNA base adducts in white blood cells of female subjects. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **6**, 597-601.
- Nair, V. e Offerman, R. J. (1985) Ring-extended products from the reaction of epoxy carbonyl compounds and nucleic acid bases. *J. Org. Chem.* **50**, 5627-5631.
- Nair, V., Offerman, R.J., Turner, G.A., Pryor, A.N. e Baenziger, N.C. (1988) Fluorescent 1,4-dihydropyridines - the malondialdehyde connection. *Tetrahedron* **44**, 2793-2803.
- Nair, V., Turner, G.A. e Offerman, R.J. (1984) Novel adducts from the modification of nucleic acid bases by malondialdehyde. *J. Am. Chem. Soc.* **106**, 3370-3371.
- Nappez, C., Battu, S. e Beneytout, J. L. (1996) *Trans, trans*-2,4-decadienal: cytotoxicity and effect on glutathione level in human erythroleukemia (HEL) cells. *Cancer Lett.* **99**, 115-119.

- Nath, R.G. e Chung, F.-L. (1994) Detection of exocyclic 1,*N*²-propanodeoxyguanosine adducts as common DNA lesions in rodents and humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 7491-7495.
- Nath, R.G., Ocando, J.E. e Chung, F.-L. (1996) Detection of 1,*N*²-propanodeoxyguanosine adducts as potential endogenous DNA lesions in rodent and human tissues. *Cancer Res.* 56, 452-456.
- Nath, R.G., Ocando, J.E., Guttenplan, J.B. e Chung, F.-L. (1998) 1,*N*²-Propanodeoxyguanosine adducts: potential new biomarkers of smoking induced DNA damage in human oral tissue. *Cancer Res.* 58, 581-584.
- Nelson, T.J. e Boor, P.J. (1982) Allylamine cardiotoxicity-IV metabolism to acrolein by cardiovascular tissues. *Biochem. Pharmacol.* 31, 509-514.
- Nicotera, P., Bellomo, G. e Orrenius, S. (1992) Calcium-mediated mechanisms in chemically induced cell death. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32, 449-470.
- Niedernhofer, L.J., Riley, M., Schnetz-Boutaud, N., Sanduwaran, G., Chaudhary, A.K., Reddy, G.R. e Mamett, L.J. (1997) Temperature-dependent formation of a conjugate between tris(hydroxy-methyl) aminomethane buffer and the malondialdehyde-DNA adduct pyrimidopurinone. *Chem. Res. Toxicol.* 10, 556-561.
- Nishigaki, I., Hagihara, M., Tsunekawa, H., Maseki, M. e Yagi, K. (1981) Lipid peroxide levels of serum lipoprotein fractions of diabetic patients. *Biochem. Med.* 25, 373-378.
- Nishikawa, T., Edelstein, D., Du, X.L., Yamagishi, S., Matsumura, T., Kaneda, Y., Yorek, M., Beebe, D., Oates, P.J., Hammes, H., Giardino, I. e Brownlee, M. (2000) Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature* 404, 787-790.
- Nohl, H. e Hegner, D. (1978) Do mitochondria produce oxygen radicals *in vivo*? *Eur. J. Biochem.* 82, 563-567.
- Norsten-Höög, C. e Cronholm, T. (1990) Analysis of aldehydic lipid peroxidation products in rat liver and hepatocytes by gas chromatography and mass spectrometry of the oxime-t-butyldimethylsilyl derivatives. *Anal. Biochem.* 189, 131-137.
- Novak, R.F. e Woodcroft, K.J. (2000) The alcohol-inducible form of cytochrome P450 (CYP2E1): role in toxicology and regulation of expression. *Arch. Pharm. Res.* 23, 267-282.
- Ohlsson, B.G., Englund, M.C.O., Karlsson, A.-L.K., Knutsen, E., Erixon, C., Skribeck, H., Liu, Y., Bondjers, G. e Wiklund, O. (1996) Oxidized low density protein inhibits lipopolysaccharide-induced binding of nuclear factor-kappa B to DNA and the subsequent expression of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1-beta in macrophages. *J. Clin. Invest.* 98, 78-89.
- Ohno, K. e Hirata, M. (1990) Induction of γ -glutamylcysteine synthetase by prostaglandin A2 in L-1210 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 168, 551-557.

- Ohshima, H. e Bartsch, H. (1994) Chronic infections and inflammatory processes as cancer risk factors: Possible role of nitric oxide in carcinogenesis. *Mutat. Res.* **305**, 253-264.
- Okamoto, K., Toyokuni, S., Uchida, K., Ogawa, O., Takenawa, J., Kakehi, Y., Kinoshita, H., Hattori-Nakakuki, Y., Hiai, H. e Yoshida, O. (1994) Formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine and 4-hydroxy-2-nonenal modified protein in human renal-cell carcinoma. *Int. J. Cancer* **58**, 825-829.
- Okuda, A., Imagawa, M., Maeda, Y., Sakai, M. e Muramatsu, M. (1989) Structural and functional-analysis of an enhancer GPEI having a phorbol 12-O-tetradecanoate 13-acetate responsive element-like sequence found in the rat glutathione transferase-P gene. *J. Biol. Chem.* **264**, 16919-16926.
- Olinski, R., Zastawny, T.H., Foksinski, M., Barecki, A. e Dizdaroglu, M. (1995) DNA base modifications and antioxidant enzyme activities in human benign prostatic hyperplasia. *Free Rad. Biol. Med.* **18**, 807-813.
- Olive, P. (1988) DNA precipitation assay: a rapid and simple method for detecting DNA damage in mammalian cells. *Environ. Mol. Mutag.* **11**, 487-495.
- Oshino, N., Chance, B., Sies, H. e Bucher, T. (1973) Role of H₂O₂ generation in perfused rat-liver and reaction of catalase compound 1 and hydrogen donors. *Arch. Biochem. Biophys.* **154**, 117-131.
- Otteneider, M. e Lutz, W. (1999) Correlation of DNA adduct levels with tumor incidence: carcinogenic potency of DNA adducts. *Mutat. Res.* **424**, 237-247.
- Page, S., Fischer, C., Baumgartner, B., Haas, M., Kreuzel, U., Loidl, G., Hayn, M., Ziegler-Heitbrock, H.W., Neumeier, D. e Brand, K. (1999) 4-Hydroxynonenal prevents NF-kappaB activation and tumor necrosis factor expression by inhibiting IkappaB phosphorylation and subsequent proteolysis. *J. Biol. Chem.* **274**, 11611-11618.
- Palejwala, V.A., Rzepka, R.W., Simha, D. e 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.
- Palinski, W., Ylä-Herttuala, S., Rosenfeld, M.E., Butler, S.W., Socher, S.A., Parthasarathy, S., Curtiss, L.K. e Witztum, J.L. (1990) Antisera and monoclonal antibodies specific for epitopes generated during oxidative modification of low density lipoprotein. *Arteriosclerosis* **10**, 325-335.
- Pandya, G.A. e Moriya, M. (1996) 1,N⁶-Ethenodeoxyadenosine, a DNA adduct highly mutagenic in mammalian cells. *Biochemistry* **35**, 11487-11492.
- Park, J.-W., Cundy, K.C. e Ames, B.N. (1989) Detection of DNA adducts by high - performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Carcinogenesis* **10**, 827-832.

- Parola, M., Pinzani, M., Casini, A., Albano, E., Poli, G., Gentilini, A., Gentilini, P. e Dianzani, M.U. (1993) Stimulation of lipid-peroxidation or 4-hydroxynonenal treatment increases procollagen-alpha-1 (I) gene-expression in human liver fat-storing cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **194**, 1044-1050.
- Patel, D.J., Mao, B., Gu, Z., Hingerty, B.E., Gorin, A., Basu, A.K. e Broyde, S. (1998) Nuclear magnetic resonance solution structures of covalent aromatic amine-DNA adducts and their mutagenic relevance. *Chem. Res. Toxicol.* **11**, 391-407.
- Patel, J.M., Wood, J.C. e Leibman, K.C. (1980) The biotransformation of allyl alcohol and acrolein in rat liver and lung preparations. *Drug Metab. Dispos.* **8**, 305-308.
- Patterson, M.K.J. (1979) Measurement of growth and viability of cells in culture. *Methods Enzymol.* **58**, 141-152.
- Pedersen, J.Z., Steinkuhler, C., Weser, U. e Rotilio, G. (1996) Cu-glutathione complexes under physiological conditions: structures in solution different from the solid state coordination. *Biometals* **9**, 3-9.
- Petrakis, N.L., Gruenke, L.D. e Craig, J.C. (1981) Cholesterol and cholesterol epoxides in nipple aspirates of human-breast fluid. *Cancer Res.* **41**, 2563-2565.
- Pierre, J.L. (2000) One electron at a time oxidations and enzymatic paradigms: from metallic to non-metallic redox centers. *Chem. Soc. Rev.* **29**, 251-257.
- Pohl, L.R. (1979) Biochemical toxicology of chloroform. *Rev. Biochem. Toxicol.* **1**, 79.
- Poirier, M.C. e Beland, F.A. (1992) DNA adduct measurements and tumor incidence during chronic carcinogen exposure in animal models: implications for DNA adduct-based human cancer risk assessment. *Chem. Res. Toxicol.* **5**, 749-755.
- Poirier, M.C., Santella, R.M. e Weston, A. (2000) Carcinogen macromolecular adducts and their measurement. *Carcinogenesis* **21**, 353-359.
- Poli, G., Dianzani, M.U., Cheeseman, K., Slater, T.F., Lang, J. e Esterbauer, H. (1985) Separation and characterization of the aldehydic products of lipid-peroxidation stimulated by carbon-tetrachloride or ADP iron in isolated rat hepatocytes and rat-liver microsomal suspensions. *Biochem. J.* **227**, 629-638.
- Poot, M., Esterbauer, H., Rabinovitch, P.S. e Hoehn, H. (1988b) Disturbance of cell proliferation by two model compounds of lipid peroxidation contradicts causative role in proliferative senescence. *J. Cell. Physiol.* **137**, 421-429.
- Poot, M., Verkerk, A., Koster, J.F., Esterbauer, H. e Jongkind, J.F. (1987) Influence of cumene hydroperoxide and 4-hydroxynonenal on the glutathione metabolism during in vitro ageing of human skin fibroblasts. *Eur. J. Biochem.* **162**, 287-291.

- Poot, M., Verkerk, A., Koster, J.F., Esterbauer, H. e Jongkind, J.F. (1988a) Reversible inhibition of DNA and protein synthesis by cumene hydroperoxide and 4-hydroxynonenal. *Mech. Age. Develop.* **43**, 1-9.
- Porter, N.A. (1984) Chemistry of lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* **105**, 273-282.
- Porter, N.A. (1986) Mechanisms for the autoxidation of polyunsaturated lipids. *Acc. Chem. Res.* **19**, 262-268.
- Potter, J.D. e Steinmetz, K. (1996) Vegetables, fruit and phytoestrogens as preventive agents. In IARC Scientific Publications 139, 61-90.
- Powley, M.W. e Carlson, G.P. (2000) Cytochromes P450 involved with benzene metabolism in hepatic and pulmonary microsomes. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* **14**, 303-309.
- Prousek, J. (1995) Fenton reaction after a century. *Chemicke Listy* **89**, 11-21.
- Pryor, W.A. (1986) Oxy-radicals and related species: their formation, lifetimes and reactions. *Annu. Rev. Physiol.* **48**, 657-667.
- Pryor, W.A. e Lightsey, J.W. (1981) Mechanisms of NO_2^\bullet reactions: initiation of lipid peroxidation and the production of HNO_2 . *Science* **214**, 435-437.
- Pryor, W.A. e Porter, N.A. (1990) Suggested mechanisms for the production of 4-hydroxy-2-nonenal from the autoxidation of polyunsaturated fatty acids. *Free Rad. Biol. Med.* **8**, 541-543.
- Pryor, W.A. e Squadrito, G.L. (1995) The chemistry of peroxyxynitrite: a product from the reaction of NO with $\text{O}_2^{\bullet-}$. *Am. J. Physiol.* **268**, L699-L722.
- Pryor, W.A. e Stanley, J.P. (1975) Suggested mechanism for production of malonaldehyde during autoxidation of polyunsaturated fatty-acids - nonenzymatic production of prostaglandin endoperoxides during autoxidation. *J. Org. Chem.* **40**, 3615-3617.
- Purmal, A.A., Lampman, G.W., Bond, J.P., Hatahet, Z. e Wallace, S.S. (1998) Enzymatic processing of uracil glycol, a major oxidative product of DNA cytosine. *J. Biol. Chem.* **273**, 10026-10035.
- Quash, G., Ripoll, H., Gazzolo, L., Doutheau, A., Saba, A. e Gore, J. (1987) Malondialdehyde production from spermine by homogenates of normal and transformed-cells. *Biochimie* **69**, 101-108.
- Quinlan, G.J., Mumby, S., Pepper, J. e Gutteridge, J.M.C. (1994) Plasma 4-hydroxy-2-nonenal levels during cardiopulmonary bypass, and their relationship to the iron-loading of transferrin. *Biochem. Mol. Biol. Internat.* **34**, 1277-1282.
- Quintanilla, M., Brown, K., Ramsden, M. e Balmain, A. (1986) Carcinogen-specific mutation and amplification of Ha-ras during mouse skin carcinogenesis. *Nature* **322**, 78-80.
- Radi, R. (1998) Peroxyxynitrite reactions and diffusion in biology. *Chem. Res. Toxicol.* **11**, 720-721.

- Rajagopalan, K.V. (1980) Xanthine oxidase and aldehyde oxidase. In *Enzymatic basis of detoxication*. v.1, ed. Jakoby W., p.295, New York, Academic Press,.
- Rajewsky, B. (1952) The limits of the target theory of the biological action of radiation. *Brit. J. Radiol.* **25**, 550-552.
- Randerath, K., Reddy, M.V. e Disher, R.M. (1986) Age- and tissue- related DNA modifications in untreated rats: detection by ³²P-post-labeling assay and possible significance for spontaneous tumor induction and aging. *Carcinogenesis* **7**, 1615-1617.
- Rauli, S., Del Puppo, M., Magni, F. e Kienle, M.G. (1998) Validation of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-trans-nonenal measurement in plasma by NICI-GC-MS. *J. Biochem.* **123**, 918-923.
- Ravanat, J.L., Turesky, R.J., Gremaud, E., Trudel, L.J. e Stadler, R.H. (1995) Determination of 8-oxoguanine in DNA by gas chromatography-mass spectrometry and HPLC-electrochemical detection: overestimation of the background level of the oxidized base by the gas chromatography-mass spectrometry assay. *Chem. Res. Toxicol.* **8**, 1039-1045.
- Ray, R.S. e McCord, J.M. (1982) Ischemia-induced conversion of xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase. *Fed. Proc.* **41**, 767.
- Reagan, L.P., Magarinos, A.M., Yee, D.K., Swzeda, L.I., Van Bueren, A., McCall, A.L. e McEwen, B. S. (2000) Oxidative stress and HNE conjugation of GLUT3 are increased in the hippocampus of diabetic rats subjected to stress. *Brain Res.* **862**, 292-300.
- Reddy, G.R. e Marnett, L.J. (1995) Synthesis of an oligonucleotide containing the alkaline labile malondialdehyde-deoxyguanosine adduct pyrimido[1,2- α]purin-10(3H)-one. *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 5007-5008.
- Rees, K.R. e Tarlow, M.J. (1967) The hepatotoxic action of allyl formate. *Biochem. J.* **104**, 757-761.
- Reiss, U. e Tappel, A.L. (1973) Fluorescent product formation and changes in the structure of DNA reacted with peroxidizing arachidonic acid. *Lipids* **8**, 199-202.
- Reiss, U., Tappel, A.L. e Chio, K.S. (1972) DNA-malonaldehyde reaction: Formation of fluorescent products. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **48**, 921-926.
- Requena, J.R., Fu, M.X., Ahmed, M.U., Jenkins, A.J., Lyons, T.J., Baynes, J.W. e Thorpe, S.R. (1997) Quantification of malondialdehyde and 4-hydroxynonenal adducts to lysine residues in native and oxidized human low-density lipoprotein. *Biochem. J.* **322**, 317-325.
- Richeson, C.E., Mulder, P., Bowry, V.W. e Ingold, K.U. (1998) The complex chemistry of peroxyxynitrite decomposition: new insights. *J. Am. Chem. Soc.* **120**, 7211-7219.

- Richman, P.G. e Meister, A. (1975) Regulation of gamma-glutamyl-cysteine synthetase by non-allosteric feedback inhibition by glutathione. *J. Biol. Chem.* **250**, 1422-1426.
- Richter, C. e Meier, P. (1990) Inhibition of prooxidant-induced mitochondrial pyridine nucleotide hydrolysis and calcium release by 4-hydroxynonenal. *Biochem. J.* **269**, 735-737.
- Rindgen, D., Nakajima, M., Wehrli, S., Xu, K. e Blair, I.A. (1999) Covalent modifications to 2'-deoxyguanosine by 4-oxo-2-nonenal, a novel product of lipid peroxidation. *Chem. Res. Toxicol.* **12**, 1195-1204.
- Roberts, J.C. e Francetic, D.J. (1991) Time course for the elevation of glutathione in numerous organs of L1210-bearing CDF1 mice given in L-cysteine prodrug, RibCys. *Toxicol. Lett.* **59**, 245-251.
- Roberts, L.J. e Morrow, J.D. (1997) The generation and actions of isoprostanes. *Biochem. Biophys. Acta* **1345**, 121-135.
- Ross, J.A. e Nesnow, S. (1999) Polycyclic aromatic hydrocarbons: correlations between DNA adducts and *ras* oncogene mutations. *Mutat. Res.* **424**, 155-166.
- Ross, R. (1993) The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* **362**, 801-809.
- Rouzer, C.A., Chaudhary, A.K., Nokubo, M., Ferguson, D.M., Reddy, G.R., Blair, I.A. e Marnett, L.J. (1997) Analysis of the malondialdehyde-2'-deoxyguanosine adduct, pyrimidopurinone, in human leukocyte DNA by gas chromatography/electron capture negative chemical ionization/mass spectrometry. *Chem. Res. Toxicol.* **10**, 181-188.
- Rubbo, H., Parthasarathy, S., Barnes, S., Kirk, M., Kalyanaraman, B. e Freeman, B.A. (1995) Inhibition of lipoxygenase-dependent liposome and LDL oxidation: termination of radical chain propagation reactions and formation of nitrogen-containing oxidized lipids. *Arch. Biochem. Biophys.* **324**, 15-25.
- Rushmore, T.H., King, R.G., Paulson, K.E. e Pickett, C.B. (1990) Regulation of glutathione S-transferase YA subunit gene-expression - identification of a unique xenobiotic responsive element controlling inducible expression by planar aromatic compounds. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **87**, 3826-3830.
- Salmon, S., Maziere, C., Theron, L., Beucler, I., Jarrier-Ayrault, M., Goldstein, S. e Polonovski, J. (1987) Immunological detection of low-density lipoproteins modified by malondialdehyde in vitro or in vivo. *Biochim. Biophys. Acta* **920**, 215-220.
- Salomon, R.G., Kaur, K., Podrez, E., Hoff, H.F., Krushinsky, A.V. e Sayre, L.M. (2000) HNE-Derived 2-pentylpyrroles are generated during oxidation of LDL, are more prevalent in blood plasma from patients with renal disease or atherosclerosis, and are present in atherosclerotic plaques. *Chem. Res. Toxicol.* **13**, 557-564.
- Santos, CXC, Bonini, M.G. e Augusto, O. (2000) Role of the carbonate radical anion in tyrosine nitration and hydroxylation by peroxynitrite. *Arch. Biochem. Biophys.* **377**, 146-152.

- Santos, M.T., Valles, J., Aznar, J. e Vilches, J. (1980) Determination of plasma malondialdehyde-like material and its clinical application in stroke patients. *J. Clin. Pathol.* **33**, 973-976.
- Saparbaev, M. e Laval, J. (1999) Enzymology of the repair of theno adducts in mammalian cells and in *Escherichia coli*. In: *Exocyclic DNA adducts in mutagenesis and carcinogenesis* (Singer, B. e Bartsch, H., eds), IARC Sci. Publ. **150**, Lyon, IARC, 249-261.
- Sato, Y., Hotta, N., Sakamoto, N., Matsuoka, S., Ohishi, N. e Yagi, K. (1979) Lipid peroxide levels in plasma of diabetic patients. *Biochem. Med.* **21**, 104-107.
- Satoh, K. (1978) Serum lipid peroxide in cerebrovascular disorders determined by a new colorimetric method. *Clin. Chim. Acta* **90**, 37-43.
- Sattangji, P.D., Leonard, N.J. e Frihart, C.R. (1977) 1,*N*²-Ethenoguanine and *N*²,3-ethenoguanine. Synthesis and comparison of the electronic spectral properties of these linear and angular triheterocycles related to the Y bases. *J. Org. Chem.* **42**, 3292-3296.
- Sawyer, D.T. e Valentine, J.S. (1981) How super is superoxide. *Accounts Chem Res.* **14**, 393-400.
- Schamberg, R.J., Corlett, C.L., Beaman, K.D. e Kasten, B.L. (1979) Antioxidants reduce the mutagenic effect of malonaldehyde and beta-propiolactone. IX. Antioxidants and cancer. *Mutat. Res.* **66**, 349-355.
- Schieberle, P. e Grosch, W. (1991) Potent odorants of the wheat bread crumb: differences to the crust and effect of a longer dough fermentation. *Z. Lebensm.-Unters.-Forsch.* **192**, 130-135.
- Schmid, K., Nair, J., Winde, G., Velic, I. e Bartsch, H. (2000) Increased levels of promutagenic etheno-DNA adducts in colonic polyps of FAP patients. *Int. J. Cancer* **87**, 1-4.
- Schnermann, P. e Schieberle, P. (1997) Evaluation of key odorants in milk chocolate and cocoa mass by aroma extract dilution analyses. *J. Agric. Food Chem.* **45**, 867-872.
- Schoental, R. (1968) Toxicology and carcinogenic action of pyrrolizidine alkaloids. *Cancer Res.* **28**, 2237-2246.
- Sedar, A.W., Silver, M.J., Kocsis, J.J. e Smith, J.B. (1978) Fatty acids and the initial events of endothelial damage seen by scanning and transmission electron microscopy. *Atherosclerosis* **30**, 273-284.
- Segall, H.J., Wilson, D.W., Dallas, J.L. e Haddon, W.F. (1985) *trans*-4-Hydroxy-2-hexenal: a reactive metabolite from the macrocyclic pyrrolizidine alkaloid senecionine. *Science* **229**, 472-475.
- Segerbäck, D. (1983) Alkylation of DNA and hemoglobin in the mouse following exposure to ethene and ethene oxide. *Chem.-Biol. Interact.* **45**, 139-151.
- Selley, M.L. (1997) Determination of the lipid peroxidation product (*E*)-4-hydroxy-2-nonenal in clinical samples by gas chromatography-negative-ion chemical ionisation mass spectrometry of the *O*-pentafluorobenzyl oxime. *J. Chromatogr. B* **691**, 263-268.

-
- Selley, M.L., Bartlett, M.R., McGuinness, J.A., Hapel, A.J., Ardlie, N.G., Lacey, M.J. (1989) Determination of the lipid peroxidation product trans-4-hydroxy-2-nonenal in biological samples by high performance liquid chromatography and combined capillary gas chromatography / negative ion chemical ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr.* **488**, 329-340.
- Seto, H., Okuda, T., Takesue, T. e Ikemura, T. (1983) Reaction of malondialdehyde with nucleic acid. I. Formation of fluorescent pyrimido[1,2- α]purin-10(3H)-one nucleosides. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **56**, 1799-1802.
- Seto, H., Takesue, T. e Ikemura, T. (1985) Reaction of malonaldehyde with nucleic acid. II. Formation of fluorescent pyrimido [1,2- α]purin-10(3H)-one mononucleotide. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **58**, 3431-3435.
- Sevanian, A. e Peterson, A.R. (1984) Cholesterol epoxide is a direct-acting mutagen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 4198-4202.
- Shi, M.M., Kugelman, A., Iwamoto, T., Tian, L. e Forman, H.J. (1994) Quinone-induced oxidative stress elevates glutathione and induces γ -glutamylcysteine synthetase activity in rat lung epithelial L2 cells. *J. Biol. Chem.* **269**, 26512-26517.
- Shibutani, S., Suzuki, N., Matsumoto, Y. e 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. e Grollman, A.P. (1991) Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxodG. *Nature* **349**, 431-434.
- Shimada, T., Yamazaki, H., Mimura, M., Wakamiya, N., Ueng, Y.F., Guengerich, F.P. e Inui, Y. (1996) Characterization of microsomal cytochrome P450 enzymes involved in the oxidation of xenobiotic chemicals in human fetal livers and adult lungs. *Drug Metab. Disp.* **24**, 515-522.
- Shimoda, M., Nakada, Y., Nakashima, M. e Osajima, Y. (1997) Quantitative comparison of volatile flavor compounds in deep-roasted and light-roasted sesame seed oil. *J. Agric. Food Chem.* **45**, 3193-3196.
- Siems, W.G., Grune, T. e Esterbauer, H. (1995) 4-Hydroxynonenal formation during ischemia and reperfusion of rat small intestine. *Life Sci.* **57**, 785-789.
- Sies, H. (1986) Biochemistry of oxidative stress. *Angewandte Chemie* **25**, 1058-1071.
- Sills, R.C., Hong, H.L., Melnick, R.L., Boorman, G.A. e Devereux, T.R. (1999) High frequency of codon 61 K-*ras* A \rightarrow T transversions in lung and Harderian gland neoplasms of B6C3F1 mice exposed to chloroprene (2-chloro-1,3-butadiene) for 2 years and comparisons with the structurally related chemicals isoprene and 1,3-butadiene. *Carcinogenesis* **20**, 657-662.
- Singer, B. e Hang, B. (1997) What structural features determine repair enzyme specificity and mechanism in chemically modified DNA? *Chem. Res. Toxicol.* **10**, 713-732.
-

- Singer, B. e Hang, B. (1999) Mammalian enzymatic repair of etheno and *para*-benzoquinone exocyclic adducts derived from the carcinogens vinyl chloride and benzene. In: *Exocyclic DNA adducts in mutagenesis and carcinogenesis* (Singer, B. e Bartsch, H., eds), IARC Sci. Publ. **150**, Lyon, IARC, 233-247.
- Singer, B., Kusmierek, J.T., Folkman, W., Chavez, F. e Dosanjh, M.K. (1991) Evidence for the mutagenic potential of the vinyl chloride induced adduct, $N^2,3$ -etheno-deoxyguanosine, using a site-directed kinetic assay. *Carcinogenesis* **12**, 745-747.
- Singer, B., Spengler, S.J., Chavez, F. e Kusmierek, J.T. (1987) The vinyl chloride-derived nucleoside, $N^2,3$ -ethenoguanosine, is a highly efficient mutagen in transcription. *Carcinogenesis* **8**, 745-747.
- Smith, B.A., Korfmacher, W.A. e Beland, F.A. (1990) DNA adduct formation in target tissues of Sprague-Dawley rats, CD-1 mice and A/J mice following tumorigenic doses of 1-nitropyrene. *Carcinogenesis* **11**, 1705-1710.
- Smith, R.A., Cohen, S.M. e Lawson, T.A. (1990) Acrolein mutagenicity in the V79 assay. *Carcinogenesis* **11**, 497-498.
- Smith, R.A., Williamson, D.S. e Cohen, S.M. (1989) Identification of 3, N^4 -propanodeoxycytidine-5'-monophosphate. *Chem. Res. Toxicol.* **2**, 267-271.
- Smith, R.A., Williamson, D.S., Cerny, R.L. e Cohen, S.M. (1990) Detection of 1, N^6 -propanodeoxyadenosine in acrolein-modified polydeoxyadenylic acid an DNA by ^{32}P postlabeling. *Cancer Res.* **50**, 3005-3012.
- Sodum, R.S. e Chung, F.-L. (1988) 1, N^2 -ethenodeoxyguanosine as a potential marker for DNA adduct formation by trans-4-hydroxy-2-nonenal. *Cancer Res.* **48**, 320-323.
- Sodum, R.S. e Chung, F.-L. (1991) Stereoselective formation of *in vitro* nucleic acid adducts by 2,3-epoxy-4-hydroxynonanal. *Cancer Res.* **51**, 137-143.
- Sodum, R.S. e Shapiro, R. (1988) Reaction of acrolein with cytosine and adenine derivatives. *Bioorganic Chem.* **16**, 272-282.
- Spalding, J.W. (1988) *Toxicology and carcinogenesis studies of malondialdehyde sodium salt (3-hydroxy-2-propenal, sodium salt) in F344/N rats and B6C3F1 mice* (NTP Tech. Rep. 331). Washington DC, National Toxicology Program, pp. 5-13.
- Spector, A. (1995) Oxidative stress-induced cataract – mechanism of action. *FASEB J.* **9**, 1173-1182.
- Spitz, D.R., Malcolm, R.R. e Roberts, R.J. (1990) Cytotoxicity and metabolism of 4-hydroxy-2-nonenal and 2-nonenal in H_2O_2 -resistant cell lines. *Biochem. J.* **267**, 453-459.
- Spitz, D.R., Sullivan, S.J., Malcolm, R.R. e Roberts, R.J. (1991) Glutathione dependent metabolism and detoxification of 4-hydroxy-2-nonenal. *Free Rad. Biol. Med.* **11**, 415-423.

- Spycher, S., Tabataba-Vakili, S., O'Donnell, V.B., Palomba, L. e Azzi, A. (1996) 4-Hydroxy-2,3-trans-nonenal induces transcription and expression of aldose reductase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **226**, 512-516.
- Steinberg, D., Parthasarathy, S., Carew, T.E., Khoo, J.C. e Witztum, J.L. (1989) Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N. Engl. J. Med.* **320**, 915-924.
- Stone, K., Ksebati, M. e Marnett, L.J. (1990a) Investigation of the adducts formed by reaction of malondialdehyde with adenosine. *Chem. Res. Toxicol.* **3**, 33-38.
- Stone, K., Uzieblo, A. e Marnett, L.J. (1990b) Studies of the reaction of malondialdehyde with cytosine nucleosides. *Chem. Res. Toxicol.* **3**, 467-472.
- Suematsu, T., Kamada, T., Abe, H., Kikuchi, S. e Yagi, K. (1977) Serum lipoperoxide level in patients suffering from liver diseases. *Clin. Chim. Acta* **79**, 267-270.
- Sukumar, S., Notario, V., Martin-Zanca, D. e Barbacid, M. (1983) Induction of mammary carcinomas in rats by nitroso-methylurea involves malignant activation of *H-ras-1* locus by single point mutations. *Nature* **306**, 658-661.
- Summerfield, F.W. e Tappel, A.L. (1983) Determination by fluorescence quenching of the environment of DNA crosslinks made by malondialdehyde. *Biochim. Biophys. Acta* **740**, 185-189.
- Summerfield, F.W. e Tappel, A.L. (1984a) Detection and measurement by high-performance liquid chromatography of malondialdehyde crosslinks in DNA. *Anal. Biochem.* **143**, 265-271.
- Summerfield, F.W. e Tappel, A.L. (1984b) Effects of dietary polyunsaturated fats and vitamin E on aging and peroxidative damage to DNA. *Arch. Biochem. Biophys.* **233**, 408-416.
- Sun, Yi (1990) Free radicals, antioxidant enzymes, and carcinogenesis. *Free Rad. Biol. Med.* **8**, 583-599.
- Suzuki, Y.J., Tsuchiya, M. e Packer, L. (1992) Lipoate prevents glucose-induced protein modifications. *Free Rad. Res. Commun.* **17**, 211-217.
- Swenberg, J. A., Fedtke, N., Ciroussel, F., Barbin, A. e Bartsch, H. (1992) Etheno adducts formed in DNA of vinyl chloride-exposed rats are highly persistent in liver. *Carcinogenesis* **13**, 727-729.
- Szweda, L.I., Uchida, K., Tsai, L. e Stadtman, E.R. (1993) Inactivation of glucose-6-phosphate dehydrogenase by 4-hydroxy-2-nonenal. Selective modification of an active-site lysine. *J. Biol. Chem.* **268**, 3342-3347.
- Tajiri, T., Maki, H. e Sekiguchi, M. (1995) Functional cooperation of MutT, MutM e MutY proteins in preventing mutations caused by spontaneous oxidation of guanine nucleotide in *Escherichia coli*. *Mutat. Res.* **336**, 257-267.

- Tamir, S., De Rojas-Walker, T., Wishnok, J.S. e Tannenbaum, S.R. (1996) DNA damage and genotoxicity by nitric oxide. *Methods Enzimol.* **269**, 230-243.
- Tanaka, T. (1997) Effect of diet on human carcinogenesis. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **25**, 73-95.
- Tchou, J., Kasai, H., Shibutani, S., Chung, M.-H., Laval, J., Grollman, A.P. e Nishimura, S. (1991) 8-Oxoguanine (8-hydroxyguanine) DNA glycosylase and its substrate specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 4690-4694.
- Thai, S.-F., Lewis, J.G., Williams, R.B., Johnson, S.P. e Adams, D.O. (1995) Effects of oxidized LDL on mononuclear phagocytes: inhibition of induction of four inflammatory cytokine gene RNAs, release of NO and cytotoxicity of tumor cells. *J. Leukocyte Biol.* **57**, 427-433.
- Thomas, C.E., Jackson, R.L., Ohlweiler, D.F. e Ku, G. (1994) Multiple lipid oxidation products in low density lipoproteins induce interleukin-1 beta release from human blood mononuclear cells. *J. Lipid Res.* **35**, 417-427.
- Thornalley, P.J. (1996) Pharmacology of methylglyoxal: formation, modification of proteins and nucleic acids, and enzymatic detoxification- a role in pathogenesis and antiproliferative chemotherapy. *Gen. Pharmacol.* **27**, 565-573.
- Tomita, M., Okuyama, T., Hatta, Y. e Kawaj, S. (1990) Determination of free malondialdehyde by gas chromatography with an electron-capture detector. *J. Chromatogr.* **526**, 174-179.
- Totter, T.R. (1980) Spontaneous cancer and its possible relationship to O₂ metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 1763-1767.
- Touw, I.P., De Koning, J.P., Ward, A.C., Hermans, M.H.A. (2000) Signaling mechanisms of cytokine receptors and their perturbances in disease. *Mol. Cell. Endocrinol.* **160**, 1-9.
- Toyokuni, S., Luo, X.P., Tanaka, T., Uchida, K., Hiai, H. e Lehotay, D.C. (1997) Induction of a wide range of C(2-12) aldehydes and C(7-12) acylolins in the kidney of Wistar rats after treatment with a renal carcinogen, ferric nitrilotriacetate. *Free Rad. Biol. Med.* **22**, 1019-1027.
- Tretyakova, N.Y., Wishnok, J.S. e Tannenbaum, S.R. (2000) Peroxynitrite-induced secondary oxidative lesions at guanine nucleobases: chemical stability and recognition by the Fpg DNA repair enzyme. *Chem. Res. Toxicol.* **13**, 658-664.
- Tsuchida, S. e Sato, K. (1992) Glutathione transferases and cancer. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **27**, 337-384.
- Tuma, D.J., Thiele, G.M., Xu, D., Klassen, L.W. e Sorrell, M.F. (1996) Acetaldehyde and malondialdehyde react together to generate distinct protein adducts in the liver during long-term ethanol administration. *Hepatology* **23**, 872-880.

- Turrens, J.F. (1997) Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *Biosci. Rep.* 17, 3-8.
- Uchida, K., Itakura, K., Kawakishi, S., Hiai, H., Toyokuni, S. e Stadtman, E.R. (1995) Characterization of epitopes recognized by 4-hydroxy-2-nonenal specific antibodies. *Arch. Biochem. Biophys.* 324, 241-248.
- Uchida, K., Shiraishi, M., Naito, Y., Torii, Y., Nakamura, Y. e Osawa, T. (1999) Activation of stress signaling pathways by the end product of lipid peroxidation. 4-Hydroxy-2-nonenal is a potential inducer of intracellular peroxide production. *J. Biol. Chem.* 274, 2234-2242.
- Uppu, R.M., Cueto, R., Squadrito, G.L., Salgo, M.G. e Pryor, W.A. (1996b) Competitive reactions of peroxynitrite with 2'-deoxyguanosine and 7,8-dihydro-8-oxo-2'-deoxyguanosine (8-oxo-dG): relevance to the formation of 8-oxo-G in DNA exposed to peroxynitrite. *Free Rad. Biol. Med.* 21, 407-411.
- Uppu, R.M., Squadrito, G.L. e Pryor, W.A. (1996a) Acceleration of peroxynitrite oxidations by carbon dioxide. *Arch. Biochem. Biophys.* 327, 335-343.
- Vaca, C.E., Fang, J.-L., Mutanen, M. e Valsta, L. (1995) ³²P-Postlabeling determination of DNA adducts of malonaldehyde in humans: total white blood cells and breast tissue. *Carcinogenesis* 16, 1847-1851.
- Vaca, C.E., Vodicka, P. e Hemminki, H. (1992) Determination of malonaldehyde-modified 2'-deoxyguanosine-3'-monophosphate and DNA by ³²P-postlabeling. *Carcinogenesis* 13, 593-599.
- Vaca, C.E., Wilhelm, J. e Harms-Ringdahl, M. (1988) Interaction of lipid peroxidation products with DNA. A review. *Mutat. Res.* 195, 137-149.
- Valentine, M.R., Rodriguez, H. e Termini, J. (1998) Mutagenesis by peroxy radical is dominated by transversions at deoxyguanosine. Evidence for the lack of involvement of 8-oxo-dG and/or abasic site formation. *Biochemistry* 37, 7030-7038.
- Van Kuijk, F.J.G.M., Holte, L.L. e Dratz, E.A. (1990) 4-Hydroxyhexenal: a lipid peroxidation product derived from oxidized docosahexaenoic acid. *Biochim. Biophys. Acta* 1043, 116-118.
- Van Ruth, S.M., Roozen, J.P. e Cozijnsen, J.L. (1995) Volatile compounds of rehydrated French beans, bell peppers and leeks. Part 1. Flavor release in the mouth and in three mouth model systems. *Food Chem.* 53, 15-22.
- Vanhoutte, K., Van Dongen, W., Hoes, I. Lemière, F., Esman E.L., Van Onckelen, H., Van den Eeckhout, E. Van Soest, R.E.J. e Hudson, A.J. (1997) Development of a nanoscale liquid chromatography/electrospray mass spectrometry methodology for the detection and identification of DNA adducts. *Anal. Chem.* 69, 3161-3168.
- Verna, L., Whysner, J. e Williams, G.M. (1996) 2-Acetylaminofluorene mechanistic data and risk assessment: DNA reactivity, enhanced cell proliferation and tumor initiation. *Pharmacol. Ther.* 71, 83-105.

- Viinikka, L., Vuori, J. e Ylikorkala, O. (1984) Lipid peroxides, prostacyclin, and thromboxane A-2 in runners during acute exercise. *Med. Sci. Sport Exer.* **16**, 275-277.
- Viner, R.I., Ferrington, D.A., Aced, G.I., Miller-Schlyer, M., Bigelow, D.J. e Schoneich, C. (1997) *In vivo* aging of rat skeletal muscle sarcoplasmic reticulum Ca-ATPase. Chemical analysis and quantitative simulation by exposure to low levels of peroxy radicals. *Biochim. Biophys. Acta* **1329**, 321-335.
- Voitkun, V. e Zhitkovich, A. (1999) Analysis of DNA-protein crosslinking activity of malondialdehyde *in vitro*. *Mutat. Res.* **424**, 97-106.
- Volin, M.V. e Koch, A.E. (2000) Cell cycle implications in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Front. Biosci.* **5**, D594-D601.
- Wagner, B.A., Buettner, G.R. e Burns, C.P. (1994) Free radical-mediated lipid peroxidation in cells: oxidizability is a function of cell lipid bis-allylic hydrogen content. *Biochemistry* **33**, 4449-4453.
- Walling, C., Partch, R.E. e Weil, T. (1975) Kinetics of the decomposition of H₂O₂ catalyzed by ferric EDTA complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **72**, 140-142.
- Wang, D., Kreutzer, D.A. e Essigmann, J.M. (1998b) Mutagenicity and repair of oxidative DNA damage: insights from studies using defined lesions. *Mutat. Res. Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* **400**, 99-115.
- Wang, M., Dhingra, K., Hittleman, W.N., Liehr, J.G., de Andrade, M. e Li, D. (1996) Lipid peroxidation-induced putative malondialdehyde-DNA adducts in human breast tissues. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **5**, 705-710.
- Wang, M.-Y. e Liehr, J.G. (1995) Induction by estrogens of lipid peroxidation and lipid peroxide-derived malonaldehyde-DNA adducts in male Syrian hamsters: role of lipid peroxidation in estrogen-induced kidney carcinogenesis. *Carcinogenesis* **16**, 1941-1945.
- Wang, X., Suzuki, T., Itoh, T., Honma, M., Nishikawa, A., Furukawa, F., Takahashi, M., Hayashi, M., Kato, T. e Sofuni, T. (1998a) Specific mutational spectrum of dimethylnitrosamine in the *lacI* transgene of Big Blue C57BL/6 mice. *Mutagenesis* **13**, 625-630.
- Ward, J.F. (1988) DNA damage produced by ionizing radiation in mammalian cells: identities, mechanisms of formation and reparability. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **35**, 95-125.
- Wawra, E., Zollner, H., Schaur, R.J., Tillian, H.M. e Schauenstein, E. (1986) The inhibitory effect of 4-hydroxynonenal on DNA-polymerases alpha and beta from rat liver and rapidly dividing Yoshida ascites hepatoma. *Cell Biochem. Funct.* **4**, 31-36.
- Wei, L., Wei, H. e Frenkel, K. (1993) Sensitivity to tumor promotion of SENCAR and C57BL/6J mice correlates with oxidative events and DNA damage. *Carcinogenesis* **14**, 841-847.

- Werner, H e Le Roith, D. (2000) New concepts in regulation and function of the insulin-like growth factors: implications for understanding normal growth and neoplasia. *Cell. Mol. Life Sci.* **57**, 932-942.
- Weston, A. (1993) Physical methods for the detection of carcinogen-DNA adducts in humans. *Mutat. Res.* **288**, 19-29.
- Williams, G., Mori, H., Hirono, I. e Nagao, M. (1980) Genotoxicity of pyrrolizidine alkaloids in the hepatocyte primary culture/DNA-repair test. *Mutat. Res.* **79**, 1-5.
- Wilson, V.L., Foiles, P.G., Chung, F.-L., Povey, A.C., Frank, A.A. e Harris, C.C. (1991) Detection of acrolein and crotonaldehyde DNA adducts in cultured human cells and canine peripheral blood lymphocytes by ³²P-postlabeling and nucleotide chromatography. *Carcinogenesis* **12**, 1483-1490.
- Winkler, P., Lindner, W., Esterbauer, H., Schauenstein, E., Schaur, R.J. e Khoschorur, G.A. (1984) Detection of 4-hydroxynonenal as a product of lipid peroxidation in native Ehrlich ascites tumor cells. *Biochim. Biophys. Acta* **796**, 232-237.
- Winter, C.K., Segall, H.J. e Haddon, W.F. (1986) Formation of cyclic adducts of deoxyguanosine with the aldehydes trans-4-hydroxy-2-hexenal and trans-4-hydroxy-2-nonenal in vitro. *Cancer Res.* **46**, 5682-5686.
- Winterbourn, C.C. (1982) Superoxide-dependent formation of hydroxyl radicals in the presence of iron salts is a feasible source of hydroxyl radicals in vivo. *Biochem. J. Lett.* **205**, 461-463.
- Winterbourn, C.C. (1985) Free-radical production and oxidative reactions of hemoglobin. *Env. Health Perspect.* **64**, 321-330.
- Witz, G. (1989) Biological interactions of α,β -unsaturated aldehydes. *Free Rad. Biol. Med.* **7**, 333-349.
- Witztum, J.L. e Steinberg, D. (1991) Role of oxidized low-density lipoprotein in atherogenesis. *J. Clin. Invest.* **88**, 1785-1792.
- Wong, S.H.Y., Knight, J.A., Hopfer, S.M., Zaharia, O., Leach, C.N. e Sunderman, F.W. (1987) Lipoperoxides in plasma as measured by liquid-chromatographic separation of malondialdehyde thiobarbituric acid adduct. *Clin. Chem.* **33**, 214-220.
- Woods, J.S., Davis, H.A. e Baer, R.P. (1992) Enhancement of gamma glutamylcysteine synthetase messenger-RNA in rat-kidney by methyl mercury. *Arch. Biochem. Biophys.* **296**, 350-353.
- Wynder, E.L., Goodman, D.A. e Hoffmann, D. (1965) Ciliotoxic compounds in cigarette smoke. II. Carboxylic acids and aldehydes. *Cancer* **18**, 505-509.
- Xu, D., Thiele, M., Kearley, M., Haugen, M., Klassen, L., Sorrell, M., Tuma, D. (1997) Epitope characterization of malondialdehyde-acetaldehyde adducts using an enzyme-linked immunosorbent assay. *Chem. Res. Toxicol.* **10**, 978-986.

- Xu, G. e Sayre, L.M. (1998) Structural characterization of 4-hydroxynonenal-2-alkenal-derived fluorophore that contributes to lipoperoxidation-dependent protein cross-linking in aging and degenerative disease. *Chem. Res. Toxicol.* **11**, 247-251.
- Yagi, K., Ohkawa, H., Ohishi, N., Yamashita, M. e Nakashima, T. (1981) Lesion of aortic intima caused by intravenous administration of linoleic acid hydroperoxide. *J. Appl. Biochem.* **3**, 58-65.
- Yang, M.-H. e Schaich, M. (1996) Factors affecting DNA damage caused by lipid hydroperoxides and aldehydes. *Free Rad. Biol. Med.* **20**, 225-236.
- Yasaka, T., Ohya, I., Matsumoto, J., Shiramizu, T. e Sasaguri, Y. (1981) Acceleration of lipid peroxidation in human paraquat poisoning. *Arch. Intern. Med.* **141**, 1169-1173.
- Yen, T.-Y., Christova-Gueogueva, N.I., Scheller, N., Holt, S., Swenberg, J.A. e Charles, M.J. (1996) Quantitative analysis of the DNA adduct $N^2,3$ -ethenoguanine using liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **31**, 1271-1276.
- Yeo, H.C., Helbock, H.J., Chyu, D.W. e Ames, B.N. (1994) Assay of malondialdehyde in biological fluids by gas chromatography-mass spectrometry. *Anal. Biochem.* **220**, 391-396.
- Yermilov, V., Yoshie, Y., Rubio, J. e Ohshima, H. (1996) Effects of $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ on induction of DNA single-strand breaks and formation of 8-nitroguanine, 8-oxoguanine and base-propenal mediated by ONOO^- . *FEBS Lett.* **399**, 67-70.
- Yi, P., Zhan, D., Samokyszyn, V.M., Doerge, D.R. e Fu, P.P. (1997) Synthesis and ^{32}P -postlabeling/high-performance liquid chromatography separation of diastereomeric $1,N^2$ -(1,3-propano)-2'-deoxyguanosine 3'-phosphate adducts formed from 4-hydroxy-2-nonenal. *Chem. Res. Toxicol.* **10**, 1259-1265.
- Yin, D. (1996) Biochemical basis of lipofuscin, ceroid, and age pigment-like fluorophores. *Free Rad. Biol. Med.* **21**, 871-888.
- Ylä-Herttua, S., Palinski, W., Rosenfeld, M.E., Parthasarathy, S., Carew, T.E., Butler, S., Witztum, J.L. e Steinberg, D. (1989) Evidence for the presence of oxidatively modified low-density lipoprotein in atherosclerotic lesions of rabbit and man. *J. Clin. Invest.* **84**, 1086-1095.
- Yonei, S. e Furui, H. (1981) Lethal and mutagenic effects of malonaldehyde, a decomposition product of peroxidised lipids on *Escherichia coli* with different DNA repair capacities. *Mutat. Res.* **88**, 23-32.
- Yoritaka, A., Hattori, N., Uchida, K., Tanaka, M., Stadtman, E.R. e Mizuno, Y. (1996) Immunohistochemical detection of 4-hydroxy-nonenal protein adducts in Parkinson disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**, 2696-2701.
- Yoshino, K., Sano, M., Fujita, M. e Tomita, I. (1986) Formation of aliphatic aldehydes in rat plasma and liver due to vitamin E deficiency. *Chem. Pharm. Bull.* **34**, 5184-5187.

- Yoshiwa, T., Morimoto, K., Sakamoto, K., Ishikawa, Y., Tokita, M. e Morita, M. (1997) Volatile compounds of fishy odor in sardine by simultaneous distillation and extraction under reduced pressure. *Nippon Suisan Gakk.* **63**, 222-230.
- Zamorra, R. e Hidalgo, F. J. (1995) Linoleic acid oxidation in the presence of amino compounds produces pyrroles by carbonyl amine reactions. *Biochim. Biophys. Acta* **1258**, 319-327.
- Zangar, R.C., Benson, J.M., Burnett, V.L. e Springer, D.L. (2000) Cytochrome P450 2E1 is the primary enzyme responsible for low-dose carbon tetrachloride metabolism in human liver microsomes. *Chem.-Biol. Interact.* **125**, 233-243.
- Zarbl, H., Sukumar, S., Arthur, A.V., Martin-Zanca, D. e Barbacid, M. (1985) Direct mutagenesis of Ha-ras-1 oncogenes by N-nitroso-N-methylurea during initiation of mammary carcinogenesis in rats. *Nature* **315**, 382-385.

Curriculum Vitae

Curriculum Vitae

ANA PAULA DE MELO LOUREIRO

Local e data de nascimento

Campinas, SP, 18 de outubro de 1972

FORMAÇÃO ACADÊMICA

1978 – 1990 – Colégio Sagrado Coração de Jesus, Campinas, SP

1991 – 1994 – Bacharelado e Licenciatura Plena em Ciências Biológicas
Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo

1995 – 2000 – Pós-graduação

Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo

Orientação: Profa. Dra. Marisa Helena Gennari de Medeiros

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

PUBLICAÇÕES

- Loureiro, A.P.M., Di Mascio, P., Gomes, O.F. e Medeiros, M.H.G. (2000) *trans,trans*-2,4-Decadienal-induced 1,N²-etheno-2'-deoxyguanosine adduct formation. *Chem. Res. Toxicol.* **13**, 601-609.
- Medeiros, M.H.G., Loureiro, A.P.M. e Carvalho, V.M. (1996) Lesões em DNA produzidas por produtos secundários da peroxidação lipídica. *Rev. Med.* **75**, 16-25
- Medeiros, M.H.G., Carvalho, V.M., Farias, L.P. e Loureiro, A.P.M. (1995) DNA Damage induced by secondary lipid peroxidation products. *Ciência e Cultura* **47**, 336-339.