UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

**LESÕES EM DNA PROMOVIDAS POR ÁCIDO 5-AMINOLEVULÍNICO:
UMA PROPOSTA DE BASES MOLECULARES PARA OS HEPATOMAS
ASSOCIADOS ÀS PORFIRINOPATIAS**

JANICE ONUKI

Orientador: Prof. Dr. Paolo DI MASCIO

**Tese de Doutorado apresentada ao
Departamento de Bioquímica**

SÃO PAULO

Agosto/2000

Aos meus pais, por tudo ...

A minha família e aos meus amigos: alicerces da vida.

MEMÓRIA

Amar o perdido
deixa confundido
este coração.

Nada pode o olvido
contra o sem sentido
apelo do Não.

As coisas tangíveis
tornam-se insensíveis
à palma da mão.

Mas as coisas findas,
muito mais que lindas,
essas ficarão.

Carlos Drummond de Andrade

"O amor é algo eterno -
o aspecto pode mudar, mas não a essência."

Vincent van Gogh

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Paolo Di Mascio pela orientação científica, incentivo, confiança e amizade ao longo desses anos.

Ao Dr. Jean Cadet e ao Dr. Thierry Douki, do “Laboratoire Lésions des Acides Nucléiques”, CEA/Grenoble, França, pela constante e produtiva colaboração científica.

Ao Dr. Bennett Van Houten, sua técnica, Yiming Chen, e seus alunos por terem possibilitado minha estada na Universidade do Texas Medical Branch em Galveston, EUA.

À Dra. Gisela Aragão e a todo o pessoal do Setor de Mutagênese da CETESB, principalmente à Célia M. Rech por ter me recebido com tanta paciência e atenção.

Ao Dr. Cesar Fraga e a Florencia Lucesoli, da Universidade de Buenos Aires, pela contribuição nos experimentos de medida de guanina oxidada.

Ao Dr. Dieter Dörnemann, pela síntese e doação do DOVA, ao Dr. Álvaro Leitão, pela doação da *E.coli* PQ37 e à Dra. Gisela Aragão pelas linhagens de *Salmonella*.

À Dra. Marilene Demasi e a Dra. Marisa Melo na ajuda no tratamento dos ratos.

Aos alunos de iniciação científica Rafael E. Ummus e principalmente à Priscila Camillo Teixeira pela ajuda na realização de experimentos que fazem parte dessa tese.

A todos os técnicos que já passaram pelo laboratório, principalmente à Christiane Cardoso e ao Osmar F. Gomes pela prontidão que sempre atenderam aos meus pedidos e pelo apoio técnico no “árido tratamento dos ratinhos”.

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

À Profa. Dra. Marisa Medeiros pela colaboração científica imprescindível, pela amizade e incentivo constantes.

Ao Prof. Dr. Etelvino Bechara pelo seu ideal, entusiasmo e ecletismo científico, e por me servir de modelo e incentivo constantes desde a iniciação científica.

Ao Prof. Dr. Roberto Baptista Casadei pela simpatia e dedicação à profissão.

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

À Profa. Dra. Mari Sogayar pelo ideal científico e pela ajuda na minha aproximação física da USP.

Ao Prof. Dr. Carlos F. Menck, a quem admiro desde a graduação e sempre me serviu de modelo e incentivo no caminho da ciência, com suas empolgantes aulas e palestras, e pelo seu entusiasmo e ideal científico. Agradeço também aos alunos de seu laboratório que sempre me receberam e me ajudaram quando precisei, principalmente à Lucymara Agnez, a Soraia Calil Jorge e à Marinalva.

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

Aos professores do Visconde de Itaúna, do Colégio Bandeirantes, do Instituto de Biociências e do Instituto de Química da USP que muito contribuíram para minha formação.

A todos meus atuais colegas dos laboratórios do Paolo e da Marisa: Ana Paula, Bellot, Christiane, Clécio, Eduardo, Flávio, Gláucia, Humberto, Lydia, Osmar, Priscila, Sabrina, Tedra e Valdemir, pela convivência agradável e bem humorada e pelo apoio compreensivo, principalmente no final da tese.

A TODOS os colegas e amigos do Instituto de Química que direta ou indiretamente contribuíram de alguma forma no meu caminho pela pós-graduação e pela vida.

Ao Jim, Kathy, Grandma (Jean), toda sua “grande família” e aos amigos que me proporcionaram uma agradável estada em Galveston.

Ao Eduardo Helmut Palkow Jr., pela amizade e companheirismo na nossa iniciação científica.

À Ana Paula de Melo Loureiro, que sempre soube em poucas palavras compartilhar sua valiosa amizade e seu apoio em todos os momentos da nossa trajetória.

À Alexandra Iwazaki pela amizade constante há décadas e por sempre ampliar cada vez mais minhas amizades.

À Regina Maki Sasahara pela amizade, companheirismo, cumplicidade, apoio e equilíbrio em todos os momentos. O agradecimento também se estende ao seu marido, Marcos Shimada, por fazê-la mais feliz.

Ao Masaru, com carinho, pela interferência construtiva ao longo desses anos, por equalizar os graves e agudos da vida, tentando sempre reduzir a microfonia incômoda das tristezas e reverberar os bons momentos de alegria.

A minha irmã Janina pelo apoio e pela “ádua” leitura e correção gramatical da tese.

Aos meus pais, Renato e Namiko, ao meu irmão, aos meus avôs e avós, tios, tias e primos por tudo o que são e pelo apoio e carinho incondicionais.

A TODOS meus amigos, cada um especial e único, pelo apoio e amizade.

Agradeço a tudo e a todos que de alguma forma me ajudaram nessa trajetória.

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

Fundo Bunka de Pesquisa - Banco Sumitomo

UBA - Universidade de Buenos Aires - Argentina

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
ABREVIATÓES.....	VI
RESUMO.....	IX
ABSTRACT	X
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. OXIGÊNIO.....	1
1.1.1. A toxicidade do oxigênio	2
1.2. Radicais livres	2
1.2.1. Espécies derivadas do oxigênio	3
1.2.1.1. Oxigênio singlete.....	4
1.2.1.2. Ânion radical superóxido.....	5
1.2.1.3. Peróxido de hidrogênio	6
1.2.1.4. Radical hidroxila	6
1.2.1.5. Metais de transição	6
1.2.1.6. Outros radicais de importância biológica	7
1.3. Defesas antioxidantes	8
1.4. Radicais livres e efeitos benéficos	10
1.5. Lesões em DNA promovidas por espécies reativas de oxigênio e suas conseqüências.....	10
1.5.1. Estrutura do DNA nuclear	10
1.5.2. Metabolismo do DNA	12
1.5.3. Danos ao DNA nuclear promovidos por espécies reativas de oxigênio.....	12
1.5.4. Danos em DNA mitocondrial.....	17
1.5.5. DNA e bases modificadas por aldeídos.....	18
1.6. Radicais livres e doenças	20

1.7. Porfirias	21
1.7.1. Definição	21
1.7.2. Histórico	21
1.7.3. O grupo heme e sua biossíntese	21
1.7.4. Regulação da biossíntese do heme.....	22
1.7.5. Tipos de porfirias	25
1.7.6. O rei, o pintor, o escultor, os lobisomens e o Conde Drácula.....	27
1.8. Porfirias que acumulam ácido 5-aminolevulínico	29
1.8.1. Intoxicação por chumbo.....	29
1.8.2. Tirosinemia hereditária	30
1.8.3. Porfiria aguda intermitente.....	31
1.8.3.1. Definição e prevalência.....	31
1.8.3.2. Histórico	31
1.8.3.3. Defeito genético	32
1.8.3.4. Diagnóstico da porfiria aguda intermitente	32
1.8.3.5. Sintomas	33
1.8.3.6. Fatores precipitantes.....	34
1.8.3.7. Tratamento	35
1.8.3.8. Doenças associadas a porfiria aguda intermitente.....	36
1.8.3.9. Porfiria aguda intermitente e carcinoma hepatocelular	36
1.8.3.10. Patogênese dos sintomas.....	37
1.8.3.11. Patogênese do carcinoma hepatocelular em porfiria aguda intermitente.....	41
1.9. O ácido 5-aminolevulínico e seu potencial pró-oxidante	42
2. OBJETIVOS	46
3. MATERIAIS E MÉTODOS	47
3.1. Reagentes	47
3.2. Equipamentos.....	47
3.3. Quebras em DNA plasmidial induzidas por ALA na presença de íons Fe²⁺.....	48

3.3.1. Competência bacteriana	48
3.3.2. Transformação de bactérias competentes	49
3.3.3. Extração do DNA plasmidial.....	49
3.3.4. Tratamento de DNA plasmidial com ALA.....	50
3.3.5. Análise e quantificação das quebras em DNA plasmidial.....	51
3.4. Formação <i>in vitro</i> de 8-oxodGuo em DNA de timo de bezerro	
induzida por ALA na presença de íons Fe²⁺.....	51
3.4.1. Tratamento do DNA de timo de bezerro	51
3.4.2. Hidrólise do DNA	52
3.4.3. Análise e quantificação da formação de 8-oxodGuo por HPLC-EC.....	52
3.5. Formação <i>in vitro</i> de outras bases de DNA modificadas em DNA	
de timo de bezerro tratado com ALA	53
3.5.1. Tratamento de DNA de timo de bezerro	53
3.5.2. Hidrólise do DNA	53
3.5.3. Análise e quantificação por HPLC-EC	53
3.5.4. Análise e quantificação por cromatografia gasosa acoplada a espectroscopia de massas (GC-MS).....	54
3.6. Formação de 8-oxodGuo e 5-OHdCyd em DNA de órgãos de ratos	
tratados com ALA	55
3.6.1. Tratamento de ratos com ALA	55
3.6.2. Extração do DNA.....	56
3.6.3. Tratamento com RNase	56
3.6.4. Análise e quantificação da formação de 8-oxodGuo e 5-OHdCyd	57
3.6.4.1. Metodologia I.....	57
3.6.4.1.1. Hidrólise do DNA	57

3.6.4.1.2. Sistema de HPLC-EC	57
3.6.4.2. Metodologia II	58
3.6.4.2.1. Hidrólise do DNA	58
3.6.4.2.2. Sistema de HPLC-EC	58
3.7. Participação da ferritina nas quebras de DNA plasmidial pBR322 promovidas por ALA	59
3.7.1. Extração do DNA plasmidial.....	59
3.7.2. Preparação da coluna de terra de diatomáceas	60
3.7.3. Purificação da ferritina.....	60
3.7.4. Dosagem da ferritina	61
3.7.5. Tratamento de plasmídeo pBR322 com ALA na presença de ferritina	61
3.7.6. Quantificação dos danos ao plasmídeo pBR322 induzidos pelo ALA na PRESENÇA DE FERRITINA.....	61
3.8. Formação de 8-oxodGuo em dGuo e DNA de timo de bezerro promovida por ALA na presença de ferritina	62
3.8.1. Tratamento de dGuo com ALA na presença de ferritina	62
3.8.2. Tratamento de DNA de timo de bezerro com ALA na presença de ferritina	62
3.8.3. Hidrólise do DNA	63
3.8.4. Detecção de 8-oxodGuo em dGuo tratada com ALA na presença de ferritina por HPLC-EC	63
3.9. Formação de adutos entre 2'-desoxiguanosina e ácido 4,5-dioxovalérico	63

3.9.1. Tratamento de dGuo com DOVA e redução por borohidreto de sódio	63
3.9.2. Análise em espectroscopia gasosa acoplada a espectrometria de massas	64
3.9.3. Análise em espectrometria de massas por “eletrospray”	65
3.9.4. Análise em espectroscopia de infravermelho	66
3.9.5. Análise em espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)	66
3.9.6. Hidrólise dos adutos de DOVA-dGuo reduzidos e eletrovoltamograma	66
3.9.7. Incubação de DNA de timo de bezerro com DOVA	67
3.9.7.1. Hidrólise do DNA	67
3.9.7.2. Análise e quantificação dos adutos por HPLC-EC	67
3.10. Detecção de ácido 4,5-dioxovalérico por cromatografia líquida de alta pressão acoplada a detector de fluorescência	68
3.10.1. Derivatização do ácido 4,5-dioxovalérico	68
3.10.2. Determinação da quantidade de DOVA formada na oxidação do ALA	68
3.10.3. Análise em HPLC acoplado a detector ultravioleta e de fluorescência	68
3.10.4. Análise em espectrometria de massas	69
3.11. Danos em DNA mitocondrial de células tratadas com ALA	69
3.11.1. Cultivo das células	69
3.11.2. Tratamento de células SVNF e PC12 com ALA	70
3.11.3. Extração do DNA	71
3.11.4. Quantificação do DNA	71
3.11.5. Reação quantitativa em cadeia da polimerase para os fragmentos alvos do DNA de células SVNF	72
3.11.6. Reação quantitativa em cadeia da polimerase para os fragmentos alvos do DNA de células PC12	73
3.11.7. Eletroforese em gel de agarose	74
3.11.8. Medida de viabilidade celular através do teste MTT	75
3.11.9 Curva de crescimento de células SVNF após tratamento com ALA	76
3.12. Análise da mutagenicidade induzida por ALA através do Teste de Kado	77

3.12.1. Características do Teste de microsuspensão e das linhagens de <i>S. typhimurium</i>	78
3.12.2. Preparação da placa estoque (“master”)	80
3.12.3. Verificação das características genéticas das cepas de <i>S. typhimurium</i>	81
3.12.3.1. Dependência de Histidina	81
3.12.3.2. Presença de mutação <i>rfa</i>	82
3.12.3.3. Presença da deleção <i>uvrB</i>	82
3.12.3.4. Presença do plasmídio pKM101	82
3.12.3.5. Taxa de reversão espontânea	83
3.12.4. Ensaio.....	83
3.13. Medida da indução de resposta SOS através do Cromoteste	84
3.13.1. Características da cepa <i>E. coli</i> PQ37	85
3.13.2. Estoque da cepa de <i>E. coli</i> PQ37	86
3.13.3. Verificação das características genéticas da cepa de <i>E.coli</i> PQ37.....	86
3.13.3.1. Presença de mutação <i>rfa</i>	86
3.13.3.2. Presença da mutação <i>uvrA</i>	86
3.13.3.3. Resistência a ampicilina.....	87
3.13.4. Ensaio.....	87
3.13.4.1. Preparo da cultura de <i>E. coli</i> utilizada no ensaio.....	87
3.13.4.2. Ensaio da β -galactosidase	88
3.13.4.3. Ensaio para fosfatase alcalina	88
3.13.4.4. Cálculo da indução da resposta SOS	88
4. RESULTADOS	90

4.1. LESÕES OXIDATIVAS AO DNA INDUZIDAS POR ALA <i>IN VITRO</i> E <i>IN VIVO</i>	90
4.1.1. Quebras em DNA plasmidial induzidas por ALA na presença de íons Fe ²⁺	90
4.1.2. Formação <i>in vitro</i> de 8-oxodGuo em DNA de timo de bezerro induzida por ALA.....	94
4.1.3. Formação <i>in vitro</i> de outras bases de DNA modificadas em DNA de timo de bezerro por ALA.....	96
4.1.4. Formação <i>in vivo</i> de 8-oxodGuo e 5-OHdCyd em DNA de órgãos de ratos tratados com ALA	99
4.1.5. Participação da ferritina nas quebras de DNA plasmidial pBR322 promovidas por ALA	101
4.1.6. Formação de 8-oxodGuo em dGuo e DNA de timo de bezerro promovida por ALA na presença de ferritina	104
4.2. FORMAÇÃO DE ADUTOS ENTRE 2'-DESOXIGUANOSINA E O ÁCIDO 4,5-DIOXOVALÉRICO	107
4.2.1. Adição do DOVA na dGuo e redução dos produtos de reação	107
4.2.2. Caracterização dos adutos reduzidos.....	112
4.2.2.1. Análises por GC/MS, ESI-MS e espectroscopia de infravermelho.....	112
4.2.2.2. Análise por ¹ H-RMN e ¹³ C-RMN	114
4.2.3. Detecção dos adutos DOVA-dGuo em DNA de timo de bezerro	120
4.3. DETECÇÃO DE ÁCIDO 4,5-DIOXOVALÉRICO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA PRESSÃO ACOPLADO A DETECTOR DE FLUORESCÊNCIA.....	123
4.4. DANOS EM DNA MITOCONDRIAL DE CÉLULAS TRATADAS COM ALA	129
4.4.1. Danos em DNA mitocondrial e nuclear de células SVNF tratadas com ALA	129
4.4.2. Danos em DNA mitocondrial e nuclear de células PC12 tratadas com ALA	136
4.4.3. Medida da viabilidade celular através do teste MTT.....	138
4.4.4. Curva de crescimento de células SVNF após tratamento com ALA.....	139
4.5. Verificação da mutagenicidade induzida por ALA e DOVA através do teste de microsuspensão.....	141
4.6. Medida da indução de resposta SOS através do Cromoteste	147
5. DISCUSSÃO	
5.1. LESÕES OXIDATIVAS EM DNA INDUZIDAS POR ALA.....	151

5.1.1. Quebras de DNA plasmidial induzidas por ALA na presença de íons Fe^{2+}	151
5.1.2. Danos em DNA induzidos por ALA na presença de ferritina	154
5.1.3. Formação de 8-oxodGuo <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> induzida por ALA.....	156
5.1.4. Formação de outras bases oxidadas em DNA induzida por ALA.....	161
5.2. FORMAÇÃO DE ADUTOS ENTRE 2'-DESOXIGUANOSINA E O ÁCIDO 4,5-DIOXOVALÉRICO.....	166
5.3. DANOS EM DNA MITOCONDRIAL INDUZIDOS POR ALA.....	168
5.4. MUTAGENICIDADE INDUZIDA POR ALA E POR DOVA	171
6. CONCLUSÕES	174
7. PERSPECTIVAS	177
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	178
9. CURRICULUM VITAE	204
10. TRABALHOS PUBLICADOS	206

INDICE DE FIGURAS, TABELAS E ESQUEMAS

Figura 1: Distribuição eletrônica na molécula diatômica de oxigênio e nos seus derivados.	4
Figura 2: Possíveis fontes de espécies reativas de oxigênio e aldeídos que podem danificar o DNA.	14
Figura 3: Estruturas moleculares de algumas das bases modificadas do DNA	15
Figura 4: Oxidação do ácido 5-aminolevulínico (ALA) catalisada por complexos de ferro gerando espécies reativas de oxigênio, NH_4^+ e ácido 4,5-dioxovalérico (DOVA).	43
Figura 5: Foto de eletroforese em gel de agarose do plasmídeo pBR322 após exposição ao ALA e efeitos da SOD, catalase e DTPA como descritos em <i>Materiais e Métodos</i> . O DNA é apresentado na formas supernoelada (SC), circular aberta (OC) e como fragmentos (F). A porcentagem das diferentes formas do DNA está representada após cada pico nos densitogramas correspondentes.	91
Figura 6: Efeito da concentração do ALA na conversão da forma SC do plasmídeo pBR322 para a forma OC. Para cada experimento a quantidade da forma OC do DNA controle foi subtraída. As condições de incubação estão descritas em <i>Materiais e Métodos</i> .	92
Figura 7: Efeito do DTPA na inibição das quebras de fita simples do plasmídeo pBR322 induzidas por ALA (3mM) na presença de Fe^{2+} (10 μM). Os danos ao DNA são expressos em número de quebras por kbp. Para cada experimento a quantidade da forma OC do DNA controle foi subtraída. As condições de incubação estão descritas em <i>Materiais e Métodos</i> .	93
Figura 8: Formação <i>in vitro</i> de 8-oxodGuo após a exposição de DNA de timo de bezerro a diferentes concentrações de ALA. Condições como descritas em <i>Materiais e Métodos</i> .	95
Figura 9: Curva de dose resposta para a formação de bases de DNA oxidadas em DNA de timo de bezerro exposto ao ALA. Cada valor é a média de três determinações. As barras de erro representam os desvios padrões.	97
Figura 10: Níveis de 8-oxodGuo em DNA de fígado de ratos tratados cronicamente com ALA. Condições como descritas em <i>Materiais e Métodos</i> . Valores representam a média de nove animais diferentes $\pm$ desvio padrão. Grupo tratado é significativamente diferente do controle ($p < 0.05$).	100
Figura 11: Formação de quebras de fita em DNA de plasmídeo pBR322 após a exposição a diferentes quantidades de ferritina (0-5 μg) na presença de 1 mM de ALA conforme descrito em <i>Materiais e Métodos</i> . O DNA apresenta-se nas formas SC (superenrolada, forma nativa), OC	

(circular aberta, resultante de quebras de fita simples) e L (linear, resultante de quebras de dupla fita). **A**: Foto da eletroforese em gel de agarose **B**: Porcentagem de forma SC, OC e L do plasmídeo tratado com diferentes quantidades de ferritina. Os valores foram obtidos a partir da integração das bandas do gel de eletroforese mostrada na figura 11A.

103

Figura 12: Foto da eletroforese em gel de agarose do DNA do plasmídeo pBR322 após o tratamento com ALA e ferritina na presença de espermidina e EDTA. As condições experimentais estão descritas em *Materiais e Métodos*.

104

Figura 13: Níveis de 8-oxodGuo em dGuo tratada com 3 mM de ALA e diferentes concentrações de ferritina (1-20 µg/100 µl). C1 corresponde ao dGuo sozinha, C2 a dGuo incubada com 3 mM de ALA e C3 a dGuo incubada com 20 µg/µl de ferritina. As condições de incubação estão descritas em *Materiais e Métodos*.

105

Figura 14: Níveis de 8-oxodGuo em DNA de timo de bezerro tratados (T) ou não (NT) com desferral. O controle (C) corresponde ao DNA não tratado incubado na presença de 10 µg/µl de ferritina. O tratamento 1 corresponde à incubação do DNA tratado (T1) e não tratado (NT1) na presença de 3 mM de ALA e 5 µg/100 µl de ferritina e o tratamento 2 à incubação do DNA tratado (T2) e não tratado (NT2) na presença de 3 mM de ALA e 10 µg/100 µl de ferritina.

106

Figura 15: Espectro de absorção UV da dGuo e dos adutos DOVA-dGuo 1 e 2.

108

Figura 16: Cromatogramas obtidos em HPLC com detecção UV. **A**: reação da mistura entre DOVA e dGuo e **B**: produtos de redução por NaBH₄. Condições descritas em *Materiais e Métodos*.

110

Figura 17: Espectro de absorção em UV dos adutos DOVA-dGuo reduzidos (3 e 4) e seu produto de hidrólise (aduto 5).

111

Figura 18: Espectro de massas por ionização por impacto de elétrons do aduto 4 DOVA-dGuo reduzido tetrasililado obtido por análise em GC/MS.

113

Figura 19: Espectro de massas em tandem obtido por ionização por eletrospray dos adutos DOVA-dGuo 3 e 4 isolados em HPLC. O espectro representa os íons filhos do íon pai a $m/z = 384$ ($[M+H]^+$). dR- 2-desoxirribose Gua-guanina.

114

Figura 20: Espectro de ¹H-RMN a 400 MHz do aduto 3 DOVA-dGuo reduzido. O espectro foi feito em in D₂O (HOD foi utilizado como referência secundária a 4,6 ppm).

116

Figura 21: Eletrovoltamograma do aduto DOVA-dGuo reduzido e hidrolisado (aduto 5). EC: detecção eletroquímica. UV: detecção ultravioleta.

121

Figura 22: Cromatogramas de HPLC com detectores ultravioleta (UV) e eletroquímico (EC) do DNA de timo de bezerro tratado com DOVA (dois painéis superiores). O painel inferior mostra o cromatograma da detecção eletroquímica correspondente a mesma amostra de DNA

com adição de 500 pmol do aduto DOVA-dGuo 5 puro, reduzido e hidrolisado.	122
Figura 23: Formação e estrutura do derivado benzoquinoxalino (BZQ) pela condensação do 2,3-diaminonaftaleno (DAN) com ácido 4,5-dioxovalérico (DOVA).	123
Figura 24: Cromatogramas de detectores ultravioleta ($\lambda=268$ nm) e de fluorescência ($\lambda_{\text{emissão}}=558$ nm e $\lambda_{\text{excitação}}=366$ nm) do composto BZQ formado entre o DOVA e o DAN obtido em sistema de HPLC conforme descrito em <i>Materiais e Métodos</i> . Os valores de absorbância e fluorescência são expressos em unidades arbitrárias (UA).	124
Figura 25: Efeito do tempo de incubação do DOVA com o DAN sobre a quantidade de BZQ formada. O gráfico foi obtido a partir das áreas do pico correspondente ao BZQ no cromatograma de fluorescência em HPLC. A fluorescência do pico correspondente ao BZQ é expressa em unidades arbitrárias (UA).	125
Figura 26: Efeito da concentração de DOVA na incubação com DAN. A curva foi obtida a partir das áreas do pico correspondente ao BZQ do cromatograma de fluorescência em HPLC.	126
Figura 27: Espectro de absorbância (em unidades arbitrárias - UA) do composto BZQ obtido no detector “diode array” no sistema de HPLC conforme descrito em <i>Materiais e Métodos</i> .	127
Figura 28: Espectro de massa obtido por ionização por “eletrospray” do composto benzoquinoxalino formado pela condensação do 2,3-diaminonaftaleno com ácido 4,5-dioxovalérico. As condições estão descritas em <i>Materiais e Métodos</i> .	128
Figura 29: Gel de agarose do DNA isolado de células SVNF tratadas com diferentes doses de ALA durante 2 horas. As bandas correspondem ao fragmento do DNA nuclear (β -globina) ou ao fragmento do DNA mitocondrial amplificados pela técnica de QPCR. As duas primeiras bandas correspondem as diluições de 50 % dos respectivos controles utilizados como controle interno da amplificação.	130
Figura 30: Número de lesões por 10 kb ao fragmento do DNA nuclear (β -globina) e do fragmento do DNA mitocondrial obtido a partir da análise por QPCR do DNA isolado de células SVNF tratadas com diferentes doses de ALA durante 2 horas. As condições de tratamento estão descritas em <i>Materiais e Métodos</i>	133
Figura 31: Número de lesões por 10 kb do fragmento do DNA mitocondrial obtido a partir da análise por QPCR do DNA isolado de células SVNF tratadas com diferentes doses de ALA durante 15 minutos. As condições de tratamento estão descritas em <i>Materiais e Métodos</i> .	135
Figura 32: Lesões por fragmento (A) e amplificação relativa (B) do fragmento do DNA nuclear (clusterina) e do fragmento do DNA mitocondrial obtidos a partir da análise por QPCR do DNA isolado de células PC12 tratadas com diferentes concentrações de ALA durante 2 horas. As condições de tratamento estão descritas em <i>Materiais e Métodos</i> .	137

Figura 33: Comparação entre as médias e os desvios das absorbâncias relativas do formazan medidas a 595 nm após a incubação com MTT (■) e o número de lesões por 10 kb do fragmento do DNA mitocondrial (●) das células tratadas com diferentes concentrações de ALA.	139
Figura 34: Curva de crescimento de células SVNF durante 6 dias após o tratamento com 20 mM ALA durante 15 minutos. O número de células foi contado conforme descrito em <i>Materiais e Métodos</i> .	140
Figura 35: Razões de mutagenicidade obtidas para diversas doses de ALA e DOVA no Teste de Kado utilizando a linhagem <i>S. typhimurium</i> TA104, realizado conforme descrito em <i>Materiais e Métodos</i> .	142
Figura 36: Atividade da β -galactosidase em resposta a doses crescentes de ALA no ensaio de Cromoteste realizado conforme descrito em <i>Materiais e Métodos</i> . As curvas correspondem aos valores respostas obtidos em três experimentos realizados separadamente.	148
Figura 37: Atividade da β -galactosidase em resposta a doses crescentes de DOVA no ensaio de Cromoteste realizado conforme descrito em <i>Materiais e Métodos</i> .	149
Figura 38: Atividade da β -galactosidase em resposta a doses crescentes do composto 4-NQO no ensaio de Cromoteste realizado conforme descrito em <i>Materiais e Métodos</i> .	150
Figura 39: Estruturas químicas da 8-oxodGuo.	159
Figura 40: Comparação entre os níveis de formação de várias bases modificadas em DNA tratado com 2 mM de ALA ou expostos a raios γ em soluções aquosas aeradas. A produção de 8-oxodGuo foi utilizada como referência e considerada como 100%.	162
Figura 41: Possíveis mecanismos de danos ao DNA induzidos por ALA associados a sua mutagenicidade.	173
Figura 42: Participação do ALA na promoção de danos em DNA entre as possíveis fontes de geração de espécies reativas de oxigênio e aldeídos.	176
Tabela I: Efeito do ALA <i>in vitro</i> sobre a produção de 8-oxodGuo em DNA de timo de bezerro. Condições como descritas em <i>Materiais e Métodos</i> . Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão e são a média de três experimentos independentes.	95
Tabela II: Níveis de bases modificadas em DNA de timo de bezerro incubado com 2 mM de ALA.	97
Tabela III: Níveis de bases oxidadas em DNA de órgãos de ratos tratados com ALA.	101

Tabela IV: ^1H -RMN - deslocamentos químicos (em ppm com relação a HOD fixado em 4,9 ppm) dos adutos reduzidos DOVA-dGuo 3 e 4 e seus produto de hidrólise (aduto 5) (400 MHz, D_2O).	115
Tabela V: Correlação de prótons não-trocáveis observados em experimentos 2D feitos em $\text{DMSO}-d_6$ na mistura dos adutos 3 e 4.	118
Tabela VI: ^{13}C -RMN - deslocamentos químicos dos adutos 3 e 4 entre DOVA-dGuo e da dGuo sozinha.	119
Tabela VII: Valor da quantificação das bandas do fragmento do DNA nuclear (A) e do fragmento do DNA mitocondrial (B) e número de lesões ao DNA das células SVNF tratadas com diferentes doses de ALA. As condições de tratamento e a forma de cálculo das lesões estão descritos em <i>Materiais e Métodos</i> .	131
Tabela VIII: Valor da quantificação das bandas do fragmento do DNA mitocondrial e número de lesões ao DNA das células SVNF tratadas com diferentes doses de ALA. As condições de tratamento e a forma de cálculo das lesões estão descritos em <i>Materiais e Métodos</i> .	134
Tabela IX: Média ($n=3$) e desvio padrão (DP) do número de colônias revertentes/placa de <i>S. typhimurium</i> TA104 tratadas com ALA e metilglioxal no ensaio do Teste de Kado. A razão de mutagenicidade (RM) foi calculada dividindo o número de colônias obtidas em cada tratamento pelo número do controle.	142
Tabela X: Média ($n=3$) e desvio padrão (DP) do número de colônias revertentes/placa de <i>S. typhimurium</i> TA104 tratadas com H_2O_2 e, H_2O_2 mais catalase no ensaio do Teste de Kado. A razão de mutagenicidade (RM) foi calculada dividindo o número de colônias obtidas em cada tratamento pelo número do controle.	144
Tabela XI: Média ($n=3$) e desvio padrão (DP) do número de colônias revertentes/placa de <i>S. typhimurium</i> TA104 tratadas com ALA (1000 μg) e ALA mais catalase no ensaio do Teste de Kado. A razão de mutagenicidade (RM) foi calculada dividindo o número de colônias obtidas em cada tratamento pelo número do controle.	145
Tabela XII: Média ($n=3$) e desvio padrão (DP) do número de colônias revertentes/placa de <i>S. typhimurium</i> TA104 tratadas com ALA (2000 μg) e ALA mais catalase no ensaio do Teste de Kado. A razão de mutagenicidade (RM) foi calculada dividindo o número de colônias obtidas em cada tratamento pelo número do controle.	146
Tabela XIII: Média ($n=3$) e desvio padrão (DP) do número de colônias revertentes/placa de <i>S. typhimurium</i> TA104 tratadas com DOVA e metilglioxal no ensaio do Teste de Kado. A razão de mutagenicidade (RM) foi calculada dividindo o número de colônias obtidas em cada tratamento pelo número do controle.....	147
Tabela XIV: Absorbância a 420 nm do produto de reação da β -galactosidade e a ONPG e as correspondentes atividades enzimáticas da β -gal calculadas	

conforme descrito em <i>Materiais e Métodos</i> no ensaio de Cromoteste empregando o DOVA.	149
Esquema I: Via biossintética do grupo heme, indicando as deficiências enzimáticas em porfirias com acúmulo de ALA.	24
Esquema II: Estrutura e formação dos adutos DOVA-dGuo e seus produtos de redução.	109

ABREVIações

β -gal	β -Galactosidase
$\cdot$ OH	Radical hidroxila
$^1\text{O}_2$	Oxigênio singlete
4-NQO	4-Nitroquinolina, 1-óxido
5-ForUra	5-formiluracila
5-HMUra	5-(hidroxi-metil)uracila
5-OHCyt	5-hidroxicitosina
5-OHdCyd	5-hidroxi-2'-desoxicitidina
5-OHdUrd	5-hidroxi-2'-desoxiuridina
5-OHUra	5-hidroxiuracila
8-oxodAdo	8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiadenosina
8-oxodGuo	8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina
AIP	Porfíria aguda intermitente
ALA	Ácido 5-aminolevulínico
AP	Apurínicos/apirimidínicos, abásicos
ATPase	Adenosina 5'-trifosfatase
BSTFA	<i>N</i> -bis(trimetilsilil)-trifluoroacetamida
BZQ	Ácido benzoquinoxalino-2-propiónico
CEP	Porfíria eritropoiética congênita
CHO	Células de ovário de hamster chinês
CoA	Coenzima A
CRIM	Material imunológico de reação cruzada
D ₂ O	Óxido de deutério
Da	Daltons
DAN	2,3-Diaminonaftaleno
DDE	2,4-Decadienal
dGuo	2'-Desoxiguanosina
DI	Diâmetro interno
DMEM	Meio mínimo essencial "Dulbecco's"
DMSO- <i>d</i> ₆	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Didesoxinucleotídeotrfosfato
dGTP	2'-Desoxiguanosina 5'-trifosfato
DO	Densidade ótica
DOVA	Ácido 4,5-dioxovalérico
DTPA	Ácido dietilenetriaminopentaacético
EC	Eletroquímico
EDTA	Ácido etilenediaminotetraacético
EPP	Protoporfíria eritropoiética
EPR	Ressonância paramagnética nuclear
ESI	Ionização por eletrospray
F	Fragmentos
FA	Fosfatase alcalina
FAH	Fumarilacetoacetato hidrolase
FapyGua	2,6-diamino-4-hidroxi-5-formamidopiridina
FI	Fator de indução
Fpg	Formamidopirimidina DNA <i>N</i> -glicosilase

FT	Transformada de Fourier
GABA	Ácido γ -aminobutírico
GC	Cromatografia gasosa
GMP	Guanosina 5'-monofosfato
GPX	Glutathione peroxidase
GSH	Glutathione reduzida
GSSG	Glutathione oxidada
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HCC	Carcinoma hepatocelular
HCP	Coproporfiria hereditária
His	Histidina
HNE	4-Hidroxi-2-nonenal
HOD	Óxido de deutério e hidrogênio
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance
IR	Ressonância por infravermelho
kb	Quilobases (mil bases)
kDa	Quilodaltons (mil daltons)
kpb	Quilo (mil) pares de base
L	Linear
LB	"Lennox Broth base"
MDA	Malonaldeído
MEM	Meio mínimo essencial
MOPS	Ácido (3-[N-morfolino]propanosulfônico)
MS	Espectroscopia de massas
MTBSTFA	<i>N</i> -tert-butildimetilsilil- <i>N</i> -metil-trifluoroacetamida
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazolium
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma reduzida)
NAT	<i>N</i> -acetiltransferase
NDPO ₂	Endoperóxido de 3,3'-(1,4)-naftilideno depropionato
NF	2-Nitrofluoreno
NO•	Óxido nítrico
NTBC	2-(2-Nitro-4-trifluorometilbenzoil)1,3-ciclohexanediona
O ₂ • ⁻	Ânion radical superóxido
OC	Circular aberta
ONOO ⁻	Peroxinitrito
ONPG	<i>o</i> -Nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo
PBG	Porfobilinogênio
PBS	"Phosphate saline buffer"
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PCT	Porfíria cutânea tarda
pH	Potencial hidrogeniônico
PNPP	<i>p</i> -Nitrofenil fosfato de sódio dibásico
QPCR	Reação quantitativa em cadeia da polimerase
RM	Razão de mutagenicidade
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
RS•	Radical tiil
<i>rTth</i>	<i>Thermus thermophilus</i>
Salanal	“Salmonella Assay Analysis”
SC	Superenovelada
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SFB	Soro fetal bovino
SLE	Lupus eritematoso sistêmico
SOD	Superóxido dismutase
SOSIP	“SOS - inducing potency”
SV	“Simiam virus”
SVNF	Fibroblastos normais transformados com SV40
TE	Tris-EDTA
TMS	Tetrametilsilano
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
UA	Unidades arbitrárias
UE	Unidades enzimáticas
uma	Unidade de massa atômica
UV	Ultravioleta
VP	Porfiria variegata

Resumo

O ácido 5-aminolevulínico (ALA) é o primeiro precursor do grupo heme acumulado, principalmente no fígado, em alguns tipos de porfirias hepáticas hereditárias (porfiria aguda intermitente-AIP e tirosinemia) ou adquiridas (intoxicação por chumbo) devido à diminuição da atividade da enzima porfobilinogênio deaminase. Amostras de biópsias de fígado de pacientes portadores de AIP revelaram alterações estruturais nas mitocôndrias e no retículo endoplasmático, acúmulo de lipofuscina, gordura e corpúsculos de ferritina. Têm sido demonstrado que mutações mitocondriais induzidas por pró-oxidantes também contribuem para o envelhecimento celular e para o desenvolvimento do câncer. Esses dados podem estar relacionados à maior incidência de carcinoma hepatocelular (HCC) em pacientes sintomáticos de AIP.

In vitro, ALA produz espécies reativas de oxigênio (ROS), através da oxidação catalisada por metais, e pode ser visto como uma fonte endógena de ROS, iniciando danos oxidativos a estruturas celulares como o DNA, podendo estar envolvido na iniciação e promoção do câncer. Além disso, o produto final de oxidação do ALA, o ácido 4,5-dioxovalérico (DOVA) é capaz de induzir modificações nas bases do DNA como outros derivados carbonílicos reativos.

Neste estudo, demonstramos que o ALA é capaz de produzir danos ao DNA como quebras de fita de DNA plasmidial, aumento do nível de 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina e 5-hidroxi-2'-desoxicitidina em DNA de órgãos de ratos tratados com ALA e aumento da formação de diversas bases modificadas em DNA de timo de bezerro. O DOVA reagiu com 2'-desoxiguanosina e DNA de timo de bezerro isolado produzindo dois adutos diastereoisômeros. O ALA e o DOVA foram capazes de aumentar a mutagenicidade em *S. typhimurium* TA104 e induzir resposta SOS em *E. coli* PQ37. Danos ao DNA mitocondrial e nuclear também foram detectados através da técnica de reação quantitativa em cadeia da polimerase em fibroblastos humanos transformados tratados com ALA.

Todos esses dados fornecem informações referentes ao potencial genotóxico do ALA e permitem estabelecer uma proposta de bases moleculares para conectar as lesões ao DNA promovidas pelo ALA com a maior incidência de carcinoma hepatocelular em pacientes sintomáticos de AIP.

ABSTRACT

5-Aminolevulinic acid (ALA) is a heme precursor accumulated in some inborn (acute intermittent porphyria-AIP and tyrosinosis) or acquired (lead poisoning) types of hepatic porphyria. In AIP patients, ALA is overproduced and accumulated in the liver. Liver biopsy samples of AIP patients revealed mitochondrial and endoplasmic reticulum structural alterations and accumulation of lipofuscin, fat and ferritin bodies. Mitochondrial mutations induced by pro-oxidants were suggested to contribute to cellular aging and cancer. These findings may be connected to the higher frequency of hepatocellular carcinoma (HCC) associated to symptomatic AIP patients.

In vitro, ALA produces reactive oxygen species (ROS) upon metal-catalyzed oxidation and can be viewed as a deleterious endogenous source of ROS, triggering oxidative damage to cell structures and organs and being involved in the initiation and promotion of cancer. Besides, the final oxidation product of ALA, the 4,5-dioxovaleric acid (DOVA) is expected to induce DNA base modifications as already shown for other reactive carbonyl derivatives.

In this study we demonstrated that ALA is able to produce DNA lesions such as strand breaks in plasmid DNA, increased steady state level of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine and 5-hydroxy-2'-deoxycytidine in rat organs DNA of ALA-treated rats and increased formation of several modified DNA bases in calf thymus DNA. 4,5-Dioxovaleric acid was shown to react with 2'-deoxyguanosine and isolated calf thymus DNA through Schiff's base formation to produce two diastereisomeric adducts. Aminolevulinic acid and DOVA were able to increase mutagenicity of the *S. typhimurim* strain TA104 and induce SOS response in *E. coli* PQ37. The mitochondrial and nuclear DNA damage were also detected by quantitative polymerase chain reaction technique in transformed human fibroblasts treated with ALA.

All these data provide additional information on the genotoxic potential of ALA and reinforce the hypothesis that ALA may be involved in the induction of HCC in symptomatic AIP patients.

1. INTRODUÇÃO

1.1. O oxigênio

O oxigênio (O_2) apareceu na atmosfera da Terra há mais de 2500 milhões de anos, provavelmente a partir da evolução da fotossíntese por cianobactérias que utilizavam a água para obtenção de hidrogênio, necessário as reduções metabólicas. Como resultado dessa reação, toneladas de O_2 foram liberadas na atmosfera. Esse aumento apresentou algumas vantagens como a formação da camada de ozônio (O_3) na estratosfera, um dos fatores que contribuiu para o desenvolvimento da vida no ambiente terrestre (Knoll, 1991).

Atualmente, o oxigênio é o elemento prevalente na crosta terrestre (abundância atômica 53,8%) e a sua porcentagem na atmosfera é de cerca de 21% (Halliwell e Gutteridge, 1999).

No entanto, o aumento gradativo da concentração de oxigênio criou uma pressão seletiva sobre a maioria dos organismos que viviam na Terra e que eram essencialmente anaeróbicos. Muitos organismos morreram, provavelmente em decorrência da oxidação de componentes celulares essenciais (Morris, 1976). Alguns conseguiram sobreviver restringindo-se a ambientes com baixa concentração de O_2 , e outros começaram um processo evolutivo de adaptação ao ambiente rico em O_2 , através da seleção de mecanismos de defesa antioxidante. Além disso, organismos que toleravam a presença de O_2 também puderam utilizá-lo em transformações metabólicas e na produção mais eficiente de energia, utilizando o O_2 como aceptor final de elétrons na cadeia de transporte de elétrons, como o que ocorre na mitocôndria (Halliwell e Gutteridge, 1999).

A produção mais eficiente de energia foi prodigiosa, permitindo que organismos multicelulares mais complexos fossem formados ao longo do processo evolutivo. Entretanto, a estrita dependência do O_2 para manutenção da vida da maioria dos organismos, inexoravelmente os expõem aos “efeitos colaterais” nocivos do O_2 .

1.1.1. A toxicidade do oxigênio

Vários processos que causam danos diversos ao organismo humano têm sido relacionados à exposição a altas concentrações de O_2 . Altas pressões de O_2 freqüentemente causam convulsões resultantes da toxicidade aguda do O_2 ao sistema nervoso central. Exposição por 72 horas de ratos adultos a O_2 puro resulta em danos severos aos pulmões (Balentine, 1982). Nos anos 40, o uso inadequado de altas concentrações de O_2 em incubadoras de recém-nascidos aumentou drasticamente, a incidência de retinopatia da prematuridade (Raju *et al.*, 1997).

O estudo da toxicidade do O_2 também é importante em relação aos procedimentos de mergulho, ao desenvolvimento de suprimento de gás em submarinos e projetos espaciais e no uso de câmaras hiperbáricas no tratamento de câncer, infecções, esclerose múltipla e doenças pulmonares (Balentine, 1982; Roth e Weiss, 1994).

Em 1954, Rebecca Gershman e Daniel L. Gilbert correlacionaram os efeitos do O_2 com os da radiação ionizante e propuseram que a maioria dos efeitos tóxicos do O_2 poderia ser atribuído à formação das espécies reativas de oxigênio (ROS) (Gilbert, 1981).

1.2. Radicais livres

Radicaís livres são espécies que contêm um ou mais elétrons desemparelhados, capazes de existir de forma independente. Os radicaís podem ser formados pela perda ou ganho de um único elétron por um não-radical, sendo facilmente formados quando uma ligação covalente é quebrada e cada um dos elétrons do par compartilhado mantém-se com um átomo (fissão homolítica) (Solomons, 1996).

A presença de um ou mais elétrons desemparelhados confere aos radicaís a propriedade de serem atraídos por campo magnético, isto é, de serem paramagnéticos, e algumas vezes os torna altamente reativos. Nem todos os

radicais possuem alta reatividade química, esta varia em função de cada espécie radicalar (Augusto *et al.*, 1995).

1.2.1. Espécies derivadas do oxigênio

Conforme a definição descrita para radical livre, a molécula diatômica de O_2 pode ser considerada um diradical pois possui dois elétrons desemparelhados, cada um localizado em orbitais antiligantes π^* diferentes com spins paralelos. Essa estrutura triplete é a forma mais estável da molécula de oxigênio (Figura 1). Devido a essa configuração, para que o O_2 possa oxidar outra molécula, esta deve apresentar elétrons em spins antiparalelos para se encaixarem nos orbitais π^* . Entretanto, a maioria das biomoléculas que reagem com oxigênio apresenta um par de elétrons com spins opostos, ocupando o mesmo orbital molecular. Isto impõe uma restrição à transferência de elétrons fazendo com que o O_2 receba um elétron de cada vez, contribuindo para explicar por que o O_2 reage tão lentamente com não-radicais (Gilbert, 1981).

Formas relativamente mais reativas do O_2 , não necessariamente radicais, podem ser formadas através de reações de transferência de energia ou de elétrons.

O oxigênio singlete (1O_2) pode ser gerado por transferência de energia (Figura 1). O estado $O_2(^1\Sigma_g^+)$ possui elétrons com spins opostos ocupando orbitais distintos. A energia de excitação é de 37,5 Kcal/mol acima do estado fundamental, decaindo muito rapidamente para o segundo estado de excitação, $O_2(^1\Delta_g)$. Este possui uma energia de excitação de 22,5 Kcal/mol acima do estado fundamental, os elétrons passam a ocupar um mesmo orbital, desfazendo a restrição de spin do O_2 no estado fundamental tornando-o muito mais oxidante (Di Mascio *et al.*, 1995).

Outra forma de geração de espécies mais reativas que o O_2 no estado fundamental é a transferência de elétrons. Se um único elétron for transferido à molécula do O_2 no estado fundamental, este deve entrar em um dos orbitais π^* antiligantes, gerando o ânion radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) (Figura 1). A adição de mais um elétron ao $O_2^{\bullet-}$ dá origem ao peróxido de hidrogênio (H_2O_2), a redução por mais dois elétrons produz água (H_2O).

A fotodissociação do O_2 molecular em dois átomos de oxigênio que reagem com moléculas de O_2 , produz o ozônio (O_3). O O_3 não é um radical livre, mas é um agente oxidante muito mais potente que o O_2 no estado fundamental. O O_3 também pode ser formado através de eventos fotoquímicos complexos de componentes da poluição urbana (Victorin, 1992).

Figura 1: Distribuição eletrônica na molécula diatômica de oxigênio e nos seus derivados (Halliwell e Gutteridge, 1999).

1.2.1.1. Oxigênio singlete

Além do maior poder oxidante do 1O_2 , seu tempo de vida é relativamente longo em sistemas aquosos ($10^{-6}s$), característica importante quando consideramos sua reatividade em sistemas biológicos (Monroe, 1985).

Inúmeras reações são capazes de gerar 1O_2 . Reações de fotossensibilização, onde corantes sintéticos (acridina, azul de metileno, rosa bengal, etc.) ou compostos biológicos (riboflavinas, bilirrubinas, retinal e porfirinas) excitados pela absorção de luz, transferem sua energia ao O_2 molecular, convertem-no ao estado singlete.

Os efeitos resultantes da fotossensibilização podem ser causados pelos próprios fotossensibilizadores excitados (mecanismo tipo I) e pelo 1O_2 formado (mecanismo tipo II). Algumas drogas como as fenotiazinas, tetraciclina e anti-inflamatórios também são sensibilizadoras da formação de 1O_2 (Gollnick, 1968;

Krinsky, 1977; Foote, 1986).

Essas reações de fotossensibilização também podem ter efeitos benéficos sendo utilizadas no tratamento de icterícia em recém-nascidos e na terapia fotodinâmica (Henderson e Dougherty, 1992) que faz uso de psoralenos, derivados de porfirinas e seus precursores como o ácido 5-aminolevulínico (ALA) (Peng *et al.*, 1997; Fuchs *et al.*, 2000) como fotossensibilizadores do O_2 para a destruição de células tumorais (Hilleberg *et al.*, 1994).

Várias reações enzimáticas catalisadas por cloroperoxidase, lipoxigenase, mieloperoxidase, lactoperoxidase, etc também geram 1O_2 . A termólise de endoperóxidos aromáticos também é bastante utilizada em estudos biológicos como fonte geradora de 1O_2 (Pierlot *et al.*, 2000).

1.2.1.2. Ânion radical superóxido

Vários processos biológicos podem gerar o $O_2^{\bullet -}$ *in vivo*. Células fagocíticas ativadas, várias oxidases (peroxidases, xantina oxidase, aldeído oxidases), hormônios como adrenalina e noradrenalina, neurotransmissor dopamina, oxidação da hemoglobina e da mioglobina, sistema do citocromo P450, e a cadeia de transporte de elétrons da mitocôndria (Fridovich, 1995). Esta última é, provavelmente, a principal fonte de $O_2^{\bullet -}$ *in vivo*. Em concentrações fisiológicas de O_2 , tem sido sugerido que cerca de 1-3% do O_2 reduzido na mitocôndria pode formar $O_2^{\bullet -}$ (Turrens, 1997).

Essa baixa taxa de liberação ocorre devido ao arranjo dos transportadores de elétrons em complexos que facilitam o movimento dos elétrons ao próximo componente na cadeia evitando que o elétron escape para o O_2 . Além disso, a citocromo oxidase, enzima terminal responsável pela redução efetiva do oxigênio à água, possui uma alta afinidade com o O_2 e com seus intermediários, minimizando os possíveis danos gerados pelo O_2 e seus derivados. Entretanto, essa taxa de liberação pode aumentar se os componentes da cadeia de transporte forem danificados.

Em soluções aquosas o $O_2^{\bullet -}$ não é muito reativo, quando comparado ao 1O_2 e ao radical hidroxila ($^{\bullet}OH$), em relação aos não-radicais, mas reage rapidamente com outros radicais como o óxido nítrico ($NO^{\bullet}$), com certas enzimas com clusters

de ferro e enxofre e com certos radicais fenoxil, como o formado pela abstração de hidrogênio do grupo OH da tirosina (Sawyer e Valentine, 1981).

1.2.1.3. Peróxido de hidrogênio

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) mistura-se facilmente com a água e difunde-se entre as células e dentro delas. Várias enzimas podem gerar H_2O_2 , como xantina, urato e *D*-amino oxidases. Além disso, qualquer sistema biológico que gera $\text{O}_2^{\bullet-}$ também pode produzir H_2O_2 através da dismutação do $\text{O}_2^{\bullet-}$.

O H_2O_2 é um agente redutor e oxidante fraco e geralmente fracamente reativo, podendo, no entanto, ser citotóxico. Deste modo, a oxidação dos componentes celulares atribuída ao H_2O_2 deve-se ao fato desta molécula atravessar rapidamente a membrana celular, e dentro da célula reagir com íons de ferro ou de cobre, produzindo uma espécie muito mais reativa, o radical $^{\bullet}\text{OH}$ (Spencer *et al.*, 1995).

1.2.1.4. Radical hidroxila

As principais fontes de geração de $^{\bullet}\text{OH}$ são a radiação ionizante (von Sonntag, 1987), reação de ácido hipocloroso com $\text{O}_2^{\bullet-}$ (Folkes *et al.*, 1995), ultrassom e liofilização (Riesz *et al.*, 1990, Wolcott *et al.*, 1994) e a reação do H_2O_2 com metais de transição (Fenton, 1894).

O $^{\bullet}\text{OH}$ reage rapidamente e *in situ*, com qualquer tipo de biomolécula, sendo a ROS mais reativa, possuindo um potencial de redução muito positivo. O $^{\bullet}\text{OH}$ pode, basicamente, reagir de três maneiras: abstração de hidrogênio, adição ou transferência de elétrons. A reação de abstração de hidrogênio é a responsável pela iniciação do processo de lipoperoxidação. Os danos a compostos aromáticos freqüentemente ocorrem por adição, como a oxidação da guanina nos ácidos nucleicos.

1.2.1.5. Metais de transição

Quase todos os metais de transição, com exceção do zinco, possuem

elétrons desemparelhados, qualificando-os como radicais livres. Essa característica permite que o metal receba ou doe elétrons, participando de sítios ativos de enzimas e de reações de oxidação e de Fenton, que geram ROS.

Vários são os metais de transição: vanádio, cromo, cobalto, níquel, tungstênio, molibdênio. Porém os mais estudados e com maior relevância nas reações geradoras de radicais livres são o cobre, o manganês e o ferro.

Várias enzimas requerem cobre, como a superóxido dismutase, citocromo oxidase, dopamina β -hidrolase. O manganês é necessário para a superóxido dismutase mitocondrial, arginase e várias hidrolases e carboxilases. O ferro é o metal mais abundante no organismo, necessário à hemoglobina, mioglobina, citocromos, ciclo-oxigenases, succinato desidrogenase, catalase, entre outras (Halliwell e Gutteridge, 1999).

Uma das principais reações de geração de ROS catalisada por metais de transição é a **reação de Fenton** (Fenton, 1894).

A reação consiste na oxidação de compostos orgânicos pelo sistema H_2O_2/Fe^{2+} , provavelmente envolvendo várias espécies oxidantes, sendo a melhor caracterizada, o radical $\cdot OH$ (reação 1).

1.2.1.6. Outros radicais de importância biológica

Radicais peroxil ($RO_2\cdot$) e alcóxil ($RO\cdot$) são, de modo geral, bons oxidantes, podendo abstrair um $\cdot H$ de outras moléculas como de lipídios de membrana, iniciando a lipoperoxidação. Esses radicais podem ser gerados a partir da reação entre o O_2 e radicais centrados no carbono provenientes do ataque do radical $\cdot OH$ a compostos orgânicos; a partir da decomposição de peróxidos orgânicos ($ROOH$) e também durante o processo de lipoperoxidação (Vaca *et al.*, 1988).

Radicais tiil ($RS\cdot$) podem ser formados quando grupos tióis reagem com radicais centrados no carbono, dióxido de nitrogênio ou peroxinitrito, metais de transição e durante a oxidação de tióis por peroxidases ou outras hemoproteínas. Esses radicais também podem iniciar o processo de peroxidação lipídica *in vitro* (Schöneich, 1989).

O óxido nítrico ou monóxido de nitrogênio ($\text{NO}^\bullet$) é um radical livre muito estudado devido a seus inúmeros papéis fisiológicos (Moncada e Higgs, 1995) principalmente como sinalizador celular. O $\text{NO}^\bullet$ sintetizado pelas células endoteliais vasculares (Palmer *et al.*, 1987), liga-se a guanilato ciclase, aumentando a produção de GMP cíclico e diminuindo a concentração intracelular de íons cálcio. Esse processo resulta no relaxamento muscular, dilatando os vasos e abaixando a pressão sanguínea. O princípio básico do remédio sildenafil (Viagra[®]) baseia-se na inibição da enzima fosfodiesterase que degrada o GMP cíclico, permitindo sua maior atuação sobre o relaxamento dos vasos sanguíneos que participam do processo de ereção.

A combinação do $\text{NO}^\bullet$ com o $\text{O}_2^{\bullet-}$, gera peroxinitrito (ONOO^-), oficialmente denominado oxoperoxonitrato (1-), cuja forma protonada (ONOOH) é um potente oxidante que atua sobre vários processos de inativação e nitração de proteínas (Beckman e Koppenol, 1996) e danos ao DNA (Yermilov *et al.*, 1996).

1.3. Defesas antioxidantes

Várias são as linhas de defesa antioxidante desenvolvidas pelas células para se defenderem da ação das espécies reativas (Halliwell e Gutteridge, 1990): sistemas catalíticos como as enzimas catalase, superóxido dismutases, peroxidases e antioxidantes tiol-específicos; proteínas que minimizam a disponibilidade de metais de transição como a ferritina e a ceruloplasmina; proteínas que protegem biomoléculas contra danos por mecanismos diversos como as proteínas de choque térmico, agentes de baixo peso molecular que seqüestram as ROS como glutathiona, e vitaminas provenientes da dieta como β -caroteno, α -tocoferol, licopeno, flavonóides e ácido ascórbico.

A atividade catalítica de remoção de radical superóxido da enzima **superóxido dismutase** (SOD) foi descoberta por McCord e Fridovich (1969). Uma das superóxido dismutases, a CuZnSOD, está presente no citossol de todas as células eucarióticas, possui duas subunidades contendo cobre e zinco no sítio ativo. O Zn auxilia na estabilização da enzima e o Cu participa da reação de dismutação do $\text{O}_2^{\bullet-}$ (reações 2, 3 e 4).

Outro tipo de SOD, presente principalmente na mitocôndria, possui manganês no sítio ativo (MnSOD).

A **catalase** animal consiste de quatro subunidades proteicas, cada uma contendo um grupo heme no sítio ativo (Reid *et al.*, 1981) catalisando a decomposição do H_2O_2 a O_2 no estado fundamental segundo a reação 5.

A maioria das células aeróbicas contém catalase, estando distribuída por todos os órgãos dos mamíferos, especialmente concentrada no fígado.

As peroxidases removem o H_2O_2 utilizando-o para oxidar outro substrato. A **glutathione peroxidase** (GPX) remove o H_2O_2 utilizando a glutathione (GSH) como substrato.

A GPX consiste de quatro subunidades cada uma contendo um átomo de selênio no sítio ativo, presente como selenocisteína. Foi descoberta em tecidos animais em 1957 e encontra-se amplamente distribuída nos tecidos (Chance *et al.*, 1979).

Componentes provenientes da dieta também podem atuar como agentes antioxidantes. O **α -tocoferol** (vitamina E) atua como um seqüestrador de radicais $\text{RO}_2^{\bullet}$ podendo inibir a peroxidação lipídica (Di Mascio *et al.*, 1991). Inúmeros estudos indicam a atividade antioxidante do **ácido ascórbico** (vitamina C) (Nishikimi e Yagi, 1996), no entanto alguns estudos *in vitro* também indicam uma atividade pró-oxidante da vitamina C (Halliwell e Gutteridge, 1990). Os **carotenóides** também atuam como importantes antioxidantes (Krinsky, 1993). Presentes como pigmentos coloridos em diversos tecidos vegetais, como o

licopeno no tomate, o **β -caroteno** na cenoura, eles possuem estruturas que alternam ligações duplas e simples. Estudos *in vitro*, indicam que os carotenóides são capazes de seqüestrar as ROS (Di Mascio *et al.*, 1989 e 1991).

Danos oxidativos ao DNA também podem ser reparados por uma variedade de **enzimas de reparo**. As enzimas que reparam os danos oxidativos ao DNA, normalmente agem via um mecanismo de reparo por excisão de bases, onde a base danificada é reconhecida por uma reação glicosílica e endonucleolítica. A base modificada é removida como uma base livre e o sítio abásico resultante é reconhecido por uma endonuclease apurínica celular que quebra o DNA adjacente a este sítio. A incisão é seguida pela ação de uma exonuclease que remove o resíduo abásico danificado do DNA e então ocorre a polimerização e ligação do DNA (Wallace, 1988; Sancar, 1996).

1.4. Radicais livres e efeitos benéficos

Os radicais livres, incluindo as ROS e as espécies reativas de nitrogênio, participam de funções benéficas no organismo. Radicais livres estão presentes em diversos sítios ativos como o ferril do citocromo P450 e de hemeperoxidases, radicais de tioredoxina ou cobalamina nas ribonucleotídeos redutases (Marsh, 1995). No processo de fagocitose, neutrófilos e macrófagos, apresentam um aumento na taxa da captação de oxigênio devido à ativação de um complexo de enzimas na membrana plasmática que oxida o NADPH gerando $O_2^{\bullet -}$ (Henderson e Chappell, 1996). Este radical auxilia no processo de defesa da célula através de sua conversão em $HO_2^{\bullet}$ e H_2O_2 que pode agir diretamente ou pela produção de radical $^{\bullet}OH$. O radical $NO^{\bullet}$, como já citado, também possui inúmeros papéis fisiológicos. Várias ROS têm sido relatadas como importantes mensageiros celulares (Khan e Wilson, 1995).

Os processos citados acima são apenas alguns exemplos da utilização benéfica das propriedades das ROS pelo organismo. Entretanto, o envolvimento em processos que causam danos tem sido mais amplamente estudado.

1.5. Lesões em DNA promovidas por espécies reativas de oxigênio e suas consequências

1.5.1. Estrutura do DNA nuclear

O DNA, molécula que carrega as informações genéticas, é formado por desoxiribonucleotídeos, cada um composto por uma base, um açúcar desoxiribose, e um grupo fosfato. As bases podem ser divididas em púricas, adenina (A) e guanina (G) e pirimidínicas, timina (T) e citosina (C). Os nucleotídeos são ligados entre si através de ligação fosfodiéster formada entre o grupo –OH da posição 3' e o grupo fosfato da posição 5' da desoxiribose. As bases dos nucleotídeos estabelecem interações hidrofóbicas e pontes de hidrogênio que permitem o pareamento complementar dos nucleotídeos; a guanina pareia com a citosina formando três pontes de hidrogênio e a adenina com a timina formando duas pontes de hidrogênio. Esse pareamento contribui para a estabilidade termodinâmica da interação entre as bases que faz com que o DNA assuma a conformação de dupla hélice. Cada par de bases possui uma rotação de cerca de 36° em torno do eixo da hélice em relação ao par de bases seguinte. Desta forma, 10 pares de bases formam um volta completa. Essa rotação das duas fitas entre si forma uma dupla hélice com uma volta menor e uma maior, sempre girando para direita. O DNA humano possui cerca de 3×10^9 pares de bases.

Para que a molécula de DNA caiba dentro do núcleo e possa ser devidamente acessada para o processamento da informação genética, esta, deve apresentar um alto e organizado grau de compactação. O DNA nuclear humano possui vários níveis de compactação. Primeiramente, a dupla hélice de DNA encontra-se superenrolada em forma de solenóide e envolta em histonas formando os nucleossomos. Cada nucleossomo possui oito histonas, duas cópias de cada H2A, H2B, H3 e H4, e contém cerca de 200 pares de bases de DNA; é

separado por um DNA ligante flexível ligado a histona H1. Essa estrutura de nucleossomos é capaz de compactar o DNA cerca de sete vezes. Os nucleossomos são organizados em fibras de 30 nm e estas fibras são extensivamente dobradas formando “loops” e rosetas até alcançar a compactação total do DNA na cromatina, que é de cerca de 10.000 vezes. A cromatina forma os cromossomos, 22 pares autossômicos e 2 sexuais em humanos (Lehninger *et al.*, 1993).

1.5.2. Metabolismo do DNA

O DNA é replicado de forma semi-conservativa, com cada fita agindo de molde para a nova fita formada. A reação inicia-se numa seqüência de DNA chamada de origem da replicação e normalmente processa-se bi-direcionalmente. O DNA é sintetizado na direção 5'-3' a partir de um “primer”, pelas DNA polimerases de modo contínuo ou descontínuo, conforme a fita. A fidelidade da replicação é mantida pela seleção de bases pela polimerase, pela atividade exonuclease 3'-5' da polimerase que retira bases incorporadas erroneamente e por um sistema de reparo específico que repara erros após a replicação. As células eucarióticas possuem pelo menos cinco tipos de polimerases. Em células humanas acredita-se que a DNA polimerase α inicia a replicação e as polimerases δ e ϵ continuam. A DNA polimerase β parece estar envolvida no reparo. A polimerase γ é responsável pela replicação do DNA mitocondrial (Lehninger *et al.*, 1993).

Os sistemas de reparo do DNA são normalmente específicos para uma determinada classe de danos: anormalidades estruturais ou de “mismatch” nas forquilhas de replicação são reparadas por reparo “mismatch”, quebras de fita dupla são reparadas por processos de recombinação homóloga, bases danificadas são usualmente reparadas por reparo por excisão de bases, e lesões que promovem distorções no DNA são reparadas por reparo por excisão de nucleotídeos (Dempsey e Harrison, 1994).

A eliminação de lesões oxidativas normalmente ocorre por reparo por excisão de bases. Esse tipo de reparo envolve a clivagem da ligação N-

glicosídica das bases oxidadas por várias enzimas e subsequente remoção dos sítios abásicos resultantes, por atividade de endonucleases (Bohr e Dianov, 1999). Há várias enzimas de reparo já descritas, específicas para danos ao DNA promovidos por ROS (Demple e Harrison, 1994).

1.5.3. Danos em DNA nuclear promovidos por espécies reativas de oxigênio

As espécies reativas de oxigênio e nitrogênio podem atacar a molécula de DNA por mecanismos diretos ou indiretos. Os mecanismos indiretos incluem a ativação de endonucleases dependentes de Ca^{2+} e a interferência com enzimas que replicam ou reparam o DNA. Os mecanismos diretos danificam as bases púricas ou pirimidínicas ou o açúcar desoxiribose do DNA (Cadet *et al.*, 1997).

Os principais tipos de danos oxidativos ao DNA são quebras de fita, bases modificadas, sítios abásicos (AP) e ligações cruzadas de DNA com proteínas (Breen e Murphy, 1995).

Várias ROS e processos oxidativos podem estar envolvidos na indução de danos ao DNA (Figura 2). Entre esses, o radical $\cdot\text{OH}$, as espécies de ferro geradas na reação de Fenton (Chaudière, 1994) e o ONOO^- são os mais eficientes, sendo capazes de reagir tanto com a base quanto com o açúcar. Por outro lado, $^1\text{O}_2$ reage com o DNA de modo mais específico. O radical $\text{O}_2\cdot^-$ e suas formas conjugadas não apresentam qualquer reatividade aos componentes do DNA em soluções aquosas (Cadet e Téoule, 1978).

A oxidação por um elétron das bases é um importante processo associado aos danos diretos ao DNA promovidos por radiação ionizante, mecanismo de fotossensitização tipo I, raios ultravioleta e outros processos (von Sonntag, 1987; Görner, 1994).

As quebras de fita do DNA podem ser geradas através da abstração de átomos de hidrogênio do açúcar, preferencialmente na posição C4, pelo radical $\cdot\text{OH}$. Os radicais resultantes levam, na maioria dos casos, a quebras de fita através de diversos mecanismos (von Sonntag, 1987; Breen e Murphy, 1995).

Figura 2: Possíveis fontes de espécies reativas de oxigênio e aldeídos que podem danificar o DNA.

Devido a sua alta reatividade e inespecificidade, o radical $\bullet OH$ pode atacar açúcares, purinas e pirimidinas, gerando diferentes produtos (Figura 3) (von Sonntag, 1987, Brenn e Murphy, 1995). O radical $\bullet OH$ pode se adicionar à 2'-desoxiguanosina (dGuo) nas posições 4, 5 ou 8 do anel púrico. A adição em C8 produz o radical aduto OH que pode ser reduzido a 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina (8-oxodGuo), oxidado a 8-hidroxi guanina ou sofrer abertura do anel imidazólico seguido por redução por um elétron e protonação, gerando 2,6-diamino-4-hidroxi-5-formamidopirimidina (FapyGua).

A adenina também pode sofrer adição de $\bullet OH$ nas posições C4, C5 ou C8. A timina pode sofrer abstração de um átomo de hidrogênio do anel ou do grupo metil; os radicais resultantes são convertidos em diversos peróxidos de timina que podem quebrar formando os glicóis de timina *trans* e *cis* (5,6-dihidroxi-6-hidrotiminas), 5-hidroxi-5-metilhidantoina, 5-hidroxi-6-hidrotimina, 6-hidroxi-5-hidrotimina e 5-(hidroximetil)uracila (5-HMUr). A oxidação da citosina também pode gerar vários produtos, como citosina glicol e 5,6-dihidroxicitosina (Cadet et

al., 1997).

Figura 3: Estruturas moleculares de algumas das bases modificadas do DNA.

O oxigênio singlete é muito mais seletivo nos danos, atacando principalmente a guanina, produzindo 8-oxodGuo e FapyGua (Ravanat e Cadet, 1995). As espécies reativas de nitrogênio também podem atacar o DNA produzindo nitração, nitrosação e deaminação de bases gerando 8-nitroguanina e os produtos de deaminação xantina e hipoxantina (Spencer *et al.*, 1996). Os radicais $RO_2^{\bullet}$ provenientes da lipoperoxidação também são capazes de promover quebras de fita em oligonucleotídeos em DNA isolado (Nakayama *et al.*, 1986), porém ainda há poucos dados referentes à relevância biológica desse processo. Os principais danos ao DNA causados por produtos da peroxidação são resultantes dos compostos quimicamente estáveis, como alcenos, alcanos e derivados carbonílicos capazes de formar adutos com o DNA (vide item: 1.5.5. *DNA e bases modificadas por aldeídos*). A incubação de DNA em solução com H_2O_2 na presença de Fe^{2+} /EDTA leva também à formação dependente do tempo de exposição, de timidina glicol, 5-HMUra, 5-formil-2'-desoxiuridina e 8-oxodGuo

(Frenkel *et al.*, 1991).

Inúmeros trabalhos relatam que várias substâncias e agentes carcinogênicos, como o benzopireno (Albert *et al.*, 1991), asbestos (Kasai e Nishimura, 1984a), ozônio (Borek *et al.*, 1987), fumaça de cigarro (Cross *et al.*, 1987), radiação γ (Frenkel *et al.*, 1985), substâncias promotoras de tumores (12-O-tetradecanoil-forbol-13-acetato, TPA), (Frenkel *et al.*, 1995) Fe-nitriloacetato (Umemura *et al.*, 1990) também causam danos oxidativos ao DNA.

Aumento dos níveis de 8-oxodGuo, 8-hidroxiadenina e FapyGua foram reportados em DNA de tumores de mama (Malins e Haimanot, 1991) e já foi demonstrado que células tumorais produzem altas quantidades de H_2O_2 (Szatrowski e Nathan, 1991) que podem potencializar os danos ao DNA e aumentar a instabilidade genética (Malins e Haimanot, 1991).

As lesões ao DNA promovidas pelas ROS podem levar a mudanças conformacionais na estrutura e a alteração da estabilidade térmica do DNA. Além disso, as lesões podem bloquear a replicação do DNA ou induzir a incorporação errônea de bases produzindo mutações.

Timidina glicol tem sido mostrada como uma lesão eficiente no bloqueio da DNA polimerase em vários estudos de replicação (Basu e Essigman, 1988; Evans *et al.*, 1993). No entanto, essa lesão não bloqueia a replicação em uma determinada seqüência de bases como 5'-citosina-timina glicol-purina-3' (Hayes e LeClerc, 1986).

A 5-hidroximetiluracila não parece ser muito mutagênica, uma vez que estudos de replicação demonstraram que, na maioria das vezes, a base correta, adenina, é incorporada na posição oposta (Mellac *et al.*, 1993). As duas principais lesões oxidativas de citosina, 5-OHCyt e 5-OHUra, são eficientemente transpostas em estudos com DNA polimerase *in vitro* (Purmal *et al.*, 1994). Entretanto, tanto a 5-OHCyt quanto a 5-OHUra podem ser consideradas lesões pré-mutagênicas, pois levam à incorporação errônea de adenina oposta à lesão. Já a incorporação de guanina oposta a 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiadenosina (8-oxodAde) não é muito eficiente (Shibutani *et al.*, 1993).

Ausência de mutação foi relatada após transfecção em *E. coli* de um fago simples fita de DNA contendo um resíduo único de 8-oxodAde. No entanto, a

presença de 8-oxodGuo levou 0,3% de tranversões G-T (Wood *et al.*, 1991). Esse último resultado é corroborado por outros estudos em células de mamíferos com a guanina oxidada posicionada em um único sítio em DNA episomal (Moriya, 1993; LePage *et al.*, 1995).

Sítios apurínicos, provavelmente, também constituem lesões mutagênicas, uma vez que ocorre incorporação preferencial de adenina em modelos de DNA sintéticos (Kunkel *et al.*, 1983; Shager e Strauss, 1983). Além disso, a extremidade 3'-glicolato, a principal lesão do açúcar do DNA promovida pela oxidação mediada por $\cdot\text{OH}$, induz quebras de fita (Henner *et al.*, 1983).

Deste modo, as consequências biológicas das lesões ao DNA têm sido muito investigadas, uma vez que alterações no DNA são pré-requisito para o início do processo de transformação maligna que, em última instância, pode levar ao aparecimento do câncer.

1.5.4. Danos em DNA mitocondrial

Cada mitocôndria contém cerca de dez moléculas de DNA dupla fita circular, contendo somente 16549 pares de bases por molécula. O DNA mitocondrial codifica apenas 13 das proteínas mitocondriais. Das 26 subunidades do complexo I, somente 7 são codificadas pelo DNA mitocondrial, o restante é feito no citosol utilizando RNA mensageiro do núcleo. A mitocôndria também codifica uma proteína do complexo III, três do complexo IV, duas do complexo V (ATPase), 22 RNAs transportadores e dois RNAs ribossomais. Diferentemente do DNA nuclear, o DNA mitocondrial não é protegido por histonas, estando mais susceptível a danos.

Mutações mitocondriais têm sido associadas com uma grande variedade de doenças como a neuropatia óptica hereditária de Leber, que leva a uma degeneração do nervo óptico, sendo causada por mutações nos genes que codificam constituintes da cadeia de transporte de elétrons. Mutações nos genes que codificam um RNA transportador carreador da leucina leva à doença denominada MELAS caracterizada por uma encefalomiopatia mitocondrial,

acidose láctica e derrames (Schapira, 1996).

A produção de radicais pela respiração mitocondrial pode contribuir para danificar proteínas, lipídios o DNA mitocondrial, esses danos parecem aumentar com a idade (Hayakawa *et al.*, 1992; Shigenaga *et al.*, 1994). Danos oxidativos às bases do DNA mitocondrial foram detectados em fígado de ratos e cérebro humano em níveis bem maiores do que no DNA nuclear (Richter *et al.*, 1995). O aumento aparente dos danos ao DNA mitocondrial em relação ao nuclear pode ser explicado pela proximidade do DNA mitocondrial das ROS, geradas na cadeia de transporte de elétrons e pela ausência de proteção por histonas. O reparo no DNA mitocondrial pode também ser menos eficiente ou mais lento, levando ao maior acúmulo de lesões (Yakes e Van Houten, 1997). Mutações no DNA mitocondrial também têm sido associadas ao processo carcinogênico e ao envelhecimento (Shay e Werbin, 1987; Bandy e Davison, 1990).

1.5.5. DNA e bases modificadas por aldeídos

Além da ação das ROS, os aldeídos também podem interagir diretamente com o DNA ou formar epóxidos, conhecidos agentes alquilantes (Ehrenberg *et al.*, 1977; Segerbäck, 1983) (Figura 2). Os principais aldeídos estudados são o malonaldeído (MDA), 4-hidroxi-2-nonenal (HNE) e 2,4-decadienal (DDE), principais produtos não radicalares formados no processo de peroxidação lipídica (Vaca *et al.*, 1988).

O malonaldeído promove alterações no DNA como mudança no perfil de desnaturação térmica, redução da hidrólise com desoxirribonuclease e mudança no comportamento cromatográfico (Brooks e Klammerth, 1968). Também leva à formação de produtos fluorescentes, relacionados linearmente com o decréscimo da atividade do DNA.

Adutos cíclicos de origem endógena entre guanina e MDA foram isolados a partir de urina (Hadley e Draper, 1990) e de DNA de fígado de ratos (Agarwal e Draper, 1992) e de humanos (Chaudhary *et al.*, 1994). O nível desses adutos em fígado de ratos foi sete vezes maior que o de 8-oxodGuo, sendo altamente persistentes, apresentando meia-vida de 12,5 dias (Kautiainen *et al.*, 1993).

Adutos de MDA com dAde e dCyt já foram caracterizados (Stone *et al.*, 1990a; Stone *et al.*, 1990b). O MDA também pode reagir com outros aldeídos formando produtos reativos também responsáveis por danos a bases de DNA (Gómez-Sánchez *et al.*, 1993), como o aduto 1,4-dihidropiridina, formando a partir da reação do produto de condensação de MDA com acetaldeído e a dAde (Le Curieux *et al.*, 1998).

O 4-hidroxi-2-nonenal, principal hidroxialcenal resultante do processo de peroxidação lipídica, reage com uma grande quantidade de biomoléculas, apresentando muitos efeitos citotóxicos, como inibição de enzimas, inibição da síntese de proteínas, inibição da síntese de DNA e RNA, indução de proteínas de choque térmico, bloqueio da proliferação de várias linhagens celulares, entre outros (Esterbauer, 1985; Esterbauer *et al.*, 1991).

Já foi detectada a formação de adutos cíclicos entre HNE e dGuo *in vitro* (Winter *et al.*, 1986; Sodum e Chung, 1988; Sodum e Chung, 1991). Tais adutos podem ser formados tanto pela reação direta de HNE, originando o aduto cíclico 1,N²-propano-2'-desoxiguanosina (Winter *et al.*, 1986), como via formação do seu epóxido 2,3-epoxi-4-hidroxinonanal. Este último pode formar o aduto cíclico 1,N²-eteno-2'-desoxiguanosina (Sodum e Chung, 1988; Sodum e Chung, 1991), 1,N²-etenoguanina, 1,N²-etanoguanina e 1,N⁶-etenoadenina (Sodum e Chung, 1991; Ghissassi *et al.*, 1995). Outro aldeído insaturado formado durante a lipoperoxidação é o *trans*-4-hidroxi-2-hexenal e é particularmente tóxico a mitocôndria (Kristal *et al.*, 1996).

Crotonaldeído [CH₃-CH=CH-CH=O] e acroleína [CH₂=CH-CH=O] (Chung *et al.*, 1984; Wilson *et al.*, 1991), produtos da lipoperoxidação e componentes da poluição ambiental (Wynder *et al.*, 1965); também levam à formação do aduto cíclico 1,N²-propano-2'-desoxiguanosina (Gölzer *et al.*, 1996). Assim como o hexenal [CH₃-CH₂-CH₂-CH=CH-CH=O], aromatizante natural e produto de processos de oxidação (Esterbauer *et al.*, 1990).

O 2,4-decadienal, um aldeído α,β-insaturado produto secundário da lipoperoxidação, também tem sido extensivamente estudado. O 2,4-decadienal reage diretamente com adenina (Hasegawa *et al.*, 1988) e DNA de timo de bezerro (Medeiros *et al.* 1992; Medeiros *et al.*, 1995) levando à formação de produtos fluorescentes. Já foram caracterizados quatro etenoadutos resultantes

da reação de metabólitos do DDE com 2'-desoxiadenosina *in vitro* (Carvalho *et al.*, 1998 e 2000). Loureiro *et al.* (2000) também isolou a partir de DNA de timo de bezerro tratado *in vitro*, três etenoadutos não fluorescentes resultantes da reação de metabólitos do DDE com dGuo. A incubação de DDE com plasmídio 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). Vários produtos do ataque de aldeídos às bases do DNA são fluorescentes. Reiss *et al.* (1972), postularam que a fluorescência formada é devida à formação de uma estrutura amino-iminopropeno conjugada, base de Schiff, $R-N=CH-CH=CH-N-R'$, entre os grupos amino das bases do DNA e o malonaldeído. Outros dados mostraram que, através da formação de bases de Schiff, podem ocorrer ligações cruzadas induzidas por MDA tanto entre as cadeias do DNA como entre proteínas e DNA (Summerfield e Tappel, 1983; Summerfield e Tappel, 1984a; Summerfield e Tappel, 1984b). Foi demonstrado também que outros compostos carbonílicos formados durante a lipoperoxidação podem reagir com o DNA, via formação de base de Schiff, originando produtos caracterizados por diferentes espectros de fluorescência (Fujimoto *et al.*, 1984, Esterbauer *et al.*, 1991). Os aldeídos também podem formar adutos de Schiff com proteínas (Medeiros e Bechara, 1986; Vaca *et al.* 1988).

1.6. Radicais livres e doenças

Como já citado, o organismo possui vários processos de defesa antioxidante. O equilíbrio entre os processos pró e antioxidantes constitui a condição normal da vida aeróbica. O desequilíbrio a favor do estado pró-oxidante desencadeia o chamado estresse oxidativo (Sies, 1991). Esse estado de desequilíbrio pode ser encontrado em inúmeros processos orgânicos degenerativos e em diversas doenças como por exemplo: artrite, aterosclerose, catarata, enfisema, doença de Parkinson, diabetes aloxânica, lesão isquêmica, mutações, transformações malignas, envelhecimento (Halliwell *et al.*, 1992; Halliwell e Gutteridge, 1999).

Várias são as evidências dos danos causados direta ou indiretamente

pelas ROS e espécies reativas de nitrogênio ao DNA (Frenkel, 1992; Cadet *et al.*, 1997), a proteínas (Davies e Delsignore, 1987; Stadtman, 1990), lipídios (Vaca *et al.*, 1988) e outras biomoléculas.

Um grupo de doenças, cujos sintomas podem estar relacionados às ROS, são as porfirias.

1.7. Porfirias

1.7.1. Definição

As porfirias são definidas como doenças inatas ou adquiridas, relacionadas à deficiência de enzimas - inibição ou insuficiência - da via biossintética do grupo heme (Esquema I) (Dailey, 1997). Esta deficiência resulta na produção excessiva e excreção de porfirinas e de seus precursores. (Chisolm, 1971; Hindmarsh, 1986; Bechara *et al.*, 1993; Kappas *et al.*, 1995; Andersson, 1997).

1.7.2. Histórico

O primeiro caso provável de porfiria aguda na história médica foi uma mulher de Thasos na Grécia, descrita em trabalhos compilados por Hipócrates (Wetterberg, 1991). Já o primeiro caso registrado de porfiria aguda, descrito por Stokvis em 1889, foi uma mulher que apresentava urina de cor vermelha escura e morreu após tomar a droga sulfonal (Stokvis, 1889, Tschudy *et al.*, 1975). Günther foi o primeiro a apresentar revisões clínicas e a descrever diferentes tipos de porfiria, ou que ele chamava de “Hämatoporphyrinurie” (Günther, 1925), e considerava a desordem como um erro inato do metabolismo. A maior parte da nomenclatura é baseada no trabalho de química orgânica sobre biossíntese do heme do prêmio Nobel Hans Fischer, de 1924.

1.7.3. O grupo heme e sua biossíntese

O grupo heme funciona como grupo prostético de inúmeras proteínas do metabolismo humano, como as enzimas catalases e peroxidases que atuam na defesa antioxidante do organismo (Andersson, 1997). O heme também é o responsável pela ligação e transporte do oxigênio (hemoglobina e mioglobina). Grande parte do heme hepático é utilizado para síntese do citocromo microssomal P-450, que auxilia na detoxificação no fígado, e também tem papel fundamental no suprimento de energia e respiração celular.

Os principais órgãos responsáveis pela síntese do grupo heme são os tecidos hematopoiéticos e o fígado, sendo este último responsável pela produção de cerca de 15% do total de heme produzido pelo organismo (Hindmarsh, 1986).

A via biossintética consiste de uma série de reações irreversíveis que ocorrem na mitocôndria (reações de oxidação-redução) e no citoplasma (reações de condensação e descarboxilação) conforme mostrado no esquema I.

O primeiro passo dessa via consiste na ação da ácido 5-aminolevulínico sintase (ALA sintase) que condensa uma molécula de glicina com succinil CoA formando o ácido 5-aminolevulínico (ALA), o primeiro precursor do heme. O passo seguinte, que ocorre no citoplasma, é a condensação de duas moléculas de ALA catalisada pela ALA desidratase, dando origem ao monopirrol porfobilinogênio (PBG). Em seguida, a enzima porfobilinogênio deaminase condensa quatro moléculas de PBG resultando no tetrapirrol intermediário hidroximetilbilano. Este, por sua vez, é ciclizado pela uroporfirinogênio-III sintase dando origem a um tetrapirrol cíclico, o uroporfirinogênio III. As cadeias laterais de acetato do uroporfirinogênio III são descarboxiladas em um processo seqüencial catalisado pela uroporfirinogênio descarboxilase, passando através de intermediários 7-, 6- e 5-carboxil. O coproporfirinogênio III resultante é convertido então pela ação da coproporfirinogênio oxidase em protoporfirinogênio IX que, por sua vez, é oxidado pela protoporfirinogênio oxidase à protoporfirina IX. O passo final é a quelação dos íons de ferro pela protoporfirina para formar proto-heme IX (heme), sendo esse passo catalisado pela enzima ferroquelatase (Kappas *et al.*, 1995; Dailey, 1997).

1.7.4. Regulação da biossíntese do heme

A enzima ALA sintase, que condensa succinil CoA e glicina é a principal envolvida no controle da biossíntese do heme.

A ALA sintase possui isoenzimas tecido-específicas que são codificadas por dois genes separados. O gene da ALA sintase constitutiva, também denominado ALA-N ou ALAS1, é expresso em todos os tecidos, enquanto o gene da ALA sintase eritróide-específica, também chamado de ALAS-E ou ALAS2, é expresso exclusivamente nas células eritróides (Bishop *et al.*, 1990). No fígado de mamíferos, a ALA sintase é sintetizada no citoplasma e subseqüentemente transferida para a mitocôndria, onde torna-se funcional.

A biossíntese do heme no fígado é, em grande parte, controlada pela taxa de produção da isoforma hepática da ALA sintase (Granick, 1966) que sofre uma retroinibição do heme intracelular. O efeito regulatório do heme sobre a síntese de ALA sintase processa-se em nível de transcrição (Srivastava *et al.*, 1980) e tradução (Sassa e Granick, 1970), inibição do transporte da enzima do citossol para a mitocôndria (Yamauchi *et al.*, 1980; Srivastava *et al.*, 1983) e inibição da atividade catalítica (May *et al.*, 1995).

A PBG deaminase provavelmente também exerce um certo controle da biossíntese do heme por ter uma atividade menor que as outras enzimas da biossíntese (Hindmarsh, 1986).

Esquema I: Via Biossintética do grupo heme, indicando as deficiências enzimáticas em porfirias com acúmulo de ALA

a – Retroinibição por heme, em AIP, ativada por drogas e metabólitos

b -Inibição por chumbo (Saturnismo)

c - Inibição por succinilacetona (Tirosinemia)

d - Biossíntese deficiente em Porfiria aguda intermitente

1.7.5. Tipos de porfirias

As porfirias são tradicionalmente classificadas com base no principal órgão que produz os metabólitos porfíricos em excesso (fígado ou os tecidos eritropoiéticos), na ocorrência ou não de ataques agudos e nas lesões cutâneas (fotossensibilidade) e/ou neurológicas produzidas (Batlle, 1993; Kappas *et al.*, 1995; Sassa e Kappas, 2000).

Tipo de porfiria	Aguda	Hepática	Cutânea
Porfiria deficiente em ALA desidratase	X	X	
Porfiria aguda intermitente (AIP)	X	X	
Coproporfiria hereditária (HCP)	X	X	X
Porfiria variegata (VP)	X	X	X
Porfiria cutânea tarda (PCT)		X	X
Porfiria eritropoiética congênita (CEP)			X
Protoporfiria eritropoiética (EPP)			X

A porfiria deficiente na atividade da enzima ALA desidratase é transmitida de forma autossômica recessiva. Somente seis casos foram reportados até hoje. Os sintomas são essencialmente neurológicos sem fotossensibilidade cutânea.

Porfiria eritropoiética congênita (CEP) também é transmitida de forma autossômica dominante e caracteriza-se por alta fotossensibilidade cutânea. O defeito genético é a deficiência da atividade da enzima uroporfirinogênio III cosintase que normalmente se manifesta ao nascimento. Pacientes com CEP normalmente apresentam hemólise, estimulando a produção de porfirinas na medula óssea. A prevenção de lesões da CEP inclui a não exposição ao sol e o tratamento das infecções cutâneas secundárias.

A porfiria cutânea tarda (PCT) é o tipo de porfiria mais comum e normalmente inicia-se na vida adulta média ou tardia. A deficiência da atividade da uroporfirinogênio descarboxilase hepática parece caracterizar todas as formas de PCT. Alguns pacientes apresentam a forma genética da doença que é autossômica dominante e podem apresentar também deficiência da enzima em

tecidos extra-hepáticos. Os pacientes com PCT apresentam fotossensibilidade de intensidade leve a grave e geralmente possuem doenças hepáticas. Álcool, estrógeno e siderose hepática são fatores agravantes comuns. A porfiria cutânea tarda pode ser tratada pela não ingestão de álcool e estrógenos e por flebotomia que reduz os estoques de ferro no fígado. A deficiência homozigota de uroporfirinogênio descarboxilase é conhecida como porfiria hepatoeritropoiética e é caracterizada por grave fotossensibilidade sem o envolvimento do fígado.

A coproporfiria hereditária (HCP) é similar mas normalmente mais leve que a AIP e pode apresentar fotossensibilidade cutânea além de sintomas neurológicos. O defeito genético correspondente a HCP é a deficiência da atividade da coproporfirinogênio descarboxilase. A expressão clínica da HCP depende da exposição a hormônios, drogas e fatores nutricionais.

A porfiria variegata (VP) é mais comum em brancos sul-africanos. O defeito primário está na diminuição de cerca de 50% da atividade da enzima protoporfirinogênio oxidase. A expressão clínica, sintomas e tratamento são similares a HCP, mas a fotossensibilidade devido ao acúmulo de porfirinas na pele é mais comum.

A protoporfiria eritropoiética (EPP) é uma doença autossômica dominante que ocorre devido à diminuição de cerca de 50% da atividade da ferroquelatase. Esta doença é normalmente associada com altos níveis de protoporfirina nos eritrócitos e é caracterizada por fotossensibilidade leve a moderada. A expressão clínica é muito variada e alguns portadores do defeito genético possuem nível normal de protoporfirina nos eritrócitos e nenhuma fotossensibilidade. Em 5 a 10% dos pacientes há desenvolvimento de falha hepática progressiva, incluindo cirrose e colestase aguda. A não exposição à luz do sol é importante na prevenção dos sintomas cutâneos e o uso de protetores solares pode reduzir a fotossensibilidade.

A natureza molecular do defeito genético é altamente heterogênea e defeitos múltiplos têm sido demonstrados em cada tipo de porfiria (Kappas *et al.*, 1995).

1.7.6. O rei, o pintor, o escultor, os lobisomens e o Conde Drácula

O Rei George III da Inglaterra (1738-1820), começou em 1765 a apresentar ataques severos de dor abdominal, vômitos, taquicardia e urina vermelha escura e episódios de distúrbio mental. Esses sintomas são característicos de porfiria aguda e em 1966, Macalpine e Hunter sugeriram que provavelmente tratava-se de porfiria aguda intermitente. Há também relatos de que outros membros da família real britânica apresentavam sintomas semelhantes (Warren *et al.*, 1996). A doença do Rei George III é retratada no filme de Alan Bennett, “The Madness of King George”.

O pintor pós-impressionista Vincent van Gogh (1853-1890), cuja insanidade fez-lhe cortar a própria orelha, apresentava períodos de extrema criatividade intermediados por episódios de uma doença debilitante. Esta última condição era exacerbada por má nutrição, trabalho intenso, abuso de álcool, particularmente na forma de absinto. Este licor, muito popular no século XIX na França, continha um grau elevado de álcool (74%) e uma variedade de óleos essenciais, inclusive tujona, um terpeno tóxico responsável pela proibição do absinto (Arnold, 1989). Acredita-se que a inclinação de van Gogh por absinto resultou na tendência de beber terpenos, como tujonas, cânfora e pineno. Cânfora foi um medicamento popular na França do século XIX e van Gogh a tomava como um remédio caseiro para insônia (Arnold, 1988). Pineno é o principal constituinte do óleo de terebentina, usado para diluir pigmentos e lavar pincéis. Ocasionalmente, van Gogh tinha de ser controlado para não tomar terebentina ou “beliscar” suas tintas (Arnold, 1988).

O absinto contém uma série de terpenos e derivados, incluindo tujona (2,4 mM) e álcool tujil (0,8 mM). A concentração final na bebida, usualmente diluída seis vezes em água, era de cerca de 0,5 mM. Essa concentração pode ser suficiente, quando ingerida, para induzir ALA sintase hepática na presença de um bloqueio parcial da síntese do heme, precipitando sintomas de porfiria (Bonkovsky *et al.*, 1992).

Estudos demonstram que cânfora, pineno e tujona são porfirinogênicos em células de fígado de galinhas cultivadas e induzem ALA sintase. Cânfora e tujona

também induzem heme oxigenase por um mecanismo dependente de heme. Deste modo, pode ser inferido o potencial porfirinogênico do absinto (devido a tujona e constituintes terpenos), terebentina (pineno) e medicamentos contendo cânfora (Bonkovsky *et al.*, 1992). Esse potencial pode também explicar alguns dos efeitos deletérios sobre Vincent van Gogh, cuja má nutrição e abuso do absinto exacerbava sua condição de portador de AIP sugerida por Loftus e Arnold (1991).

O mais importante artista do Barroco brasileiro, o escultor mineiro Antônio Francisco Lisboa (1738-1814) conhecido como Aleijadinho, provavelmente também sofria de porfíria, talvez do tipo variegata, comum na tribo dos Banthus na África. Aleijadinho era filho de português com uma escrava africana. Há relatos que Aleijadinho possuía hábitos incomuns como trabalhar protegido por um toldo, sair para trabalhar de madrugada e retornar à noite e sempre usar roupas de mangas compridas. Sabe-se que as famosas esculturas dos 12 profetas de pedra sabão e as 66 estátuas de madeira das Capelas dos Passos foram feitas entre 1796 e 1808, quando o artista já havia perdido parte dos dedos devido à sua doença. Para trabalhar ele pedia a alguém para amarrar o cinzel nas suas mãos.

Segundo artigos publicados no jornal *Folha de S. Paulo* de 16 de março de 1998, alguns acreditam que Aleijadinho era portador de hanseníase, entretanto seus ossos apresentavam pontos avermelhados. Para verificar se esses pontos poderiam ser resquícios de porfirinas, seus ossos foram exumados na Universidade Federal de Juiz de Fora. Entretanto, mesmo a origem de seus ossos é duvidosa pois quando faleceu, Aleijadinho foi enterrado em uma vala comum, somente sendo transferido em 1930 para uma urna especial. Infelizmente, o resultado da exumação dos ossos não foi publicado.

Uma das mais famosas lendas em todo mundo, a do lobisomem, provavelmente surgiu de indivíduos portadores de um tipo de porfíria, provavelmente a porfíria eritropoiética congênita (Moore, 1990). Conhecida como doença de Günther, é uma doença rara autossômica recessiva, resultante da deficiência da uroporfirinogênio III sintase. Ocorre um acúmulo de uroporfirinogênio I e coproporfirinogênio I ocasionando fragilidade e fotossensibilidade da pele resultando em cicatrizes e deformações cutâneas. Outro sintoma é a fragilidade eritrocitária levando à anemia hemolítica. Podem

também ocorrer hirsutismo, e descoloração de dentes, unhas e urina, tornando-os vermelhos devido ao acúmulo de porfirinas e deficiência no crescimento, tornando os portadores raquíticos. Além disso, a gengiva e os lábios podem se retrair expondo mais os dentes.

Esses sintomas desfigurantes podem explicar parcialmente a lenda dos lobisomens surgida na Idade Média. Mas provavelmente a mais conhecida e temida associação com a porfiria eritropoiética congênita é a figura do vampiro. Vários sintomas dessa doença podem estar associados aos comportamentos estranhos atribuídos ao famoso Conde Drácula e a outros menos notáveis portadores. No entanto, alguns autores alegam que tal associação não possui fundamentos e é imprecisa quanto aos sintomas atribuídos, uma vez que portadores de porfiria não desejam sangue, não são mortos pela exposição à luz do sol e não possuem poderes especiais (Moore, 1990). Talvez esses mitos tenham surgido com base nos portadores de porfiria, mas acredito que grande parte seja resultado da imensa imaginação humana, capaz de exacerbar e atribuir falsos sintomas.

Em razão dessas associações entre figuras famosas ou lendárias e porfiria, comumente esse grupo de doenças recebe nomes populares como “doença do vampiro”, “doença do lobisomem”, “enfermidade real” ou “doença mental”.

1.8. Porfirias que acumulam ácido 5-aminolevulínico

O interesse principal da nossa pesquisa são as porfirias que não ocasionam lesões cutâneas por fotossensibilidade e são caracterizadas pelo acúmulo e excreção urinária de ácido 5-aminolevulínico (ALA), o primeiro metabólito da biossíntese do heme (Esquema I): intoxicação por chumbo, tirosinemia hereditária e porfiria aguda intermitente (AIP) (Kappas *et al.*, 1995), que discutiremos com mais detalhes abaixo.

1.8.1. Intoxicação por chumbo

A intoxicação por chumbo, também chamada de saturnismo ou plumbismo

caracteriza-se como uma porfiria adquirida. O chumbo afeta a biossíntese do heme, inibindo as enzimas ALA desidratase, coproporfinogênio oxidase e ferroquelatase, levando ao acúmulo de ALA, coproporfirina e zinco protoporfirina (Chisolm, 1971, Hindmarsh, 1986). As concentrações urinárias de ALA e de protoporfirina no sangue são consideradas como indicadores biológicos da intoxicação por chumbo.

Os sintomas característicos são anemia, insuficiência renal, fraqueza neuromuscular, ataques de apoplexia e coma (Nathanson e Bloom, 1975). Hermes-Lima *et al.* (1991b) postularam que as ROS produzidas pela oxidação do ALA poderiam estar envolvidas na patogênese da intoxicação por chumbo (vide item 1.9. *O ALA e seu potencial oxidante*).

Além disso, a intoxicação por chumbo é considerada uma doença ocupacional séria (Allesio e Foa, 1983) e pode ser uma fonte potencial, em áreas urbanas, de danos cerebrais, retardamento mental e problemas comportamentais graves em bebês (Chisolm, 1971, Piomelli *et al.* 1982). Na Europa, por exemplo, o encanamento de água nas casas que era feito de chumbo, foi trocado.

1.8.2. Tirosinemia hereditária

A tirosinemia hereditária, também conhecida como tirosinemia hepatorenal, tirosinemia do tipo I ou tirosinose congênita, é causada por uma deficiência da fumarilacetoacetato hidrolase (FAH), a enzima envolvida no último passo do catabolismo da tirosina. Essa deficiência resulta na produção aumentada de succinilacetona que compete fortemente com o ALA na reação da ALA desidratase e deste modo, resulta num acúmulo de ALA. As mutações no gene da FAH que levam a tirosinemia são heterogêneas (Mitchell *et al.*, 1995).

Os sintomas são muito variáveis e incluem falha hepática aguda, carcinoma hepatocelular, síndrome de Fanconi renal, cirrose, glomeruloesclerose e crises de neuropatia periférica.

O diagnóstico da doença é feito pela presença de succinilacetona na urina ou no sangue. Muitos pacientes respondem à restrição de fenilalanina e tirosina na dieta. O transplante de fígado cura as manifestações hepáticas e previne as crises neurológicas. O tratamento com 2-(2-nitro-4-trifluorometilbenzoil)1,3-

ciclohexanediona, NTBC, um inibidor da 4-hidroxifenilpiruvato dioxigenase (que participa do catabolismo da tirosina), normaliza as funções renais e hepáticas. Já foi reportado a correção da deficiência da FHA em fibroblastos humanos em cultura por transferência gênica mediada por retrovírus (Phaneuf *et al.*, 1995).

1.8.3. Porfíria aguda intermitente

1.8.3.1. Definição e prevalência

A porfíria aguda intermitente (AIP) também denominada porfíria sueca, pirroloporfíria e porfíria intermitente aguda (Kappas *et al.*, 1995, Sacks, 1990), é uma desordem hereditária autossômica dominante, relativamente rara, mas que é encontrada em diversas populações (Sassa e Kappas, 1981). Nos Estados Unidos, a incidência do defeito gênico afeta entre 5-10 em cada 100 mil indivíduos e na Austrália 3 em 100 mil (Tschudy *et al.* 1975). Na Suécia, país de maior prevalência da doença, estimam-se 10 casos em cada 100 mil habitantes (Andersson, 1997).

1.8.3.2. Histórico

A maior parte da história médica da AIP originou-se na Suécia, particularmente no Norte, como resultado das intensas investigações de Waldenström. Em 1934, ele descreveu onze casos de porfíria aguda e naquela época, somente 42 casos haviam sido reportados na literatura mundial. Em 1934, Beronius reportou 3 pacientes com indiscutível hereditariedade entre 5 casos de porfíria aguda em Skelleftea (Beronius, 1935). Em 1935, Einar Wallquist, um pioneiro na pesquisa sobre porfíria, apresentou uma árvore genealógica com oito gerações descendentes de Lars Olofsson Laestander, nascido em 1701, incluindo quatorze pacientes com porfíria aguda e 6 supostos portadores. Esses autores demonstraram, sem nenhuma dúvida, que o fator hereditário era de extrema importância na patogênese da doença (Engel e Wallquist, 1935).

1.8.3.3. Defeito genético

O defeito primário da AIP está no gene que codifica para a terceira enzima da síntese do heme, a PBG deaminase (PBGD) que catalisa a síntese do hidroximetilbilano a partir do porfobilinogênio (Esquema I).

O gene da PBGD consiste de 15 exons (10 kb) localizados no braço longo do cromossomo 11 (Meissler *et al.*, 1980; Namba *et al.*, 1991). Há cerca de 58 mutações diferentes no gene da PBGD associadas à AIP (Deybach e Puy, 1995; Lundin, 1996), sugerindo uma frequência de mutagênese relativamente alta. Essas mutações resultam em mudanças na sequência de aminoácidos da proteína e deleções em certas regiões que levam à diminuição da atividade da enzima.

Duas formas moleculares distintas de PBGD foram identificadas em células humanas: uma isoforma constitutiva de 44 kDa e uma isoforma eritróide específica de 42 kDa (Grandchamp *et al.*, 1987). Essas duas isoformas são codificadas por RNA mensageiros distintos que são produzidos através de processos de “splicing” diferentes de dois transcritos primários codificados a partir de dois promotores coexistentes no mesmo gene (Deybach e Puy, 1995).

Um modelo animal para o estudo da AIP humana foi descrito recentemente por Linderberg *et al.* (1996). O camundongo deficiente em PBGD apresenta as características bioquímicas típicas da AIP humana, como aumento da excreção urinária de ALA.

1.8.3.4. Diagnóstico da porfiria aguda intermitente

A diminuição da atividade da PBGD nos eritrócitos, encontrada em cerca de 80% dos portadores de AIP, (Magnussen *et al.*, 1974; Lannfelt *et al.*, 1989) constitui uma das formas de diagnóstico da doença. No entanto, há variações significativas nos níveis da enzima e na sua atividade e este teste muitas vezes não é suficiente para diagnosticar a doença, uma vez que outras alterações também podem levar à diminuição ou ao aumento da atividade da PBGD

(Andriolo *et al.*, 1980; Epstein *et al.*, 1983). Além disso, esse tipo de análise não pode ser aplicada quando o defeito da enzima PBGD é restrito aos tecidos não eritróides (Kaupinnen *et al.*, 1995).

Estudo bioquímicos e imunológicos revelaram que os portadores de AIP podem ser divididos em quatro diferentes grupos em relação à razão entre a concentração e a atividade da enzima PBG deaminase nos eritrócitos. Quando a razão entre o material imunológico de reação cruzada (CRIM) e a atividade é determinada, normalmente há uma diminuição paralela na concentração e na atividade da enzima. São os casos CRIM-negativos que correspondem a 80% dos casos. Os CRIM negativos são subdivididos em tipo 1 e tipo 2, correspondendo a 50% ou 100% da atividade da enzima (Mustajoki e Desnick, 1985). Nos casos CRIM-positivos, a concentração da PBGD é elevada enquanto a atividade da enzima é reduzida em cerca de 50% (Kaupinnen e Mustajoki, 1992). Nos pacientes CRIM-positivos uma proteína truncada, mas não inativa, é produzida.

Outro método de diagnóstico utilizado é a análise dos níveis de ALA e de PBG na urina que quase sempre aumentam durante os ataques de AIP (Haeger, 1958; Kappas *et al.*, 1995). Entretanto, somente um terço dos portadores do gene com AIP latente excretam quantidades elevadas desses precursores na urina e essa elevação também é encontrada em portadores de VP e HCP (Kappas *et al.*, 1995). Quando há aumento da excreção de PBG na urina, esta adquire cor vermelha escura, devido a oxidação da PBG à porfirina quando exposta à luz.

Outra forma de auxílio na identificação de AIP é a análise genética (Schreiber *et al.*, 1994), embora haja inúmeros tipos de mutações no gene do PBGD que podem resultar na mesma expressão clínica.

Dessa forma têm sido utilizados diversos métodos, em conjunto com a identificação dos sintomas clínicos e análise do histórico familiar, para identificação mais precisa da AIP.

1.8.3.5. Sintomas

A dificuldade de identificação talvez decorra também do fato da doença permanecer latente em muitos casos. Somente 20-50% dos portadores do gene apresentam os sintomas clínicos, sendo que esses sintomas são muitos variáveis

e comuns a outras doenças (Andersson, 1997). Geralmente os sintomas, caracteristicamente intermitentes, aparecem após a puberdade e são mais comuns em mulheres do que em homens.

Os principais sintomas clínicos relatados podem ser agrupados em neuropatia autônoma, neuropatia periférica e disfunção cerebral (Andersson, 1997).

Há alta incidência de neuropatia autônoma como ataques severos de dores abdominais (85-95%) seguidos de dores nas costas e nos membros; vômitos e constipação (50-80%). Taquicardia durante os ataques (30-80%) também é comum em ataques severos. Hipertensão é reportada em 40-60% dos casos (Beattie e Goldberg, 1976).

Neuropatia periférica, principalmente motora também é um sintoma encontrado. Fraqueza muscular (35-60%), dor nas costas e nas pernas (45-70%) algumas vezes acompanhadas de distesia ou parestesia são sintomas comuns.

Os sintomas neurológicos característicos são ataques epiléticos e encefalopatia (King e Bragdon, 1991) e manifestações psiquiátricas como ansiedade, insônia, depressão e irritabilidade. Em ataques severos, podem ocorrer paranóia, confusão e alucinações. Wetterberg encontrou uma correlação positiva entre os portadores de AIP e desordem mental (Wetterberg, 1967).

A maioria dos ataques são precipitados por fatores endógenos ou exógenos ambientais, porém a causa dos ataques permanece desconhecida em cerca de 30% dos casos (Lip *et al.*, 1993).

1.8.3.6. Fatores precipitantes

Há diversos fatores que podem levar a AIP latente a se manifestar, como certas drogas (sulfonamidas e barbituratos) (Kappas *et al.*, 1995 e referências citadas), hormônios sexuais endógenos (Andersson, 1989) ou exógenos (Lamon *et al.*, 1979), excesso de álcool (Thunell *et al.*, 1992), nutrição inadequada (Welland *et al.*, 1964), estresse (Thunell *et al.*, 1995), infecções (Stein e Tschudy, 1970), fumo (Lip *et al.*, 1991) e certas substâncias químicas, como terpenos, solventes orgânicos e drogas lipofílicas (Bonkovsky *et al.*, 1992). Entretanto a sensibilidade a esses fatores é muito variável entre os pacientes e até mesmo em

um mesmo indivíduo (Thunell *et al.*, 1992). Sabe-se que as mulheres são mais afetadas pela doença havendo uma correlação entre os sintomas clínicos e o ciclo menstrual (McColl *et al.*, 1982).

O mecanismo exato que leva esses fatores a precipitarem os ataques que constituem os sintomas clínicos da doença ainda não é consensual. Algumas drogas induzem citocromo P450 e aumentam a demanda metabólica por heme no fígado, podendo levar a uma indução da atividade da ALA sintase (Anderson *et al.*, 1982). Porém, algumas drogas, como as sulfonamidas, parecem inibir diretamente a PBG deaminase, sob um mecanismo independente da indução de citocromo P450 (Rifkind, 1976).

1.8.3.7. Tratamento

O tratamento da AIP é baseado na profilaxia, em terapias específicas para diminuir os níveis de precursores do heme e no tratamento dos sintomas da doença. Vários tipos de terapia têm sido propostos para atenuar os sintomas da AIP (Kauppinen *et al.*, 1994).

A ingestão de grande quantidade de carboidratos reduz os ataques, a excreção de precursores de porfirinas e bloqueia a atividade da ALA sintase no fígado (Doss *et al.*, 1985).

A infusão intravenosa de hematina também atua inibindo a atividade da ALA sintase, reduzindo a formação dos precursores do heme e também repondo a deficiência de heme que hipoteticamente levariam ao aparecimento dos ataques (Bonkowsky *et al.*, 1971). No entanto, alguns efeitos colaterais têm sido reportados no tratamento com hematina, como tromboflebite, coagulopatia, hemólise, hematúria forte seguida de falha renal aguda transiente, devido à necrose tubular, e a diminuição da efetividade terapêutica da hematina após repetidas infusões, devido ao aumento da heme oxigenase (Dahr *et al.*, 1978; Morris *et al.*, 1981). Outro produto, o heme arginato, foi introduzido há cerca de dez anos e devido a sua maior estabilidade, apresenta menos efeitos colaterais, porém é também substrato da heme oxigenase (Mustajoki e Nordmann, 1993).

Outro grupo de compostos em teste, relacionados com heme, são as metaloporfirinas sintéticas. Estes compostos não são degradados pela heme

oxigenase, ao contrário, inibem sua atividade, além de prevenir a indução de ALA sintase e suprimir a excreção de ALA e PBG na urina em ratos (Dover *et al.*, 1991).

Outras drogas têm sido estudadas, como o propranolol, a 3,5,3'-triiodotreonina, esteróides, agentes quelantes etc., mas ainda não há resultados precisos da eficácia desses agentes, sendo que quase todos não apresentam efeitos bioquímicos específicos nos ataques porfíricos agudos, resultando em diversos efeitos colaterais (Kappas *et al.*, 1995).

Tratamento com cimetidina, um inibidor do sistema enzimático do citocromo P450, também tem sido proposto como terapia eficaz para os ataques agudos em pacientes com AIP (Rogers, 1997).

Recentemente foi reportada uma terapia baseada na administração de diversos antioxidantes (vitamina E, N-acetilcisteína, β -caroteno, ascorbato, selênio, ubiquinona, manitol e carnitina) a dois pacientes portadores de AIP (Thunell *et al.*, 1997).

1.8.3.8. Doenças associadas a AIP

Algumas doenças têm sido associadas à AIP. A hipertensão e a falha renal têm sido encontradas em muitos pacientes que sofrem de AIP (Andersson e Lithner, 1994). A hipertensão tem sido associada à AIP durante os ataques agudos, mas pouco se conhece da sua prevalência como uma doença crônica. A hipertensão pode contribuir para a patogênese da falha renal crônica, reportada em pacientes portadores de AIP (Laiwah *et al.*, 1983).

Outra doença que possivelmente pode estar associada com AIP é o lupus eritematoso sistêmico (SLE), onde ocorre a formação de anticorpos antinucleares (Rosemarin *et al.*, 1982), embora não seja muito evidente essa associação, podendo ser somente uma coincidência rara (Andersson, 1997).

1.8.3.9. Porfíria aguda intermitente e carcinoma hepatocelular

A associação entre a AIP e o carcinoma hepatocelular (HCC) foi primeiramente descrita por Lithner e Wetterberg (1984). Entre os 206 portadores

do gene da PBGD alterado, foram encontrados 11 casos de HCC (5%). Todos os pacientes tinham mais de 60 anos e pertenciam a um grupo com alta excreção urinária de PBG, sendo que 7 eram mulheres e 4 homens. Cirrose hepática foi encontrada em todos os 5 pacientes submetidos a exame histológico.

Hardell (1984) relataram três casos de AIP entre 83 pacientes com HCC (4%). Outro estudo revelou 5 casos de HCC em duas famílias com 15 portadores de AIP (Bengtsson e Hardell, 1986). Em estudos de Kauppinen e Mustajoki (1988), HCC foi a causa de morte de 6 dos 64 pacientes com AIP (9%) e em 1 dos 18 pacientes com porfiria variegata. Cirrose foi encontrada em 2 dos pacientes com HCC e AIP. Esses autores detectaram que pacientes com AIP apresentavam um risco 61 vezes maior de desenvolvimento de HCC. Gubler *et al.* (1990) relataram o caso de duas irmãs portadoras de AIP que desenvolveram HCC, uma de 65 e outra de 62 anos. Ambas consumiam álcool mas não apresentaram cirrose hepática ou anticorpos contra hepatite B.

Thunnissen *et al.* (1991) reportaram um caso de um paciente homem de 67 anos que desenvolveu HCC sem exposição a fatores de risco ambiental, metabólico ou viral; a única causa encontrada foi a AIP. Andersson *et al.* (1996) relataram também que HCC foi a causa da morte de 27% dos pacientes com AIP, sendo mais comum em mulheres e em pacientes sintomáticos. Em pacientes com PCT, o risco de HCC foi de 100 a 200 vezes maior (Hardell, 1986, Salata *et al.*, 1985).

O HCC é uma das doenças mais comuns no mundo (Bisceglie *et al.*, 1988) e freqüentemente sua etiologia está associada à hepatite B crônica, infecções virais de hepatite C, cirrose de fígado e exposição à aflotoxina (Hardell *et al.*, 1984). Outros fatores que podem estar associados são a exposição a solventes orgânicos (Hardell *et al.*, 1984) e o uso prolongado de contraceptivos orais (Wands e Blum, 1991). Recentemente, mutações seletivas no gene supressor de tumor p53 foram encontrados em HCC (Diamantis *et al.*, 1994).

1.8.3.10. Patogênese dos sintomas

Várias são as hipóteses levantadas para explicar a patogênese dos sintomas associados à AIP: depleção de substrato de cofatores provenientes da

biossíntese deficiente de heme; neurotoxicidade resultante do excesso de precursores de porfirinas e deficiência intracelular de heme (Yeung *et al.*, 1987; Lip *et al.*, 1993; Kappas *et al.*, 1995; Thunell *et al.*, 1995).

Piridoxal fosfato é a coenzima envolvida na condensação de glicina e succinil CoA catalisada pela ALA sintase. O aumento da atividade da ALA sintase durante os ataques agudos, aumentaria a demanda e o consumo de piridoxal fosfato resultando na neuropatia (Cavanagh e Ridley, 1967). No entanto, não foi encontrada nenhuma correlação entre a concentração da coenzima e a atividade clínica da doença (Hamfelt e Wetterberg, 1969).

A deficiência intracelular de heme pode acarretar inúmeros distúrbios metabólicos em vias dependentes de heme proteínas. A redução da quantidade de “pool” de heme livre no fígado pode afetar a produção de citocromo P450 e de importantes enzimas antioxidantes. De fato, a capacidade funcional do sistema oxidase dependente de P450 é significativamente reduzida em pacientes com porfirias agudas, especialmente durante os ataques (Ostrowski *et al.*, 1983). A deficiência de citocromos no sistema nervoso, se realmente existir, pode servir de base para o conceito de bloqueio neuronal funcional nas porfirias, sendo a diminuição da utilização de oxigênio pelo tecido a causa das manifestações clínicas. Deste modo, o defeito primário poderia ser resultado da inibição do sistema de transporte de elétrons da mitocôndria, que alteraria a produção de energia e a respiração celular. Se essa deficiência de heme realmente ocorre no tecido nervoso, ou se é alterada conforme a atividade da doença, ainda é uma questão em aberto.

Outra hipótese a ser considerada no que se refere às alterações do sistema nervoso central é uma consequência metabólica indireta da deficiência de heme hepático. A concentração plasmática de triptofano determina os níveis de triptofano no cérebro e síntese subsequente de 5-hidroxitriptamina (serotonina). Por outro lado, a concentração de triptofano no plasma é determinada pela atividade da enzima hepática triptofano pirrolase, uma enzima dependente de heme, que converte triptofano em quinurenina. Em ataques agudos de AIP, a deficiência do heme hepático pode levar a um aumento nos níveis plasmáticos e cerebrais de triptofano e de serotonina (Badawy *et al.*, 1987) devido à diminuição da atividade da triptofano pirrolase (Litman e Correia, 1983).

O aumento de serotonina no cérebro pode produzir os mesmos sintomas encontrados em AIP como náuseas, dores abdominais e distúrbios psicomotores (Litman e Correia, 1983). Em um estudo feito em 12 mulheres portadoras de AIP, foi demonstrado um aumento de serotonina no sangue e de triptofano no plasma durante os ataques, em contraposição a uma diminuição drástica da concentração de melatonina (Puy *et al.*, 1993). A melatonina é formada na glândula pineal a partir da conversão do triptofano a serotonina, acetilada pela *N*-acetiltransferase (NAT) formando *N*-acetilserotonina e finalmente convertida a melatonina.

Puy *et al.* (1996) propuseram que a diminuição da melatonina seria causada pelo aumento da concentração de ALA e não pela falta de hemeproteínas. O ALA, estruturalmente análogo ao neurotransmissor ácido γ -aminobutírico (GABA), diminuiria a atividade da NAT mediada pelo bloqueio da estimulação β -adrenérgica na glândula pineal. Esse resultado poderia ser significativo na patofisiologia intermitente e variável dos ataques em AIP, uma vez que a melatonina está relacionada com o controle das funções circadianas e sua sincronização influencia as funções cronobiológica, reprodutiva e psiconeuroendócrina.

Os efeitos tóxicos dos precursores de porfirinas produzidos em excesso, como ALA e PBG, também poderiam explicar a patogênese dos sintomas. Todos distúrbios metabólicos, caracterizados pelo acúmulo de ALA, são acompanhados por distúrbios neurológicos similares, como as quatro porfirias agudas, a tirosinemia hereditária e a intoxicação por chumbo (Kappas *et al.*, 1995).

A barreira encefálica é pouco permeável ao ALA e ao PBG, mas durante os ataques agudos de AIP essas substâncias podem ser detectadas no fluido cerebroespinal, onde não é detectado em condições normais (Gorchein e Webber, 1984; Yeung Laiwah *et al.*, 1987).

A concentração no tecido nervoso pode ser ainda maior quando comparada aos níveis mais baixos no fluido cerebroespinal, uma vez que experimentos demonstraram que os neurônios podem concentrar ativamente o ALA. Os ataques agudos somente ocorrem quando há uma elevação das concentrações de ALA e de PBG. No entanto, há pacientes que apresentam concentrações elevadas mesmo nos períodos sem sintomas. Nestes casos, as

exacerbações são acompanhadas de uma maior excreção desses compostos (Yeung Laiwah *et al.*, 1987).

Além disso, têm-se demonstrado que o ALA, gerado no fígado e na medula óssea, é capaz de atravessar a barreira encefálica e se distribuir por outros órgãos (McGillion *et al.*, 1974; McGillion *et al.*, 1975). A administração aguda de altas doses de ALA em animais promoveu efeitos excitatórios transientes e mudanças comportamentais (McGillion *et al.*, 1975). Em um estudo realizado em humanos, a infusão de ALA por 92 horas elevou o nível plasmático de ALA até o encontrado nos ataques agudos. No entanto, nenhum sintoma foi relatado (Mustajoki *et al.*, 1992).

O papel do PBG na patogênese dos sintomas é incerto, uma vez que pacientes portadores de porfiria deficiente em ALA desidratase produzem ALA em excesso, mas não PBG e mesmo assim apresentam os mesmos sintomas neurológicos encontrados em outras porfirias. O mesmo ocorre na intoxicação por chumbo e na tirosinemia hereditária.

Uma combinação entre estresse oxidativo, excesso de ALA e deficiência de heme também poderia explicar os sintomas clínicos da AIP (Thunell *et al.*, 1995). AIP pode ser considerada como uma doença que leva a um estado constante de estresse oxidativo com uma sobrecarga de radicais livres periódica. Isso pode acarretar alterações neurológicas agudas e, a longo prazo, lesões hepática e renais. De fato, o ALA tem sido relatado como sendo o agente principal no processo metabólico que leva às manifestações neurológicas da doença (Demasi *et al.*, 1996).

Foi demonstrado, *in vitro*, que o ALA é capaz de gerar ROS durante sua oxidação catalisada por íons ferro (Monteiro *et al.*, 1989; Hermes Lima *et al.* 1991) (vide item: 1.9. ALA e seu potencial pró-oxidante). O ALA pode gerar ROS *in situ* que levariam à lesão dos neurônios (Helson *et al.*, 1993). A vulnerabilidade poderia ser dependente do balanço entre os fatores geradores de radicais (fatores que precipitam os ataques) e da defesa antioxidante.

Componentes chaves nesse processo seriam as enzimas antioxidantes, o “pool” de heme e o P450. Esse modelo sugere que alguns fatores precipitantes dos ataques podem agir exacerbando os efeitos deletérios dos radicais. O uso terapêutico de heme em AIP pode ser explicado também pelo fato do heme ser

um dos mais efetivos quelantes de ferro o que reduziria a ação das ROS (Thunell *et al.*, 1995).

1.8.3.11. Patogênese do carcinoma hepatocelular em porfiria aguda intermitente

A causa da maior prevalência de HCC nos pacientes com AIP ainda não está estabelecida.

Bengtsson *et al.* (1986) sugeriram que o gene da PBGD poderia funcionar como um gene supressor de tumor. No entanto, Bjersing *et al.* (1996) não encontraram nenhum alelo mutado ou perdido no gene da PBGD, nem mesmo nos tecidos tumorais. Outra possibilidade remota seria que a proteína truncada codificada pelo gene da PBGD mutado poderia alterar a transcrição do gene, como por exemplo ligando-se a proteína p53. Isso imitaria funcionalmente uma mutação em p53 e seria consistente com as poucas mutações em p53 encontradas por Bjersing *et al.*, 1996.

Outra alteração em pacientes com AIP durante os ataques é o aumento de níveis séricos de aminotransferases, indicando danos às células hepáticas que poderiam estar relacionados à morfologia de pré-cirrose e cirrose encontrados em vários casos estudados por Andersson *et al.* (1996). A cirrose geralmente aumenta o risco de desenvolvimento de HCC; a destruição de células parenquimáticas e a fibrinogênese, no processo cirrótico, estimulam a regeneração celular e aumentam o risco de câncer (Andersson *et al.*, 1996).

Outra hipótese sugere que o mecanismo de detoxificação do organismo fica alterado na AIP, levando ao acúmulo de substâncias carcinogênicas (Lithner e Wetterberg, 1984).

Bengtsson *et al.* (1986) sugeriram que as porfirinas seriam carcinogênicas *per se*, uma vez que a principal consequência da mutação no gene da PBG deaminase é o acúmulo de ALA e PBG. O carcinoma hepatocelular foi encontrado somente em grupos de pacientes com AIP que apresentavam excreções urinárias de ALA e PBG elevadas (Lithner e Wetterberg, 1984). Pacientes sintomáticos de AIP possuem um nível de excreção urinária de PBG cinco vezes maior, e de ALA, três vezes maior, quando comparados a pacientes com AIP latente (Andersson *et al.*, 1995). Além disso, HCC é mais comum em pacientes sintomáticos de AIP do

que em latentes (Andersson *et al.*, 1996). Essas evidências suportam a hipótese que os precursores poderiam, de alguma forma, ser carcinogênicos.

Outra hipótese a ser considerada no que se refere ao HCC em AIP, seria a combinação entre a redução da quantidade de heme livre, resultando em níveis mais baixos de P450 e outras heme enzimas importantes na defesa antioxidante, e o aumento do estresse oxidativo proveniente do acúmulo do ALA (vide item: 1.9. *ALA e seu potencial pró-oxidante*). As ROS produzidas poderiam atacar aleatoriamente o genoma das células hepáticas e, eventualmente, algum gene relacionado ao início do processo carcinogênico.

Bjersing *et al.* (1996) investigaram mutações nos códons 249 e 166 no gene p53 em pacientes com HCC e AIP em áreas com baixa exposição a aflotoxina B1 e ao vírus da hepatite B. Nenhuma mutação foi encontrada no códon 249 e a mutação no códon 166 somente foi verificada em um tumor. Nenhuma mutação foi encontrada em H-ras 12 ou 61.

1.9. O ácido 5-aminolevulínico e seu potencial pró-oxidante

O ALA, o primeiro precursor do grupo heme acumulado em pacientes sintomáticos de AIP, sofre enolização sob pH básico e conseqüente oxidação catalisada por complexos de ferro gerando ROS e o aldeído ácido 4,5-dioxovalérico (DOVA) como produto final (Figura 4). Monteiro *et al.* (1986) demonstraram que o ALA é capaz de acelerar a conversão da oxihemoglobina e metahemoglobina, sendo oxidado neste processo. A intermediação de ROS na reação foi evidenciada pelo efeito inibitório da SOD e da catalase.

O mecanismo de oxidação do ALA e a formação do radical $\cdot\text{OH}$ e de um radical centrado no carbono foram inferidos a partir de análises cinéticas e de ressonância paramagnética nuclear (EPR) (Monteiro *et al.*, 1989). Estudos utilizando folhas de alface e trigo como modelo para verificação do mecanismo da ação herbicida do ALA sob irradiação (Härtel *et al.*, 1996), detectaram adutos de radicais livres por EPR de espectro idêntico àquele atribuído por Monteiro *et al.* (1989). Vários estudos revelaram o potencial oxidante do ALA sobre diferentes

sistemas celulares.

Figura 4: Oxidação do ácido 5-aminolevulínico (ALA) catalisada por complexos de ferro gerando espécies reativas de oxigênio, NH_4^+ e ácido 4,5-dioxovalérico (DOVA).

Estudos realizados com mitocôndrias de fígado de rato sustentadas com succinato na presença de ALA, revelaram alterações nas propriedades mitocondriais como o colapso do potencial da membrana, inchamento e liberação da taxa respiratória na presença de íons cálcio. Catalase, SOD e *o*-fenantrolina inibiram tais processos, indicando a participação de H_2O_2 e íons ferro (Hermes-Lima *et al.*, 1991a e Hermes-Lima *et al.*, 1992).

Vercesi *et al.* (1994) propuseram que a permeabilização da membrana mitocondrial induzida por Ca^{2+} na presença de ALA é mediada pelo ataque de ROS a tióis de proteínas, gerando agregados protéicos de alto peso molecular via reações de ligação cruzada S-S, que podem resultar em poros de membranas não específicos. O Ca^{2+} age de maneira sinérgica aumentando a produção de ROS pela mitocôndria e facilitando seu ataque a tióis de proteína. Tal processo foi inibido pela adição de EGTA que remove o Ca^{2+} (Hermes-Lima, 1995).

Pereira *et al.*, 1992 mostraram que o ALA também exerce um papel pró-

oxidativo *in vivo*: ratos tratados com ALA cronicamente sofreram alterações metabólicas, enzimáticas e fisiológicas indicando o aumento do metabolismo glicolítico associado ao dano mitocondrial do fígado e do músculo vermelho. Esses dados são consistentes com os achados prévios de Biempica *et al.* (1974); analisando amostras de biópsia de fígado de quatro pacientes com AIP, estes autores encontraram numerosas gotas de lipídios, abundantes grânulos de ferritina, largos corpos de lipofuscina, mitocôndrias com formas alteradas e hiperplasia do retículo endoplasmático liso e de vacúolos autofágicos contendo mitocôndrias bem preservadas, o que pode ser atribuído ao extenso dano oxidativo iniciado pelo ALA.

In vitro, ALA prejudica as funções mitocondriais de fígado de rato e *in vivo*, promove a perda das atividades da citrato sintase e da SOD dependente de magnésio (Pereira *et al.*, 1992).

Oteiza e Bechara (1993) demonstraram que o ALA é capaz de induzir peroxidação lipídica em lipossomos ricos em cardiolipinas e que tal processo é inibido pela adição de α -tocoferol.

O efeito pró-oxidante do ALA também foi demonstrado em tecido cerebral de ratos. Após duas semanas de tratamento com ALA (40 mg/kg peso corporal) vários parâmetros indicadores de estresse oxidativo apresentaram níveis aumentados: atividade de CuZnSOD, quantidade de ferro total, ferritina, carbonilas proteicas e captação de Ca^{2+} por sinaptossomas corticais. Além disso, membranas sinápticas apresentaram alterações de afinidade de ligação nos receptores de GABA, formação de grupos carbonílicos protéicos, produtos reativos ao ácido tiobarbitúrico e dienos conjugados (Demasi *et al.*, 1996)

Células de ovário de hamster chinês (CHO) apresentaram inibição da formação de colônias e de sobrevivência celular quando tratados com ALA. Foram observados também diminuição do nível de GSH e aumento dos níveis de GSSG e MDA. A adição de *N*-acetilcisteína foi capaz de minimizar os efeitos sobre a sobrevivência celular e os níveis de GSH e GSSG (Neal *et al.*, 1997).

O ferro também desempenha papel importante nas lesões promovidas pelas ROS uma vez que está envolvido na formação destas, participa da oxidação do ALA (Bechara *et al.*, 1993) e também está presente no núcleo celular associado ao DNA (Meneghini *et al.*, 1995). Deste modo, a ferritina, principal

proteína armazenadora de ferro no organismo, também pode estar envolvida nas lesões. Já foi demonstrado que o ALA é capaz de liberar ferro da ferritina através do ânion superóxido gerado a partir de sua oxidação (Oteiza *et al.*, 1995). A liberação potencialmente deletéria de ferro de microssomas induzida por ALA foi também observada por Minotti (1992).

A ferritina também pode atravessar a membrana nuclear em hepatócitos de camundongos tratados com ferro dextran (Smith, 1990a). Foi também demonstrado que o ALA é capaz de induzir a ativação da proteína tipo 1 regulatória de ferro, podendo funcionar como um co-sensor na regulação do metabolismo de ferro (Carvalho *et al.*, 1997).

Os efeitos das ROS geradas pela oxidação do ALA também foram descritos em cerebelo de ratos, como o aumento da peroxidação lipídica e oxidação de proteínas da biossíntese de heme, especialmente da ALA desidratase, o que poderia contribuir para o aumento da concentração de ALA. O ALA também diminuiu a captação de glicose pelo cerebelo o que poderia diminuir a atividade funcional das células cerebrais levando a depleção de energia e a um aumento dramático da concentração de Ca^{2+} (Princ *et al.*, 1998). A peroxidação lipídica *in vitro* e *in vivo* foi reduzida pelo tratamento com melatonina (Carneiro e Reiter, 1998) que atravessa a barreira cerebral entrando nos neurônios e células gliais, exercendo alta atividade antioxidante (Reiter, 1995).

Todos esses estudos demonstram o potencial pró-oxidante que o ALA pode exercer, indicando uma participação importante nos processos patofisiológicos de portadores de AIP.

2. OBJETIVOS

Apesar do crescente interesse pelo ALA, pouco se conhece sobre os possíveis mecanismos moleculares associados à sua propriedade de danificar o DNA. Há inúmeras evidências sobre o potencial pró-oxidante do ALA e sobre as lesões que as ROS e os aldeídos podem promover no DNA. Deste modo, o principal objetivo deste estudo está centrado na verificação de lesões oxidativas ao DNA induzidas por ALA e lesões produzidas pelo seu produto de oxidação, o DOVA. Este estudo também buscou estabelecer uma proposta de bases moleculares para conectar as lesões ao DNA promovidas pelo ALA com a maior incidência de carcinoma hepatocelular (HCC) em pacientes sintomáticos de AIP.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Reagentes

Todos os reagentes utilizados, exceto quando especificados, foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, Missouri, EUA). Os solventes foram adquiridos da Merck (Darmstadt, Alemanha).

Todos os reagentes utilizados foram de grau para biologia molecular ou analítico e os solventes para cromatografia. A água foi deionizada pelo sistema NANOpure da Barnstead/Thermolyne Co. (Iowa, EUA).

O ácido 4,5-dioxovalérico (DOVA) foi sintetizado e gentilmente cedido pelo Dr. Dieter Dörnemann (Philipps-Universität, Marburg, Alemanha).

Os cepas de *Salmonella typhimurium* foram cedidas pela Dra. Gisela Aragão do Setor de Mutagênese da CETESB.

A cepa de *Escherichia coli* PQ37 foi cedida pelo Dr. Álvaro Leitão da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

3.2. Equipamentos

As balanças utilizadas foram XE-310 e analítica AA-200 (Denver Instrument Company, Colorado, EUA), o banho, modelo 1235 da Shel-Lab (Sheldon Manufacturing Inc., Oregon, EUA) e a bomba de pressão a vácuo modelo 400-1901 (Barnant Company, Illinois, EUA). A estufa para incubação das bactérias é proveniente da Quimis, modelo Q-316.24 (Quimis Aparelhos Científicos Ltda., São Paulo, Brasil). As soluções foram autoclavadas em autoclave vertical modelo 415 (Fanem, São Paulo, Brasil). As determinações espectrofotométricas foram feitas no espectrofotômetro Hitachi U-3000 (Hitachi Koki Co. Ltd, Ibaraki, Japão). Para as centrifugações foram utilizadas a centrífuga Hitachi, modelo CR21E (Hitachi) rotores R14A e R20A2 e as microcentrífugas Eppendorf, modelo 5402 (refrigerada) e 5415C. (Eppendorf, Hamburg, Alemanha). As medidas de pH foram feitas em potenciômetro da Corning modelo 320 (Sigma).

3.3. Quebras em DNA plasmidial induzidas por ALA na presença de íons Fe^{2+}

3.3.1. Competência bacteriana

Meios de cultura

LB: 20 g LB (Lennox L Broth Base), 1 l água bidestilada

SOB: 2% bactotripton, 0,5% extrato de levedura, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl_2 , 10 mM MgSO_4 , pH 6,8

SOC: meio SOB acrescido de 20 mM de glicose

Os meios de cultura foram esterilizados por autoclavagem a 121°C por 15 min.

Soluções

RFI: 30 mM acetato de potássio, 50 mM MnCl_2 , 100 mM KCl, 10 mM CaCl_2 , 2. H_2O , 15% glicerol, pH final 5,8

RFII: 10 mM Na-MOPS (pH 7,0), 75 mM CaCl_2 , 10 mM KCl, 15% glicerol, pH final 6,8

Bactérias *E.coli*, cepa HB101, provenientes de estoque em glicerol a -80°C, foram estriadas em placa de Petri com meio LB contendo 15 g/l de ágar e incubadas a 37°C por 20 h.

Em seguida uma colônia foi inoculada em 2 ml de meio SOB, mantendo-se a cultura a 37°C por 2 h sob agitação constante de 200 rpm.

Alíquotas de 500 μl da cultura foram inoculadas em 100 ml de meio SOB e incubadas novamente a 37°C sob agitação de 200 rpm até atingir uma densidade ótica (DO) entre 0,6 e 0,8 a um comprimento de onda de 600 nm. (± 3 h). Em seguida adicionou-se 0,5 ml de MgCl_2 1 M, manteve-se as bactérias no gelo por 15 min e procedeu-se a centrifugação a 8570 g por 15 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspensionado em 10 ml de solução RFI, mantendo-

se os tubos no gelo por 15 min. A seguir, centrifugou-se novamente a 8570 g por 15 min a 4°C e o sobrenadante foi novamente descartado.

As bactérias foram então ressuspensas em 2 ml da solução RFII (previamente mantida no gelo), distribuídas em alíquotas em microtubos resfriados rapidamente em nitrogênio líquido e estocadas a -80°C.

3.3.2. Transformação de bactérias competentes

As bactérias competentes foram descongeladas no gelo e distribuídas em alíquotas de 50 µl. A cada alíquota foram adicionados 5 ng de DNA plasmidial pBR322 (1 ng/µl) incubando-se as bactérias durante 30 min a 4°C. A seguir as bactérias foram submetidas a um choque térmico a 37°C por exatamente 2 min e transferidas imediatamente para o gelo. Após 5 min, foram adicionados 450 µl de meio SOC à cada alíquota, incubando-as a 37°C durante 1 h sob agitação constante de 200 rpm. (Hanahan, 1983).

Em seguida, as bactérias (200 µl) foram plaqueadas em placas de Petri com meio LB contendo 15 g/l de ágar e 100 µg/ml de ampicilina e incubadas pernoite a 37°C.

3.3.3. Extração do DNA plasmidial

Tampões

Tampão P1: 50 mM Tris-HCl, pH 8,0; 10 mM EDTA; 100 µg/ml RNase A

Tampão P2: 200 mM NaOH; 1% SDS

Tampão P3: 3 M acetato de potássio, pH 5,5

Tampão QBT: 750 mM NaCl; 50 mM MOPS, pH 7,0; 15% isopropanol; 0,15% Triton X-100

Tampão QC: 1 M NaCl, 50 mM MOPS, pH 7,0; 15% isopropanol

Tampão QF: 1,25 M NaCl; 50 mM Tris-HCl pH 8,5; 15% isopropanol

Tampão QN: 1,6 M NaCl; 50 mM MOPS, pH 7,0; 15% isopropanol

O DNA plasmidial foi purificado utilizando o kit QIAGEN-tip100 (Qiagen Studio City, CA, EUA).

Uma colônia de bactérias transformadas foi cultivada em 3 ml de meio LB contendo 100 µg/ml de ampicilina a 37°C por 8 h a 300 rpm. A seguir, a cultura foi diluída 1:500 em 100 ml de meio LB contendo 100 µg/ml de ampicilina e foi incubada a 37°C até atingir uma DO de 1 a um comprimento de onda de 600 nm (densidade de 1×10^9 células/ml). A cultura foi então centrifugada a 6000 g por 15 min a 4°C, as bactérias precipitadas foram ressuspensas em 10 ml de tampão P1. Foram adicionados 4 ml de tampão P2, os tubos foram invertidos 5 vezes e incubados a temperatura ambiente por 5 min. Quatro mililitros de tampão P3 gelado foram adicionados, imediatamente misturados, invertendo-se os tubos 5 vezes, e incubados no gelo por 15 min. As amostras foram centrifugadas a 20000 g por 30 min a 4°C. O sobrenadante foi coletado, novamente centrifugado a 20000 g por 15 min a 4°C e aplicado na coluna previamente equilibrada com 4 ml de tampão QBT. Após a entrada de todo o sobrenadante na coluna, esta foi lavada duas vezes com 10 ml de tampão QC. O DNA foi então eluído da coluna utilizando-se 5 ml de tampão QF e precipitado pela adição de 0,7 volume de isopropanol. O DNA foi centrifugado a 15000 g por 30 min a 4°C, lavado com 2 ml de etanol 70% e novamente centrifugado a 15000 g por 10 min. O DNA precipitado foi ressuspenso em tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,4. A concentração de DNA foi estimada espectrofotometricamente, considerando 1 DO=50 µg/ml (Maxam e Gilbert, 1980).

3.3.4. Tratamento de DNA plasmidial com ALA

Dois microgramas (20 µl) de DNA plasmidial pBR322 foram expostos a 0,01-3 mM (20 µl) de ALA em tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,4 na presença de 10 µM de FeSO₄ (volume total de 200 µl). Para testar a participação das ROS nas quebras do DNA, 20 µg/ml de catalase, 10 µg/ml de SOD ou 1-5 mM de DTPA, foram adicionados às amostras contendo 3 mM de ALA. Os seguintes controles também foram feitos: plasmídio sozinho, plasmídio mais H₂O₂ (100 µM) e plasmídio mais FeSO₄ (10 µM). Em todos os casos, as amostras foram incubadas a 37°C por 2 h.

3.3.5. Análise e quantificação das quebras em DNA plasmidial

A separação das diferentes formas do plasmídeo pBR322, forma nativa superenovelada (SC), forma circular aberta (OC) resultante de quebras de fita simples e forma linear (L) resultante de quebras de fita dupla; foi feita através de um gel de eletroforese, utilizando 0,8% de agarose / 1,8 μ M de brometo de etídio em uma cuba de eletroforese horizontal a 30 mA por 120 min em tampão Tris - borato 90 mM / EDTA 2 mM a pH 8,0. O DNA (23 μ l, 230 ng) foi misturado com 4 μ l de uma solução contendo 15% de Ficoll tipo 400 / 0,25% de azul de bromofenol e aplicado no gel. Após a eletroforese, as bandas do DNA foram visualizadas por fluorescência em luz UV Fotodyne 440 (Fotodyne Incorporated, WI, EUA). O negativo fotográfico (Polaroid tipo 55P/N) do gel foi submetido a uma densitometria em “dual-wavelength flying spot scanner” CS-9000da (Shimadzu Co., Tokyo, Japão) para quantificação das diferentes formas do DNA plasmidial. A preparação do plasmídeo continha aproximadamente 85% da forma SC, 10% da forma OC, e 5% de fragmentos (F) de DNA. A extensão do dano oxidativo promovido pelo ALA foi expresso tanto em porcentagem da forma OC do DNA quanto pelo número de quebras do DNA por Kpb estimado pela distribuição de Poisson ($e^{-x} = 1,4 [SC] / (1,4 [SC] + [OC])$), onde x é o número médio de quebras por molécula de DNA (Ribeiro *et al.*, 1992). O fator de correção de 1,4 foi aplicado ao valor das formas SC para considerar a produção quântica de fluorescência mais baixa que a das formas OC (Lloyd *et al.*, 1978).

3.4. Formação in vitro de 8-oxodGuo em DNA de timo de bezerro induzida por ALA na presença de íons Fe^{2+}

3.4.1. Tratamento do DNA de timo de bezerro

Duzentos microgramas de DNA de timo de bezerro foram tratados com 0,05-5 mM de ALA na presença de 10 μ M de $FeSO_4$ em tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,4. Para testar a participação das diferentes ROS na formação de 8-

oxodGuo, 2,5 e 5 mM de DTPA ou 100 mM de manitol foram adicionados às incubações contendo 3 mM de ALA. Os seguintes controles também foram feitos: DNA sozinho, DNA mais ALA (3mM), DNA mais H₂O₂ (100 µM), e DNA mais FeSO₄ (10 µM). Em todos os casos, as amostras foram incubadas a 37°C por 2 h.

3.4.2. Hidrólise do DNA

Após a incubação, o DNA tratado (200 µg) foi seco e ressuspensão em acetato de sódio 20 mM, pH 4,8, hidrolisado com 20 µg de nuclease P1 a 45°C por 30 min. A seguir foram adicionados 20 µl de Tris-HCl 1M, pH 7,4 e 1,3 unidades de fosfatase alcalina e as amostras foram incubadas a 37°C por 60 min. Foram adicionados 20 µl de acetato de sódio 20 mM, pH 4,8 e as amostras foram filtradas em filtro 0,22 µm antes da análise em cromatografia líquida de alta performance acoplada a detecção eletroquímica (HPLC-EC).

3.4.3. Análise e quantificação da formação de 8-oxodGuo por HPLC-EC

A análise de 8-oxodGuo foi feita utilizando-se um sistema de HPLC-EC. A coluna utilizada foi uma coluna de fase reversa C-18 (Spherex, 250 x 4,6 mm DI, tamanho da partícula: 5 µm) da Phenomenex (CA, EUA). A fase móvel filtrada e degaseificada utilizada foi uma solução de KH₂PO₄ 50 mM, pH 5,5, contendo 10% de metanol e 2,5 mM de EDTA. O fluxo utilizado foi isocrático de 1 ml/min e as amostras foram monitoradas durante 30 min. A análise dos nucleosídeos não modificados foi feita a partir da absorbância dos mesmos detectados a um comprimento de onda fixado a 285 nm em detector UV Waters (Millipore, MA, EUA) e a detecção eletroquímica da base modificada (8-oxodGuo) a um potencial de +600 mV em detector eletroquímico amperométrico (Shimadzu). Os cromatogramas resultantes foram analisados em computador com o auxílio de programa específico (EZChrom™, Shimadzu), onde foram integradas as áreas dos picos referentes às bases do DNA hidrolisado e à 8-oxodGuo (Wako Pure Chemical Industries, Ltd. Japão). Para determinação das quantidades

equivalentes em resíduos de 8-oxodGuo/ 10^6 dGuo, foram injetados padrões de dGuo e de 8-oxodGuo e feita uma curva de calibração.

3.5. Formação in vitro de outras bases de DNA modificadas em DNA de timo de bezerro tratado com ALA

3.5.1. Tratamento do DNA de timo de bezerro

Dez mililitros de DNA de timo de bezerro (1 mg/ml) foram tratados com 2, 15 e 30 mM de ALA. O pH foi ajustado a 8,0 pela adição de NaOH 1 M. As amostras foram incubadas a 37°C pernoite. Após a incubação foram adicionados 1 ml de NaCl 4 M e 25 ml de etanol absoluto resfriado a -20°C. O DNA precipitado foi recuperado sob centrifugação a 5000 g por 15 min a temperatura ambiente, lavado com 500 µl de etanol 70% e solubilizado em 10 ml de água. Cada amostra foi dividida em três alíquotas iguais.

3.5.2. Hidrólise do DNA

As amostras de DNA (100 µl) foram digeridas pela adição de 10 µl de tampão acetato de sódio 300 mM, pH 5,3 contendo 1 mM ZnSO₄ e 10 µl (10 unidades) de solução de nuclease P1. As amostras foram incubadas a 37°C por 2 h. A defosforilação dos nucleotídeos resultantes foi feita pela adição de 12 µl de tampão Tris-HCl 500 mM, pH 8,0 contendo 1 mM EDTA e 3 µl (3 unidades) de solução de fosfatase alcalina. Após a incubação por 1 h a 37°C, as proteínas foram precipitadas pela adição de clorofórmio. As amostras foram centrifugadas a 10509 g a temperatura ambiente por 3 min, a fase aquosa foi coletada e analisada por HPLC-EC.

3.5.3. Análise e quantificação por HPLC-EC

As amostras foram analisadas em HPLC utilizando-se uma coluna de sílica octadecilsilil Inertsil ODS 2 (250 x 4,6 mm ID, tamanho da partícula: 5 µm), (Interchim, Montluçon, França). Uma solução aquosa de KH_2PO_4 50 mM, pH 5,5, foi utilizada como fase móvel para análise simultânea de 5-OHdCyd e 5-OHdUrd. Para análise de 8-oxodGuo foi adicionado à solução acima, 9% de metanol e para análise de 8-oxodAdo foi adicionado 5% de acetonitrila. Foi utilizado um fluxo isocrático de 1 ml/min. A detecção colouométrica foi feita através de um detector Coulochem II (ESA, MA, EUA). O potencial dos dois eletrodos foi fixado em +150 e +450 mV para a detecção simultânea de 5-OHdCyd e 5-OHdUrd. Potenciais de +200 e +400 mV foram utilizados para detecção de 8-oxodGuo, e de +300 e +450 mV para detecção de 8-oxodAdo. A eluição dos nucleosídeos não modificados foi monitorada simultaneamente por absorbância em um detector UV Waters 484 (Millipore) a um comprimento de onda fixado a 280 nm. Todas as análises foram feitas em triplicata.

3.5.4. Análise e quantificação por cromatografia gasosa acoplada à espectroscopia de massas (GC-MS)

Uma alíquota da solução de DNA foi analisada para verificar o conteúdo de FapyGua, 500 pmol em 100 µl foram liofilizados em tubos de polipropileno, 100 µl de HF/piridina foram adicionados e a amostra foi incubada a 37°C por períodos crescentes de tempo. A solução foi colocada em uma suspensão de 300 µg de carbonato de cálcio em 1 ml de água. Trezentos microgramas do padrão interno marcado isotopicamente ($^{15}\text{N}_3$ -FapyGua) foram adicionados, e a mistura foi agitada até o pH atingir 7. A suspensão foi centrifugada e a fase líquida coletada. A fração sólida foi lavada com 500 µl de uma mistura de etanol e água (1:1). As duas fases líquidas foram misturadas e liofilizadas.

As amostras resultantes foram submetidas a uma pré-purificação por HPLC e a fração contendo FapyGua, e os derivativos isotopicamente marcados, foi coletada e liofilizada. O resíduo resultante foi siliado em 100 µl de *N*-bis(trimetilsilil)-trifluoroacetamida (BSTFA) e acetonitrila (1:1) por 25 min a 110°C. 5-OHUra, 5-OHCyt, 5-HMUra e 5-ForUra foram analisados na presença de

padrões internos, incluindo [$^{15}\text{N}_2$, ^{18}O]-5-OHUr, [$^{15}\text{N}_2$, ^{13}C]-5-OHCyt, [$^{15}\text{N}_2$, $^2\text{H}_2$]-HMUr e [$^{15}\text{N}_2$, ^2H]-5-ForUr (Douki *et al.*, 1996).

Após a hidrólise com 88% de ácido fórmico e pré-purificação por HPLC, as frações contendo as pirimidinas oxidadas foram liofilizadas e seu conteúdo subsequente derivatizado em 100 μl de uma mistura (1:1) de acetonitrila (Pierce, IL, EUA) e *N*-tert-butildimetilsilil-*N*-metil-trifluoroacetamida (MTBSTFA, Fluka, Buchs, Suíça) por 20 min a 100°C. As amostras foram analisadas em um sistema de GC-MS constituído de cromatógrafo HP5890 (Hewlett Packard, Les Ulis, França) e um detector de massas MSD 5972 utilizados no modo de monitoramento de um único íon. As amostras (1 μl) foram injetadas sem desvio em uma coluna HP5-trace (15 m x 0,25 mm DI, 0,1 μm de espessura do filme, Hewlett-Packard). A temperatura do injetor foi de 250°C e a coluna foi mantida a 130°C por 1 min. A temperatura foi aumentada linearmente até 280°C a uma taxa de 10°C/min. Os íons coletados foram [M] e [M-metil] para FapyGua derivatizado com BSTFA e [M-tert-butil] para as bases pirimídicas tratadas com MTBSTFA. Os tempos de retenção respectivos das cinco bases modificadas sililadas foram os seguintes: FapyGua: 7,0 min; 5-OHUr: 7,9 min; 5-OHCyt: 8,7 min; 5-ForUr: 6,0 min; 5-HMUr: 8,4 min.

3.6. Formação de 8-oxodGuo e 5-OHdCyd em DNA de órgãos de ratos tratados com ALA

3.6.1. Tratamento de ratos com ALA

A solução estoque de ALA foi preparada a cada dia de tratamento sendo dissolvida em solução de cloreto de sódio 0,9% autoclavada e mantida a 4° C. O pH da solução foi ajustado a um valor de 6,5 pela adição de NaHCO_3 .

Ratos machos albinos Wistar (3 meses, peso médio de 250 g) foram pesados no dia anterior ao início do tratamento. A pesagem dos ratos foi feita novamente após uma semana verificando-se uma alteração de menos de 6% no peso total de cada rato. Os ratos foram mantidos em uma sala a temperatura entre 20 e 25°C sobre um ciclo de 12:12h luz-escuro e alimentados com uma

dieta comercial *ad libitum*. Foi feito um tratamento crônico como descrito por McGillion *et al.* (1975). Um grupo de seis ratos recebeu injeção intraperitoneal de 40 mg de solução de ALA/kg de peso corporal. Os animais que constituíram o grupo controle receberam o mesmo volume de solução de cloreto de sódio 0,9% (0,5 ml). O tratamento foi feito a cada dois dias durante 15 dias pela manhã (9:30-10:30 h). Vinte e quatro horas após a última injeção, os ratos foram sacrificados por decapitação e dissecados para retirada dos órgãos (fígado, rins e baço). No tratamento agudo, os ratos foram sacrificados 24 h após uma única injeção de ALA de 40 mg/Kg de peso corporal.

Os órgãos foram pesados para verificação do peso fresco, congelados em nitrogênio líquido e imediatamente colocados em gelo seco e armazenados a -80°C.

3.6.2. Extração do DNA

O DNA dos órgãos dos ratos tratados com ALA foi extraído através da modificação de um procedimento previamente relatado (Gupta, 1984). O tecido congelado (200 mg) foi homogeneizado em 1 ml de uma solução contendo 1 mM de EDTA e 1% de SDS por cerca de 2 min e o homogenato incubado a 37°C por 60 min com 0,5 mg/ml de proteinase K. Após a adição de 50 µl de Tris-HCl 1 mM, pH 7,4, o homogenato foi extraído sucessivamente com 1 volume cada de fenol (5 min), fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1) (5 min), e clorofórmio/álcool isoamílico (24:1) (5 min). As fases foram separadas por centrifugação a 29000 g a 4°C, 10 min para a primeira extração e 5 min para as extrações subseqüentes. Após adição de 0,1 volume de NaCl 5 M, o DNA foi precipitado pela adição de 1 volume etanol absoluto pré-resfriado a -20°C. Após inverter o tubo várias vezes, a suspensão de DNA foi estocada a -20°C por 24 h e centrifugada a 1475 g a 4°C por 30 min. Para a remoção de sais, 2 ml de etanol 70% foram adicionados ao DNA e centrifugados como descrito acima. Este procedimento foi repetido três vezes. Resíduos de etanol foram removidos com pipeta Pasteur e o DNA foi dissolvido, sem que o precipitado secasse, em 150 µl de tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,4.

3.6.3. *Tratamento com RNase*

Para remoção do RNA das amostras, foram acrescentados 50 U/ml de RNase T1 e 100 µg/ml de RNase A e a solução foi incubada a 37°C durante 90 min. O DNA foi novamente extraído com 0,5 volume de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1), centrifugado a temperatura ambiente a 16000 g por 30 min. O sobrenadante foi coletado e o DNA foi precipitado com 1 volume de isopropanol, lavado com etanol 70% e ressuspenso em água para medida da quantidade final de DNA das amostras (Gupta, 1984). A concentração de DNA foi estimada espectrofotometricamente, considerando 1 DO=50 µg/ml (Maxam e Gilbert, 1980). A razão entre as absorvâncias das amostras a 260 e 280 nm encontrada foi de $1,84 \pm 0,03$. Após a medida da quantidade total de DNA ($2,79 \text{ mg} \pm 0,55$), parte deste foi novamente precipitado e liofilizado para posterior análise.

3.6.4. *Análise e quantificação da formação de 8-oxodGuo e 5-OHdCyd*

3.6.4.1. **Metodologia I**

3.6.4.1.1. **Hidrólise do DNA**

Para análise, cerca de 200 µg de DNA foram digeridos para a obtenção de nucleotídeos com 20 µg de nuclease P1 a 45°C por 30 min em tampão acetato de sódio 20 mM, pH 4,8. Vinte microlitros de Tris-HCl 1 M, pH 7,4, foram adicionados às amostras que foram então, tratadas com 1,3 unidades de fosfatase alcalina a 37°C por 60 min. Foram adicionados 20 µl de acetato de sódio 20 mM, pH 4,8 às soluções resultantes que foram filtradas através de um filtro de nylon com poros de 0,22 µm e analisados por HPLC-EC.

3.6.4.1.2. **Sistema de HPLC-EC**

A análise de 8-oxodGuo foi feita utilizando-se um sistema de HPLC-EC com detector eletroquímico amperométrico modelo LC4C (Bioanalytical Systems, IN, EUA). A coluna utilizada foi uma coluna de fase reversa C-18 (Spherex, 250 x 4,6 mm DI, tamanho da partícula: 5 µm) da Phenomenex. A fase móvel filtrada e degaseificada utilizada foi uma solução de KH_2PO_4 50 mM, pH 5,5, contendo 10% de metanol e 2,5 mM de EDTA. O fluxo utilizado foi isocrático de 1ml/min e as amostras foram monitoradas durante 30 min. A análise dos nucleosídeos não modificados foi feita a partir da absorbância dos mesmos, detectados a um comprimento de onda fixado a 285 nm e a detecção eletroquímica da base modificada (8-oxodGuo) a um potencial de +600 mV. Os cromatogramas resultantes foram analisados em computador com o auxílio de software específico (EZChrom™), onde foram integradas as áreas dos picos referentes às bases do DNA hidrolisado e à 8-oxodGuo (Wako). Para determinação das quantidades equivalentes em resíduos de 8-oxodGuo/ 10^6 dGuo, foram injetados padrões de dGuo e de 8-oxodGuo e feita uma curva de calibração.

3.6.4.2. Metodologia II

3.6.4.2.1. Hidrólise do DNA

As amostras de DNA (100 µl) foram digeridas pela adição de 10 µl de tampão acetato de sódio 300 mM, pH 5,3 contendo 1 mM ZnSO_4 e 10 µl (10 unidades) de solução de nuclease P1. As amostras foram incubadas a 37°C por 2 h. A defosforilação dos nucleotídeos resultantes foi feita pela adição de 12 µl de tampão Tris-HCl 500 mM, pH 8 contendo 1 mM EDTA e 3 µl (3 unidades) de solução de fosfatase alcalina. Após a incubação por 60 min a 37°C, as proteínas foram precipitadas pela adição de clorofórmio. As amostras foram centrifugadas e a fase aquosa foi coletada e analisada por HPLC-EC.

3.6.4.2.2. Sistema de HPLC-EC

As amostras foram analisadas em HPLC utilizando-se uma coluna de sílica octadecilsilil Inertsil ODS 2 (250 x 4,6 mm DI, tamanho da partícula: 5 µm), (Interchim). Uma solução de KH₂PO₄ 50 mM, pH 5,5, foi utilizada como fase móvel para análise de 5-OHdCyd. Para análise de 8-oxodGuo foi adicionado à solução acima, 9% de metanol. Foi utilizado um fluxo isocrático de 1 ml/min. A detecção colouométrica foi feita através de um detector Coulochem II (ESA). O potencial dos dois eletrodos foi fixado em + 150 e + 450 mV para a detecção simultânea de 5-OHdCyd. Potenciais de +200 e +400 mV foram utilizados para detecção de 8-oxodGuo. A eluição dos nucleosídeos não modificados foi monitorada simultaneamente por um detector UV Waters 484 (Millipore) fixado a um comprimento de onda de 280 nm. Todas as análises foram feitas em triplicata.

3.7. Participação da ferritina nas quebras de DNA plasmidial pBR322 promovidas por ALA

3.7.1. Extração do DNA plasmidial

A competência e a transformação das bactérias da cepa HB101 foram feitas segundo as metodologias já descritas anteriormente (Items 3.3.1. e 3.3.2.). As bactérias foram transformadas com o plasmídeo pBR322 que foram extraídos utilizando-se uma coluna de terra de diatomáceas como descrito a seguir, adaptado de Hansen *et al.*, 1995.

Bactérias *E.coli* HB101, transformadas com o plasmídeo pBR322, foram crescidas em 3 ml de meio LB contendo 60 µg/ml de ampicilina por 16 horas a 37°C sob agitação constante de 200 rpm. As bactérias foram coletadas centrifugando-se a amostra por 2 min a 29300 g. A seguir ressuspendeu-se as bactérias em 500 µl de Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, contendo 10 mM de EDTA e 100 µg/ml de RNase A e adicionou-se 500 µl de uma solução contendo 0,2 M de

NaOH / 1% de SDS misturando-se vagarosamente. A suspensão foi incubada a temperatura ambiente. Após 5 min, adicionou-se 500 µl de acetato de sódio 4 M, pH 4,8 e a amostra foi centrifugada a temperatura ambiente por 10 min a 10509 g. O sobrenadante foi coletado e misturado com o mesmo volume de guanidina 6 M. Essa mistura foi aplicada na coluna de terra de diatomáceas previamente preparada e foi submetida à pressão reduzida com o auxílio de uma bomba de vácuo para que o DNA se ligasse à coluna. A seguir, a coluna foi lavada com 80% de isopropanol que foi posteriormente retirado, centrifugando-se a amostra a 17761 g, 4 min. Cinquenta microlitros de tampão Tris-HCl 10 mM, pH 8,5 foi adicionado à coluna e após 10 min a temperatura ambiente, o DNA foi eluído da coluna centrifugando-se a 17761 g, 5 min. Esse último passo foi repetido mais 2 vezes utilizando-se volume de tampão de 25 µl.

3.7.2. Preparação da coluna de terra de diatomáceas

Primeiramente procedeu-se a lavagem da terra de diatomáceas. Cinquenta miligramas de terra de diatomáceas foram ressuspensos em 1 ml de água. Após 3 h, a água contendo a suspensão coloidal gelatinosa formada, foi cuidadosamente descartada, deixando a terra sedimentada intacta. Tal procedimento foi repetido pelo menos três vezes.

A seguir, um microtubo de 0,65 ml com a extremidade furada serviu de suporte para a coluna. Uma bolinha de vidro de cerca de 3 mm foi colocada no fundo do microtubo para impedir a saída abrupta da suspensão de terra de diatomáceas (600 µl). Com o auxílio de uma bomba de vácuo reduziu-se a pressão no fundo do microtubo, de modo que a fase líquida da suspensão de terra fosse retirada do tubo e uma coluna de terra de diatomáceas se formasse no fundo do tubo. Sem que a coluna secasse totalmente, foi aplicada a solução de guanidina misturada com o sobrenadante contendo DNA conforme descrito acima.

3.7.3. Purificação da Ferritina

A ferritina utilizada nos experimentos de verificação de danos ao DNA produzidos por ALA, foi previamente purificada para retirada do excesso de íons ferro. A ferritina (108 mg/ml) foi incubada em tampão Tris-HCl 20 mM, pH 7,4 contendo NaCl 140 mM e EDTA 10 mM por 1 h a 4°C e purificada em coluna Sephadex G-25.

No preparo da coluna foram utilizados 2 g de Sephadex para obtenção de uma coluna de cerca de 10 cm de altura, equilibrada com tampão Tris-HCl 20 mM, 7,4 contendo NaCl 140 mM. Após a passagem da ferritina pela coluna, foi feita uma dosagem de proteína nas alíquotas obtidas, utilizando o método de Lowry *et al.*, (1951) como descrito abaixo.

3.7.4. Dosagem da ferritina

Para determinação da concentração de ferritina através do método de Lowry foi feita uma curva padrão utilizando albumina de soro bovino com concentração variando de 0 a 50 µg/µl. De cada alíquota obtida foram utilizados 100 µl de uma diluição adequada. A cada amostra foram acrescentados 250 µl de NaOH 1N, os tubos foram agitados e incubados a temperatura ambiente por 90 min. A seguir acrescentou-se 2,5 ml de solução cobre alcalina, agitou-se os tubos que foram novamente incubados por 10 min a temperatura ambiente. Em seguida foram acrescentados 250 µl de Folin (diluído 2 vezes), os tubos foram agitados e após 30 min, as absorbâncias das amostras foram medidas a um comprimento de onda de 660 nm.

A solução cobre alcalina foi preparada misturando-se 1% de tartarato de potássio e sódio (2% em água deionizada) e de 1% CuSO₄.5 H₂O (1% em água deionizada) em uma solução de Na₂CO₃ (2% em água deionizada).

As concentrações de ferritina obtidas variaram de 5 µg/µl a 13 µg/µl.

3.7.5. Tratamento de plasmídio pBR322 com ALA na presença de ferritina

Cinco microlitros de plasmídio pBR322 (250-500 ng) foram incubados com 1 ou 3 mM de ALA na presença de 0 a 20 µg de ferritina purificada em 100 µl de tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,4 a 37°C por 2 h. Nos experimentos com espermidina e EDTA, foram utilizadas as mesmas condições, na presença de 5 mM de esperimidina ou 1 mM de EDTA e 20 µg/100 µL de ferritina.

3.7.6. Quantificação dos danos ao plasmídio pBR322 induzidos pelo ALA na presença de ferritina

A separação das diferentes formas do plasmídio pBR322 (SC, OC, L) foi feita através de um gel de eletroforese, utilizando 0,8% de agarose / 1,8 µM de brometo de etídio em uma cuba de eletroforese horizontal a 30 mA por 2 h em tampão Tris - borato 90 mM / EDTA 2 mM a pH 8,0. O DNA foi misturado com 4 µl de uma solução contendo 15% de Ficoll tipo 400 / 0,25% de azul de bromofenol e aplicado no gel.

Após a eletroforese, as bandas do DNA foram visualizadas por fluorescência em luz UV em densitômetro ImageMaster VDS (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden). As bandas foram quantificadas para determinação da extensão do dano oxidativo promovido pelo ALA que foi expresso em porcentagem da forma OC e L em relação ao total de DNA plasmidial.

3.8. Formação de 8-oxodGuo em dGuo e DNA de timo de bezerro promovida por ALA na presença de ferritina

3.8.1. Tratamento de dGuo com ALA na presença de ferritina

Um milimolar de dGuo foi incubado com 3 mM de ALA na presença de 0-20 µg de ferritina em 100 µl de tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,4 a 37°C por 2 h. A

ferritina foi precipitada por agitação vigorosa com 1 volume de clorofórmio, centrifugada a 6600 g por 2 min. Alíquotas de 20 µl do sobrenadante foram injetados na coluna de HPLC.

3.8.2. Tratamento de DNA de timo de bezerro com ALA na presença de ferritina

Para reduzir a quantidade de metais ligados ao DNA, a solução de DNA de timo de bezerro (1 mg/ml) em tampão Tris-HCl 20 mM, pH 7,4 contendo EDTA 20 mM foi incubada a 37°C por 1 h com 5 mM de desferral, seguido de precipitação do DNA com 1 volume de etanol absoluto e NaCl 5M, e lavagem com etanol 70%.

Quinhentos microgramas de DNA de timo de bezerro (1 mg/ml) foram tratados com 3 mM de ALA na presença de 5 ou 10 µg de ferritina em 600 µl de tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,4 a 37°C por 2 h. Após a incubação a ferritina foi retirada através da adição de 1 volume de clorofórmio, centrifugação a 6600 rpm por 3 min. A fase aquosa foi coletada e submetida a hidrólise enzimática.

3.8.3. Hidrólise do DNA

As incubações de DNA de timo de bezerro (500 µg) foram hidrolisadas pela adição inicial de 10 µl de tampão acetato de sódio 1 M pH 4,8 e 50 unidades de nuclease P1. As amostras foram incubadas a 37°C por 8 h. A seguir, foi acrescentado 60 µl de tampão Tris-HCl 1M, pH 7,4 e 2,5 unidades de fosfatase alcalina e as amostras novamente incubadas a 37°C por 2 h. As amostras foram filtradas em filtros de poro 0,22 µm e injetadas no HPLC.

3.8.4. Detecção de 8-oxodGuo em dGuo tratada com ALA na presença de ferritina por HPLC-EC

A quantidade de 8-oxodGuo foi determinada por HPLC (Shimadzu) acoplado a um detector eletroquímico amperométrico digital Antec Decade (Antec, Leiden, Holanda) com um potencial de +600 mV. A fase móvel consistiu de KH₂PO₄ 50 mM, pH 5,5 contendo 10% de metanol e bombeado a um fluxo de 1

ml/min por uma bomba modelo LC-10AD/VP. A separação foi feita através de uma coluna de fase reversa C18 (Spherex, 250 x 4.6 mm DI, tamanho da partícula: 5 μ m) (Phenomenex) e a dGuo foi detectada por um detector UV modelo SPD-10AV/VP fixado a 254 nm. Para processar e calcular a área dos picos foi utilizado o software Shimadzu Class-VP versão 1.0.

3.9. Formação de adutos entre 2'-desoxiguanosina e ácido 4,5-dioxovalérico

3.9.1. Tratamento de dGuo com DOVA e redução por borohidreto de sódio

Dois mililitros de uma solução aquosa, pH 7,0, contendo DOVA (5 mg) e dGuo (5 mg) foram incubados a 37°C durante 3 h. Após esse período, uma alíquota da solução foi retirada e analisada em HPLC. Os picos correspondentes aos dois principais produtos da reação, denominados adutos 1 e 2, foram observados no cromatograma em tempos de retenção de 19,6 e 21,5 min, respectivamente. Dez miligramas de NaBH₄ foram adicionados a 1 ml da solução. O pH foi mantido abaixo de 10 pela adição de HCl 1 N. Após 2 horas, a amostra foi neutralizada. A solução resultante foi então analisada por HPLC. Dois picos adicionais, correspondentes aos compostos 3 e 4, foram observados em tempos de retenção de 23,5 e 24,3 min, respectivamente.

Um espectro em luz ultravioleta dos adutos DOVA-dGuo 1 e 2 também foram obtidos por HPLC acoplado a um detector "diode array". A fase móvel utilizada foi uma solução de formiato de amônio 25 mM, pH 7,0, contendo 10% de metanol.

Para síntese em maior escala dos compostos 3 e 4, dGuo (10 mg) e DOVA (50 mg) foram dissolvidos em 3 ml de água. O pH 7,0 foi obtido através da adição de NaOH 0,1 N. Após 30 min de incubação, 50 mg de NaBH₄ foram adicionados sendo o pH mantido abaixo de 10 pela adição de HCl 1 M.

Para verificação da eficiência da reação, uma alíquota de 50 μ l foi coletada, diluída em 200 μ l de tampão fosfato de sódio pH 7,0 e injetada em um sistema analítico de HPLC. O procedimento de adição de NaBH₄ e HCl foi repetido 5

vezes até que os cromatogramas das análises em HPLC não mais detectassem os adutos 1 e 2, indicando que estes foram reduzidos. Desse modo, devido à adição de HCl 1 M, necessário para manutenção do pH da solução após o acréscimo de NaBH₄, o volume final da incubação resultou em 15 ml.

A solução foi concentrada a 2 ml, centrifugada e a fase líquida foi injetada em um sistema semi-preparativo de HPLC. As duas frações correspondentes aos dois picos eluídos a 12,7 e 13,4 min foram coletados separadamente. Uma alíquota de cada uma das frações coletadas (100 µl de 25 ml) foi injetada em um sistema analítico de HPLC. Ambas as frações continham um composto cada, denominados adutos DOVA-dGuo reduzidos 3 e 4, respectivamente.

Uma segunda alíquota de 100 µl foi utilizada para análise em GC-MS. A maior parte de cada fração coletada foi liofilizada e utilizada para estudos de ressonância magnética nuclear (RMN) e para otimizações de hidrólises ácidas.

3.9.2. Análise em cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

A mistura dos adutos 3 e 4 (100 µg) foi liofilizada e acetilada pernoite em 1 ml de uma mistura 1:1 de piridina e anidrido acético. A amostra foi então evaporada sob vácuo. Foi adicionado etanol e a solução foi então transferida para frascos de silição. O etanol foi removido sob vácuo, o resíduo obtido foi derivatizado por 20 min em 100 µl de 1:1 (v/v) de uma mistura de acetonitrila e BSTFA a 110°C. As análises em GC-MS foram feitas em um cromatógrafo a gás HP 5890 Serie II (Hewlett-Packard) equipado com uma coluna capilar HP5-trace (15 m x 0,25 mm DI, 0,11 µm de espessura do filme, Hewlett-Packard). O fluxo isocrático foi de 0,8 ml/min e a injeção (volume da injeção: 1 µl) foi feita no modo contínuo com a temperatura do injetor mantido a 250°C. A temperatura do forno de GC foi mantida a 110°C por 1 min e então aumentada a 280°C a uma taxa de 15°C/min. A detecção no modo positivo foi feita por um espectrômetro de massas HP 5972 (Hewlett-Packard) utilizando ionização por impacto de elétrons. O espectrômetro de massas foi usado em escala total com uma faixa de massa de 50-700.

3.9.3. Análise em espectroscopia de massas por “eletrospray”

Os adutos reduzidos DOVA-dGuo foram também analisados por espectroscopia de massas com ionização por eletrospray. As análises foram feitas no modo positivo em dois espectrofotômetros: Platform (Micromass, Altricham, Reino Unido) utilizando como eluente uma mistura (1:1) de água e acetonitrila (fluxo: 5 µl/min); a amostra (5 µg) foi injetada em 10 µl de solução aquosa de ácido fórmico 0,25%; e Quatro II triplo quadrupolo MS/MS (Micromass). Uma bomba Shimadzu modelo LC-10AD/VP, conectada a um separador, foi utilizada para o eluente, uma mistura (1:1) de água e acetonitrila (fluxo: 5-10 µl/min). As amostras com concentração de 1 µg/µl foram injetadas através de um “loop” de 10 µl (Rheodyne, CA, EUA) em solução aquosa de ácido fórmico 0,1%. A temperatura da fonte foi mantida a 80°C, os fluxos do gás de secagem e de nebulização foram otimizados para 250 e 30 l/h, respectivamente. A voltagem do cone foi mantida em 23 V e os potenciais de capilar e do eletrodo de alta voltagem foram mantidos em 3,50 e 0,69 kV, respectivamente. Os dados foram adquiridos na faixa de massas de 100 a 500. Os dados foram utilizando o sistema MassLynx NT, versão 3.2 (Micromass).

3.9.4. Análise em espectroscopia de infravermelho

O espectro de infravermelho da mistura dos adutos 3 e 4 foi obtido no estado sólido em pastilhas de brometo de potássio (1 mg da mistura de 3 e 4 e 100 mg de KBr) em um espectrômetro 1600 FT-IR (Perkin-Elmer, CA, EUA).

3.9.5. Análise em espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)

Os produtos foram dissolvidos em 1 ml de D₂O 99,5% e secos sob vácuo. Os resíduos sólidos foram dissolvidos em 500 µl de D₂O 99,99%. Ambos os produtos 3 e 4 foram analisados por espectroscopia de ¹H-RMN utilizando espectrômetros de 300 e 400 MHz (Brucker Instruments, Inc. MA, EUA). O espectro de ¹H-RMN foi calibrado utilizando um pico de HOD (4,6 ppm) como

referência. Um espectro de ^1H -RMN da mistura dos compostos 3 e 4 também foi obtido em DMSO- d_6 . Os desvios químicos foram expressos em relação ao tetrametilsilano (TMS) utilizado como referência interna. Os compostos 3 e 4 foram também analisados por espectroscopia a 75 MHz de ^{13}C em D_2O . Os desvios químicos do ^{13}C foram calibrados em relação ao metanol (49,9 ppm), utilizado como referência interna (a dGuo foi analisada de modo semelhante). O espectro de ^{13}C -RMN do composto 4 foi também feito em DMSO, utilizando TMS como referência interna. Experimentos de acoplamento heteronuclear ^1H - ^{13}C do composto 4 também foram feitos em D_2O em um espectrômetro Bruker AM 400.

3.9.6. Hidrólise dos adutos de DOVA-dGuo reduzidos e eletrovoltagem

A mistura dos dois adutos reduzidos 3 e 4 de DOVA-dGuo (30 μg) foi incubada em 1 ml de HCl 0,1 M a 50°C. Alíquotas de 50 μl foram coletadas em crescentes intervalos de tempo (0 a 130 min) e analisadas em sistema analítico de HPLC. Foi feito também um eletrovoltagem do produto da hidrólise dos adutos de DOVA-dGuo reduzidos em HPLC-EC. Uma quantidade constante do produto (0,3 μg) foi injetada. A razão entre a resposta do detector eletroquímico (EC) e do ultravioleta (UV) ao composto injetado foi plotado em um gráfico com o potencial aplicado à célula de detecção eletroquímica (faixa: 600 - 900 mV).

3.9.7. Incubação de DNA de timo de bezerro com DOVA

Quinhentos microlitros de DNA de timo de bezerro (1 mg/ml) foram incubados com 5 mg de DOVA a pH 7,0 durante 2 h. Após este período, 25 mg de NaBH_4 foram adicionados à solução; o pH foi mantido entre 10 e 11 pela adição de NaOH 1 M. Após 30 min, a amostra foi neutralizada pela adição de HCl 1 M, o DNA foi precipitado pela adição de 1,5 ml de etanol absoluto previamente resfriado a -20°C, centrifugado a 10509 g por 10 min a 4°C, ressuspensão em 250 μl de água e precipitado novamente pela adição de etanol. O precipitado resultante foi então lavado com 100 μl de etanol 70% e novamente centrifugado.

3.9.7.1. Hidrólise do DNA

O DNA foi dissolvido em 500 µl de tampão acetato de sódio 20 mM, pH 4,8. Nuclease P1 (25 unidades) foi adicionada e a amostra foi incubada pernoite a 37°C. Adicionou-se tampão Tris-HCl 500 mM, pH 8,0 contendo 1 mM de EDTA e 50 unidades de fosfatase alcalina. A solução foi incubada a 37°C por 2 h. As enzimas de hidrólise foram subsequentemente precipitadas pela adição de 250 µl de clorofórmio, centrifugadas a 10509 g a temperatura ambiente por 10 min, a fase aquosa coletada e concentrada a 200 µl sob vácuo. A solução foi dividida em duas alíquotas que foram injetadas em um sistema analítico de HPLC.

3.9.7.2. Análise e quantificação dos adutos por HPLC-EC

A fração do HPLC contendo os adutos foi concentrada a 1 ml sob vácuo e liofilizada. O resíduo obtido foi dissolvido em 100 µl de HCl 0,1 M e a solução resultante foi aquecida a 50°C por 2 h. A amostra foi então neutralizada pela adição de NaOH 1 M e analisada em HPLC-EC (Shimadzu) com um potencial aplicado ao detector eletroquímico amperométrico de +850 mV. O volume da injeção foi de 50 µl retirados da solução inicial de 100 µl. O aduto DOVA-dGuo reduzido, hidrolisado e purificado (500 pmol) foi adicionado à outra metade da amostra e a solução resultante analisada em HPLC-EC.

3.10. Detecção de ácido 4,5-dioxovalérico por cromatografia líquida de alta pressão acoplada a detector de fluorescência

3.10.1. Derivatização do ácido 4,5-dioxovalérico

Para a detecção do DOVA por fluorescência, foi primeiramente obtido uma substância derivada da reação entre o DOVA e o 2,3-diaminonaftaleno (DAN), o ácido benzoquinoxalino-2-propiónico (BZQ). A obtenção dessa substância foi feita incubando-se 50 µg/ml de DOVA com 100 µg/ml de DAN em Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0 com 25% de etanol para manter o DAN em solução. A condensação ocorreu

pelo aquecimento a 60°C por 1 h no escuro conforme descrito por Porra *et al.* (1980a).

Diferentes concentrações de DOVA (0-550 µM) com a mesma concentração de DAN (100 µg/ml) também foram incubadas, injetando-se uma alíquota de 100 µl no sistema de HPLC descrito a seguir. Variações do tempo de incubação (0-60 min) também foram analisadas.

3.10.2. Determinação da quantidade de DOVA formada na oxidação do ALA

Cem micromolares de ALA foram incubados na presença de 20 µM de FeSO₄ em 200µl de tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,4 a 37°C por 2 h. A seguir, 100 µl da amostra foram incubados com 300 µM de DAN a 60°C por 1 h. Após a incubação, 100 µl da amostra foi injetada em sistema HPLC para detecção do derivado BZQ e determinação da quantidade de DOVA formada durante a oxidação do ALA.

3.10.3. Análise em HPLC acoplado a detector ultravioleta e de fluorescência

A amostra foi injetada em sistema de HPLC (Shimadzu) acoplado a detector de luz ultravioleta e de fluorescência. A fase móvel utilizada foi tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,0 contendo 20% de acetonitrila. A coluna utilizada foi de fase reversa C18 (Spherex, 25 x 4,6 mm DI, tamanho da partícula: 5 µm) (Phenomenex). A fase móvel foi bombeada com o auxílio da bomba modelo LC-10AD com fluxo isocrático de 1 ml/min. O comprimento de onda utilizado foi de 268 nm para a detecção ultravioleta em detector modelo SPD-10AV, o comprimento de onda de excitação foi fixado em 350 nm e o de emissão em 540 nm em detector de fluorescência modelo RF-551 versão 2.4. A aquisição dos dados foi feita pelo módulo de comunicação CBM 10A e analisados utilizando-se o programa CLASS-LC10, versão 1.60. O espectro do composto também foi obtido através de análise em HPLC acoplado a um “diode array” modelo SPD-

M10AV que possibilita a detecção da absorbância em diversos comprimentos de onda.

3.10.4. Análise em espectrometria de massas

O espectro de massa do derivado BZQ foi obtido em um espectrômetro de massas com ionização por “eletrospray” Platform II (Micromass) utilizando-se o modo positivo. Uma bomba Waters 501 (Millipore) com separador foi utilizada para bombear o eluente, uma mistura de 1:1 de água e acetonitrila, a um fluxo final de 5 a 10 µl/min. A amostra (0,8 µg/µl) foi injetada em 50 µl de solução aquosa 0,2% de ácido fórmico. Os dados foram adquiridos em um sistema de dados Mass Lynx NT™ versão 2.2 (Micromass).

3.11. Danos em DNA mitocondrial de células tratadas com ALA

3.11.1. Cultivo das células

Foram utilizados fibroblastos de humanos transformados com SV40 (SVNF), (GM00637E, NIGMS Human Genetic Mutant Cell Repository, Coriell Institute, Camden, NJ, EUA) cultivados em meio mínimo essencial (MEM) (500 ml) suplementado com vitaminas 100x (10 ml), aminoácidos não essenciais 100x (10 ml), aminoácidos 50x (20 ml), glutamina 200 mM (6,3 ml), contendo 15% de soro fetal bovino (SFB) (75 ml) (Gibco BRL). As culturas foram incubadas em atmosfera úmida com 5% de CO₂, a 37°C, no escuro.

As células cresceram aderidas à superfície de garrafas plásticas de cultura de 75 mm² e foram repicadas em períodos de 6 a 7 dias.

Procedimento para o repique das células: após a retirada do meio, a cultura foi lavada uma vez com 2 ml de tripsina-EDTA (0,05% em PBS com 1 mM de EDTA). A seguir, foi incubada a 37°C com 2 ml de solução de tripsina-EDTA até que as células se desprendessem das garrafas ($\pm$ 5 min). As células foram, então, ressuspensas em meio MEM suplementado e a suspensão distribuída em novas garrafas na diluição desejada.

3.11.2. Tratamento de células SVNf e PC12 com ALA

Quando as células atingiram uma confluência de aproximadamente 90%, foram desprendidas da placa com 2 ml de tripsina como descrito para o repique. A seguir foram adicionados 10 ml de meio MEM suplementado e o número de células contadas em uma câmara de Neubauer ao microscópio. Adicionou-se a quantidade de meio MEM necessária para atingir a concentração de 10^6 células/ml. Um mililitro do meio com células foi colocado em placas de 6 mm de diâmetro adicionando-se 3 ml de MEM. As placas foram incubadas por 16 a 24 h antes do tratamento com ALA.

Após esse período, o meio MEM foi retirado, a cultura foi lavada duas vezes com 3 ml de MEM sem vermelho de fenol, sem soro e sem suplementação e exposta a diferentes concentrações de ALA, 0-100 mM por 2 h ou 15 min a 37°C. O ALA foi preparado imediatamente antes de cada experimento, dissolvido em meio MEM sem vermelho de fenol, sem soro e sem suplementação, pH 7,4. Após a incubação, a cultura foi lavada duas vezes com 3 ml de MEM sem vermelho de fenol, sem soro e sem suplementação, gelado. Adicionou-se 2 ml do mesmo meio e as células foram desprendidas da placa e transferidas para um tubo. Os tubos foram centrifugados a 2700 g por 5 min a 4°C. O sobrenadante foi aspirado e o precipitado de células armazenado a -20°C para posterior extração de DNA.

Nos experimentos que envolviam verificação do reparo do DNA, após o tratamento, as células foram lavadas duas vezes com 3 ml de MEM sem vermelho de fenol, sem soro e sem suplementação equilibrado previamente a 37°C, foram adicionados 3 ml de meio MEM equilibrado a 37°C e as células foram novamente incubadas na estufa a 37°C nos tempos de recuperação correspondentes (2 ou 4 h) antes de serem coletadas como já descrito. O meio utilizado para a incubação de recuperação foi o mesmo utilizado para o repique inicial das células antes do tratamento, que foi coletado, centrifugado e reservado antes da lavagem.

No tratamento de células PC12, o procedimento adotado foi o mesmo apenas alterando o meio MEM para meio mínimo essencial Dulbecco's (DMEM).

3.11.3. Extração do DNA

O DNA das células foi extraído utilizando-se um kit de extração de DNA de tecidos QIAamp® Tissue Kit (Qiagen).

As células precipitadas foram ressuspensas em 200 µl de PBS, lisadas com 200 µl do tampão de lise (Tampão AL) por 10 min a 70°C na presença de 2,5 mg/ml de proteinase K e precipitado com 210 µl de etanol absoluto a temperatura ambiente.

A mistura foi então aplicada à coluna que foi centrifugada a 6000 g por 1 min e lavada duas vezes com 500 µl com tampão de lavagem (Tampão AW). O DNA foi eluído duas vezes com 100 e 200 µl de tampão de eluição (Tampão AE) pré-aquecido a 70°C.

3.11.4. Quantificação do DNA

A quantificação do DNA foi feita através do método alcalino fluorimétrico (Kowalski, 1979). Para uma estimativa da quantidade de DNA isolada, a solução estoque de DNA foi diluída 1:10 em H₂O. A medida foi feita em um fluorímetro (Optical Technology, Inc., NY, EUA) com comprimentos de onda fixados em 365 nm para excitação e em 600 nm para emissão. Duas alíquotas sucessivas de 5 µl da solução de DNA diluída foi adicionada a 1,2 ml de tampão fosfato alcalino (20 mM KH₂PO₄, 0,5 mM EDTA, 0,5 µg/ml de brometo de etídio, pH 11,8). Os dois valores de fluorescência obtidos foram comparados com uma curva padrão feita com quantidades de 0 a 75 ng de DNA Lambda/Hind III digerido. Por extrapolação, pode-se obter a estimativa da concentração inicial. Baseado nessa concentração, foi preparado 200 µl de uma diluição de 10 ng/µl em tampão TE. Quatro alíquotas sucessivas de 3 µl foram medidas três vezes cada e os valores utilizados para a diluição do DNA para 3 ng/µl.

3.11.5. Reação quantitativa em cadeia da polimerase para os fragmentos alvos do DNA de células SVNF

Para as análises por reação quantitativa em cadeia da polimerase (QPCR), foi utilizado um kit para PCR GeneAmp XL (Perkin-Elmer/Roche, CA, EUA). A reação foi feita utilizando-se 5 µl da solução de DNA (3 ng/µl), 9,8 µl de H₂O, 15 µl de tampão de PCR 3,3 x, 2,2 µl (1,1 mM) de solução de Mg(OAc)₂ 25 mM, 4 µl de solução de dNTPs (10 mM de cada dNTP), 5 µl de 1 mg/ml de BSA (Boehringer Mannheim Corp., IN, EUA), 0,2 µl de dNTPs marcadas radioativamente com ³²P, e 2 µl de cada primer (10 pmol/µl) adequado à amplificação do gene nuclear ou mitocondrial. Todas as amostras foram feitas em duplicata.

Para a análise de danos ao DNA nuclear das células SVNF, foi utilizado como alvo de amplificação um fragmento de 13,5 Kb da região 5' flanqueada próxima ao gene da β-globina, e para o DNA mitocondrial, um fragmento de 16,2 kb. Os primers utilizados foram os seguintes:

Fragmento de 13,5 kb da β-globina:

5'-CGA GTA AGA GAC CAT TGT GGC AG-3'	sense
5'-GCA CTG GCT TAG GAG TTG GAC T-3'	anti-sense

Fragmento mitocondrial de 16,2 kb:

5'-TGA GGC CAA ATA TCA TTC TGA GGG GC-3'	sense
5'-TTT CAT CAT GCG GAG ATG TTG GAT GG-3'	anti-sense

Inicialmente as amostras foram submetidas a uma temperatura de 75°C durante 2 min, a reação foi interrompida após 90 s para adição de 5 µl de DNA polimerase de *Thermus thermophilus* (*rTth*) (1 unidade). A seguir, as amostras foram submetidas a temperatura de 94°C durante 1 min, iniciando-se então os ciclos de desnaturação, hibridização e extensão do primer. Para a amplificação do fragmento da β-globina, foram realizados 27 ciclos de 94°C por 0,15 min e 66°C por 12 min. Para o fragmento do DNA mitocondrial foram utilizadas as mesmas temperaturas, mas 28 ciclos. A seguir, as amostras foram deixadas a 72°C por 10 min e a 25°C até que fossem retiradas da máquina de PCR.

Considerando que a taxa de amplificação do DNA não danificado está dentro da faixa exponencial do PCR, foi utilizada uma diluição de 50% de uma amostra não danificada como controle interno.

3.11.6. Reação quantitativa em cadeia da polimerase para os fragmentos alvos do DNA de células PC12

Para as análises de QPCR para as células PC12 foram feitas algumas modificações no ensaio uma vez que a célula é de rato. O kit para PCR utilizado foi o mesmo. A reação foi feita utilizando-se 5 µl da solução de DNA (3 ng/µl), 7,8 µl de H₂O, 15 µl de tampão de PCR 3,3 x, 2,2 µl (1,1 mM) de solução de Mg(OAc)₂ 25 mM, 4 µl de solução de dNTPs (10 mM de cada dNTP), 5 µl de 1 mg/ml de albumina de soro bovino (BSA), 0,2 µl de dNTPs marcadas radioativamente com ³²P, e 3 µl de cada primer (10 pmol/µl) adequado à amplificação do gene nuclear ou mitocondrial. Todas as amostras foram feitas em duplicata.

Para a análise de danos ao DNA nuclear das células PC12, foi utilizado como alvo de amplificação um fragmento de 12,5 kb do gene da clusterina (TRPM-2) e para o DNA mitocondrial, um fragmento de 13,4 kb. Os primers utilizados foram os seguintes:

Fragmento de 12,5 kb da clusterina:

5'-AGA CGG GTG AGA CAG CTG CAC CTT TTC-3'	sense
5'-CGA GAG CAT CAA GTG CAG GCA TTA GAG-3'	anti-sense

Fragmento mitocondrial de 13,4 kb da mitocôndria:

5'- AAA ATC CCC GCA AAC AAT GAC CAC CC-3'	sense
5'-GGC AAT TAA GAG TGG GAT GGA GCC AA-3'	anti-sense

Inicialmente as amostras foram submetidas a uma temperatura de 75°C durante 2 min, a reação foi interrompida após 90 s para adição de 5 µl de DNA polimerase *rTth* (1 unidade), a seguir as amostras foram submetidas a 94°C durante 1 min, iniciando-se então os ciclos de desnaturação, hibridização e extensão do primer. Para a amplificação do fragmento da clusterina e do fragmento do DNA mitocondrial foram realizados 23 ciclos de 94°C por 0,15 min e 67°C por 12 min. A seguir, as amostras foram deixadas a 72°C por 10 min e a 25°C até que fossem retiradas da máquina de PCR.

A diluição de 50% de uma amostra não danificada também foi utilizada como controle interno.

3.11.7. Eletroforese em gel de agarose

Os produtos pós-PCR foram separados em gel de agarose 1% vertical modelo V16, com espaçadores de 1,5 mm (Gibco BRL, NY, EUA). Foram colocados na parte inferior da cuba 150 ml de agarose 1%, que funciona como suporte para as placas e também captura os nucleotídeos radioativos não incorporados no produto de PCR. Para o gel de corrida foram utilizados aproximadamente 50 ml de agarose. Após a formação do gel, os poços foram limpos para retirada de resíduos de agarose que podem interferir na corrida e diminuir a qualidade das bandas do gel. Foi adicionado tampão Tris-borato 90 mM / EDTA 2 mM a pH 8,0 aos reservatórios superior e inferior da cuba e os poços limpos com uma seringa preenchida com tampão. Para a preparação das amostras de PCR foram utilizados 15 µl de cada amostra e 3 µl de 6 x solução de aplicação (0,25% de azul de bromofenol, 0,25% de xileno cianol FF e 30% de glicerol em água). O gel foi submetido a uma voltagem de 100 V por 3 horas.

Após a eletroforese, o gel foi seco entre papel de filtro e filme plástico a 80°C por 1:15 h em um secador de gel modelo 583 (BioRad Lab., CA, EUA) conectado a um bomba de vácuo Hydrotech™ (BioRad Lab). O gel seco foi exposto a uma placa “Phosphorimager” por 12 a 18 h. Após esse período a placa foi submetida à análise pelo sistema “Molecular Dynamics Phosphorimaging™” (Molecular Dynamics, CA, EUA) e os sinais de amplificação foram quantificados utilizando o programa Image Quant™ (Molecular Dynamics) para o cálculo do número de lesões obtidas nos fragmentos.

Os dados obtidos foram expressos em termos de amplificação do molde de DNA (Ad/Ao) ou como lesões por fragmento ou por 10 kb. A quantificação da frequência de lesões utilizando a equação de Poisson é definida como $f(x) = e^{-\lambda} \lambda^x / x!$ e a amplificação é diretamente proporcional à fração dos moldes de DNA não danificados. No entanto, a frequência média de lesões por fragmento é igual a $-\ln Ad/Ao$ onde Ad corresponde ao valor da amplificação do molde danificado e Ao à amplificação do DNA não danificado.

O número de lesões/fragmento é obtido dividindo-se o número de lesões pelo tamanho do fragmento amplificado, 13,5 kb no caso da β -globina, 16,2 kb no fragmento da mitocôndria para células SVNf, 12,5 kb para clusterina e 13,4 kb para o fragmento da mitocôndria das células PC12.

3.11.8. Medida de viabilidade celular através do teste MTT

O teste foi realizado segundo protocolo descrito por Hansen *et al*, 1989. Primeiramente as células foram plaqueadas a uma densidade de $0,8 \times 10^6$ células em placas para cultura de células de 60 mm de diâmetro. Três placas para cada ponto desejado. Para a curva padrão foram plaqueadas densidades de 0 a $1,2 \times 10^6$ células/placa em duplicata. As células foram crescidas de 14 a 16 horas antes do tratamento de modo a evitar o crescimento excessivo.

O meio foi removido por aspiração, as células foram lavadas com meio MEM sem soro pré-aquecido a 37°C e foram expostas a diferentes concentrações de ALA por 15 min a 37°C.

O meio foi então removido de todas as placas, as culturas lavadas e adicionados novamente 3 ml de meio MEM sem soro.

Adicionou-se 100 μ l de uma solução 5 mg/ml de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazolium) a cada placa, incubando-se a 37°C por 1 h. O meio contendo MTT foi então retirado, tomando-se o cuidado de não remover o precipitado formado. Adicionou-se 3 ml do tampão de lise (20% SDS, 50% de dimetilformamida em água, pH 4,8), dissolvendo-se o precipitado de MTT com o auxílio de uma pipeta. A absorbância da solução foi lida a um comprimento de onda de 595 nm.

3.11.9. Curva de crescimento de células SVNf após tratamento com ALA

A curva de crescimento após o tratamento com ALA foi feita contando a quantidade de células nas placas controles e tratadas durante 6 dias. Para cada dia foram utilizadas 6 placas, 3 controles e 3 tratadas, cada uma contendo inicialmente aproximadamente 80.000 células em 3 ml de meio MEM. Antes do tratamento, as células foram incubadas de 12 a 16 horas em estufa a 37°C. Após esse período, as células foram lavadas 2 vezes com 3 ml de meio MEM sem

vermelho de fenol, sem soro e sem suplementação. As três placas controles receberam 2 ml de meio MEM sem vermelho de fenol, sem soro e sem suplementação e as três placas restantes foram tratadas com 2 ml de uma solução de ALA 20 mM durante 15 min a 37°C. As células foram então lavadas duas vezes com 3 ml de meio MEM sem vermelho de fenol, sem soro e sem suplementação equilibrado previamente a temperatura de 37°C. Três mililitros de meio MEM foram adicionados em cada placa, incubadas novamente em estufa a 37°C.

A cada dia, sempre no mesmo horário, 3 placas controles e 3 tratadas foram retiradas da estufa e lavadas duas vezes com 3 ml de solução salina (9 g NaCl/l água). Foi adicionado 1 ml de solução hipotônica pH 7,4, (10 mM Ácido Hepes, 1,5 mM $MgCl_2 \cdot 6H_2O$) à cada placa, agitando-se levemente e periodicamente durante 5 min. Cem microlitros da solução de fixação (3 ml de ácido acético glacial, 5 g de cetil-dimetil-etil-brometo de amônio) foram adicionados, misturados bem e as placas foram incubadas durante 7 min a temperatura ambiente. A seguir foram adicionados 4 ml da solução salina-formaldeído (12,5 ml de solução de formaldeído 37% para 1 l de solução salina). Misturou-se vigorosamente 4 vezes, lavando toda a superfície da placa. Quatro mililitros de cada amostra foram transferidos para um frasco de contagem contendo 10 ml de solução salina. O número de células foi contado utilizando um contador Coulter® Multisizer II (Coulter Electronics Ltd, Beds, Inglaterra). Para calcular o número de células por placa, o valor obtido no contador foi multiplicado por 35,7 para correção do volume.

3.12. Análise da mutagenicidade induzida por ALA através do Teste de Kado

Meios de cultura

Meio Vogel-Bonner “E” (10x): 2 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 20 g ácido cítrico, 100 g K_2HPO_4 , 35 g fosfato de sódio e amônio, 1 l água bidestilada

Ágar glicose: 15 g bacto ágar, 20 g glicose, 900 ml água bidestilada

Ágar mínimo: 900 ml ágar glicose, 100 ml Meio Vogel-Bonner “E” (10x), 10 ml solução biotina/histidina

Ágar mínimo com biotina: 900 ml ágar glicose, 100 ml meio Vogel-Bonner “E” (10x), 6 ml solução biotina 0,5 mM

Ágar mínimo com histidina/biotina: 900 ml ágar glicose, 100 ml Meio Vogel-Bonner “E” (10x), 6 ml solução de biotina 0,5 mM, 10 ml solução de histidina 0,5%

Ágar mínimo com histidina/biotina e ampicilina e/ou tetraciclina: 900 ml ágar glicose, 100 ml meio Vogel-Bonner “E” (10x), 6 ml solução biotina 0,5 mM, 10 ml solução de histidina 0,5% e 3,15 ml de solução de ampicilina 8 mg/ml e/ou 0,25 ml de solução de tetraciclina 8 mg/ml

Caldo nutriente: 25 g Nutriente Broth nº 2 (OXOID) 1 l água bidestilada

Ágar nutriente: 25 g Nutriente Broth nº 2 (OXOID), 15 g ágar, 1 l água bidestilada, pH final 7,0

Ágar de superfície (“Top agar”): 6 g bacto ágar, 5 g NaCl, 1 l água bidestilada, pH final 7,0

Os meios de cultura foram esterilizados por autoclavagem a 121°C por 15 min.

Soluções

Solução *biotina*/histidina: 0,138 g de *L*-histidina HCl, 0,117 g de *D*-biotina, 1 l água bidestilada

Solução de ampicilina: 8 mg de ampicilina, 10 ml de NaOH 0,02 N

Solução de tetraciclina: 8 mg de tetraciclina, 10 ml de HCl 0,02 N

3.12.1. Características do Teste de microssuspensão e das linhagens de S. typhimurium

O Teste de Ames, desenvolvido por Ames e colaboradores (1975), consiste basicamente na utilização de linhagens da bactéria *Salmonella typhimurium*, para detectar mutações causadas por diversos agentes físicos e químicos. Conforme a linhagem utilizada, o ensaio é capaz de detectar diferentes eventos mutacionais: mutações por substituição de pares de bases, por mudança no quadro de leitura ou por deleções (Green, 1978).

Vários sistemas de reparo atuam na célula bacteriana: reparo por excisão de bases, reparo por excisão de nucleotídeos (Kirtikar e Goldstwait, 1974), fotorreativação, reparo por recombinação (Rupp e Howard-Flanders, 1968) e o reparo SOS ("error-prone repair") (Little e Mount, 1982).

O sistema de reparo SOS possui uma importância considerável no aparecimento de mutações uma vez que é induzido por lesões (Witkin, 1976) e leva à incorporação errônea de bases no DNA como mecanismo para evitar o bloqueio da replicação.

Considerando os diversos tipos de reparo da célula, há diferentes maneiras de aumentar a mutabilidade das linhagens. Algumas linhagens não possuem a principal endonuclease do reparo por excisão, levando a um aumento das mutações devido à recombinação ou ao reparo SOS de lesões não codificadoras. A sensibilidade das linhagens pode ser aumentada também através da introdução do plasmídeo pKM101 que possui o gene *muc*, análogo do gene *umuDC* que

participa do reparo SOS. Esse plasmídio também confere resistência à ampicilina (McCann *et al*, 1975a).

A bactéria também pode ser alterada de modo a torná-la mais permeável às moléculas grandes, através da mutação no gene *rfa* que causa modificações na camada polissacarídica da parede celular bacteriana. A sensibilidade ao UV e outros agentes mutagênicos pode ser aumentada pela deleção do gene *uvrB*, um dos responsáveis pelo reparo por excisão. A deleção do gene *uvrB* pode se estender até o gene da biotina e conseqüentemente as cepas tornam-se auxotróficas para biotina, ou seja, necessitam da biotina para crescer. A presença de mutações no DNA da bactéria causadas por agentes externos é detectada através da mutação reversa de mutações no operon da histidina que torna a bactéria auxotrófica para histidina. Se o agente for capaz de reverter essa mutação, a bactéria, dita revertente, é capaz de crescer sem a presença de histidina.

Diversas são as cepas de *Salmonella typhimurium* utilizadas no Teste de Ames. Cada uma possui características próprias que as tornam mais ou menos susceptíveis aos diversos agentes químicos e ou físicos, sendo capazes que detectar diferentes tipos de mutações. As cepas utilizadas no Teste de Ames também detectam agentes que causam mutações indiretas no DNA através da utilização de sistema de ativação metabólica (S9), que consiste num extrato de fígado de rato.

A função primordial das diferentes linhagens é detectar e caracterizar os danos ao DNA, sem que seja considerado um modelo de processos de mutações operantes em células de mamíferos. A correlação que se pode fazer é que os eventos mutacionais ocorridos na bactéria e em células de mamíferos são ambos decorrentes de danos ao DNA celular (Green, 1978).

Uma das cepas utilizadas foi a TA100, cujo genótipo é *hisG46*, *rfa-1001*, $\Delta uvrB$, *bio*⁻, pKM101, Ap^R sendo o alvo da mutação o par C:G e a taxa de reversão espontânea de 75 a 225 revertentes por placa. Essa linhagem é uma das que detectam mutágenos que causam substituição de pares de bases no DNA (Maron e Ames, 1983). A TA100 surgiu de outra linhagem denominada TA1535 pela introdução do plasmídio pKM101, o que conferiu um aumento na susceptibilidade a substituição de bases e mutagênese por deslocamento de

quadro de leitura (McCann *et al.*, 1975a, McCann *et al.*, 1975b, Mortelmans e Stocker, 1976) e aumento da resistência a morte por UV (Monti e Bragadin, 1976) sem afetar a mutagênese espontânea. A linhagem TA1535 possui o seguinte genótipo: *hisG46*, *rfa*, Δ *uvrB*, *bio*⁻. A taxa de reversão espontânea é de 20 a 35 revertentes e o alvo de mutação é o par C:G (Maron e Ames, 1983). Outra linhagem testada foi a TA98 cujo genótipo é: *hisD3052*, *rfa-1004*, Δ *uvrB*, *bio*⁻, pKM101, Ap^R que detecta deslocamento do quadro de leitura do DNA. A taxa de reversão espontânea é de 25 a 75 revertentes e o alvo de mutação é o par C:G (Maron e Ames, 1983). A linhagem TA102 possui o genótipo *hisG428*, *rfa*, pKM101, Ap^R, pAQ1, Tt^R. A taxa de reversão espontânea é alta, 240-320 revertentes e o alvo de mutação é o par A:T. O genótipo da linhagem TA104 é *hisG428*, *rfa*, *uvrB*, *bio*⁻, pKM101, Ap^R. A taxa de mutação espontânea também é alta, de 245 a 475 revertentes e o alvo de mutação é o par A:T.

O teste empregado para detecção de mutações em *Salmonella typhimurium* consiste de uma modificação no Teste de Ames de modo a torná-lo mais sensível, desenvolvido por Kado *et al.* (1983). Essa metodologia é baseada no aumento da quantidade de bactérias utilizadas no ensaio e na redução da quantidade de amostra, aumentando em 10 vezes a sensibilidade do Teste de Ames. O ensaio, assim como o Teste de Ames, pode ser realizado na presença ou ausência de sistema de ativação metabólica (S9), permitindo a detecção de agentes mutagênicos diretos e indiretos.

A análise de mutagenicidade de compostos pelo Teste de Kado é feita utilizando-se linhagens mutantes de *S. typhimurium* auxotróficas para histidina (*his*⁻) que detectam diferentes tipos de mutágenos e possuem várias mutações no operon da histidina que serão alvos para mutação reversa, assim como mutações que aumentam a sensibilidade aos agentes genotóxicos (Kado *et al.*, 1983).

3.12.2. Preparação da placa estoque (“master”)

As amostras de diversas cepas de *S. typhimurium* armazenadas a -80°C em caldo nutriente contendo 10% de DMSO foram inoculadas em 30 ml de caldo nutriente contendo os respectivos antibióticos (ampicilina para TA100, TA98, TA104 e TA1535 e ampicilina e tetraciclina para cepa TA102) e incubadas a 37°C por 12 a 16 h sob agitação constante (150-170 rpm).

Após a incubação, a cultura foi estriada em placas de Petri contendo ágar nutriente, de forma a obter colônias isoladas. As placas foram incubadas invertidas a 37°C por 24 h. A seguir foram selecionadas cerca de 5 colônias de cada cepa, transferidas uma a uma para tubos com 5 ml de caldo nutriente somente com ampicilina, incubando-se a 37°C por 12 a 16 h sob agitação constante (150-170 rpm).

Após o período de incubação as culturas foram inoculadas em ágar mínimo com histidina/biotina em forma de estrias grossas e as placas foram incubadas invertidas a 37°C por 24 h. Para que essas placas fossem utilizadas como estoque, ou placas "master", elas deveriam apresentar todas as características próprias de cada linhagem como a sua taxa de reversão espontânea e a presença de marcadores genéticos: dependência de histidina, fator de resistência a tetraciclina e/ou a ampicilina (fator R), mutação no gene *rfa* e deleção no gene *uvrB*.

As placas "master", após os testes para verificação das características genéticas de cada cepa, foram vedadas com parafilme e armazenadas até dois meses, sob refrigeração (4°C). As placas "master" da cepa TA102 só puderam ser armazenadas por duas semanas, uma vez que após esse período a taxa de reversão espontânea eleva-se significativamente, inviabilizando a sua utilização.

3.12.3. Verificação das características genéticas das cepas de S. typhimurium

3.12.3.1. Dependência de histidina

O caráter *his⁻* das cepas-testes foi confirmado pela demonstração do requerimento de histidina para crescer em placas de ágar mínimo. As culturas foram semeadas em placa de ágar mínimo com biotina (controle) e em placa de ágar mínimo com histidina/biotina e incubadas por 24 h a 37°C. As culturas cresceram somente nas placas contendo histidina/biotina.

3.12.3.2. Presença de mutação *rfa*

O caráter *rfa* das cepas-testes foi confirmado através da sensibilidade ao cristal violeta. As culturas foram semeadas em placa de ágar nutriente. Um disco de papel de filtro de 5 mm de diâmetro, embebido em 10 µl de solução de cristal violeta 0,1%, foi colocado no centro da placa. As placas foram incubadas 24 h a 37°C, verificando a presença de halos de inibição de crescimento. As cepas apresentaram uma zona de inibição de crescimento entre 16 e 21 mm de diâmetro, ao redor do disco com a solução de cristal violeta.

3.12.3.3. Presença da deleção *uvrB*

A mutação *uvrB* pode ser confirmada verificando-se a sensibilidade ao UV. As culturas em caldo nutriente foram semeadas em placas de ágar nutriente em estrias paralelas. A tampa da placa foi retirada e metade da placa foi coberta com papel cartolina. A placa foi irradiada com lâmpada UV de 15 W, a uma distância de 33 cm. As cepas foram expostas por 15 segundos. A seguir, as placas foram incubadas a 37°C por 24 h e o crescimento foi verificado. As cepas com deleção *uvrB* cresceram somente na metade da placa não irradiada. A cepa TA102 que não apresenta essa deleção cresceu em toda a placa.

3.12.3.4. Presença do plasmídio pKM101

As cepas com o fator R (TA98, TA100, TA102 e TA104) foram testadas incubando-se em meio contendo ampicilina. Uma solução de ampicilina 8 mg/ml foi estriada em forma de X em placas de ágar nutriente. Após a secagem, a placa foi dividida em quadrantes e, em cada um deles, foi inoculado a cultura em caldo nutriente, perpendicularmente à estria do antibiótico. As placas foram incubadas a 37°C por 24 h. As cepas resistentes à ampicilina (TA98, TA100, TA102 e TA104) não foram inibidas pelo antibiótico, crescendo continuamente através das estrias. A cepa sensível à ampicilina (TA1535) teve seu crescimento interrompido na zona de estria da solução de ampicilina.

3.12.3.5. Taxa de reversão espontânea

A taxa de reversão espontânea das cepas *his*⁻ para *his*⁺ foi medida durante a preparação da placa “master” e em cada experimento realizado. Cem microlitros do caldo nutriente de cada cultura foram misturados a 2,5 ml de “top agar” e invertidos em placas de ágar mínimo, incubadas a 37°C por 66 h. Esse teste foi feito em triplicata. A taxa de reversão espontânea é característica de cada cepa.

3.12.4. Ensaio

Uma pequena quantidade da cultura da placa “master” foi semeada em 30 ml de caldo nutriente e incubada a 37°C por 18 a 20 horas, sob agitação constante de 180-200 rpm de modo a obter uma densidade de 2×10^9 bactérias/ml. As bactérias foram centrifugadas a 29300 g por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado, o precipitado ressuspenso em 6 ml de tampão PBS diluído 1:13 em água deionizada, pH 7,8 e mantido em gelo.

Para o ensaio foram incubados 50 µl da suspensão de bactérias com 5 µl de ALA dissolvido em PBS e 50 µl de PBS. As doses de ALA foram de 1, 3, 10, 30, 100, 300 e 1000 e 2000 µg, correspondendo a 0,0375; 0,1125; 0,375; 1,125; 3,75; 11,25; 37,5 e 75 mM, respectivamente. As de DOVA foram 1000, 1500 e 2000 µg correspondendo a 59; 88,5 e 118 mM, respectivamente. As amostras foram pré-incubadas a 37°C por 90 min sem agitação e sem S9 (extrato de fígado que permite ativação metabólica). A seguir, foram acrescentados 2 ml de “top agar” a cada amostra e estas foram plaqueadas em placas de Petri contendo meio ágar mínimo durante 66 h a 37°C. Cada concentração utilizada foi testada em triplicata.

Nos experimentos utilizando H₂O₂, a concentração do peróxido foi determinada espectrofotometricamente através da medida da absorbância a um comprimento de onda de 240 nm. Foram utilizadas doses de 500, 750, 1000 µg correspondentes a 2,94; 4,41 e 5,88 M.

A catalase foi utilizada na dose de 4 µg, correspondente a 6,16 unidades e incubada anteriormente à adição da cepa. A catalase foi inativada incubando-se a solução a 100°C por 10 min.

Paralelamente foram realizados vários tipos de controles para verificação da viabilidade celular, esterilidade do tampão, controle positivo e o branco. A viabilidade da cepa foi testada eluindo-se a cultura para 10^{-7} e 10^{-8} em tampão fosfato e plaqueando 100 µl em placa com meio ágar nutriente. O controle positivo das linhagens TA100, TA98 e TA1535 foi feito utilizando-se 0,5 µg (5 µl) por placa de 2- nitrofluoreno (NF) em duplicata. O controle positivo das linhagens TA102 e TA104 foi feito utilizando-se 14,4 µg de metilglioxal (5 µl) em duplicata. O controle negativo (branco) contendo 50 µl de PBS foi feito em 5 placas. Para controle da reversão espontânea da cepa, feito em triplicata, utilizou-se somente 50 µl de cepa.

Após o período de incubação, as colônias crescidas em cada placa foram contadas em um contador automático e analisadas através do programa “Salanal” (“Salmonella Assay Analysis” versão 1.0, Integrated Laboratory Systems, NC, EUA), para verificação da mutagenicidade, utilizando-se métodos estatísticos como Anova, Bernstein e outros parâmetros como a potência da amostra e razão de mutagenicidade (RM).

A razão de mutagenicidade (RM) foi calculada através da relação: $RM=E/C$, onde E é igual ao número de colônias revertentes na placa-teste (revertentes espontâneas + revertentes induzidas) e C corresponde ao número de colônias revertentes na placa de controle negativo (revertentes espontâneas).

3.13. Medida da indução de resposta SOS através do Cromoteste

Meios de Cultura

Caldo L: 10 g bacto triptona, 5 g bacto extrato de levedura, 10 g NaCl, 1 l água bidestilada

Ágar MacConkey: 40 g base ágar MacConkey, 1 l água bidestilada

Os meios de cultura foram autoclavados a 121°C por 15 minutos.

Os meios de cultura contendo ágar foram acrescidos de 15 g de ágar/l de caldo L. Os meios contendo ampicilina (**caldo La**) foram preparados com a mesma

composição do caldo L, acrescentando após a autoclavagem, 2 ml de uma solução de 10 mg/ml de ampicilina.

Soluções

Tampão B: 16,1 g Na_2HPO_4 , 5,5 g NaH_2PO_4 , 0,75 g KCl, 0,25 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1 g SDS, 2,7 ml β -mercaptoetanol, 1 l água bidestilada, pH final; 7,0

Tampão P: 121 g Tris, 1 g SDS, 1 l água bidestilada, pH final: 8,8

3.13.1. Características genéticas da cepa *E. coli* PQ37

O organismo indicador da resposta SOS utilizado foi a linhagem *Escherichia coli* PQ37 que apresenta o gene estrutural da β -galactosidase (β -gal) sob o controle do operador do gene *sfiA*, um dos responsáveis pela filamentação bacteriana, uma das respostas SOS.

Na *E.coli* PQ37, a síntese de β -gal só ocorre quando o gene *sfiA* é induzido, uma vez que o gene *lacZ* normal desta cepa foi deletado.

Nesta cepa a toxicidade da substância analisada pode ser avaliada através da medida da enzima fosfatase alcalina (FA) cuja produção nesta linhagem é constitutiva (mutação *Pho C*).

A *E. coli* PQ37 possui ainda as mutações *uvrA* e *rfa* que aumentam a sua sensibilidade, a primeira por torná-la deficiente em reparo por excisão, e a segunda por permitir a entrada de substâncias químicas normalmente não difusíveis em uma célula de *E.coli* selvagem. Os principais marcadores genéticos da linhagem de *E.coli* PQ37 são apresentados a seguir:

sul A: : Mud (Ap *lac*) *cts*

lac Δ U 169

mal+, *uvrA*, *gal E*, *gal Y*, *Pho C*, *rfa*

3.13.2. *Estoque da cepa de E. coli PQ37*

A cultura foi recebida aderida em papel de filtro. Este papel foi transferido assepticamente para um erlenmeyer contendo caldo La e as bactérias foram incubadas sob agitação constante (150 a 170 rpm) pernoite a 37°C. Após a incubação, a cultura foi estriada em uma placa com caldo La e ágar, de forma a obter colônias isoladas. As placas foram incubadas invertidas a 37°C. Dez colônias foram selecionadas e transferidas, uma a uma, para tubos com 5 ml de caldo La. Os tubos foram incubados sob agitação (180 a 200 rpm) pernoite a 37°C. As características genéticas da cultura foram checadas antes do ensaio. As culturas estoque permanentes foram preparadas a partir das culturas obtidas pelo crescimento pernoite em 5 ml de caldo La. Foram adicionados a 0,9 ml da cultura, 0,1 ml de DMSO. As culturas foram armazenadas a 4°C por 5 h e depois colocadas a -20°C. Após a verificação das marcas genéticas, as culturas correspondentes foram armazenadas a -80°C.

3.13.3. *Verificação das características genéticas da cepa de E.coli PQ37*

3.13.3.1. **Presença de mutação *rfa***

O caráter *rfa* da cepa foi confirmado através da sensibilidade ao desoxicolato. A cultura crescida pernoite em caldo La foi semeada em estria única em placas com caldo La e ágar (controle) e em placas contendo ágar MacConkey. As placas foram incubadas invertidas a 37°C, pernoite. As cepas PQ37 são sensíveis ao desoxicolato, não crescendo nas placas com ágar MacConkey, somente nas placas com caldo La e ágar.

3.13.3.2. **Presença da mutação *uvrA***

A mutação *uvrA* pode ser confirmada através da sensibilidade ao UV. As culturas crescidas pernoite em caldo La foram semeadas em placas de Petri com caldo La e ágar em estrias paralelas. As placas de Petri foram cobertas pela metade com cartolina e irradiadas com lâmpada UV de 15 W a uma distância de

33 cm. As placas foram incubadas invertidas a 37°C, pernoite. As cepas com mutação *uvrA* cresceram somente na metade da placa não irradiada.

3.13.3.3. Resistência à ampicilina

A resistência a ampicilina pode ser verificada através de crescimento em meio contendo este antibiótico. As culturas crescidas em caldo La foram semeadas em estrias paralelas em placas de petri com caldo La e ágar. As placas foram incubadas invertidas 24 h a 37°C e o crescimento verificado após esse período.

3.13.4. Ensaio

3.13.4.1. Preparo da cultura de *E. coli* utilizada no ensaio

Uma ampola com a cultura *E. coli* foi descongelada a temperatura ambiente, inoculada em 30 ml de caldo La e incubada a 37°C sob agitação constante (150-170 rpm) pernoite. Após o período de incubação, a cultura foi diluída 1:50 (0,6 ml da cultura em 29,4 ml de caldo L) e incubada novamente a 37°C por 2 -3 h até atingir a DO de 0,2 a um comprimento de onda de 550 nm, correspondendo a 2×10^8 células/ml na fase exponencial. A cultura foi então diluída 1:10 em caldo L. Para cada tubo utilizado no ensaio foram utilizados 600 µl da cultura diluída e 20 µl de cada amostra a ser testada em diversas concentrações. As doses de ALA utilizadas foram 1, 10, 30, 100, 300, 1000 e 2000 µg. A de DOVA de 1000 e 2000 µg. O controle positivo utilizado foi o 4-nitroquinolina-1-óxido (4-NQO) em doses de 5, 10, 15 e 20 ng. O metilglioxal também foi utilizado como controle positivo nas doses de 3,6; 7,2 e 14,4 µg. Os tubos foram incubados sob agitação constante a 200 rpm por 2 h a 37°C. Após o período de incubação, o conteúdo de cada tubo foi dividido igualmente (310 µL) para realização do ensaio de β-galactosidase e de fosfatase alcalina.

3.13.4.2. Ensaio da β -galactosidase

Foram adicionados aos tubos contendo 310 μ l da cultura previamente tratada, 2,7 ml de tampão B, previamente estabilizado a 37°C. Os tubos foram incubados a 37°C por 10 min. A seguir, adicionaram-se 600 μ l de solução de α -nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo (ONPG) 4 mg/ml a cada tubo. Os tubos foram incubados a 37°C por 3 h. Após este período, a reação foi paralisada pela adição de 2 ml de solução de Na₂CO₃ 1 M a cada tubo. A seguir, foi feita a leitura da absorbância do produto amarelo resultante da ação da β -galactosidase sobre o ONPG, a 420 nm, zerando o espectrofotômetro com um tubo contendo todas as soluções utilizadas no ensaio, substituindo-se a cultura tratada por caldo L.

3.13.4.3. Ensaio para fosfatase alcalina

Adicionaram-se 2,7 ml de tampão P, previamente estabilizado a 37°C, à alíquota de 310 μ l da cultura tratada. Os tubos foram colocados a 37°C por 10 min. A seguir, foram adicionados 600 μ l da solução de *p*-nitrofenil fosfato de sódio dibásico (PNPP) 4 mg/ml a cada tubo. Os tubos foram incubados a 37°C por 3 h. Após este período a reação foi paralisada pela adição de 1 ml de HCl 2,5 M e 1 ml de Tris 2 M. A absorbância do produto formado foi lida a 420 nm.

3.13.4.4. Cálculo da indução da resposta SOS

Primeiramente calcula-se as unidades enzimáticas (UE) de β -galactosidase e fosfatase alcalina para cada tubo segunda a fórmula abaixo (Miller, 1972):

$$\text{U.E.} = 1000 \times A_{420} / \Delta t$$

A_{420} = Valor da absorbância obtido a 420 nm.

Δt = tempo necessário para aparecimento de cor após a adição do substrato (ONPG no ensaio com β -gal e PNPP no ensaio da FA, na incubação a 37°C)

Calcula-se então a razão (R) entre as duas unidades enzimáticas obtidas

$$R = \text{UE } \beta\text{-gal} / \text{UE FA}$$

A seguir é calculado o fator de indução (FI) que permite comparar resultados obtidos em diferentes experimentos.

$$\text{FI} = R(\text{Cn}) / R(\text{Co})$$

Onde R (Cn) = razão de cada concentração da substância ou amostra em teste

R (Co) = razão na concentração zero (controle negativo)

A potência da amostra ou composto químico frente ao Cromoteste costuma ser expressa através do SOSIP ("SOS - inducing potency"), que equivale ao FI avaliado por unidade de massa ou volume do composto analisado. O valor do SOSIP pode ser facilmente obtido pela inclinação da porção retilínea da curva dose-resposta.

4. RESULTADOS

4.1. Lesões oxidativas ao DNA induzidas por ALA *in vitro* e *in vivo*

4.1.1. **Quebras em DNA plasmidial induzidas por ALA na presença de íons Fe^{2+}**

Com o objetivo de verificar se o ALA poderia produzir quebras em DNA utilizamos o DNA plasmidial pBR322 como sistema modelo *in vitro*.

A exposição do plasmídio de fita dupla pBR322 ao ALA, induziu quebras de fita simples no DNA (Figura 5). A porcentagem da forma OC do DNA aumentou de $9,4\% \pm 2,3\%$ no sistema controle para $84,4\% \pm 9,8\%$ na incubação com 3 mM de ALA e $10 \mu\text{M}$ de Fe^{2+} (Figura 5 poços 4 e 9). Peróxido de hidrogênio sozinho, um dos produtos da oxidação do ALA (Hermes-Lima *et al.*, 1991a), não afetou significativamente a produção da forma OC do DNA (Figura 5 poço 2); Fe^{2+} sozinho produziu somente 32% de DNA OC (Figura 5 poço 3). Outro controle contendo o plasmídio e 3 mM de ALA, na ausência de Fe^{2+} , produziu somente 30% de quebras no DNA. Para identificar o mecanismo envolvido nas quebras do DNA, o efeito de interceptores de ROS foi testado e expresso como a porcentagem de inibição da conversão da forma SC para a forma OC. A extensa quebra do DNA induzida por ALA foi consideravelmente reduzida pela adição do quelante de ferro DTPA (74% a 4,5 mM de DTPA, Figura 5 poço 5) ou pela adição de enzimas antioxidantes, catalase (45% a 20 $\mu\text{g/ml}$; Figura 5 poço 6) ou SOD (35% a 10 $\mu\text{g/ml}$; Figura 5 poço 7). O manitol (100 mM) promoveu 81% de proteção contra a formação da forma OC do DNA. Quando o pBR322 foi incubado em tampão fosfato a pH 6,0 ao invés de pH 7,4, a produção de quebras do DNA foi menor (41%, Figura 5 poço 8). Isso está de acordo com o fato de que pH mais alto favorece a enolização do ALA que precede sua oxidação (Monteiro *et al.*, 1989; Jaffe e Rajagopalan, 1990).

A figura 6 mostra que a perda da forma nativa do DNA (SC) depende da concentração de ALA. Com 3 mM ALA, o DNA SC foi quase quantitativamente

convertido na forma OC (84,4% $\pm$ 9,8%). É importante notar que a 0,1 mM de ALA, a concentração presente estimada no fígado de pacientes com AIP, (Pereira *et al.*, 1992), a forma OC do DNA ainda é detectada.

Figura 5: Foto de eletroforese em gel de agarose do plasmídio pBR322 após exposição ao ALA e efeitos da SOD, catalase e DTPA como descritos em *Materiais e Métodos*. O DNA é apresentado na formas supernovelada (SC), circular aberta (OC) e como fragmentos (F). A porcentagem das diferentes

formas do DNA está representada após cada pico nos densitogramas correspondentes.

1: DNA controle; 2: 100 μ M H₂O₂; 3: 10 μ M Fe²⁺; 4: 10 μ M Fe²⁺ e 3 mM de ALA; 5: 10 μ M Fe²⁺, 3 mM de ALA e 4,5 mM de DTPA; 6: 10 μ M Fe²⁺, 3 mM de ALA e 20 μ g/ml de catalase; 7: 10 μ M Fe²⁺, 3 mM de ALA e 10 μ g/ml de SOD; 8: 10 μ M Fe²⁺, 3 mM de ALA em tampão fosfato pH 6,0; 9: 10 μ M Fe²⁺, 3 mM de

ALA. Exceto em 8, as incubações foram feitas a pH 7,4.

Figura 6: Efeito da concentração do ALA na conversão da forma SC do plasmídeo pBR322 para a forma OC. Para cada experimento a quantidade da forma OC do DNA controle foi subtraída. As condições de incubação estão descritas em *Materiais e Métodos*.

A figura 7 mostra que a quebra de fita simples do DNA é inibida pelo aumento das doses de DTPA; uma concentração de 2,5 mM reduziu 55% a quantidade da forma OC. O efeito concentração-dependente do DTPA indica que o mecanismo de danos ao DNA estudado é mediado por íons de metais de

transição. O papel desses íons, particularmente as espécies de ferro, na quebra de fita simples do DNA na presença de H_2O_2 (reação de Fenton) já é há muito tempo conhecido (Nassi-Calo *et al.*, 1989).

Em uma tentativa de verificar o possível dano ao DNA por DOVA, o produto da oxidação do ALA, foi feita a seguinte incubação por 1 h: 3 mM de ALA / 10 μM Fe^{2+} / O_2 puro em tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,8 para acelerar a enolização do ALA e posterior oxidação gerando DOVA. Incubando-se essa solução com pBR322 na presença de 10 $\mu\text{g/ml}$ de SOD e 20 $\mu\text{g/ml}$ de catalase, para prevenir posterior oxidação do ALA não reagido, também foram detectadas quebras no DNA (59% de DNA OC), demonstrando que o DOVA pode estar envolvido no dano ao DNA. De fato, é esperado que o DOVA, sendo um α -cetoaldeído, pode formar adutos de Schiff com proteínas (Medeiros e Bechara, 1986; Vaca *et al.*, 1988) e bases do DNA (Esterbauer *et al.*, 1991), tornando-o sujeito à formação de sítios abásicos e posteriormente à quebras.

Incubação de plasmídio com DOVA puro resultou em quebras de fita simples e dupla no DNA (dados não mostrados- Di Mascio *et al.*, 2000).

Figura 7: Efeito do DTPA na inibição das quebras de fita simples do plasmídeo pBR322 induzidas por ALA (3mM) na presença de Fe^{2+} (10 μM). Os danos ao DNA são expressos em número de quebras por kbp. Para cada experimento a quantidade da forma OC do DNA controle foi subtraída. As condições de incubação estão descritas em *Materiais e Métodos*.

4.1.2. Formação in vitro de 8-oxodGuo em DNA de timo de bezerro induzida por ALA

A medida da base oxidada 8-oxodGuo tem sido muito utilizada como um parâmetro para verificação de ataque ao DNA por ROS em diferentes tipos de

células (Kasai *et al.*, 1986; Fraga *et al.*, 1990). Para investigarmos a capacidade do ALA em promover a formação de 8-oxodGuo, realizamos experimentos *in vitro*, com DNA de timo de bezerro.

A exposição de DNA de timo de bezerro ao ALA induziu a formação de 8-oxodGuo (Figura 8). Antes dos diferentes tratamentos não foram observadas diferenças significativas no DNA quanto à pureza indicada pela relação A_{260}/A_{280} ($1,77 \pm 0,06$) e quanto à produção da hidrólise enzimática. A quantidade de 8-oxodGuo aumentou de 135 ± 15 resíduos/ 10^6 dGuo na ausência de ALA (condições controle) para 1140 ± 150 resíduos / 10^6 dGuo sob a incubação do DNA de timo de bezerro com 5 mM de ALA e 10 μ M de Fe^{2+} . A formação de 8-oxodGuo foi dependente da concentração de ALA (Figura 8). Como mostrado na Tabela I, H_2O_2 sozinho (100 μ M), um dos produtos da oxidação do ALA ou Fe^{2+} sozinho (10 μ M) não afetou a produção de 8-oxodGuo. Quando o DNA foi incubado com 3 mM de ALA na ausência de Fe^{2+} , a produção de 8-oxodGuo aumentou para 752 ± 92 resíduos/ 10^6 dGuo, o que pode ser atribuído ao ferro residual.

Para determinação dos mecanismos envolvidos na oxidação do DNA mediada por ALA, o DNA foi incubado na presença de DTPA, um quelante de metais, e manitol, um seqüestrador de radical $\cdot OH$. A formação de 8-oxodGuo induzida por ALA foi parcialmente inibida por DTPA (45 e 63% de inibição a 2,5 mM e 5 mM de DTPA, respectivamente). Manitol (100 mM) promoveu 69% de proteção contra a formação de 8-oxodGuo.

Figura 8: Formação *in vitro* de 8-oxodGuo após a exposição de DNA de timo de bezerro a diferentes concentrações de ALA. Condições como descritas em *Materiais e Métodos*.

Tabela I: Efeito do ALA *in vitro* sobre a produção de 8-oxodGuo em DNA de timo de bezerro. Condições como descritas em *Materiais e Métodos*. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão e são a média de três experimentos independentes.

Adição	8-oxodGuo (resíduos/10 ⁶ dGuo)
DNA	131,3 $\pm$ 12,0
+ 100 μ M H ₂ O ₂	129,8 $\pm$ 3,0
+ 10 μ M Fe ²⁺	132,0 $\pm$ 9,8
+ 3 mM ALA	752,3 $\pm$ 91,5 ^a
+ 10 μ M Fe ²⁺ + 3 mM ALA	1063,5 $\pm$ 105,8 ^a
+ 10 μ M Fe ²⁺ + 3 mM ALA + 2,5 mM DTPA	647,3 $\pm$ 21,0 ^{a,b}

+ 10 μM Fe^{2+} + 3 mM ALA + 5 mM DTPA	476,3 $\pm$ 21,0 ^{a,b}
+ 10 μM Fe^{2+} + 3 mM ALA + 100 mM manitol	384,8 $\pm$ 8,3 ^{a,b}

^asignificativamente diferente do DNA sozinho

^bsignificativamente diferente do DNA mais 3 mM ALA, 10 μM Fe^{2+}

4.1.3. Formação *in vitro* de outras bases de DNA modificadas em DNA de timo de bezerro tratado com ALA

Apesar de ser um índice de danos oxidativos ao DNA, a 8-oxodGuo não é um bom marcador químico para estudos mecanísticos uma vez que pode ser produzido por uma ampla variedade de oxidantes e processos, incluindo radicais $\cdot\text{OH}$, fotossensitização tipo I e $^1\text{O}_2$ (Kasai *et al.*, 1984; Floyd *et al.*, 1990; Kasai *et al.*, 1992). Deste modo, resolvemos investigar a formação de outros produtos resultantes da degradação de bases caracteristicamente mediada pelo radical $\cdot\text{OH}$.

Os produtos de degradação das bases do DNA de timo de bezerro tratado com ALA foram medidos por HPLC-EC após a digestão enzimática ou pela análise em GC-MS do DNA hidrolisado sob condições ácidas, na presença de padrões internos isotopicamente marcados. Nesta última análise, o procedimento de pré-purificação foi sistematicamente realizado para prevenir a formação de nucleobases oxidadas durante o processo de sililação, a qual é necessária para tornar os componentes de interesse voláteis para análise em GC-MS. Além disso, a hidrólise ácida foi realizada sob condições otimizadas de modo a minimizar a degradação de bases modificadas instáveis como a FapyGua.

A figura 9 mostra as curvas de dose-resposta da formação das bases modificadas mediada por ALA. Os valores obtidos para a concentração de 2 mM de ALA estão relacionados na tabela II.

Figura 9: Curva de dose resposta para a formação de bases de DNA oxidadas em DNA de timo de bezerro exposto ao ALA. Cada valor é a média de três determinações. As barras de erro representam os desvios padrões.

Tabela II: Níveis de bases modificadas em DNA de timo de bezerro incubado com 2 mM de ALA.

Lesões	DNA controle	DNA + 2 mM ALA
8-oxodGuo	5,5 ± 0,7	125 ± 3
FapyGua	18 ± 16	70 ± 6
5-OHCyt	26 ± 13	79 ± 22
5-OHUra	18,5 ± 10	90 ± 24
5-OHdCyd	5,5 ± 0,3	35 ± 10
5-OHdUrd	2,8 ± 0,5	40 ± 5
5-HMUra	2 ± 1	15 ± 6
5-ForUra	4,6 ± 2,8	38 ± 18

8-oxodAdo	4,0 ± 1,2	59 ± 4
-----------	-----------	--------

Expresso em lesões por 10⁶ nucleotídeos, valor médio ± desvio padrão
(n= 3)

As formações de 8-oxodGuo e de FapyGua podem ser racionalizadas em termos da adição inicial de $\bullet\text{OH}$ ao átomo C8 da guanina, seguidas pela respectiva oxidação e redução do radical resultante 8-hidroxi-7,8-dihidroguanil. 8-Oxo-7,8-dihidrodesoxiadenosina é produzida a partir da adenina através de um processo similar envolvendo a oxidação de um radical transiente 8-hidroxi-7,8-dihydroadenil. A abstração do hidrogênio da timina pelo $\bullet\text{OH}$ dá origem ao radical centrado no metil, o qual reage com O₂ produzindo 5-HMUra e 5-ForUra. A 5-hidroxicitosina é produzida pela adição consecutiva de $\bullet\text{OH}$ e uma molécula de oxigênio à dupla ligação C5-C6 da citosina. Isso leva à formação de uma mistura de isômeros *cis* e *trans* de 5,6-dihidroxi-5,6-dihidrocitosina (citosina glicóis). Subseqüentemente, citosina glicóis podem ser convertidos tanto em 5-OHdCyt ou uracil glicóis através de desidratação e deaminação, respectivamente. A desidratação de uracil glicóis origina 5-OHUra.

A oxidação do DNA mediada por ALA foi feita sem a adição de íons metálicos como o Fe²⁺ ou Cu⁺, para evitar a ocorrência de reações paralelas das bases do DNA ou seus radicais transientes (Cadet *et al.*, 1997). Deste modo, os radicais $\bullet\text{OH}$, e/ou as espécies relacionadas, produzidos na oxidação inicial do ALA são provenientes da catálise promovida pelo ferro e pelo cobre presentes na solução e/ou ligados ao DNA. Isso pode explicar a forma das curvas de dose-resposta da formação das bases modificadas mediada por ALA. Na figura 9 pode-se observar que a produção máxima de bases modificadas ocorre com 15 mM de ALA. Além disso, o aumento relativo no nível de bases modificadas foi muito maior nas amostras de DNA tratadas com uma concentração de ALA de 2 mM do que com 15 mM. Um platô na formação de 8-oxodGuo também foi observado em DNA isolado tratado com ALA (Figura 8). Isso aconteceu com concentrações de 2 a 5 mM de ALA na presença de 10 μM de Fe²⁺ ou acima de 1 mM na presença de 20 μM de Cu⁺ (Hiraku e Kawanishi, 1996). Tal resultado

poderia ser explicado, na ausência da adição de metais de transição na incubação, pela disponibilidade limitada de metal ligado ao DNA. Deste modo, não se espera uma produção dose-dependente de radicais $\cdot\text{OH}$ em altas concentrações de ALA (15 e 30 mM) pois este torna-se um substrato competitivo do DNA. Conseqüentemente, em altas concentrações de ALA, a produção de danos ao DNA diminui. Uma explicação alternativa a ser considerada é a possibilidade de dimerização do ALA levando à formação do derivado dihidropirazina (Hiraku e Kawanishi, 1996). A quantidade relativa de ALA livre é muito menor na concentração de 30 mM do que na de 2 mM. Deste modo, a concentração de 2 mM de ALA foi a utilizada para determinar o nível de bases modificadas nas amostras de DNA de timo de bezerro (Tabela II).

4.1.4. Formação *in vivo* de 8-oxodGuo e 5-OHdCyd em DNA de órgãos de ratos tratados com ALA

Para verificar se o ALA poderia produzir lesões oxidativas também *in vivo*, medimos a quantidade de 8-oxodGuo em fígado, rins e baço e 5-OHdCyd em fígado, de ratos tratados com ALA.

Nenhuma diferença significativa no peso corporal e dos órgãos foi observada entre os ratos tratados com ALA e os controles, durante o período de duas semanas. A qualidade do DNA do fígado, avaliada pela relação A_{260}/A_{280} ($1,84 \pm 0,03$) e pela produção enzimática, foi similar para ambos os grupos. Utilizando a metodologia I descrita em *Materiais e Métodos*, o nível de 8-oxodGuo em equilíbrio estacionário encontrado no DNA de fígado ($94,5 \pm 23,3$ resíduos/ 10^6 dGuo ou $71,3$ fmol 8-oxodGuo/ μg de DNA) foi significativamente maior (4,5 vezes, $p < 0,05$) nos animais cronicamente tratados com ALA do que nos ratos controle ($21 \pm 7,5$ resíduos/ 10^6 dGuo ou $15,8$ fmol 8-oxodGuo/ μg de DNA) (Figura 10). Nenhum efeito no nível de 8-oxodGuo foi observado no DNA do fígado dos animais sacrificados 24 h após uma única injeção (tratamento agudo).

Figura 10: Níveis de 8-oxodGuo em DNA de fígado de ratos tratados cronicamente com ALA. Condições como descritas em *Materiais e Métodos*. Valores representam a média de nove animais diferentes $\pm$ desvio padrão. Grupo tratado é significativamente diferente do controle ($p < 0.05$).

A detecção de 8-oxodGuo em fígado de ratos tratados cronicamente com ALA foi confirmada utilizando a metodologia II. A quantidade de 8-oxodGuo medida no DNA de fígado dos ratos tratados foi de $23,2 \pm 1,8$ resíduos/ 10^6 dGuo e $14,2 \pm 3,0$ resíduos/ 10^6 dGuo no controle. Esse resultado foi estendido a outros órgãos como o baço e os rins obtendo-se os valores de $14,0 \pm 2,5$ resíduos/ 10^6 dGuo e $58,2 \pm 16,2$ resíduos/ 10^6 dGuo, respectivamente para os ratos tratados (Tabela III). Como já citado, a medida de 8-oxodGuo não é um bom marcador para estudos mecanísticos; desse modo, o nível de 5-OHdCyd também foi determinado no fígado dos ratos tratados com ALA. Foi obtida uma quantidade três vezes maior dessa base modificada no DNA de fígado de ratos tratados ($3,5 \pm 1,8$ resíduos/ 10^6 dCyd) em relação aos controles ($1,0 \pm 0,3$ resíduos/ 10^6 dCyd). Foram feitas tentativas de medir a quantidade de 5-OHdCyt, 5-OHUra, 5-HMUra e 5-ForUra por GC-MS otimizado, mas a sensibilidade do

método (aproximadamente 5 lesões por 10^6 bases normais em 200 μg de DNA) foi muito baixa para detectar a formação de qualquer uma das bases oxidadas.

Tabela III: Níveis de bases oxidadas em DNA de órgãos de ratos tratados com ALA.

Or	Baço	Rins	Fígado	
Le	8-	8-	8-	5-
Co	7,6 $\pm$ 0,25	15,2 $\pm$ 3,0	14,2 $\pm$	1,0 $\pm$ 0,3
Tr	14,0 $\pm$ 2,5	58,2 $\pm$	23,2 $\pm$	3,5 $\pm$ 1,8

Expresso em lesões por 10^6 nucleotídeos, valor médio $\pm$ desvio padrão (n= 3)

4.1.5. Participação da ferritina nas quebras de DNA plasmidial pBR322 promovidas por ALA

Levando em consideração que o ALA induz liberação de Fe^{2+} de ferritina (Oteiza *et al.*, 1995; Rocha *et al.*, 2000), e que este pode participar das quebras promovidas pelo ALA; testamos a capacidade do ALA de danificar o DNA na presença de ferritina. A exposição do plasmídeo pBR322 ao ALA na presença de ferritina induziu a formação de quebras de simples fita, como mostrado nas figuras 11A e 11B. A porcentagem conjunta da forma OC e da forma linear aumentou de 11% no controle contendo apenas 3 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ de ferritina para 42% sob incubação com 1 mM de ALA. A ferritina sozinha não afetou significativamente a proporção da forma OC (Figura 11A, poço 3). A figura 11B mostra que a perda da forma SC do DNA depende somente da concentração de ferritina para uma certa concentração de ALA. Em concentrações de 20 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ de ferritina e 3 mM de ALA, a forma SC foi quase totalmente convertida nas formas OC e L (Figura 12, poço 3). A presença de ferritina na incubação exerce um aumento significativo na quebra do DNA induzida pela reação de oxidação

do ALA. No entanto, podemos notar que na concentração de ferritina de 1 $\mu\text{g}/100\ \mu\text{l}$, a forma OC ainda pode ser detectada (Figura 11A, poço 4). A concentração de ferritina no fígado humano é alta, cerca de 2,4 mg por grama de tecido liofilizado (Dubiel *et al.*, 1999). As quebras no DNA promovidas por ALA foram reduzidas pela adição de EDTA a concentração de 1 mM (Figura 12, poço 5). Esse último resultado evidencia a ocorrência de uma liberação eficiente de íons Fe^{2+} da ferritina que podem promover uma reação do tipo Fenton, aumentando a formação de quebras de fita simples e dupla no DNA. Um efeito protetor também foi observado pela adição de 5 mM de espermidina (Figura 12, poço 4). Postula-se que a espermidina esteja associada ao DNA no núcleo e exerça efeito protetor contra ataques de ROS (Douki *et al.*, 2000)

Figura 11: Formação de quebras de fita em DNA de plasmídio pBR322 após a exposição a diferentes quantidades de ferritina (0-5 μg) na presença de 1 mM de ALA conforme descrito em *Materiais e Métodos*. O DNA apresenta-se nas formas SC (superenovelada, forma nativa), OC (circular aberta, resultante de quebras de fita simples) e L (linear, resultante de quebras de dupla fita).

A: Foto da eletroforese em gel de agarose; poço 1: DNA controle; poço 2: DNA mais 1 mM de ALA; poço 3: DNA mais 3 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ de ferritina; poços 4 a 8: DNA mais 1 mM de ALA e 1, 2, 3, 4 e 5 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ de ferritina, respectivamente.

B: Porcentagem de forma SC, OC e L do plasmídio tratado com diferentes quantidades de ferritina. Os valores foram obtidos a partir da integração das bandas do gel de eletroforese mostrada na figura 11A.

Figura 12: Foto da eletroforese em gel de agarose do DNA do plasmídeo pBR322 após o tratamento com ALA e ferritina na presença de espermidina e EDTA. Poço 1: DNA controle; poço 2: DNA mais 3 mM de ALA; poço 3: DNA mais 3 mM de ALA e 20 µg/100 µl de ferritina; poço 4: DNA mais 3 mM de ALA, 20 µg/100 µl de ferritina e 5 mM de espermidina; poço 5 : DNA mais 3 mM de ALA, 20 µg/100 µl de ferritina e 1 mM de EDTA; poço 6: DNA mais 1 M de EDTA; poço 7: DNA mais 5 mM de espermidina. As condições experimentais estão descritas em *Materiais e Métodos*.

4.1.6. Formação de 8-oxodGuo em dGuo e DNA de timo de bezerro promovida por ALA na presença de ferritina

A medida de 8-oxodGuo em dGuo tratada com ALA na presença de ferritina também foi medida. A figura 13 mostra que a quantidade de 8-oxodGuo aumentou na presença de ferritina (1-20 µg/100 µl) na incubação contendo dGuo. O tratamento de DNA de timo de bezerro com desferral e EDTA para reduzir a quantidade de ferro ligado ao DNA, diminuiu a formação de 8-oxodGuo (Figura 14). A capacidade do ALA de oxidar o DNA na presença de ferritina fornece mais uma evidência da importância biológica da oxidação do ALA catalisada por metais de transição nas lesões ao DNA.

Figura 13: Níveis de 8-oxidGuo em dGuo tratada com 3 mM de ALA e diferentes concentrações de ferritina (1-20 μg/100 μl). **C1** corresponde ao dGuo sozinha, **C2** a dGuo incubada com 3 mM de ALA e **C3** a dGuo incubada com 20 μg/μl de ferritina. As condições de incubação estão descritas em *Materiais e Métodos*.

Figura 14: Níveis de 8-oxodGuo em DNA de timo de bezerro tratados (T) ou não (NT) com desferral. O controle (C) corresponde ao DNA não tratado incubado na presença de 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de ferritina. O tratamento 1 corresponde à incubação do DNA tratado (T1) e não tratado (NT1) na presença de 3 mM de ALA e 5 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ de ferritina e o tratamento 2 à incubação do DNA tratado (T2) e não tratado (NT2) na presença de 3 mM de ALA e 10 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ de ferritina.

4.2. Formação de adutos entre 2'-desoxiguanosina e o ácido 4,5-dioxovalérico

Vários aldeídos têm sido estudados quanto a sua reatividade ao DNA e têm sido identificados como eficientes agentes alquilantes de bases, como o MDA (Basu *et al.*, 1988; Chaudhary *et al.*, 1994; Vaca *et al.*, 1992), acetaldeído (Vaca *et al.*, 1995; Fang e Vaca, 1997) compostos dicarbonílicos (Shapiro e Hachmann, 1966; Shapiro *et al.*, 1968) e uma série de aldeídos α - β insaturados (Chung *et al.*, 1984; Winter *et al.*, 1986; Eder *et al.*, 1993; Nath e Chung, 1994; Douki e Ames, 1994; Carvalho *et al.*, 1998, 2000; Loureiro *et al.*, 2000). Na maioria dos casos, o principal sítio reativo é o grupo amino exocíclico da guanina que é a base mais nucleofílica do DNA. Considerando esses estudos, resolvemos investigar a reatividade do produto final da oxidação do ALA, o ácido 4,5-dioxovalérico (DOVA), com a base dGuo, no intuito de verificar se esse composto também poderia estar envolvido nas lesões ao DNA promovidas pelo ALA.

4.2.1. Adição do DOVA na dGuo e redução dos produtos de reação

A reação entre DOVA e dGuo levou à formação de dois produtos principais (adutos 1 e 2) que foram separados por HPLC de fase reversa. Os espectros de absorção UV dos compostos 1 e 2 foram muito semelhantes ao da dGuo com um pequeno desvio para o vermelho de aproximadamente 5 nm (Figura 15).

Figura 15: Espectro de absorção UV da dGuo e dos adutos DOVA-dGuo 1 e 2.

As tentativas de isolar os compostos 1 e 2 falharam devido à decomposição rápida apresentada pelos compostos com um tempo de reação médio de 25 min a pH 7,0 a temperatura ambiente. Os cromatogramas de HPLC das soluções obtidos após o isolamento e a decomposição tanto do composto 1 como do 2 foram idênticos e similares àqueles obtidos da mistura de reação

original. Esta observação indica que a decomposição dos compostos 1 e 2 leva a uma liberação tanto de dGuo quanto de DOVA que se tornam, deste modo, capazes de reagir entre si. Esses resultados sugerem que os produtos de incubação do DOVA com a dGuo são adutos cuja reação de formação é reversível em água. A identificação dos produtos reduzidos de 1 e 2 mostrou que a base de Schiff envolve a cetona em C4* do DOVA. A similaridade entre a eficiência de formação, o comportamento cromatográfico e o espectro UV sugerem que 1 e 2 sejam diastereoisômeros. Infelizmente, a instabilidade dos adutos não permitiu estudos espectroscópicos mais aprofundados que levariam a uma caracterização mais completa. Também não foi possível determinar se a desidratação da ligação -NH-CHOH- leva à formação de uma base de Schiff ocorrida antes ou depois da ciclização do aduto. No último caso, um composto exibindo uma estrutura similar aos dos produtos obtidos pela adição tanto do glioal, quanto dos seus derivados, à dGuo poderia ser um intermediário na formação de 1 e 2.

Esquema II: Estrutura e formação dos adutos DOVA-dGuo e seus produtos de redução.

A reação de mistura de dGuo e DOVA foi tratada com NaBH₄ de maneira a estabilizar a base de Schiff dos adutos 1 e 2 pela redução da função amina secundária. Dois produtos adicionais, correspondentes aos compostos 3 e 4 foram obtidos por HPLC (Figura 16). Foi observado claramente que a formação dos produtos 3 e 4 está associada com a diminuição de 1 e 2. Quando utilizamos pequenas quantidades do nucleosídeo, a redução de 1 e 2 pelo excesso de NaBH₄ foi quantitativa. No entanto, quando utilizamos miligramas da incubação DOVA-dGuo, a produção foi limitada a cerca de 50%. Isso pode ser

explicado pelo fato de que grandes quantidades de sais são produzidas pela adição sucessiva de NaBH_4 e HCl . Esses compostos exibiram espectros em UV similares àqueles dos adutos 1 e 2 (Figura 17). A principal diferença entre os compostos 1 e 2 e seus análogos reduzidos foi a alta estabilidade de 3 e 4. Esses compostos permaneceram estáveis por mais de três dias em solução aquosa a temperatura ambiente.

Figura 16: Cromatogramas obtidos em HPLC com detecção UV. **A:** reação da mistura entre DOVA e dGuo e **B:** produtos de redução por NaBH_4 . Condições descritas em *Materiais e Métodos*.

Figura 17: Espectro de absorção em UV dos adutos DOVA-dGuo reduzidos (3 e 4) e seu produto de hidrólise (aduto 5).

4.2.2. Caracterização dos adutos reduzidos

4.2.2.1. Análises por GC/MS, ESI-MS e espectroscopia de infravermelho

Os adutos reduzidos 3 e 4 foram analisados separadamente por GC/MS seguido de trimetilsililação. Os espectros de massa (Figura 18) obtidos para os derivativos TMS de ambos os adutos DOVA-dGuo reduzidos foram muito similares, sugerindo mais uma vez que 3 e 4 são diastereoisômeros. A identificação do pico a $m/z=653$ como o íon molecular foi confirmado pela observação da perda do fragmento metil ($m/z=638$) que representa a fragmentação clássica para compostos trimetilsililados. Um íon a $m/z=393$ (e seu derivado demetilado) correspondente à base protonada do nucleosídeo também estava presente entre os principais picos do espectro de massa. O peso molecular de 653 Da pode ser explicado pela adição de quatro grupos trimetilsilil à 3 e 4 e uma perda adicional de uma molécula de água. Essa segunda desidratação pode ser explicada tanto por uma esterificação intramolecular quanto por uma amidação do grupo ácido carboxílico no DOVA, durante a etapa de sililação. Deve ser mencionado que a análise em GC/MS após a acetilação e derivatização por BSFTA de 3 e 4 forneceu os espectros de massa da base diacetilada e disililada com uma cadeia aberta para o DOVA. Isso pode ser explicado pela acetilação dos grupos hidroxila e amina secundária do DOVA o que torna impossível a reação desses grupos com o ácido carboxílico durante a sililação.

Os produtos 3 e 4 foram caracterizados como dois diastereoisômeros dos produtos reduzidos da base de Schiff produzida pela adição do DOVA ao grupo N^2 -amino da dGuo. O peso molecular de 3 e 4 foi de 383 como inferido pela análise de ESI-MS (Figura 19). Isso pode ser entendido como um aduto DOVA-dGuo 1:1 que perdeu uma molécula de água e ganhou quatro átomos de hidrogênio. Esse último ganho é consistente com a redução da base de Schiff e do grupo carboxílico restante do DOVA. A perda de uma molécula de água ocorre devido à formação da base de Schiff. De fato, os dados (não mostrados)

do infravermelho mostraram que um grupo carboxilato está presente na molécula ($\nu=1605\text{ cm}^{-1}$). Duas bandas de vibração foram observadas na região da carbonila: $\nu\text{ (cm}^{-1}\text{)}$ 1682 (C=O da guanina), 1605 ($-\text{COO}^-$). Esses resultados sugerem uma esterificação intramolecular ou uma amidação do grupo carboxilato como uma explicação alternativa para a perda de água na formação de 3 e 4.

Figura 18: Espectro de massas por impacto de elétrons do aduto 4 DOVA-dGuo reduzido tetrasililado obtido por análise em GC/MS.

Figura 19: Espectro de massas em tandem obtido por ionização por eletrospray dos adutos DOVA-dGuo 3 e 4 isolados em HPLC. O espectro representa os íons filhos do íon pai a $m/z = 384$ ($[M+H]^+$). dR- 2-desoxiribose Gua-guanina.

4.2.2.2. Análise por 1H -RMN e ^{13}C -RMN

Os espectros dos adutos reduzidos 3 e 4 obtidos na análise por 1H -RMN, foram quase idênticos (Tabela IV e Figura 20), como havia sido também observado nas análises com espectroscopia de massas. As diferenças nos respectivos deslocamentos químicos dos prótons de 3 e 4 foram menores que 0,05 ppm e a multiplicidade de todos os sinais foram idênticos para ambos os compostos. Observou-se também sinais correspondentes aos prótons da hidroxila não trocáveis da 2-desoxiribose, inferidos pelo experimento de COSY 2D (Tabela V), confirmando que 3 e 4 são derivados de nucleosídeo. A similaridade entre as características do espectro de 1H -RMN do anel da 2-desoxiribose da dGuo e do espectro dos adutos 3 e 4 também foi encontrada no espectro de ^{13}C -RMN (Tabela VI).

TABELA IV: ^1H -RMN - deslocamentos químicos (em ppm com relação a HOD fixado em 4,9 ppm) dos adutos reduzidos DOVA-dGuo 3 e 4 e seu produto de hidrólise (aduto 5) (400 MHz, D_2O).

Próton	Aduto 3	Aduto 4	Aduto 5	dGuo
H1'	6.45 (m)	6.45 (m)		6.40 (m)
H2'	3,07 (m)	3.02 (m)		2.89 (m)
H2''	2.45 (m)	2.63 (m)		2.62 (m)
H3'	4.77 (m)	4.74 (m)		4.74 (m)
H4'	4.17 (m)	4.18 (m)		4.24 (m)
H5'	3.93 (dd)	3.92 (dd)		3.92 (dd)
H5''	3.82 (dd)	3.83 (dd)		3.87 (dd)
H8	8.04 (s)	8.07 (s)	7.97 (s)	8.09 (s)
H4*	4.21 (m)	4.25 (m)	4.13 (m)	
H5*	3.85 (dd)	3.85 (dd)	3.84 (dd)	
	3.75 (dd)	3.75 (dd)	3.72 (dd)	
H2*	2.45 (t)	2.46 (t)	2.45 (t)	
H3*	2.04 (m)	2.09 (m)	2.05 (m)	
H3*	1.93 (m)	1.93 (m)	1.95 (m)	

*: prótons do DOVA estão numerados da mesma maneira do ácido livre.

Figura 20: Espectro de ^1H -RMN a 400 MHz do aduto 3 DOVA-dGuo reduzido. O espectro foi feito em D_2O (HOD foi utilizado como referência secundária a 4,6 ppm)

É importante mencionar que os deslocamentos químicos dos prótons $\text{H}5'$, $\text{H}5''$ e $\text{H}3'$ no espectro de ^1H -RMN e dos carbonos $\text{C}5'$ e $\text{C}3'$ no ^{13}C -RMN foram similares aos obtidos a partir da dGuo não modificada. O sinal do átomo do hidrogênio H8 dos adutos 3 e 4 exibiu um deslocamento químico similar ao da dGuo (Tabela IV). Além disso, os respectivos valores de deslocamentos químicos dos átomos de carbono do anel púrico de 3 e 4, determinados por ^{13}C -RMN (Tabela VI) e também por análises do acoplamento heteronuclear ^1H - ^{13}C a curta e longa distâncias (Tabela V), foram similares àqueles observados para dGuo. Essas observações, juntamente com a alta similaridade entre os espectros de ultravioleta de 3 e 4 e da dGuo (Figura 17), sugerem de maneira consistente que o anel púrico não é modificado pela reação de adição. Evidências da alquilação do grupo amino exocíclico da guanina foram obtidas pela observação da perda do sinal correspondente (6,47 ppm para dGuo) no

espectro de ^1H -RMN obtido em $\text{DMSO}-d_6$ (não mostrado). No entanto, um próton trocável foi observado em $\delta=6,85$ ppm. O valor relativamente alto do deslocamento químico dessa ressonância é mais consistente com um NH do que um próton OH. Deste modo, podemos considerar o envolvimento do grupo amino exocíclico na reação inicial com DOVA. Além disso, o próton amino exibe um acoplamento escalar com o próton metínico vicinal $\text{H}-\text{C}4^*$, como foi inferido pela análise do ^1H -RMN 2D-COSY (Tabela V).

Podemos concluir então que a adição inicial do grupo amino da guanina ocorre na função cetona do DOVA. De fato, o NH deveria estar ligado ao grupo metileno, ressonando como um tripleto no caso da adição na função aldeído. Esta função é convertida no grupo hidrometil na redução com NaBH_4 .

A estrutura proposta também confere com as características do GC/MS dos adutos 3 e 4. Se a lactamização ocorresse com esses compostos durante a reação de derivatização, os derivativos sililados resultantes exibiriam um grupo hidroximetil trimetilsililado. A perda desse fragmento poderia contribuir para a perda predominante de 103 uma observada no espectro de GC/MS (Figura 18).

Além disso, evidências para a presença de um grupo $-\text{CH}_2-\text{O}-$ na posição 5^* do DOVA foram obtidas a partir dos dois sinais observados em 3,8 ppm no espectro de ^1H -RMN de 3 e 4 ($J_{5^*a,5^*b} = -20,8$ Hz, $J_{4^*,5^*a} = 4,4$ Hz, $J_{4^*,5^*b} = 5,9$ Hz). O deslocamento químico do próton $\text{H}4^*$ (4,21 ppm) também está de acordo com a presença de amina secundária vicinal. Os sinais dos grupos metilenos 2^* e 3^* estão localizados a 2,45 ($J_{2^*,3^*} = 7,1$ Hz) e em torno de 2 ppm ($J_{3^*a,3^*b} = -16,7$ Hz, $J_{3^*b,4^*} = 7,2$ Hz) respectivamente. Essas atribuições foram confirmadas pelas correlações observadas no experimento de acoplamento homonuclear ^1H - ^1H COSY (Tabela V). Além disso, experimentos de acoplamento heteronuclear ^1H - ^{13}C , a curta e longa distâncias (Tabela V), forneceram valores de deslocamentos químicos para os átomos de carbono da porção DOVA de 3 e 4 que são consistentes com a estrutura proposta. As ressonâncias de $\text{C}2^*$ e $\text{C}3^*$ na região de baixo campo estão de acordo com suas atribuições como grupos metilenos ligados a dois outros átomos de carbono. Os altos valores de deslocamento químico dos carbonos $\text{C}5^*$ e $\text{C}4^*$ podem ser devido à ligação de um heteroátomo

a ambos. A presença do sinal de C1* na região de baixo campo (177,1 ppm) do espectro confirma que a etapa de redução por NaBH₄ não modificou o ácido carboxílico do DOVA.

O nome oficial do aduto reduzido formado entre o DOVA e a dGuo é ácido 4-[[9- (2-deoxi-β-D-eritro-pentofuranosil)- 6,9-dihidro-6-oxo-1H-purina-2-il] amino] -5-hidroxicarboxílico.

TABELA V: Correlação de prótons não-trocáveis observados em experimentos 2D feitos em DMSO-*d*₆ na mistura dos adutos 3 e 4.

Próton	COSY ¹ H- ¹ H	curta distância ¹ H- ¹³ C	longa distância ¹ H- ¹³ C
H1'	H2', H2''	C1'	C8, C4, C3'
H2'	H1', H2'', H3'	C2'	C1', C3', C4'
H2''	H1', H2', H3'	C2'	C3', C4'
H3'	H3', H4'	C3'	
H4'	H3', H5', H5''	C4'	C1', C4'
H5'	H4', H5''	C5'	C1', C3'
H5''	H4'	C5'	C3', C4'
H8		C8	C4, C5, C6
H2*	H3*	C2*	C1*, C3*, C4*
H3*	H2*, H4*	C3*	C1*, C2*, C4*, C5*
H4*	H3*, H5*, NH	C4*	
H5*	H4*	C5*	C4*

TABELA VI: ^{13}C -RMN - deslocamentos químicos dos adutos 3 e 4 entre DOVA-dGuo e da dGuo sozinha.

Carbono	Resultado do DEPT	Aduto 3 ^a	Aduto 4 ^b	Adutos 3+4 ^c	dGuo ^a
C1'	CH	85.4	85.0	82.6	83.2
C2'	CH ₂	39.2	39.2	41.3	40.0
C3'	CH	72.2	72.2	70.7	71.2
C4'	CH	87.9	87.9	87.4	88.0
C5'	CH ₂	62.8	62.7	61.7	62.1
C2	-	153.7	n. d.	152.6	154.1
C4	-	n. d.	n. d.	151.6	151.4
C5	-	111.1	n. d.	116.6	117.0
C6	-	160.3	n. d.	157.9	157.5
C8	-	138.0	n. d.	135.5	136.1
C1*	-	n. d.	n.d.	177.1	-
C2*	<u>C</u> H ₂	34.2	33.9	n. d.	-
C3*	<u>C</u> H ₂	28.2	28.0	26.8	-
C4*	<u>C</u> H	53.7	53.7	51.7	-
C5*	<u>C</u> H ₂	64.6	64.6	62.2	-

*: carbonos do DOVA estão numerados da mesma maneira que no ácido livre.
n.d.: não detectado b: a 100 MHz, em D₂O (deslocamentos químicos expressos em relação ao metanol como referência interna) c: a 100 MHz, em DMSO-*d*₆ (deslocamentos químicos expressos em relação ao TMS como referência interna)

4.2.3. Detecção dos adutos DOVA-dGuo em DNA de timo de bezerro

A padronização da análise dos adutos DOVA-dGuo em DNA de timo de bezerro foi feita em duas etapas preliminares. A primeira foi a otimização das condições da hidrólise ácida do nucleosídeo. O uso de HCl 0,1 N a 50°C permitiu a liberação quantitativa da base modificada de 3 e 4. O espectro de absorção de UV do produto da hidrólise (aduto 5) foi similar aqueles dos nucleosídeos modificados 3 e 4 (Figura 17). A observação de que a hidrólise dos adutos reduzidos 3 e 4 levou à formação de compostos que coeluíram foi uma indicação adicional que esses adutos são diastereoisômeros. De fato, a hidrólise deu origem aos enantiômeros correspondentes.

Devido a eletroatividade apresentada pelo composto resultante da hidrólise, foi possível a detecção do aduto DOVA-dGuo hidrolisado 5. A faixa de potencial estudada para a determinação de um eletrovoltamograma do composto 5 não permitiu alcançar um platô para a resposta eletroquímica (Figura 21). O potencial de detecção foi limitado a +850 mV para evitar um grande aumento da corrente basal. No entanto, o limite de detecção foi de cerca de 10 pmol, o método poderia então ser utilizado para detectar adutos em experimentos *in vivo*, onde a quantidade de DNA lesado provavelmente seria bem menor.

DNA de timo de bezerro isolado foi incubado com DOVA e posteriormente reduzido por NaBH₄, de modo a estabilizar os adutos DOVA-dGuo. O DNA foi então hidrolisado em nucleosídeos pela incubação sucessiva com Nuclease P1 e fosfatase alcalina. A mistura resultante foi injetada em um sistema de HPLC e a fração correspondente ao tempo de retenção dos adutos DOVA-dGuo foi

coletada. Este passo de purificação foi realizado para retirada da grande quantidade de sais produzida pela etapa da redução e para remover a dGuo da amostra. De fato, a dGuo poderia ser hidrolisada em guanina a qual é eletroativa no potencial usado para a detecção do aduto 5 reduzido e hidrolisado. Devido ao excesso de guanina não reagida no DNA, sua presença poderia interferir na análise do HPLC-EC. Vale a pena mencionar que os dois picos, com tempos de retenção similares aqueles dos adutos 3 e 4 foram observados no cromatograma de UV do DNA digerido enzimaticamente (dados não mostrados). A fração purificada correspondente foi então hidrolisada sob condições ácidas e analisadas em HPLC com detecção eletroquímica e ultravioleta. Tanto o perfil de eluição monitorado pela absorção UV quanto pela detecção eletroquímica exibiram um pico correspondente ao aduto 5 reduzido e hidrolisado (Figura 22). A identificação do produto eletroativo relacionado também foi feita pela observação da razão entre os sinais no UV e no EC de maneira similar àquela obtida com o composto 5 autêntico. Além disso, o composto observado nos cromatogramas de HPLC coeluíram com o autêntico aduto 5 reduzido e hidrolisado. Juntos, esses dados demonstraram que os adutos DOVA-dGuo são produzidos em DNA isolado. A taxa de modificação determinada foi de cerca de 1300 adutos por 10^6 nucleotídeos normais. No entanto, este valor pode ter sido subestimado uma vez que não se pode ter nenhuma comprovação de que a etapa de redução com NaBH_4 foi completa.

Figura 21: Eletrovoltamograma do aduto DOVA-dGuo reduzido e hidrolisado (aduto 5). EC: detecção eletroquímica. UV: detecção ultravioleta.

Aduto 5 hidrolisado

Figura 22: Cromatogramas de HPLC com detectores ultravioleta (UV) e eletroquímico (EC) do DNA de timo de bezerro tratado com DOVA (dois painéis superiores). O painel inferior mostra o cromatograma da detecção eletroquímica correspondente à mesma amostra de DNA com adição de 500 pmol do aduto DOVA-dGuo 5 puro, reduzido e hidrolisado.

4.3. Detecção de ácido 4,5-dioxovalérico por cromatografia líquida de alta pressão acoplado a detector de fluorescência

No intuito de detectar o DOVA formado na oxidação do ALA catalisada por metais, estabelecemos uma metodologia baseada na formação de derivados quinoxalino, comumente utilizados na análise de α -dialdeídos (Maroulis *et al.*, 1985, Hara *et al.*, 1988, McLellan e Thornalley, 1992).

Devido à alta reatividade dos α -cetoaldeídos, a reação entre o DOVA e o 2,3-diaminonaftaleno (DAN) levou à formação do ácido 3-(benzo[g]quinoxalinil-2)propiónico (BZQ) (Figura 23) o qual foi separado por HPLC de fase reversa (Figura 24). O método desenvolvido permitiu o isolamento do BZQ sem pré-purificação para retirada do excesso de DAN, antes de ser submetido às análises espectrofotométricas (Porra *et al.*, 1980a e 1980b). A determinação qualitativa do BZQ foi feita por HPLC acoplado a detectores UV e de fluorescência em série.

Figura 23: Formação e estrutura do derivado benzoquinoxalino (BZQ) pela condensação do 2,3-diaminonaftaleno (DAN) com ácido 4,5-dioxovalérico (DOVA).

Figura 24: Cromatogramas de detectores ultravioleta ($\lambda=268$ nm) e de fluorescência ($\lambda_{\text{emissão}}=558$ nm e $\lambda_{\text{excitação}}=366$ nm) do composto BZQ formado entre o DOVA e o DAN obtido em sistema de HPLC conforme descrito em *Materiais e Métodos*. Os valores de absorbância e fluorescência são expressos em unidades arbitrárias (UA).

Para o estabelecimento da metodologia, primeiramente foi feita uma otimização das condições de HPLC para a detecção do derivado DOVA-DAN. Iniciamos com as condições de análise descritas por Dörnemann e Senger (1980). O pico correspondente ao produto da reação, BZQ, foi observado no

detector UV a um tempo de retenção de 9,8 min, enquanto o excesso de DAN eluiu a 26,6 min. Nos comprimentos de ondas de excitação ($\lambda=350$ nm) e emissão ($\lambda=540$ nm) escolhidos, somente o BZQ foi identificado no tempo de retenção de 10,4 min no detector de fluorescência (Figura 24).

Variando-se o tempo de incubação do DOVA e do DAN, observou-se um aumento da área do pico correspondente ao BZQ, sendo que após 50 min a quantidade do produto parece estabilizar (Figura 25).

Figura 25: Efeito do tempo de incubação do DOVA com o DAN sobre a quantidade de BZQ formada. O gráfico foi obtido a partir das áreas do pico correspondente ao BZQ no cromatograma de fluorescência em HPLC. A fluorescência do pico correspondente ao BZQ é expressa em unidades arbitrárias (UA).

A curva de calibração para a fluorescência do DOVA derivatizado padrão pode ser representada pela equação $Y=62,1 \times 10^4 X$ e para a curva no UV por $Y=3,8 \times 10^4 X$. A linearidade das curvas foi avaliada pelos coeficientes de correlação linear para as curvas UV e fluorescência: 0,993 e 0,998, respectivamente, na faixa de 5-60 μ M. O limite de detecção para o DOVA em Tris-

HCl foi de 100 fmol, baseado na razão sinal/ruído de 3. A figura 26, mostrando o efeito da concentração do DOVA na incubação com DAN, demonstra a maior sensibilidade do detector de fluorescência em relação ao ultravioleta.

Figura 26: Efeito da concentração de DOVA na incubação com DAN. A curva foi obtida a partir das áreas do pico correspondente ao BZQ do cromatograma de fluorescência e de UV em HPLC.

O espectro de UV do BZQ foi similar ao obtido por Dörnemann e Senger(1980) com uma absorbância máxima a 268 nm (Figura 27).

A formação do derivado BZQ também foi acompanhada por espectroscopia de massas (Figura 28). O pico obtido em m/z 122 corresponde a $[\text{Tris}+\text{H}]^+$, em m/z 159 ao $[\text{DAN} + \text{H}]^+$ e em m/z 253 ao composto $[\text{BZQ}+\text{H}]^+$.

Figura 27: Espectro de absorvância (em unidades arbitrárias - UA) do composto BZQ obtido no detector “diode array” no sistema de HPLC conforme descrito em *Materiais e Métodos*.

Figura 28: Espectro de massa obtido por ionização por eletrospray do composto benzoquinoxalino formado pela condensação do 2,3-diaminonaftaleno com ácido 4,5-dioxovalérico. As condições estão descritas em *Materiais e Métodos*.

O desenvolvimento dessa metodologia nos permitiu medir a formação do DOVA como produto final da oxidação do ALA na presença de íons Fe^{2+} e de ferritina. Essa determinação é importante uma vez que o DOVA pode reagir com bases do DNA, como foi demonstrado para a dGuo. Ácido 5-aminolevulínico (100 μM) na presença de Fe^{2+} (20 μM) levou à formação de DOVA (8 μM), medido através da integração da área do pico de BZQ.

4.4. Danos em DNA mitocondrial de células tratadas com ALA

As ROS formadas na respiração celular e durante processos patológicos podem contribuir para os danos ao DNA mitocondrial e alterações na estrutura da mitocôndria que afetam a bioenergética celular (Richter *et al.*, 1995). Esses processos têm sido relacionados a várias patologias humanas (Luft, 1995; Richter *et al.*, 1995; Morgan-Hughes *et al.*, 1995), inclusive ao desenvolvimento do câncer (Shay e Werbin, 1987; Bandy e Davison, 1990).

Vários estudos anteriores relataram danos estruturais à mitocôndria promovidos pelo ALA (Hermes-Lima *et al.*, 1991a; Hermes-Lima *et al.*, 1992; Vercesi *et al.*, 1994 e Hermes-Lima, 1995). Desse modo, resolvemos investigar se o ALA estaria levando também a danos ao DNA mitocondrial. Para realizar esses experimentos utilizamos a técnica de reação quantitativa em cadeia da polimerase (QPCR).

4.4.1. Danos em DNA mitocondrial e nuclear de células SVNF tratadas com ALA

Como um ensaio inicial para determinar quais as melhores condições de tratamento com ALA, as células foram expostas ao ALA por 2 horas a concentrações de 0,5; 1; 2; 4 e 8 mM. Este primeiro experimento não revelou danos significativos ao DNA (dados não apresentados). Deste modo, resolvemos incubar as células a concentrações maiores de ALA (1, 10 e 100 mM) pelo mesmo período.

Essa exposição revelou danos significativos ao DNA como podem ser vistos na figura 29 e na tabela VII A e B que mostra a quantificação dos danos ao fragmento do DNA nuclear (β -globina - 13,5 kb) e ao fragmento do DNA mitocondrial (16,2 kb).

Figura 29: Gel de agarose do DNA isolado de células SVNf tratadas com diferentes concentrações de ALA durante 2 horas. As bandas correspondem ao fragmento do DNA nuclear (β -globina) ou ao fragmento do DNA mitocondrial amplificados pela técnica de QPCR.

As duas primeiras bandas correspondem às diluições de 50% dos respectivos controles utilizados como controle interno da amplificação.

Tabela VII: Valor da quantificação das bandas do fragmento do DNA nuclear (A) e do fragmento do DNA mitocondrial (B) e número de lesões ao DNA das células SVNF tratadas com diferentes concentrações de ALA. As condições de tratamento e a forma de cálculo das lesões estão descritos em *Materiais e Métodos*.

A - Fragmento nuclear (β -globina)

Amostra	Quantificação	Média	Ad/Ao	Lesões/ fragmento	Lesões/ 10kb
Controle A Controle B	12454727 10885640	11670184	1	0,000	0,000
1mM A	9751664	9751664	0,835605	0,180	0,133
10 mM A 10 mM B	11124295 14780672	12952484	1,109878	-0,104	-0,077
100 mM A 100 mM B	3907160 2645925	3276543	0,280762	1,270	0,941

B- Fragmento mitocondrial

Amostra	Quantificação	Média	Ad/Ao	Lesões/ fragmento	Lesões/ 10kb
Controle A Controle B	2881401 2097428	2489415	1	0,000	0,000
1mM A	2067256	2067256	0,830419	0,186	0,115
10 mM A 10 mM B	1540820 1345733	1443277	0,579765	0,545	0,337
100 mM A 100 mM B	12244 42103	27173,5	0,010916	4,518	2,789

Ad: valor da amplificação do fragmento tratado.

Ao: valor da amplificação do fragmento controle.

A partir desse experimento, fizemos um ensaio dose-resposta utilizando concentrações de 5, 10, 20, 30, 50 e 100 mM por 2 horas. Duas amplificações por PCR independentes das amostras de DNA foram realizadas e os dados obtidos das lesões por 10 kb no gene nuclear e no fragmento do DNA mitocondrial foram relacionados no gráfico da figura 30.

A análise desses dados mostra que houve um aumento dos danos ao DNA, tanto nuclear quanto mitocondrial, em relação à concentração de ALA utilizada no tratamento. Pudemos observar que o número de lesões ao fragmento do DNA mitocondrial foi maior que ao nuclear em concentrações acima de 10 mM, indicando uma maior susceptibilidade do DNA mitocondrial aos danos promovidos por ALA.

A gráfico também mostra que o aumento dos danos é maior em concentrações até 30 mM. Acima dessa concentração os danos parecem atingir um platô.

Figura 30: Número de lesões por 10 kb ao fragmento do DNA nuclear (β -globina) e do fragmento do DNA mitocondrial obtido a partir da análise por QPCR do DNA isolado de células SVNf tratadas com diferentes concentrações de ALA durante 2 horas. As condições de tratamento estão descritas em *Materiais e Métodos*.

Outro experimento realizado utilizando diferentes concentrações de 5-50 mM de ALA para tratar as células durante 2 horas, mostrou um aumento dose-dependente das lesões ao DNA, sendo o DNA mitocondrial mais susceptível aos danos. O reparo dos danos gerados pelo tratamento com 20 mM de ALA foi acompanhado por 2 e 4 horas. Observamos que após 2 horas de recuperação o número de lesões encontrado no gene da β -globina (0,088/10kb) foi menor que o encontrado no tratamento (0,113 lesões /10 kb). Após 4 horas de recuperação o nível de lesões encontrado foi de -0,032 lesões/10 kb, indicando um reparo eficiente dos danos ao DNA nuclear.

No entanto, os danos ao fragmento do DNA mitocondrial não foram totalmente reparados, mesmo após 4 horas de recuperação. Após 2 horas o

nível de lesão no fragmento do DNA mitocondrial foi de 0,718 lesões/10 kb, maior ainda que o encontrado no tratamento (0,427 lesões/10 kb). Após 4 horas as lesões abaixaram para 0,140 lesões/10 kb (Tabela VIII).

Esses resultados indicam que a célula é capaz de reparar os danos nucleares. Porém o reparo no DNA mitocondrial, se houver, parece agir de maneira mais lenta. A cinética de reparo ao longo do tempo de recuperação ainda não foi estabelecida.

Tabela VIII: Valor da quantificação das bandas do fragmento do DNA mitocondrial e número de lesões ao DNA das células SVNf tratadas com diferentes concentrações de ALA. As condições de tratamento e a forma de cálculo das lesões estão descritos em *Materiais e Métodos*.

Fragmento mitocondrial

Amostra	Ad/Ao	Lesões/fragmentos	Lesões/10kb
Controle	1	0,000	0,000
5 mM	0,799443	0,224	0,138
10 mM	0,9223	0,081	0,050
15 mM	0,720455	0,328	0,202
20 mM	0,500907	0,691	0,427
30 mM	0,322926	1,130	0,698
50 mM	0,15676	1,853	1,144
20 mM* reparo 2 h	0,312729	1,162	0,718
20 mM* reparo 4 h	0,796591	0,227	0,140

As amostras marcadas com * correspondem às células submetidas à condição de reparo pelos tempos indicados, após tratamento com ALA.

Ad: valor da amplificação do fragmento tratado.

Ao: valor da amplificação do fragmento controle.

Utilizando-se uma concentração de 20 mM de ALA realizamos também um experimento expondo as células a diferentes tempos (0, 15, 30, 60, 90 e 120 min). Os valores obtidos para as lesões no DNA mitocondrial foram sempre maiores em relação ao DNA nuclear em qualquer tempo de exposição. A média dos valores das lesões obtida para o DNA mitocondrial foi de 0,39 lesões/10kb e para o nuclear foi de 0,12 lesões/10 kb. Entretanto, comparando os valores obtidos para as lesões nos diferentes tempos, tanto para a β -globina quanto para o fragmento de DNA mitocondrial, observamos que não houve um aumento significativo dependente do tempo. O tratamento por 15 min (0,549 lesões/10 kb para o fragmento de DNA mitocondrial e 0,097 lesões/10 kb para a β -globina) ou por 2 horas (0,435 lesões/10 kb para o fragmento de DNA mitocondrial e 0,136 lesões/10 kb) parece não afetar de modo significativo o número de lesões, indicando que 15 min de exposição ao ALA seriam suficientes para causar as lesões. Deste modo, realizamos um tratamento dose-dependente (5-50 mM) de ALA expondo as células durante 15 min, ao invés das 2 horas utilizadas anteriormente. Como pode ser observado no gráfico da figura 31, os danos ao DNA mitocondrial foram crescentes nas concentrações de 15 a 30 mM.

Figura 31: Número de lesões por 10 kb do fragmento do DNA mitocondrial obtido a partir da análise por QPCR do DNA isolado de células SVNf tratadas com diferentes concentrações de ALA durante 15 minutos. As condições de tratamento estão descritas em *Materiais e Métodos*.

Em todos os experimentos realizados o controle interno de 50% de diluição de um fragmento não danificado foi utilizado e apresentou ampliações entre 40% e 60%.

4.4.2. Danos em DNA mitocondrial e nuclear de células PC12 tratadas com ALA

As células PC12 constituem uma linhagem derivada de glândula adrenal de ratos comumente utilizada como sistema modelo para estudo de desenvolvimento neuronal (Greene e Tischler, 1976).

Essas células quando expostas ao ALA (5-50 mM) durante 2 horas mostraram-se muito mais sensíveis ao tratamento quando comparado com as células SVNf. Em concentrações acima de 30 mM as células não resistiram ao tratamento e morreram. Nos tratamentos com concentrações mais baixas, algumas células morreram, mas a quantidade de DNA obtida ainda foi suficiente para amplificação dos fragmentos e quantificação dos danos.

Analisando o gráfico da figura 32 A e B verificamos novamente, assim como para as células SVNf, que os danos ao fragmento do DNA mitocondrial foram mais extensos que ao gene da clusterina nuclear em concentrações acima de 10 mM.

A **B**

Figura 32:. Lesões por fragmento (**A**) e amplificação relativa (**B**) do fragmento do DNA nuclear (clusterina) e do fragmento do DNA mitocondrial obtidos a partir da análise por QPCR do DNA isolado de células PC12 tratadas com diferentes concentrações de ALA durante 2 horas. As condições de tratamento estão descritas em *Materiais e Métodos*.

4.4.3. Teste MTT

Originalmente descrito por Mosmann (1983), o teste de MTT detecta o crescimento ou morte celular através da redução do sal de tetrazolium MTT, 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazolium, ao formazam, um produto colorido que pode ser medido espectrofotometricamente. Essa reação processa-se principalmente na mitocôndria. A medida indireta da viabilidade celular, através da redução do MTT pela mitocôndria, foi feita em células SVNf após tratamento com diferentes concentrações de ALA por 15 min. O gráfico da figura 33 mostra uma diminuição da absorbância relativa a 595 nm em relação ao aumento da concentração de ALA, indicando a perda da viabilidade mitocondrial e celular. A mitocôndria danificada não é capaz de reduzir o MTT, não ocorrendo a formação de formazam que absorve no comprimento de onda utilizado.

Esse experimento indica que o ALA está afetando as funções normais da célula como a respiração mitocondrial, o que poderia levar a uma maior susceptibilidade ao ataque das ROS às diversas estruturas celulares, incluindo o DNA nuclear e mitocondrial. De fato, há uma correlação inversa entre a viabilidade celular e as lesões promovidas pelo ALA no DNA mitocondrial (Figura 33).

Figura 33: Comparação entre as médias e os desvios das absorbâncias relativas do formazan medidas a 595 nm após a incubação com MTT (■) e o número de lesões por 10 kb do fragmento do DNA mitocondrial (●) das células tratadas com diferentes concentrações de ALA.

4.4.4. Curva de crescimento de células SVNF após tratamento com ALA

A curva de crescimento das células SVNF durante 6 dias após o tratamento com ALA 20 mM durante 15 min está representada no gráfico da figura 34.

Pudemos observar que as células que foram tratadas apresentaram um crescimento defasado em relação ao controle, indicando uma alteração no metabolismo de crescimento em decorrência do tratamento. No dia 1, logo após o tratamento, o número de células nos controles e nos tratados eram praticamente iguais, mostrando que não houve uma diminuição do número de células após o tratamento, o que poderia refletir nas contagens posteriores. Pudemos observar

também que somente no dia 6, a contagem das células tratadas atingiu o mesmo valor obtido com as células controle do dia 3. Esse resultado indica que as células podem se recuperar do tratamento com ALA, não sendo a concentração de 20 mM tóxica. No entanto, a recuperação é relativamente lenta quando comparada com o controle, sugerindo alterações celulares promovidas pelo tratamento.

Figura 34: Curva de crescimento de células SVNf durante 6 dias após o tratamento com 20 mM ALA durante 15 minutos. O número de células foi contado conforme descrito em *Materiais e Métodos*.

4.5. Verificação da mutagenicidade induzida por ALA e DOVA através do Teste de microssuspensão

O teste de mutagenicidade por microssomo/*Salmonella* (Teste de Ames) tem sido muito utilizado para verificação de mutagenicidade de inúmeros compostos (Ames *et al.*, 1995). Várias linhagens já foram desenvolvidas, cada uma com características próprias que as tornam mais ou menos susceptíveis a determinadas substâncias, permitindo a análise de amplo espectro de compostos. O Teste de Kado, desenvolvido por Kado *et al.* (1983), segue o mesmo princípio do Teste de Ames, porém permite a utilização de quantidades menores dos compostos e torna o teste mais sensível.

As linhagens TA98 e TA100, TA102 e TA1535 foram testadas, porém nenhuma dessas linhagens apresentou resultados positivos nas doses de ALA utilizadas (dados não mostrados).

A linhagem TA104 foi tratada com diversas doses de ALA (1-2000 µg). Em doses abaixo de 250 µg, a razão de mutagenicidade não foi alterada, apresentando valor igual a 1. Nas doses de 250 e 500 µg, pudemos observar um pequeno aumento da razão de mutagenicidade, porém não significativo. Somente em doses de 1000 e 2000 µg de ALA a razão de mutagenicidade foi significativa em relação ao controle, apresentando os valores de 1,4 e 1,5 (Figura 35 e Tabela IX).

Apesar da razão de mutagenicidade não ser acima de 2, ou seja, não apresentar o dobro do número de mutantes, a análise estatística apresentou diferença significativa. A baixa razão de mutagenicidade provavelmente se deve ao fato do ALA ser um composto endógeno e sua genotoxicidade ser devido à produção de espécies reativas de oxigênio e de DOVA.

O metilglioxal, na dose de 14,4 µg, utilizado como controle positivo, apresentou uma razão de mutagenicidade de 3,2, indicando que as bactérias estavam respondendo adequadamente (Tabela IX).

Figura 35: Razões de mutagenicidade obtidas para diversas doses de ALA e DOVA no Teste de Kado utilizando a linhagem *S. typhimurium* TA104, realizado conforme descrito em *Materiais e Métodos*.

Tabela IX: Média (n=3) e desvio padrão (DP) do número de colônias revertentes/placa de *S. typhimurium* TA104 tratadas com ALA ou metilglioal no ensaio do Teste de Kado. A razão de mutagenicidade (RM) foi calculada dividindo o número de colônias obtidas em cada tratamento pelo número do controle.

ALA (µg)	Média	DP	RM
0	341,80	17,88	1,0
250	392,00	20,66	1,1
500	415,67	18,77*	1,2
1000	466,33	5,03**	1,4
1500	468,67	8,14**	1,4
2000	496,67	29,37**	1,5
Metilglioal (14,4 µg)	1073,67	147,08**	3,2

* significante a 5% ** significante a 1% no teste ANOVA.

Para verificar se o H_2O_2 produzido pela oxidação do ALA estaria envolvido na indução de mutagenicidade da linhagem testada, tratamos a cepa com H_2O_2 na presença e ausência de catalase. Utilizando 500 μg de H_2O_2 sozinho a razão de mutagenicidade foi de 2,0; voltando ao valor 1,0 com a adição prévia à incubação com a bactéria de 4 μg de catalase. Doses acima de 500 μg foram tóxicas para bactéria, resultando em razão de mutagenicidade próxima ou abaixo de 1,0 (Tabela X). Utilizando esse controle, pudemos confirmar que a linhagem é capaz de responder positivamente ao H_2O_2 e que a inativação por catalase, diminui a ocorrência de mutação, resultando em um número de revertentes igual ao controle.

No entanto, não foi possível estabelecer a efetiva participação do H_2O_2 no tratamento com ALA. Alguns tratamentos apresentaram redução significativa da razão de mutagenicidade e outros não, quando incubados na presença de catalase (Tabela XI e XII). Provavelmente não foi possível distinguir o efeito da adição da catalase devido ao fato do ALA apresentar uma razão de mutagenicidade baixa. Além disso, o DOVA, produto final da oxidação do ALA, também pode estar envolvido no efeito da mutagenicidade, e este não é afetado pela adição de catalase.

De fato, o DOVA também apresentou aumento da razão de mutagenicidade, em doses acima de 1000 μg . (Tabela XIII).

Tabela X: Média (n=3) e desvio padrão (DP) do número de colônias revertentes/placa de *S. typhimurium* TA104 tratadas com H₂O₂ e, H₂O₂ mais catalase no ensaio do Teste de Kado. A razão de mutagenicidade (RM) foi calculada dividindo o número de colônias obtidas em cada tratamento pelo número do controle.

H ₂ O ₂				H ₂ O ₂ + catalase (4 µg)		
H ₂ O ₂ (µg)	Média	DP	RM	Média	DP	RM
Controle	413,40	15,71	1,0	413,40	15,71	1,0
500	874,00	33,02**	2,1	456,33	9,50**	1,1
750	284,67	61,16	0,7	430,67	5,51	1,0
1000	0	0	0	445,67	8,74	1,0
Controle	445,80	11,28	1,0	445,80	11,28	1,0
500	913,00	69,91**	2,0	468,33	15,69**	1,1
750	536,33	114,77	1,2	455,67	21,82	1,0
1000	559,33	61,13	1,2	456,67	29,02	1,0

** significante a 1% no teste ANOVA.

Tabela XI: Média (n=3) e desvio padrão (DP) do número de colônias revertentes/placa de *S. typhimurium* TA104 tratadas com ALA (1000 µg) e ALA mais catalase no ensaio do Teste de Kado. A razão de mutagenicidade (RM) foi calculada dividindo o número de colônias obtidas em cada tratamento pelo número do controle.

Controles (PBS)		ALA (1000 µg)			ALA (1000 µg) +catalase (4 µg)		
Média	DP	Média	DP	RM	Média	DP	RM
341,80	17,88	466,33	5,03**	1,4			
353,40	10,01	570,33	30,89**	1,6	514,00	16,00*	1,4
552,60	15,29	959,67	100,00**	1,7	679,67	19,86**	1,2
413,40	15,71	537,00	41,04*	1,3	546,00	8,19	1,3
445,80	11,28	567,67	28,29**	1,3	518,00	41,33	1,1

* significante a 5% ** significante a 1% no teste ANOVA.

Tabela XII: Média (n=3) e desvio padrão (DP) do número de colônias revertentes/placa de *S. typhimurium* TA104 tratadas com ALA (2000 µg) e ALA mais catalase no ensaio do Teste de Kado. A razão de mutagenicidade (RM) foi calculada dividindo o número de colônias obtidas em cada tratamento pelo número do controle

Controles (PBS)		ALA (2000 µg)			ALA (2000 µg) +catalase (4 µg)		
Média	DP	Média	DP	RM	Média	DP	RM
341,80	17,88	496,67	29,67**	1,5			
353,40	10,01	630,33	55,25**	1,8	594,33	36,69	1,7
552,60	15,29	1011,00	102,81**	1,8	762,00	36,29*	1,4
413,40	15,71	617,00	37,03**	1,5	569,33	34,36	1,4
445,80	11,28	584,00	28,62**	1,3	513,33	16,26*	1,1

* significante a 5% ** significante a 1% no teste ANOVA.

Tabela XIII: Média (n=3) e desvio padrão (DP) do número de colônias revertentes/placa de *S. typhimurium* TA104 tratadas com DOVA e metilglioxal no ensaio do Teste de Kado. A razão de mutagenicidade (RM) foi calculada dividindo o número de colônias obtidas em cada tratamento pelo número do controle.

DOVA (µg)	Média	DP	RM
0	413,40	15,71	1,0
1000	563,67	26,10**	1,4
1500	637,00	39,74**	1,5
2000	604,33	34,30**	1,5
Metilglioxal (14,4 µg)	1523,33	20,23**	3,7

** significante a 1% no teste ANOVA.

4.6. Cromoteste

O Cromoteste é um teste utilizado para verificação de indução de resposta SOS em bactérias, associada a lesões ao DNA por diferentes agentes químicos.

Em todos os ensaios realizados foram feitas também as incubações para medida da atividade da fosfatase alcalina. No entanto, as absorbâncias obtidas apresentaram sempre valores muito baixos, abaixo ou bem próximos de zero. Deste modo não foi possível calcular o fator de indução (FI) conforme os cálculos propostos por Miller (1972). No entanto, apesar da atividade da fosfatase alcalina não ter sido medida, provavelmente devido à perda dessa característica (*PhoC*), as bactérias continuaram viáveis e as doses utilizadas não foram tóxicas para as bactérias.

Para análises qualitativas, o cálculo da indução da atividade de β -gal já é suficiente para indicar a indução de resposta SOS pelo ALA e pelo DOVA.

Os resultados obtidos nos ensaios de Cromoteste indicaram que o ALA e o DOVA são capazes de induzir a resposta SOS em *E.coli* PQ37.

Como pode ser observado na figura 36, o ALA induziu um aumento crescente da atividade de β -gal.

Figura 36: Atividade da β -galactosidase em resposta a doses crescentes de ALA no ensaio de Cromoteste realizado, conforme descrito em *Materiais e Métodos*. As curvas correspondem aos valores obtidos em três experimentos realizados separadamente.

Como pode ser observado na tabela XIV e na figura 37, o DOVA também foi capaz de induzir a atividade de β -gal, indicando ativação do sistema SOS, como resultado de danos ao DNA da bactéria.

Tabela XIV: Absorbância a 420 nm do produto de reação da β -galactosidase e a ONPG e as correspondentes atividades enzimáticas da β -gal calculadas conforme descrito em *Materiais e Métodos* no ensaio de Cromoteste empregando o DOVA.

DOVA (μ g)	Abs 420 nm	U.E. (β -gal)
0	0,1451	0,786
1000	0,1686	0,937
2000	0,1796	0,998

Figura 37: Atividade da β -galactosidase em resposta a doses crescentes de DOVA no ensaio de Cromoteste realizado, conforme descrito em *Materiais e Métodos*.

Como controle positivo do ensaio foi feita uma curva dose-resposta com o 4-NQO, composto reconhecidamente mutagênico e indutor do sistema SOS, para verificar a funcionalidade da cepa utilizada. No gráfico da figura 38 podemos observar um aumento da atividade de β -gal com o aumento da dose de 4-NQO.

O metilglioxal também foi capaz de induzir a resposta SOS, as doses testadas foram as mesmas utilizadas no ensaio de mutagenicidade de teste de

microsuspensão (Teste de Kado). A dose de 3,6 μg foi capaz de induzir a resposta SOS, aumentando a atividade da β -gal de 0,786 no controle para 0,986.

Figura 38: Atividade da β -galactosidase em resposta a doses crescentes do composto 4-NQO no ensaio de Cromoteste realizado conforme descrito em *Materiais e Métodos*.

5. DISCUSSÃO

5.1. LESÕES OXIDATIVAS EM DNA INDUZIDAS POR ALA

5.1.1. *Quebras de DNA plasmidial induzidas por ALA na presença de íons Fe^{2+}*

Em ratos injetados com ALA intraperitonealmente, a concentração do ácido no fígado pode alcançar oito vezes ou mais que a do nível plasmático (McGillion *et al.*, 1974; McGillion *et al.*, 1975). O nível plasmático de ALA é cerca de 100 vezes maior em pacientes com AIP do que em indivíduos normais, passando de 0,1 μ M para cerca de 10 μ M (Gorchein e Webber, 1984) e 4-100 vezes maior em indivíduos com mais de 30 μ g de chumbo/100 g de sangue (Minder, 1986). Deste modo, vários autores sugerem que o acúmulo de ALA poderia contribuir para os inúmeros sintomas da AIP.

Considerando-se o potencial pró-oxidante do ALA e os inúmeros trabalhos relatando a maior incidência de HCC em pacientes sintomáticos de AIP, iniciamos nosso trabalho verificando *in vitro*, que o ALA é capaz de promover quebras em DNA plasmidial mediadas por íons Fe^{2+} . A redução ou até a supressão das quebras de fita simples pelo SOD, catalase e DTPA indicam claramente o envolvimento de uma série de reações bem conhecidas (reações 7-11).

Ferro

De fato a formação de espécies $O_2^{\bullet-}$, radicais centrados no carbono (ALA enoil) e radicais $\bullet OH$ durante a oxidação do ALA, já foi evidenciada por técnicas de ressonância paramagnética eletrônica (Monteiro *et al.*, 1989). A co-oxidação da oxihemoglobina com ALA também foi demonstrada ser inibida por SOD, catalase e manitol (Monteiro *et al.*, 1986).

Os resultados obtidos também concordam com aqueles descritos para mitocôndrias de fígado de ratos sustentados com succinato na presença de 0,1-3 mM de ALA: alterações nas propriedades mitocondriais como o colapso do potencial da membrana, liberação de cálcio, a diminuição da taxa respiratória e o inchamento que são atribuídos ao dano oxidativo da membrana interna causado pelo $\bullet OH$ produzido pelo ALA através da reação de Haber-Weiss (Hermes-Lima *et al.*, 1991a; Hermes-Lima *et al.*, 1992). Mostrou-se também que a catalase, a SOD e a *o*-fenantrolina - outro quelante de ferro - inibiram estes efeitos. Vercesi *et al.* (1994) propuseram que a permeabilização da membrana mitocondrial, induzida por Ca^{2+} na presença de ALA, é mediada pelo ataque de ROS a tióis de proteínas, gerando agregados protéicos de alto peso molecular via reações de ligação cruzada S-S, que poderiam resultar em poros de membranas não específicos. O Ca^{2+} agiria de maneira sinérgica aumentando a produção de ROS pela mitocôndria e facilitando seu ataque a tióis de proteína. Tal processo foi inibido pela adição de EGTA que remove o Ca^{2+} (Hermes-Lima, 1995).

Pereira *et al.* (1992) mostraram que o ALA também exerce um papel pró-oxidativo *in vivo*. Ratos tratados com ALA cronicamente sofreram alterações metabólicas, enzimáticas e fisiológicas indicando o aumento do metabolismo glicolítico associado ao dano mitocondrial de fígado e de músculo vermelho. Esses dados são consistentes com os achados prévios de Biempica *et al.* (1974). Analisando amostras de biópsia de fígado de quatro pacientes com AIP, encontraram numerosas gotas de lipídios, abundantes grânulos de ferritina, largos corpos de lipofusцина, mitocôndrias com formas alteradas, hiperplasia do retículo endoplasmático liso e de vacúolos autofágicos contendo mitocôndrias bem preservadas. Estas alterações podem ser atribuídas ao extenso dano oxidativo iniciado pelo ALA. *In vitro*, ALA prejudica as funções mitocondriais de fígado de rato e *in vivo*, promove a perda das atividades da citrato sintase e da SOD dependente de magnésio (Pereira *et al.*, 1992).

O efeito pró-oxidante do ALA também foi demonstrado em tecido cerebral de ratos. Após duas semanas de tratamento com ALA (40 mg/kg peso corporal) vários parâmetros indicadores de estresse oxidativo apresentaram níveis aumentados: atividade de CuZnSOD, quantidade de ferro total, ferritina, carbonilas proteicas e captação de Ca^{2+} por sinaptossomas corticais. Além disso, membranas sinápticas apresentaram alterações de afinidade de ligação nos receptores de GABA, formação de grupos carbonílicos protéicos, produtos reativos ao ácido tiobarbitúrico e dienos conjugados (Demasi et al., 1996).

Danos oxidativos ao DNA, mediados por ALA na presença de íons Cu^{2+} , também foram reportados por Hiraku e Kawanishi (1996), como a formação de 8-oxodGuo em DNA de timo de bezerro e danos em fragmentos de DNA obtidos do proto-oncogene *c-Ha-ras*. Esses autores propõem dois possíveis mecanismos de danos ao DNA induzidos por ALA na presença de Cu^{2+} . O principal seria a formação de DOVA e geração de NH_4^+ . O ALA seria convertido em um radical centrado no carbono na presença de Cu^{2+} . Este radical reagiria com O_2 gerando $\text{O}_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 , seguido da formação de DOVA e NH_4^+ . A redução de Cu^{2+} a Cu^+ e a formação de H_2O_2 pela dismutação de $\text{O}_2^{\bullet-}$ ocorreria concomitantemente. O H_2O_2 , então, reagiria com Cu^+ formando um radical cripto OH como o complexo Cu^+ -peróxido, causando o dano ao DNA.

Um segundo mecanismo também poderia ser considerado; a dimerização do ALA gerando o derivado pirazina. Duas moléculas de ALA condensariam através da reação amino-carbonil para formar o derivado dihidropirazina seguido da oxidação mediada por Cu^{2+} gerando o ácido pirazina-2,5-dipropiônico com a redução de Cu^{2+} a Cu^+ e a produção de $\text{O}_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 . Danos ao DNA seriam causados pela interação do Cu^+ e H_2O_2 para formar o complexo metal-peróxido. De fato, experimentos feitos com o derivado de dihidropirazina (ácido 3,6-dihidropirazina-2,5-dipropanóico) sintetizado, mostraram que este é um agente extremamente eficaz em promover quebras de DNA plasmidial e também na formação de 8-oxodGuo em DNA de timo de bezerro (dados não mostrados).

5.1.2. Danos em DNA induzidos por ALA na presença de ferritina

A ferritina consiste na principal forma de armazenamento de íons ferro dentro da célula. Ela exerce um papel dinâmico no metabolismo de ferro com regulação ocorrendo nos níveis de síntese e reciclagem proteica, e deposição e liberação de ferro (Aisen e Listowsky, 1980).

Fígado, baço e medula óssea de mamíferos são especialmente ricos em ferritina, mas esta também pode ser encontrada em outros tecidos, no soro e em células sanguíneas (Aisen e Listowsky, 1980). A ferritina encontra-se preferencialmente no citoplasma celular, porém estudos indicam também a presença de ferritina dentro do núcleo (Smith *et al.* 1990a).

Haddow e Horning (1960) e Richter (1961) observaram a presença de inclusões intranucleares de ferro semelhantes à ferritina em hepatócitos de camundongos após administração de doses múltiplas de ferro-dextran e de óxido de ferro ligados a sacarídeos. Injeções múltiplas de ferro-sorbitol ou ferro-polimaltose em macacos produziram partículas semelhantes à ferritina observadas nos núcleos de hepatócitos, de células endoteliais e de células de Kupffer (Iancu *et al.*, 1985). Smith *et al.* (1990a), através de técnicas de imunocitoquímica, identificaram a presença de ferritina no núcleo de hepatócitos de camundongos tratados com uma dose única de ferro dextran e analisados de 3 a 6 meses após o tratamento. Os estudos citados contribuem para a hipótese de que em hepatócitos de camundongos sobrecarregados com ferro, ocorre uma passagem lenta de moléculas de ferritina através dos poros da membrana nuclear e este gradiente é mantido pela contínua agregação da ferritina dentro do núcleo (Smith *et al.*, 1990a).

A ferritina armazena o ferro na forma de Fe^{3+} de modo que este se torna menos reativo, porém estando ainda disponível para ser mobilizado e utilizado na síntese de hemoproteínas, por exemplo (Aisen e Listowsky, 1980). O ferro é um elemento essencial para o metabolismo celular, porém em certas circunstâncias pode se tornar extremamente tóxico. Uma das razões para esta toxicidade é a sua participação, na forma de Fe^{2+} , na reação de Fenton (reação 10) que produz espécies altamente reativas como o radical $\cdot\text{OH}$ e complexos de ferro e oxigênio (Halliwell, 1987). Como já discutido anteriormente, estas espécies podem causar

danos a diversas estruturas celulares (Hermes-Lima *et al.*, 1991a; Pereira *et al.*, 1992) e também interagir diretamente com o DNA, podendo iniciar ou promover um processo carcinogênico (Nassi-Calo *et al.*, 1989; Cerruti *et al.*, 1990; Frenkel, 1992). Camundongos tratados com dose única de ferro-dextran possuem uma maior probabilidade de desenvolver câncer hepático causado pela administração posterior na dieta de hexaclorobenzeno ou de bifenil policlorado (Smith *et al.*, 1989; Smith *et al.*, 1990b).

A ferritina, então, pode ser considerada uma forma relativamente segura de armazenamento de ferro dentro da célula; por si só, ela não é capaz de produzir radicais $\cdot\text{OH}$ através da reação de Fenton ou da reação de Haber-Weiss (Halliwell, 1978; Maguire *et al.*, 1982). Entretanto, vários agentes redutores podem liberar o ferro da ferritina (Monteiro e Winterbourn, 1989), podendo assim contribuir para um processo oxidativo que afetaria a integridade celular. Além disso, *in vitro*, foi demonstrado que ditionito e tioglicolato liberam ferro da ferritina rapidamente (Granick e Michaelis, 1943; Crichton, 1973) enquanto redutores de importância fisiológica (ascorbato, cisteína, glutatona) liberam o ferro de maneira bem mais lenta (Mazur *et al.*, 1955). Agentes quelantes (EDTA e 2,2'-dipiridil) podem facilitar a liberação de ferro da ferritina, mas somente na presença de redutores (Crichton *et al.*, 1980). Os mobilizadores de ferro mais efetivos parecem ser as flavinas (Dognin e Crichton, 1975).

Biernacki *et al.* (1984) demonstraram que leucócitos polimorfonucleares estimulados e superóxido gerado a partir de óxido de potássio liberavam ferro da ferritina. Thomas *et al.* (1985) demonstraram que o $\text{O}_2^{\cdot-}$, gerado por xantina oxidase, também libera o ferro ligado a ferritina. Uma vez liberado, o ferro pode promover a peroxidação de lipossomos. Entretanto, Biernacki *et al.* (1986) relataram outro mecanismo de liberação de ferro da ferritina independente de $\text{O}_2^{\cdot-}$. O papel exclusivo do $\text{O}_2^{\cdot-}$ na liberação ainda se mantém controverso, as razões para as diferenças ainda são especulativas podendo refletir contaminações variáveis de ferro da xantina oxidase utilizada (Britigan *et al.*, 1990) ou pode resultar de diferenças na preparação e no tecido de origem da ferritina (Theil, 1983). Na presença de agentes de ciclo redox, como o paraquat ou a menadiona, a ferritina pode catalisar a produção nuclear de radical $\cdot\text{OH}$ (Kukielka e Cederbaum, 1994). Apesar de fortes evidências da liberação de ferro da ferritina

por diversos compostos *in vitro*, ainda não há evidências que tal mecanismo possa realmente ocorrer *in vivo*.

Oteiza et al. (1995) demonstraram que o ALA é um agente capaz de liberar ferro da ferritina através do $O_2^{\bullet-}$, gerado a partir de sua oxidação. Liberação potencialmente deletéria de ferro de microssomas induzida por ALA foi também observada por Minotti (1992). Biempica et al. (1974) verificaram, entre outras alterações, abundantes grânulos de ferritina em biópsias de fígado de pacientes portadores de AIP. O ALA também é capaz de induzir a ativação da proteína tipo 1 regulatória de ferro, podendo funcionar como um co-sensor na regulação do metabolismo de ferro (Carvalho et al., 1997).

Deste modo, nossos dados indicam que a ferritina também poderia estar participando das reações envolvidas nas lesões ao DNA promovidas por ALA. O aumento do número de quebras no DNA plasmidial e da 8-oxodGuo em DNA de timo de bezerro incubados com ALA na presença de ferritina são indícios de que esta pode aumentar os efeitos do ALA através da liberação do Fe^{2+} , tornando-o disponível para participar da reação de oxidação.

5.1.3. Formação de 8-oxodGuo *in vitro* e *in vivo* induzida por ALA

Outros resultados obtidos corroboram para a hipótese de que o ALA pode promover danos oxidativos ao DNA. Foram detectados níveis aumentados, *in vitro* e *in vivo*, de 8-oxodGuo em DNA de timo de bezerro (Figura 8 e Tabela I) e em DNA de órgãos de ratos tratados cronicamente com ALA (Figura 10). O aumento das concentrações estacionárias de bases oxidadas, pode estar relacionado a uma taxa aumentada de sua formação, a uma diminuição da taxa de reparo, ou a uma combinação de ambos os processos (Fraga *et al.*, 1990). Estes resultados estão de acordo com aqueles que mostraram que ALA induz quebras de fita no DNA de plasmídeo pBR322. A possibilidade de uma diminuição na taxa de reparo do DNA não foi investigada neste estudo.

O mesmo mecanismo proposto para a formação de quebras de fita de DNA poderia também explicar a formação da 8-oxodGuo. Durante o processo de oxidação do ALA até o DOVA, ROS e radicais centrados no carbono (ALA enoil) são produzidos, como indicado nas reações 7-11. Baseado nos resultados obtidos

(Tabela I), é possível propor que a geração de 8-oxodGuo seria resultado do ataque ao DNA pelo radical $\cdot\text{OH}$ formado pelo sistema ALA/ Fe^{2+} . De fato, este mecanismo é corroborado pelos dados apresentados na tabela I: DTPA inibe a formação de 8-oxodGuo, indicando a necessidade de ferro para catalisar as reações 7-10 levando à produção do radical $\cdot\text{OH}$; manitol, um seqüestrador de $\cdot\text{OH}$, inibe a reação 11, prevenindo a formação de 8-oxodGuo; a adição de ferro ou H_2O_2 em concentrações que excedem os níveis fisiológicos não provoca nenhum dano *in vitro* ao DNA, indicando que a produção de $\cdot\text{OH}$ é dependente da disponibilidade de $\text{O}_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , e Fe^{2+} (reação 8-10).

Dados da literatura descritos por Yusof *et al.* (1999), demonstraram que o ALA é capaz de induzir a produção de 8-oxodGuo em células de ovário de hamster chinês, indicando a participação das ROS através da diminuição dos danos pela adição de SOD, catalase e *N*-acetilcisteína.

Vários estudos utilizam a formação de 8-oxodGuo como um índice de lesões oxidativas ao DNA por diversos agentes químicos e físicos que produzem ROS como agentes redutores (Kasai e Nishimura, 1984b), raios X (Kasai *et al.*, 1984), asbestos e H_2O_2 (Kasai e Nishimura, 1984a, Fung *et al.*, 1997), polifenol com H_2O_2 e íon férrico (Kasai e Nishimura, 1984b), radiação ionizante (Kasai *et al.*, 1986), H_2O_2 na presença de luz UV (Floyd *et al.*, 1988), azul de metileno na presença de luz (Schneider *et al.*, 1989), $^1\text{O}_2$ (Devasagayam *et al.*, 1991), radiação gama (Dizdaroglu, 1985; Douki *et al.*, 1997) e diversos agentes mutagênicos, promotores de tumor (Floyd *et al.*, 1986) e carcinogênicos (Kasai *et al.*, 1987).

A medida de 8-oxodGuo em rins e fígado foi utilizada em estudos de exposição a metais como o cobre, encontrando-se um aumento significativo na formação da base modificada (Toyokuni e Sagripanti, 1994, 1996). Além disso, a formação de 8-oxodGuo também foi utilizada como um índice para avaliar o dano oxidativo ao DNA de diferentes órgãos de ratos em relação à idade (Fraga *et al.*, 1990) e verificar a influência do fumo e da massa corporal em homens e mulheres (Loft *et al.*, 1992).

A relação entre a geração de ROS *in vivo* e a carcinogênese tem sido muito estudada e a formação de bases oxidadas como ao 8-oxodGuo pode estar intimamente envolvida no início de um processo carcinogênico (Frenkel, 1992).

Várias são as evidências que reforçam a participação da 8-oxodGuo como lesão pré-mutagênica na carcinogênese (Floyd, 1990).

A presença de 8-oxodGuo no DNA molde causa uma incorporação errônea de nucleotídeos no DNA replicado pela α -polimerase. Quando a 8-oxodGuo está antes de uma purina, a incorporação errônea é mais acentuada. Parece haver menor seletividade no nucleotídeo inserido opostamente a 8-oxodGuo (Kuchino *et al.*, 1987). Wood *et al.* (1990) indicaram que a inserção de uma pequena sequência de DNA contendo 8-oxodGuo no lugar de dGuo no codon âmbar do gene do fago *LacZ*, aumentou o número de mutantes, com a ocorrência de transverso G→T no sítio de lesão. Resultados similares foram obtidos em estudo de replicação de plasmídios utilizando uma lesão de fita única (Moriya *et al.*, 1991) e um fago vetor dupla fita (Cheng *et al.*, 1992). Em células de mamíferos com a 8-oxodGuo posicionada em um único sítio em DNA episomal foi observada transverso G→T (Moryia, 1993; Le Page *et al.*, 1995). Em ensaios *in vitro* de incorporação de nucleotídeos frente à 8-oxodGuo, utilizando diferentes polimerases, foi observado que as enzimas envolvidas na replicação do DNA (polimerase α , polimerase δ e polimerase III) tendem a inserir adenina frente a 8-oxodGuo, já as polimerases envolvidas em síntese de reparo (polimerase β e polimerase I e polimerase γ) tendem a inserir citosina frente à lesão (Shibutani *et al.*, 1991).

A capacidade da 8-oxodGuo bloquear a síntese de DNA ainda é controversa. Utilizando oligonucleotídeos contendo 8-oxodGuo como moldes para síntese de DNA por várias DNA polimerases, Shibutani *et al.* (1991) demonstraram que essa lesão pode interromper a polimerização do DNA de modo transiente. Entretanto, Kuchino *et al.* (1987) observaram que 8-oxodGuo apenas leva à incorporação errônea de bases sem que haja um bloqueio efetivo. Ribeiro *et al.* (1992a) demonstraram que lesões em dGuo induzidas por $^1\text{O}_2$, são capazes de interromper a síntese de DNA *in vitro*, e que pelo menos parte das lesões bloqueadoras da síntese consiste de 8-oxodGuo; considerando que esse é o principal produto da oxidação de dGuo por $^1\text{O}_2$ (Devasagayam *et al.*, 1991).

As mutações induzidas pela presença de 8-oxodGuo no DNA podem estar relacionadas a perturbações induzidas na estrutura macromolecular do DNA. A 8-oxodGuo é encontrada preferencialmente na forma tautomérica 6,8-diceto, que é

a forma de menor energia e mais estável do nucleotídeo livre (Figura 39) (Aida e Nishimura, 1987). A 8-oxodGuo pode assumir duas conformações: anti e syn. Na conformação anti pode emparelhar normalmente com a citosina e na conformação syn pode emparelhar com a adenina o que explicaria a ocorrência de transversões G→T, após ciclos de replicação. Quando adquire a forma 6-enol-8-ceto (Figura 39), que na conformação anti pode emparelhar com guaninas, pode levar a mutações G→C (Culp et al., 1989).

Forma 6-ceto, 8-enol

Forma 6,8-diceto

Forma 6-enol, 8-ceto

Figura 39: Estruturas químicas da 8-oxodGuo.

Para que uma lesão ao DNA possa resultar em mutações ela deve persistir durante os ciclos de replicação celular. Entretanto, para manter a integridade do material genético, a célula possui um eficiente maquinaria de reparo do DNA. Kasai *et al.* (1986) verificaram a presença de 8-oxodGuo após irradiação das células HeLa e de fígado de camundongos com raios X e γ . Analisando o DNA, em diferentes tempos após a irradiação, observou-se a redução progressiva da quantidade de 8-oxodGuo, sugerindo o reparo do DNA.

Vários estudos indicam que a 8-oxodGuo pode ser reparada por diversos processos complementares. A enzima formamidopirimidina-DNA-glicosilase (Fpg) ou MutM é responsável pela retirada de 8-oxodGuo quando emparelhada com citosina (Chetsanga e Lindahl, 1979, Breimer, 1984). Bactérias deficientes em *fpg* apresentam aumento na frequência de mutações espontâneas, geralmente transversões G→T (Cabrera *et al.*, 1988; Michaels *et al.*, 1991 e 1992), provavelmente devido ao acúmulo de 8-oxodGuo no DNA.

A proteína MutY, originalmente identificada como uma adenina glicosilase ativa em pareamentos A:G (Au *et al.*, 1989), pode também remover a adenina não

danificada de pareamentos A:8-oxodGuo (Michaels, *et al.*, 1992). Bactérias deficientes em *mutY* possuem taxas elevadas de transversões G→T (Nghiem *et al.*, 1988).

Mutantes duplos *mutM mutY* apresentam taxas de tranversões 20 vezes maior que os mutantes simples isolados (Michaels, *et al.*, 1992).

A lesão na posição 8 da guanina pode estar presente também no “pool” de nucleotídeos como a 8-oxodGTP. Esse dano é potencialmente mutagênico, pois pode ser incorporado erroneamente em posição oposta à adenina (Maki e Sekiguchi, 1992). A enzima MutT é responsável pelo reparo desse dano. Bactérias deficientes em *mutT* apresentam nível elevado de transversão A→C (Yanofsky *et al.*, 1966, Fowler *et al.*, 1992, Tajiri *et al.*, 1995) devido à incorporação de 8-oxodGuo frente à adenina.

Analogia em relação à proteína Fpg bacteriana já foi descrita em células eucarióticas. O gene *OGG1* de *Saccharomyces cerevisiae* codifica uma proteína análoga com atividade DNA glicosilase, capaz de retirar 8-oxodGuo do DNA quando este pareia com pirimidinas (Auffret van der Kemp *et al.*, 1996; Thomas *et al.*, 1997). Uma proteína humana homóloga, funcional e estruturalmente da proteína Ogg1 de *S. cerevisiae*, também já foi caracterizada. Essa proteína, denominada hOgg1, também parece ter atividade glicosilase preferencial para o pareamento de 8-oxodGuo com pirimidinas (Radicella *et al.*, 1997). Foram encontradas duas formas (α e β) da proteína hOgg1, provavelmente originadas de diferentes processos de “splicing” (Radicella *et al.*, 1997, Arai *et al.*, 1997). Através de experimentos imunocitoquímicos foi demonstrado que a forma α está presente no núcleo enquanto a forma β localiza-se na mitocôndria (Takao *et al.*, 1998). Reparo de 8-oxodGuo foi reportado em extratos de mitocôndria de células humanas e de ratos, mas o envolvimento da β -hOgg1 não foi ainda comprovado (Croteau *et al.*, 1997). Em células humanas também já foi caracterizado um gene homólogo ao gene *mutY* de *E.coli* (Slupska *et al.*, 1996). Chevillard *et al.* (1998) identificaram mutações em *OGG1* em tumores de pulmão e rins humanos sugerindo que *OGG1* poderia ser um gene supressor de tumor estando envolvido na iniciação e promoção do processo carcinogênico (Boiteux e Radicella, 1999).

Estudos mais recentes em leveduras indicam que outras vias de reparo por excisão, como reparo por excisão de nucleotídeos mediado por *RAD14* (Scott *et*

al., 1999) ou reparo por “mismatch” (Ni *et al.*, 1999) mediado por *MSH2/MSH6*, também estão envolvidos no reparo de 8-oxodGuo.

Além da medida de 8-oxodGuo em DNA de fígado de ratos tratados com ALA, também foram obtidas medidas em baço e rins. O aumento de 8-oxodGuo em rins poderia estar relacionado à falha renal crônica reportada em portadores de AIP (Andersson e Lithner, 1994) e aos distúrbios renais encontrados na tirosinemia hereditária (Mitchell *et al.*, 1995).

5.1.4. Formação de outras bases oxidadas em DNA induzida por ALA

Amostras isoladas de DNA foram incubadas com ALA em soluções aquosas aeradas. Como nos experimentos descritos anteriormente, de quebras de fitas simples em DNA plasmidial e a formação de 8-oxodGuo em DNA de timo de bezerro na presença de ALA, nestes estudos também observamos o efeito estimulatório de metais de transição reduzidos como o ferro nos danos ao DNA promovidos pelo ALA. Além disso, a presença de SOD, catalase, DTPA e manitol protegeram o DNA contra os danos. Esses resultados sugerem a participação tanto de radicais $\cdot\text{OH}$ quanto de espécies oxidantes relacionadas, nos processos de oxidação do DNA mediados por ALA. Deste modo, para obter mais resultados que corroborem com essa hipótese, resolvemos investigar a distribuição dos principais produtos de degradação das nucleobases por radicais pela exposição ao ALA (Figura 40), comparando com os danos pela exposição do DNA a raios γ em soluções aquosas aeradas (Douki *et al.*, 1996; 1997; Douki e Cadet, 1996; Cadet *et al.*, 1997).

Figura 40: Comparação entre os níveis de formação de várias bases modificadas em DNA tratado com 2 mM de ALA ou expostos a raios γ em soluções aquosas aeradas. A produção de 8-oxodGuo foi utilizada como referência e considerada como 100%. Os dados da decomposição do DNA induzida por radiação foram obtidos dos trabalhos de Douki *et al.*, 1996; 1997 e Douki e Cadet, 1996.

A distribuição dos produtos de oxidação do DNA exhibe similaridades irrespectivas às condições de oxidação utilizadas (Figura 40). Essa observação indica o envolvimento de espécies que apresentam propriedades oxidantes similares àquelas dos radicais $\cdot\text{OH}$ em amostras tratadas com ALA. O mecanismo de oxidação por um elétron pode ser desconsiderado uma vez que esse processo leva a uma degradação dez vezes maior dos resíduos púricos (sítios sensíveis a Fpg) em relação aos pirimídicos (sítios sensíveis a endonuclease III) (Epe *et al.*, 1993). No entanto, a razão entre as respectivas produções de 8-oxodAdo e 8-oxodGuo foi menor nas amostras tratadas com ALA (razão: 2,2) do que a obtida pela exposição de soluções aeradas de DNA a raios γ (razão: 20,2) (Douki e Cadet, 1996). Em contraste, o valor da razão entre 8-oxodAdo/8-oxodGuo obtido em DNA tratado com ALA foi muito mais próximo daquele determinado na

incubação de DNA de timo de bezerro com H_2O_2 (razão: 4,2) (Douki e Cadet, 1996).

Recentemente, um estudo feito com nucleosídeos também reportou diferenças drásticas entre a degradação de dAdo induzida por radiação e a oxidação mediada pela reação de Fenton (Murata Kamiya *et al.*, 1997). Íons metálicos são requeridos para a ação tanto de ALA, quanto de H_2O_2 . Deste modo, pode ser proposto que espécies altamente oxidantes, liberadas via reação de Fenton, como íons ferril ($Fe=O^{2+}$) e perferril ($Fe=O^{3+}$) (Sutton e Winterbourn, 1989) exibem propriedades de oxidação diferentes em relação às bases púricas do DNA no que se refere ao radical $\bullet OH$.

Uma explicação alternativa pode ser a ligação preferencial de metais à adenina ou a regiões do DNA ricas em adenina, levando a produção aumentada de produtos da oxidação da adenina resultantes dos efeitos dos radicais $\bullet OH$ produzidos pela radiação. Investigações mais aprofundadas seriam necessárias para elucidar o comportamento peculiar da adenina nos processos de oxidação mediados por metais.

In vivo, também reportamos um aumento de 5-OHCyd em DNA de fígado de ratos tratados com ALA. A razão entre o aumento de nível de 8-oxodGuo e o de 5-OHdCyd (razão = 3,6) é muito próxima à determinada no DNA de timo de bezerro (razão: 4,0). Isso indica o envolvimento de radicais $\bullet OH$ ou espécies reativas de oxigênio relacionadas, produzidas via reações como a de Fenton, também nas reações de oxidação *in vivo* do DNA mediadas pelo ALA.

Os mecanismos que poderiam aumentar os riscos de desenvolvimento do processo carcinogênico em relação ao aumento de outras bases oxidadas são semelhantes aqueles já descritos para a 8-oxodGuo. Apesar de haver mais estudos referentes à mutagenicidade e ao reparo da 8-oxodGuo, as outras bases modificadas também poderiam levar a mutações, sendo que sistemas de reparo para algumas das lesões também já foram descritos.

Tem sido relatado que a timidina glicol é uma lesão que bloqueia eficientemente a DNA polimerase *in vitro* (Ide *et al.*, 1985; Basu *et al.*, 1989; Rouet e Essigmann, 1985; Clark e Beardsley, 1986; Basu e Essigmann, 1988; Evans *et al.*, 1993).

A 5-hidroximetiluracila não parece ser muito mutagênica, uma vez que estudos de replicação mostraram que na maioria dos casos, a base correta, adenina, era incorporada no sítio oposto (Mellac *et al.*, 1993).

As duas principais lesões em citosina, incluindo a 5-OHCyt e a 5-OHUr podem ser consideradas como lesões pré-mutagênicas, pois dependendo da sequência, podem incorporar adenina erroneamente no sítio oposto à lesão, principalmente no caso da uracila.

A incorporação de guanina oposta à 8-oxodAdo ocorre com uma eficiência muito baixa em um molde de DNA durante a síntese translesão *in vitro* (Shibutani *et al.*, 1993). A ausência de mutação foi relatada na transfecção em células de *E. coli* de um DNA simples fita de fago contendo um resíduo de 8-oxodAde.

Sítios apurínicos são provavelmente lesões mutagênicas, pois incorporam preferencialmente adenina oposta ao dano em moldes de DNA sintéticos (Kunkel *et al.*, 1983; Shager e Strauss, 1983; Loeb e Preston, 1986; Povirk e Goldberg, 1987).

Além disso, a extremidade 3'-glicolato, o principal produto de oxidação do açúcar mediada por $\cdot\text{OH}$, constitui uma lesão bloqueadora da DNA polimerase (Henner *et al.*, 1983).

O reparo das quebras do DNA também poderia levar a mutações através de mecanismos pelos quais a DNA ligase poderia pular um nucleotídeo levando a uma deleção; poderia ocorrer também uma incorporação errônea de base durante o preenchimento da quebra (Henner *et al.*, 1983).

Várias *N*-glicosilases que participam do reparo por excisão de bases, já foram isoladas e caracterizadas (Boiteux, 1993; Demple e Harrison, 1994; Wallace, 1998), principalmente em procariotos como a endonuclease III (Breimer e Lindahl, 1984), endonuclease VIII (Jiang *et al.*, 1997) e a Fpg (Boiteux *et al.*, 1990). Já foi demonstrado que a 3-metiladenina DNA glicosilase II (AlkA) é capaz de excisar a 5-ForUra e, em menor extensão, a 5-HMUra (Bjelland *et al.*, 1994), dois compostos oxidados do grupo metil da timina.

O reparo por excisão de nucleotídeos parece também participar do reparo de bases oxidadas uma vez que 5,6-dihidroxi-5,6-dihidrotimina (timidina glicol) é substrato para o complexo da nuclease bacteriana UvrABC (Kow *et al.*, 1990). Além disso, evidências recentes mostram a ocorrência de reparo acoplado à

transcrição de bases oxidadas em leveduras e células humanas (Leadon *et al.*, 1995; Gowen *et al.*, 1998).

A proteína Fpg também é capaz de liberar o anel aberto imidazólico das purinas como da FapyGua (Boiteux, 1993). A 8-oxo7,8-dihidro-2'-desoxiadenosina parece não ser um bom substrato para a Fpg (Ravanat *et al.*, 1993; Tchou *et al.*, 1994), mas esta é capaz de remover 5-OHCyt e 5,6-dihidrotimina (DHThy), 5-OHdCyd e 5-OHdUrd (Hatahet *et al.*, 1994; Jurado *et al.*, 1998).

A uracil DNA glicosilase (Lindahl *et al.*, 1977) reconhece o produto de deaminação da citosina, a uracila (DaRoza *et al.*, 1977; Duncan e Weiss, 1982). Essa enzima age no DNA simples ou dupla fita e libera a base livre, não possuindo atividade endonucleolítica associada.

A endonuclease III possui atividade exclusiva em DNA dupla fita e libera através de reação glicosílica, timina glicol e resíduos de uréia (produtos da hidrólise alcalina de timina glicol) e outros produtos da quebra de pirimidinas (Armel *et al.*, 1977, Breimer e Lindahl, 1984). A endonuclease III parece ser eficaz na remoção de três bases oxidadas, sendo que a eficiência relativa da excisão ocorre da seguinte forma 5,6-dihidroxi-5,6-dihidrouracila > 5-OHUr > 5-OHCyt. Além disso, é capaz de remover 5-OHdCyd e 5-OHdUrd (Hatahet *et al.*, 1994).

A exonuclease III possui múltiplas atividades (Weiss, 1981), age sobre DNA dupla fita e sua atividade endonucleolítica básica é uma atividade apurínica que quebra a extremidade 5' do sítio AP deixando um bom substrato para DNA polimerase (Warner *et al.*, 1980). A exonuclease III reconheceu resíduos de uréia no DNA, produzidos após ação alcalina sobre a timidina glicol, agindo como se essa lesão fosse um sítio AP (Kow e Wallace, 1985).

A endonuclease IV age sobre sítios AP catalisando a clivagem na extremidade 5' da ligação fosfodiéster nos sítios AP (Friedberg, 1995).

Já é um consenso que eventos mutacionais estão na origem do processo de desenvolvimento do câncer. Tem sido proposto que um fenótipo mutante pode estar envolvido em alguns pontos nos vários estágios do processo carcinogênico (Feig *et al.*, 1994; Wiseman *et al.*, 1995; Beckman e Ames, 1997; Fearon, 1997). Este modelo foi confirmado pela associação entre o câncer colorretal hereditário e defeitos em genes que codificam para proteínas de reparo "mismatch" (Fishel *et*

al., 1993; Jiricny, 1994). O impedimento dos mecanismos de reparo dos erros de replicação do DNA pode originar uma instabilidade genética intrínseca. Esse passo inicial da carcinogênese pode levar a mutações em oncogenes ou inativação de genes supressores de tumor alterando o controle de crescimento celular. Um ataque oxidativo a genes envolvidos no reparo de bases oxidadas como a 8-oxodGuo poderia participar no processo do câncer, iniciando ou acelerando certos passos pelo aumento da instabilidade genética de uma célula em particular (Boiteux e Radicella, 1999, 2000).

5.2. Formação de adutos entre 2'-desoxiguanosina e o ácido 4,5-dioxovalérico

O produto final da oxidação do ALA, o DOVA, sendo um α -cetoaldeído, pode formar adutos com os grupos amino das bases do DNA. A partir dos experimentos realizados pudemos estabelecer o possível mecanismo pelo qual o DOVA poderia lesar o DNA. Utilizando a dGuo como modelo, foi demonstrado que o DOVA é capaz de se adicionar ao grupo amino exocíclico do anel de guanina (Esquema II). Dois diastereoisômeros principais são produzidos a partir da formação de uma base de Schiff entre o átomo de nitrogênio N^2 exocíclico da guanina e o carbono C4 do DOVA. Um intermediário dessa reação pode exibir uma estrutura diol como os adutos gerados pela reação do glioxal e seus derivados com compostos contendo guanina (Shapiro e Hachmann, 1966; Shapiro *et al.*, 1968). No entanto, no caso do DOVA, ocorre a desidratação da ligação $-NH-C-OH-$, levando à formação da base de Schiff. Essa reação foi evidenciada pela formação de adutos similares em DNA isolado incubado com DOVA. Isso indica que o envolvimento do grupo amino N^2 exocíclico da guanina no pareamento com a citosina, não impede a adição nucleofílica ao grupo cetona do DOVA. No entanto, a relativa instabilidade da base de Schiff dos adutos DOVA-dGuo deve ser observada, sendo revertidos a dGuo e DOVA por hidrólise. Deste modo, a caracterização dos adutos DOVA-dGuo por análises em RMN e MS requereu a redução preliminar da base de Schiff em um grupo amina secundária mais estável. O mesmo procedimento foi realizado para a detecção do aduto no DNA de timo de bezerro. Entretanto, a relativa instabilidade dos adutos

DOVA-dGuo é compensada pela eficiência da reação de adição do DOVA a dGuo. Além disso, é provável que a estrutura de dupla fita do DNA estabilize os adutos formados.

Outros aldeídos que também induzem formação de bases de Schiff no DNA são conhecidos mutagênicos (Marnett et al., 1985; Dellarco, 1993). Glioxal e outros compostos α -dicarbonílicos também são mutagênicos (Bjeldanes e Chew, 1979) e eficientes agentes alquilantes do grupo amino N² exocíclico da guanina (Shapiro e Hachmann, 1966; Shapiro et al., 1968). O acetaldeído é capaz de promover aberrações cromossômicas em células de mamíferos em cultura (Bird et al., 1982; Delarco, 1988). Também deve ser enfatizado que os adutos acetaldeídos de guanina com estrutura de base de Schiff foram recentemente detectados em células sangüíneas de humanos e podem estar relacionados com os efeitos carcinogênicos atribuídos ao álcool (Fang e Vaca, 1997).

Adutos estáveis formados a partir do crotonaldeído, também já foram detectados *in vivo*, sendo, entretanto, reparados lentamente (Eder et al., 1999). Os etenoadutos produzidos a partir de diversos compostos carcinogênicos e produtos da lipoperoxidação, como certos aldeídos, também são capazes de produzir substituições de bases em DNA. *In vitro* as eteno bases são reparadas por DNA glicosilases de mamíferos (Matijasevic et al., 1992; Dosanjh et al., 1994; Sapparbaev et al., 1995; Hang et al., 1996, 1997) e por extratos de células de ratos (Oesch et al., 1986) ou humanas (Oesch et al., 1994). Etenoaduto de timina é removido por uma DNA glicosilase humana timina específica (Hang et al., 1998, Sapparbaev e Laval, 1998). A inibição dessas enzimas de reparo ou a falta de expressão em certos tipos celulares levou ao acúmulo ou persistência de alguns etenoadutos em DNA de alguns tecidos e células de roedores (Swenberg et al., 1992; Guichard et al., 1996).

Conjuntamente, esses dados sugerem que a formação de adutos entre DOVA e a guanina no DNA pode ser relevante no processo de danos ao DNA promovido por ALA que poderia levar à mutagênese.

5.3. Danos em DNA mitocondrial induzidos por ALA

O DNA mitocondrial pode ser considerado um alvo significativo das espécies reativas de oxigênio (Bandy e Davison, 1990).

Yakes e Van Houten (1997) relataram que os danos ao DNA mitocondrial são mais extensos e persistem por mais tempo que os danos ao DNA nuclear em células de fibroblastos humanos submetidos a estresse oxidativo gerado por H_2O_2 . Estudo de reparo revelou que as células expostas a H_2O_2 por 60 min conseguiram reparar o DNA do gene da β -globina em 1,5 h, enquanto os danos ao DNA mitocondrial persistiram por 3,5 h. Quando as células foram expostas a H_2O_2 por 15 min, o reparo de ambos os genes foi observado em 1,5 h. Estudos de Ames *et al.*, 1995, revelaram que o DNA mitocondrial de ratos mais velhos apresenta mais danos que o de ratos mais jovens.

Salazar e Van Houten (1997) relataram também um aumento nos danos ao DNA mitocondrial em células tratadas com H_2O_2 . Já foi demonstrado também que os produtos da peroxidação lipídica podem atacar o DNA mitocondrial (Hruszkewycz, 1992) e que este é mais susceptível que o nuclear à alquilação (Allen e Coombs, 1980; Myers *et al.*, 1988). Niranjan *et al.* (1982) demonstraram que a administração do carcinógeno hepático aflotoxina B1 a ratos resulta em ligação covalente ao DNA mitocondrial do fígado em concentrações de três a quatro vezes maior que ao DNA nuclear, permanecendo inalterada mesmo após 24 horas.

Esses dados indicam que o DNA mitocondrial seria mais susceptível que o nuclear ao ataque por ROS. De fato, Richter *et al.* (1988) relataram maior quantidade de 8-oxodGuo em DNA mitocondrial em relação ao nuclear pós tratamento de mitocôndrias isoladas com raios γ . Várias são as razões para se acreditar na maior susceptibilidade do DNA mitocondrial aos danos oxidativos; a mitocôndria consome mais de 90% do oxigênio celular e a cadeia respiratória é uma fonte contínua de ROS (Chance *et al.*, 1979); o DNA mitocondrial não possui histonas, estando mais susceptível ao ataque por ROS que o DNA nuclear. O genoma mitocondrial possui poucas seqüências não codificadoras e não possui introns. Além disso, a mitocôndria é menos eficiente no reparo de danos ao DNA e erros de replicação que o núcleo (Clayton, 1984).

A mitocôndria parece não possuir reparo por excisão de nucleotídeos (Clayton *et al.*, 1974, Myers *et al.*, 1988). Entretanto é capaz de reparo por excisão de bases (LeDoux *et al.*, 1999). Já foram identificadas três uracil DNA glicosilases (Anderson e Friedberg, 1980; Gupta e Sirover, 1981; Domena e Mosbaugh, 1985), duas endonucleases específicas para sítios apurínicos/apirimidínicos e uma DNA ligase (Levin e Zimmerman, 1976) que podem ser responsáveis pelos baixos níveis de lesões oxidativas em condições fisiológicas (Hegler *et al.*, 1993). Já foi identificada uma endonuclease específica pra danos oxidativos em mitocôndria de fígado de ratos que é específica para 8-oxodGuo e sítos abásicos no DNA dupla fita (Croteau *et al.*, 1997). Estudos imunológicos localizaram o produto do gene *OGG1* humano em mitocôndrias (Takao *et al.*, 1998). Myers *et al.* (1988) demonstraram que *O*⁶-metil-2'-desoxiguanosina pode ser reparada na mitocôndria por uma proteína codificada no núcleo e transportada para mitocôndria.

Outros estudos também sugerem que a mitocôndria pode ter reparo por recombinação; DNA mitocondrial de hamster foi capaz de reparar lesões induzidas por cisplatina, a qual é reparada por recombinação (Ledoux *et al.*, 1992), ensaios *in vitro* também apresentaram recombinação entre plasmídios utilizando extratos de proteína de mitocôndrias humanas (Thyagarajan *et al.*, 1996).

Vários estudos correlacionam alterações funcionais e estruturais na mitocôndria e danos ao seu DNA, ao envelhecimento celular (Miquel, 1992) e ao processo carcinogênico (Shay e Werbin, 1987; Bandy e Davison, 1990). Alterações na estrutura, nas funções e no número de mitocôndrias em células tumorais, conjuntamente com altas taxas glicolíticas já foram reportadas em algumas linhagens celulares tumorais (Pederson, 1978). A toxicidade de agentes anti-mitocondriais a alguns tumores, a reação preferencial de carcinógenos com DNA mitocondrial em relação ao nuclear (Yakes *et al.*, 1997; Salazar e Van Houten, 1997) e relação direta entre a potência carcinogênica de uma série de *N*-hidroxiacetilaminofluorenos em ratos e sua capacidade de afetar a fosforilação oxidativa (Hadler e Daniel, 1973), são indícios de que a mitocôndria pode exercer um papel importante nos danos celulares quimicamente induzidos.

Já foi demonstrado que o ALA também é capaz de alterar as funções mitocondriais através da produção de ROS (Hermes-Lima *et al.*, 1991a; Hermes-Lima *et al.*, 1992; Vercesi *et al.*, 1994) e biópsias de fígado de pacientes portadores de porfirias apresentaram alterações estruturais em mitocôndrias (Biempica *et al.*, 1974).

Dentro deste contexto, o maior número de lesões encontradas no DNA mitocondrial em relação ao nuclear em células tratadas com ALA, indica que danos à mitocôndria também poderia contribuir para os mecanismos envolvidos na maior incidência de HCC em pacientes com AIP.

Várias são as hipóteses para explicar como as mutações no DNA mitocondrial poderiam contribuir para o processo carcinogênico (Shay e Werbin, 1987; Bandy e Davison, 1990).

As mutações mitocondriais poderiam fornecer à célula vantagens de crescimento e seriam então acumuladas, até que a célula se tornasse homoplástica para aquela mutação ou que pelo menos um conteúdo mínimo de mitocôndrias contendo as mutações fosse alcançado. Esse evento isolado ou em conjunto com um oncogene ativado, levaria a célula à tumorigênese. Outro modelo propõe que as mutações mitocondriais seriam deletérias e que essas mitocôndrias seriam eliminadas por segregação estocástica ou não, dependente do tempo. Desse modo, seria assumido que a mitocôndria codificaria um fator importante para a supressão da tumorigênese. A redução gradual do número de mitocôndrias durante o estágio de progressão do câncer levaria à uma redução simultânea do supressor citoplasmático. Essa diminuição poderia levar a uma gradual ativação de um oncogene mutado e ao estabelecimento de um fenótipo mutado (Shay e Werbin, 1987). Entretanto não podemos deixar de considerar o estado energético da célula.

Outra hipótese seria a inserção de seqüências de DNA mitocondrial em regiões do DNA nuclear que levariam a alterações na conformação do DNA causando quebras que poderiam ativar oncogenes ou colocar o gene sob um promotor diferente (Reid, 1983). Já foram encontradas seqüências de DNA mitocondrial em DNA nuclear de ratos (Hadler *et al.*, 1983) e durante o desenvolvimento da senescência em *Podospora anserina*, um plasmídio mitocondrial é inserido no DNA nuclear (Osiewacz e Esser, 1984).

Entretanto, de acordo com nossos resultados, a hipótese mais plausível para a implicação dos danos ao DNA mitocondrial no processo carcinogênico seria a conexão entre a deficiência respiratória de mitocôndrias mutantes e a liberação aumentada de ROS e de produtos secundários da peroxidação lipídica para o citossol, expondo o núcleo e outros componentes celulares a essas espécies citotóxicas.

Aumentando o estresse oxidativo, as mutações no DNA mitocondrial, induzidas por agentes carcinogênicos, poderiam amplificar os danos ao DNA nuclear e aumentar a probabilidade de ativação de oncogenes ou inativação de genes supressores de tumor (Bandy e Davison, 1990). Mutações mitocondriais que aumentam o estresse oxidativo, também poderiam influenciar a proliferação celular através de alterações no armazenamento de cálcio ou na sinalização celular (Burdon e Rice-Evans, 1989).

5.4. Mutagenicidade induzida por ALA e por DOVA

Recentemente, foi relatado que o ALA é capaz de induzir aberrações cromossômicas em hepatócitos de ratos (Fiedler *et al.*, 1996) e o potencial carcinogênico do ALA tem recebido atenção adicional com a utilização do ALA como um agente fototerápico (Kennedy e Pottier, 1992; Ortel *et al.*, 1993, Peng *et al.*, 1997, Fuchs *et al.*, 2000).

Nossos resultados indicam que o ALA pode ser uma agente mutagênico, como foi observado pelo Teste de microssuspensão de Kado e também do Cromoteste.

Linhagens de *S. typhimurium* têm sido utilizadas para monitorar o potencial carcinogênico de diversos compostos. As linhagens TA102 e TA104 carregam a mutação nonsense (-TAA-) no sítio de reversão que está presente em uma única cópia no cromossomo (TA104), ou em múltiplas cópias em plasmídios (TA102). Ambas as linhagens foram originalmente desenvolvidas para detectar peróxidos e outros oxidantes. Vários agentes oxidantes mutagênicos já foram testados como raios-X, bleomicina, H₂O₂ e outros hidroperóxidos; aldeídos como formaldeído, glioxal, glutaraldeído, malonaldeído e psoralenos (Levin *et al.*, 1982; Levin *et al.*,

1984, Marnett et al., 1985). Esses compostos são pouco ou nada detectados em linhagens que contêm os pares C:G no sítio de reversão.

A mutagenicidade do ALA e do DOVA foi detectada somente na linhagem TA104. Podemos observar que as razões de mutagenicidade calculadas para ambos os compostos foram semelhantes.

Comparando-se com o Teste de Kado, as doses de metilglioxal para indução de toxicidade foram um pouco menores, indicando uma maior sensibilidade da cepa de E.coli PQ37 em relação a S. typhimurium TA104. No entanto as doses de ALA e DOVA que induziram a resposta SOS foram as mesmas que no Teste de Kado. Esse efeito já era esperado uma vez que o ALA é um composto endógeno e não deveria, a princípio, ser mutagênico em baixas doses. Em doses mais elevadas, devido à produção de ROS e de DOVA pode-se tornar um indutor de lesões no DNA aumentando a probabilidade de mutações no DNA.

O Teste de Kado e o Cromoteste indicaram que o ALA e o DOVA são capazes de promover mutações no DNA, revertendo o fenótipo da S. typhimurium TA104, permitindo que elas metabolizem a histidina e também de induzir a resposta SOS em E.coli PQ37.

De fato, outros compostos que também induzem a formação de adutos em DNA já foram testados quanto a sua mutagenicidade pelo Teste de Ames e pelo Cromoteste. Crotonaldeído promoveu o crescimento de 940 revertentes/ μ mol em linhagem TA104 (Marnett et al., 1985) e de 1952 revertentes/ μ mol em TA100 (Eder et al., 1992) e também induziu resposta SOS no Cromoteste em PQ37 (Eder et al., 1993). O tratamento de TA104 com 2-hexenal induziu 460 revertente/ μ mol (Marnett et al., 1995) e 980 revertentes/mmol na linhagem TA100 (Eder et al., 1992). Desse modo, podemos considerar que o DOVA também pode contribuir significativamente para os danos ao DNA promovidos por ALA.

Considerando todos os resultados reportados nesse trabalho, podemos estabelecer uma proposta de bases moleculares envolvendo diferentes mecanismos de lesões ao DNA promovidas por ALA, que poderiam levar a mutações, constituindo o passo inicial de promoção de um processo carcinogênico. Esses processos poderiam ser conectados à maior incidência de HCC em pacientes sintomáticos portadores de AIP (Figura 41).

Figura 41: Possíveis mecanismos de danos ao DNA induzidos por ALA associados a sua mutagenicidade.

6. CONCLUSÕES

O ácido 5-aminolevulínico, o primeiro precursor do grupo heme, acumula-se principalmente no fígado de pacientes portadores de AIP, em concentrações que podem alcançar oito ou mais vezes que a do nível plasmático. Devido à produção de ROS durante sua oxidação, o ALA pode ser visto como um pró-oxidante endógeno, causando danos a diversas biomoléculas. De fato, há várias evidências do seu potencial pró-oxidante, principalmente na presença de metais de transição. Deste modo o ALA pode estar relacionado às manifestações clínicas da AIP, inclusive ao maior índice de HCC (Lithner e Wetterberg, 1984; Bengtsson e Hardel, 1986, Kauppinen e Mustajoki, 1988; Gubler et al., 1990; Thunissen et al., 1991), uma vez que a produção de ROS tem sido constantemente relacionada à iniciação e à promoção do câncer (Nassi-Calo et al., 1989; Cerruti et al., 1990; Frenkel, 1992; Stadtman, 1992; Ames et al., 1993).

Os resultados apresentados nesse trabalho mostraram que o ALA foi capaz de promover lesões ao DNA, como quebras de fita em DNA plasmidial, aumento dos níveis de várias bases oxidadas *in vitro* e *in vivo*, além da formação de adutos entre a dGuo e o DOVA, produto final de oxidação do ALA. O ácido 5-aminolevulínico e o DOVA também foram capazes de induzir aumento de mutagenicidade em *S. typhimurium* TA104, e resposta SOS em *E. coli* P37.

Considerando os danos ao DNA promovidos pelo ALA podemos estabelecer uma possível conexão entre a concentração elevada de ALA, os metais de transição, aldeídos e o processo de displasia celular. É bem documentado que íons de metais de transição, como o ferro, podem exercer um papel importante na geração de quantidades deletérias de ROS causando, deste modo, mudanças patológicas. Vários casos de câncer de fígado têm sido relatados em pacientes com acúmulo de ferro. Deste modo, o aumento da geração de ROS pode levar a danos oxidativos e ser potencialmente carcinogênico (Nassi-Calo et al., 1989; Cerruti et al., 1990; Frenkel, 1992; Batlle e Ridley, 1991, Loft e Poulsen, 1996). DNA de fígado pode ser um alvo potencial para as ROS geradas pela oxidação aeróbica do ALA catalisada por metais e os íons de Fe^{2+} podem ser cruciais para o dano ao DNA induzido por ALA *in vivo*. O grande acúmulo de Fe^{3+} -ferritina observado no citoplasma de hepatócitos de

pacientes com AIP (Biempica et al., 1974) pode ser uma fonte potencial de íons Fe^{2+} assim como o $\text{O}_2^{\bullet-}$ e o radical enoil gerados pelo ALA que podem liberar Fe^{2+} da ferritina (Oteiza et al., 1995; Rocha et al., 2000).

Anormalidades no metabolismo das porfirinas, que inclui o acúmulo de ALA, foram previamente implicadas na patogênese de HCC (Salata et al., 1985; Lithner e Wetterberg, 1984; Kauppinen e Mustajoki, 1988). Bengtsson e Hardell (1986) propuseram duas hipóteses para explicar esta associação: primeiro, uma mutação de ponto no locus do gene da porfobilinogênio deaminase, presente no braço longo do cromossomo 11, pode estar ligada com a ativação do oncogene responsável pelo desenvolvimento do HCC. Segundo, as porfirinas por si próprias poderiam ser carcinogênicas.

Considerando os resultados apresentados nesse trabalho, uma terceira proposta de bases moleculares para explicar as recentes associações do HCC com a AIP pode agora ser sugerida.

Em AIP, ALA é superproduzida primariamente como resultado da baixa atividade da porfobilinogênio deaminase (Esquema I) (Hindmarsh, 1986); grandes quantidades de ALA são acumuladas cronicamente no fígado, provavelmente na mitocôndria, durante anos (Pereira *et al.*, 1992); o ferro cronicamente acumulado nos hepatócitos de pacientes com AIP participa da oxidação do ALA, produzindo H_2O_2 (Monteiro *et al.*, 1989) e o ataque ao material genético (DNA nuclear e/ou mitocondrial) pelos radicais $^{\bullet}\text{OH}$ formados *in situ* leva à:

- (i) hidroxilação de bases;
- (ii) quebras de fita;
- (iii) alquilação das bases do DNA pelo DOVA, formando adutos;
- (iv) as lesões ao DNA podem ser potencialmente mutagênicas, constituindo o primeiro passo para o estabelecimento de um processo carcinogênico. (Figura 41).

Apesar das concentrações utilizadas nos experimentos serem da ordem de mM, devemos considerar que ainda não se determinou para cada tipo de célula qual a quantidade de ALA realmente captada. Além disso, é necessário ressaltar que nas estruturas celulares como a mitocôndria e o núcleo, a concentração

localizada de ALA pode ser altíssima, considerando o volume mínimo do microambiente.

Em conclusão, níveis aumentados de ALA cronicamente, em pacientes com AIP, podem desempenhar um papel importante nos danos ao DNA. A formação de bases oxidadas e alquiladas poderia desencadear processos mutagênicos levando a um maior risco de desenvolvimento de um carcinoma hepatocelular nesses pacientes.

O conhecimento sobre a patogênese do câncer é um pré-requisito básico para a prevenção e tratamento do mesmo; o estudo do potencial pró-oxidante do ALA pode servir de modelo na tentativa de melhor compreender a participação das ROS e dos aldeídos nos danos ao DNA (Figura 42).

Figura 42: Participação do ALA na promoção de danos em DNA entre as possíveis fontes de geração de espécies reativas de oxigênio e aldeídos.

7. PERSPECTIVAS

Os resultados apresentados nessa tese, devido a sua amplitude, propiciam várias perspectivas de prosseguimento do trabalho.

- A investigação da formação de adutos de DNA com o DOVA in vivo, utilizando fígado de ratos tratados com ALA ou camundongos deficientes em PBG deaminase e também biópsias de fígado de pacientes portadores de AIP e HCC.
- O espectro de mutações promovido por ALA também poderia ser obtido utilizando-se o sistema de vetor ponte. Resultados preliminares indicam um aumento do número de mutantes de bactérias transformadas com plasmídios tratados com ALA.
- A construção de oligonucleotídeos contendo o aduto poderia ser utilizado para experimentos de reparo in vitro e de mutagenicidade e reparo em células de mamíferos.
 - Investigação da estabilidade do aduto no DNA
 - Verificação de outros tipos de adutos no DNA resultantes de produtos da lipoperoxidação iniciada pelo ALA.
 - Verificação de reatividade do DOVA com outras bases do DNA.
 - Investigação da participação da pirazina, produto da dimerização do ALA na presença de cobre, nos danos ao DNA. Resultados preliminares indicam que esse composto é altamente eficiente em promover lesões ao DNA.
- Estudo da reatividade do ALA com proteínas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agarwal, S. e Draper, H.H. (1992) Isolation of a malondialdehyde-deoxiguanosine adduct from rat liver DNA. *Free Rad. Biol. Med.* **13**, 695-699.
- Aida, M. e Nishimura, S. (1987) An *ab initio* molecular orbital study on the characteristics of 8-hydroxyguanine. *Mutat. Res.* **192**, 83-89.
- Aisen, P. e Listowsky, I. (1980) Iron transport and storage proteins. *Ann. Rev. Biochem* **49**, 357-393.
- Albert, R.E., Miller, M.L., Cody, T., Andringa, A., Shukla, R. e Baxter, C.S. (1991) Benzo[a]pyrene induced skin damage and tumor promotion in the mouse. *Carcinogenesis* **12**, 1273-1280.
- Alessio, L. e Foa, V. (1983) Lead: human biological monitoring. In Alessio, L., Berlin, A., Roy, R. e Boni, M. (eds) *Industrial Chemical Series*. CECA, Luxemburg. p. 107.
- Allen, J.A. e Coombs, M.M. (1980) Covalent binding of polycyclic aromatic compounds to mitochondrial and nuclear DNA. *Nature* **287**, 244-245.
- Ames, B. N., Shigenaga, M. S., and Hagen, T. M. (1993) Oxidants, antioxidants, and degenerative diseases of aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 7915-7922.
- Ames, B.N., McCann, J. e Yamasaki, E. (1975) Methods for detecting carcinogenesis and mutagens with the *Salmonella*/mammalian microsome mutagenicity test. *Mutat. Res.* **31**, 347-364.
- Ames, B.N., Shigenaga, M.S. e Hagen, T.M. (1995) Mitochondrial decay in aging. *Biochim. Biophys. Acta* **1271**, 165-170.
- Anderson, C.T.M. e Friedberg, E.C. (1980) The presence of nuclear and mitochondrial uracil-DNA glycosylase in extracts of human KB cells. *Nucleic Acid Res.* **8**, 875-888.
- Anderson, K.E. (1989) LHRH analogues for hormonal manipulation in acute intermittent porphyria. *Semin. Hematol.* **26**, 10-15.
- Anderson, K.E., Freddara, U. e Kappas, A. (1982) Induction of hepatic cytochrome P-450 by natural steroids: relationship to the induction of δ -aminolevulinic acid synthase and porphyrin accumulation in the avian embryo. *Arch. Biochem. Biophys.* **217**, 597-608.
- Andersson, C. (1997) *Acute Intermittent Porphyria in Northern Sweden - A population-based study* - Dissertation, Departments of Family Medicine and Medicine University of Umea and Primary Health Care Center, Arjeplog, Sweden.
- Andersson, C., Bjersing, L. e Lithner, F. (1996) The epidemiology of hepatocellular carcinoma in patients with acute intermittent porphyria. *J. Int. Med.* **240**, 195-201.

Andersson, C., Thunell, S., Floderus, Y., Forsell, C., Lundin, G., Anvret, M., Lannfelt, L., Wetterberg, L. e Lithner, F. (1995) Diagnosis of acute intermittent porphyria in Northern Sweden: an evaluation of mutation analysis and biochemical methods. *J. Int. Med.* **237**, 301-308.

Andersson, L. e Lithner, F. (1994) Hypertension and renal disease in patients with acute intermittent porphyria. *J. Int. Med.* **236**, 169-175.

Andriolo, A., Mocelin, A.J., Stella, S.R., Ajzen, H. e Ramos, O.L. (1980) Determination of erythrocyte uroporphobilinogen I synthase in chronic renal failure. *Clin. Chim. Acta* **104**, 241-244.

Arai, K., Morishita, K., Shinmura, K., Kohno, T., Kim, S.R., Nohmi, T., Taniwaki, M., Ohwada, S. e Yokota, J. (1997) Cloning of a human homolog of the yeast OGG1 gene that is involved in the repair of oxidative DNA damage. *Oncogene* **14**, 2857-2861.

Armel, P.R., Strinse, G.F. e Wallace, S.S. (1977) Studies on *Escherichia coli* X-ray endonuclease specificity: roles of hydroxyl and reducing radicals in the production of DNA lesions. *Radiat. Res.* **69**, 328-338.

Arnold, W.N. (1988) Vincent van Gogh and the thujone connection. *J. Am. Med. Assoc.* **260**, 3042-3044.

Arnold, W.N. (1989) Absinthe. *Sci. Am.* **260**, 112-117.

Au, K.G., Clark, S., Miller, J.H. e Modrich, P. (1989) *Escherichia coli* mutY gene product is required for specific A:G-C:G mismatch correction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 8877-8881.

Auffret van der Kemp, P.A., Thomas, D., Barbey, R., Oliveira, R. e Boiteux, S. (1996) Cloning and expression in *Escherichia coli* of the OGG1 gene of *Saccharomyces cerevisiae*, which codes for a DNA glycosylase that excises 7,8-dihydro-8-oxoguanine and 2,6-diamino-4-hydroxy-5-N-methylformamidopyrimidine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 5197-5202.

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.

Badawy, A.A.B., Morgan, C.J., e Davis, N.R. (1987) Effects of the heme 5-aminolevulinate on tryptophan metabolism and disposition in the rat. *Biochem. J.* **248**, 293-295.

Balentine, J.D. (1982) *Pathology of Oxygen Toxicity*. Academic Press, New York.

Bandy, B. e Davison, A.J. (1990) Mitochondrial mutations may increase oxidative stress: implications for carcinogenesis and aging? *Free Rad. Biol. Med.* **8**, 523-539.

Basu A.K. e Essigmann J.M. (1988) Site-specific modified oligodeoxynucleotides as probes for the structural and biological effects of DNA-damaging agents. *Chem. Res. Toxicol.* **1**, 1-18.

Basu, A.K., Loechler, E.L., Leadon, S.A. e Essigmann, J.M. (1989) Genetic effects of thymine glycol:site-specific mutagenesis and molecular modeling studies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 7677-7681.

Basu, A.K., O'Hara, S.M., Valladir, P., Stone, K., Mols, O. e Marnett, L.J. (1988) Identification of adducts formed by reaction of guanine nucleosides with malondialdehyde and structurally related aldehydes. *Chem. Res. Toxicol.* **1**, 53-59.

Battle, A.M. del C. (1993) Porphyrins, porphyrias, cancer and photodynamic therapy-a model for carcinogenesis. *J. Photochem. Photobiol. B. Biol.* **20**, 5-22.

Beattie, A.D. e Goldberg, A. (1976) Acute intermittent porphyria. Natural history and prognosis. In Doss, M. e Lahn, M. (eds) *Porphyrias in human diseases*. Basel, Karger, p. 245-250.

Bechara, E.J.H., Medeiros, M.H.G., Monteiro, H.P., Hermes-Lima, M., Pereira, B., Demasi, M., Costa, C.A., Abdalla, D.S.P., Onuki, J., Wendel, C.M.A. e Di Mascio, P. (1993) A free radical hypotheses of lead poisoning and inborn porphyrias associated with 5-aminolevulinic acid overload. *Química Nova* **16**, 385-391.

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, K.B. e Ames, B. N. (1997) Oxidative decay of DNA. *J. Biol. Chem.* **272**, 19633-19636.

Bengtsson, N.O. e Hardell, L. (1986) Porphyrias, porphyrins and hepatocellular cancer. *Br. J. Cancer* **54**, 115-117.

Berónius, H. (1935) Heredo-familjär fall av porfyriksjukdom. *Nord. Med. Tidskrift* **10**, 1311-1316.

Biernacki, P., Swaak, A.J.G., Beindorff, C.M. e Koster, J.F. (1986) Superoxide-dependent and independent mechanisms of iron mobilization from ferritin by xanthine oxidase. *Biochem. J.* **239**, 169-173.

Biernacki, P., van Eijk, H.G., Swaak, A.J.G. e Koster, J.F. (1984) Iron mobilization from ferritin by superoxide derived from stimulated polymorphonuclear leukocytes. *J. Clin. Invest.* **73**, 1576-1579.

Biernacki, L., Kosower, N., Ma, M.H. e Goldfischer, S. (1974) Cytochemical & ultrastructural studies of liver in acute intermittent porphyria and porphyria cutanea tarda. *Arch. Pathol.* **98**, 336-343.

Bird, R.P., Draper, H.H. e Basur, P.K. (1982) Effect of malonaldehyde and acetaldehyde on cultured mammalian cells; production of micronuclei and chromosomal aberrations. *Mutat. Res.* **101**, 237-246.

Bisceglie, A.M., Rustgi, V.K., Hoofnagle, J.H., Dusheiko, G.M. e Lotze, M.T. (1988) NIH conference. Hepatocellular carcinoma. *Ann Intern. Med.* **89**, 390-401.

Bishop, D.F., Henderson, A.S. e Astrin, K.H. (1990) Human δ -aminolevulinate synthase: assignment of the housekeeping gene to 3p21 and the erythroid-specific gene to the X chromosome. *Genomics* **7**, 207-214.

Bjeldanes, L.F. e Chew, H. (1979) Mutagenicity of 1,2-dicarbonyl compounds: maltol, kojic acid, diacetyl and related substances. *Mutat. Res.* **67**, 367-371.

Bjelland, S., Birkeland, N.-K., Benneche, T., Volden, G. e Seeberg, E. (1994) DNA glycosylase activities for thymine residues oxidized in the methyl group are functions of the AlkA enzyme in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **269**, 30489-30495.

Bjersing, L., Andersson, C. e Lithner, F. (1996) Hepatocellular carcinoma in patients from northern Sweden with acute intermittent porphyria: morphology and mutations. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **5**: 393-397.

Bohr, V.A. e Dianov, G.L. (1999) Oxidative DNA damage processing in nuclear and mitochondrial DNA. *Biochimie* **81**, 155-160.

Boiteux, S. e Radicella, P. (1999) Base excision repair of 8-hydroxyguanine protects DNA from endogenous oxidative stress. *Biochimie* **81**, 59-67.

Boiteux, S. (1993) Properties and biological functions of the NTH and FPG proteins of *Escherichia coli*: two glycosylases that repair oxidative damage in DNA. *J. Photochem. Photobiol. B* **19**, 87-96.

Boiteux, S. e Radicella, P. (2000) The human *OGG1* gene: structure, functions, and its implication in the process of carcinogenesis. *Arch. Biochem. Biophys.* **377**, 1-8.

Boiteux, S., D' Connor, T.T., Lederer, F., Gouyette, A. e Laval, J. (1990) Homogenous Fpg protein: a DNA glycosylase which excises imidazole ring-opened purines and nicks DNA at apurinic/aprimidinic sites. *J. Biol. Chem.* **265**, 3916-1922.

Bonkovsky, H.L., Cable, E.E., Cable, J.W., Donohue, S.E., White, E.C., Greene, Y.J., Lambrecht, R.W., Srivastava, K.K. e Arnold, W.N. (1992) Porphyrinogenic properties of the terpenes camphor, pinene, and thujone (with a note on historic implications for absinthe and the illness of Vincent van Gogh). *Biochem. Pharm.* **43**, 2359-2368.

Bonkowsky, H.L., Tschudy, D.P., Collins, A., Doherty, J., Bossenmaier, I., Cardinal, R. e Watson, C.J. (1971) Repression of the over-production of porphyrin precursors in acute intermittent porphyria by intravenous infusions of hematin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **68**, 2725-2729.

Borek, C., Ong, A., Mason, H., Zeider, M., Witz, G. e Mehlman, M.A. (1987) Ozone carcinogenesis and co-carcinogenesis and its prevention. In Cerruti, P.A., Nygaard, O.F. e

Simic, M.G. (eds) *Anticarcinogenesis and radiation protection*. Plenum Press, New York/London, p. 247-252.

Breen, A.P. e Murphy, J.A. (1995) Reactions of oxyl radicals with DNA. *Free. Rad. Biol. Med.* **18**, 1033-1077.

Breimer, L.H. (1984) Enzymatic excision from γ -irradiated polydeoxyribonucleotides of adenine residues whose imidazole rings have been ruptured. *Nucleic Acid. Res.* **12**, 6359-6367.

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

Britigan, B.E., Pou, S., Rosen, G.M., Lilleg, D.M. e Buettner, G.R. (1990) Hydroxyl radical is not a product of the reaction of xanthine oxidase and xanthine. *J. Biol. Chem.* **265**, 17533-17538.

Brooks, B.R. e Klammerth, O.L. (1968) Interaction of DNA with bifunctional aldehydes. *Eur. J. Biochem.* **5**, 178-182.

Burdon, R.H. e Rice-Evans, C. (1989) Free radical and regulation of mammalian cell proliferation. *Free Rad. Res. Comm.* **6**, 345-358.

Cabrera, M., Nighiem, Y. e Miller, J.H. (1988) mutM, a second mutator locus in *Escherichia coli* that generates G:C-T:A transversions. *J. Bacteriol.* **170**, 5405-5407.

Cadet, J. e Téoule, R. (1978) Comparative study of oxidation of nucleic acid components by hydroxyl radicals, singlet oxygen and superoxide anion radicals. *Photochem. Photobiol.* **28**, 661-667.

Cadet, J., Berger, M., Douki, T. e Ravanat, J.-L. (1997) Oxidative damage to DNA: formation, measurement, and biological significance. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **131**, 1-87.

Carneiro, R.C.G. e Reiter, R.J. (1998) Melatonin protects against lipid peroxidation induced by delta-aminolevulinic acid in rat cerebellum, cortex and hippocampus. *Neuroscience* **82**, 293-299.

Carvalho, H., Bechara, E.J.H., Meneghini, R. e Demasi, M. (1997) Haem precursor δ -aminolaevulinic acid induces activation of the cytosolic iron regulatory protein 1. *Biochem. J.* **328**, 827-832.

Carvalho, V.M., Asahara, F., Di Mascio, P., Arruda-Campos, I.P.A., Cadet, J. e Medeiros, M.H.G. (2000) Novel 1, N^6 -etheno-2'-deoxyadenosine adducts from lipid peroxidation products. *Chem. Res. Toxicol.* **13**, 397-405.

Carvalho, V.M., Di Mascio, P., Arruda-Campos, I.P.A., Douki, T., Cadet, J. e Medeiros, M.H.G. (1998) Formation of 1, N^6 -etheno-2'-deoxyadenosine adducts by *trans,trans*-2,4-decadienal. *Chem. Res. Toxicol.* **11**, 1042-1047.

Cavanagh, J.B. e Ridley, A.R. (1967) The nature of the neuropathy complicating acute intermittent porphyria. *Lancet* **2**, 1023-1024.

Cerutti, P., Amstad, P., Larsson, R., Shah, G. e Krupitza, G. (1990) Mechanisms of oxidant carcinogenesis. *Prog. Clin. Biol. Res.* **347**, 183-186.

Chance, B., Sies, H. e Boveris, A. (1979) Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol. Rev.* **59**, 527-605.

Chaudhary, A.K., Nobuko, 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.

Chaudière, J. (1994) Some chemical and biochemical constraints of oxidative stress in living cells. In Rice-Evans, C.A. e Burton, R.H. (eds) *Free radical damage and its control*. Elsevier, Amsterdam, p. 25-66.

Cheng, K.C., Cahill, D.S., Kasai, H., Nishimura, S. e Loeb, L.A. (1992) 8-hydroxyguanine, an abundant form of oxidative DNA damage, cause G-T and A-C substitutions. *J. Biol. Chem.* **267**, 166-172.

Chetsanga, C.J. e Lindahl, T. (1979) Release of 7-methylguanine residues whose imidazole rings have been opened from damaged DNA by a DNA glycosylase from *Escherichia coli*. *Nucleic Acid. Res.* **6**, 3673-3684.

Chevillard, S., Radicella, J.P., Levalois, C., Lebeau, J., Poupon, M.F., Oudard, S., Dutrillaux, B. e Boiteux, S. (1998) Mutations in *OGG1*, a gene involved in the repair of oxidative DNA damage, are found in human lung and kidney tumours. *Oncogene* **16**, 3083-3086.

Chisolm Jr., J.J. (1971) Lead poisoning. *Sci. Am.* **224**, 15-23.

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.

Clark, J.M. e Beardsley, G.P. (1986) Thymine glycol lesions terminate chain elongation by DNA polimerase I *in vitro*. *Nucleic Acids Res.* **14**, 737-749.

Clayton, D.A. (1984) Transcription of the mammalian mitochondrial genome. *Ann. Rev. Biochem.* **53**, 573-594.

Clayton, D.A., Doda, J.N. e Friedberg, E.C. (1974) The absence of a pyrimidine dimer repair mechanism in mammalian mitochondria. *Proc. Natl. Acd. Sci. USA* **71**, 2777-2781.

Crichton, R.R. (1973) Ferritin. *Struct. Bonding* **17**, 67-134.

Crichton, R.R., Roman, F. e Roland, F. (1980) Iron mobilization from ferritin by chelating agents. *J. Inorg. Biochem.* **13**, 305-316.

Cross, C.E., Halliwell, B., Borish, E.T., Pryor, W.A., Ames, B.N., Saul, R.L., McCord, J.M. e Harman, D. (1987) Oxygen radicals and human diseases. *Ann. Intern. Med.* **107**, 526-545.

Croteau, D.I., Rhys, C.M.J., Hudson, E.K., Dianov, G.L., Hansford, R.G. e Bohr, V.A. (1997) An oxidative damage specific endonuclease from rat liver mitochondria. *J. Biol. Chem.* **272**, 27338-27344.

Culp, S.J., Cho, B.P., Kadlubar, F.F. e Evans, F.E. (1989) Structural and conformational analyses of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine. *Chem. Res. Toxicol.* **2**, 416-422.

Dahr, G.J., Bossenmaier, I., Cardinai, R., Petryka, Z.J. e Watson, C.J. (1978) Transitory renal failure following rapid administration of relatively large amount of hematine in a patient with acute intermittent porphyria in clinical remission. *Acta Med. Scand.* **203**, 437-443.

Dailey, H.A. (1997) Enzymes of heme biosynthesis. *JBIC* **2**, 411-417.

DaRoza, R., Friedberg, E.C., Duncan, B.K. e Warner, H.R. (1977) Repair of nitrous acid damage to DNA in *Escherichia coli*. *Biochemistry* **15**, 4934-4939.

Davies, K.J.A. e Delsignore, M.E. (1987) Protein damage and degradation by oxygen radicals. *J. Biol. Chem.* **262**, 9909-9913.

Dellarco, V.L. (1988) A mutagenicity assessment of acetaldehyde. *Mutat. Res.* **195**, 1-20.

Demasi, M., Penatti, C.A.A., DeLucia, R. e Bechara, E.J.H. (1996) The prooxidant effect of 5-aminolevulinic acid in the brain tissue of rats: implications in neuropsychiatric manifestations in porphyrias. *Free Rad. Biol. Med.* **20**, 291-299.

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

Devasagayam, T.P.A., Steenken, S., Obendorf, M.S.W., Schulz, W.A. e Sies, H. (1991) Formation of 8-hydroxy(deoxy)guanosine and generation of strand breaks at guanine residues in DNA by singlet oxygen. *Biochemistry* **30**, 6284-6289.

Deybach, J.C. e Puy, H. (1995) Porphobilinogen deaminase gene structure and molecular defects. *J. Bioenerg. Biomembr.* **27**, 197-205.

Di Mascio, P., Kaiser, S. e Sies, H. (1989) Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. *Arch. Biochem. Biophys.* **274**, 532-538.

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

Di Mascio, P., Murphy, M.E. e Sies, H. (1991) Antioxidant defense systems: The role of carotenoids, tocopherols and thiols. *Am. J. Clin. Nutr.* **53**, 194S-200S.

Di Mascio, P., Teixeira, P.C., Onuki, J., Medeiros, M.H.G., Dörnemann, D., Douki, T. e Cadet, J. (2000) DNA damage by 5-aminolevulinic acid and 4,5-dioxovaleric acids in the presence of ferritin. *Arch. Biochem. Biophys.* **373**, 2, 368-374.

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.

Dizdaroglu, M. (1985) Formation of an 8-hydroxyguanine moiety in deoxyribonucleic acid on γ -irradiation in aqueous solution. *Biochemistry* **24**, 4476-4481.

Dognin, J. e Crichton, R.R. (1975) Mobilization of iron from ferritin fractions of defined iron content by biological reductants. *FEBS Lett.* **54**, 234-236.

Domana, J.D. e Mosbaugh, D.W. (1985) Purification of nuclear and mitochondrial uracil-DNA glycosylase from rat liver. Identification of two distinct subcellular forms. *Biochemistry* **24**, 7320-7328.

Dörnemann, D. e Senger, H. (1980) The synthesis and properties of 4,5-dioxovaleric acid, a possible intermediate in the biosynthesis of 5-aminolaevulinic acid, and its *in vivo* formation in *Scenedesmus obliquus*. *Biochem. Biophys. Acta* **628**, 35-45.

Dosanjh, M.K., Chenna, A., Kim, E., Fraenkel Conrat, H., Samson, L. e Singer, B. (1994) All four known cyclic adducts formed in DNA by the vinyl chloride metabolite chloroacetaldehyde are released by a human DNA glycosylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 1024-1028.

Doss, M.; Sixel, D.F. e Verspohl, F. (1985) "Glucose effect" and rate limiting function of uroporphyrinogen synthase on porphyrin metabolism in hepatocyte culture: relationship with human acute hepatic porphyrias. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* **23**, 505-513.

Douki, T. e Ames, B.N. (1994) An HPLC 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. e Cadet, J. (1996) Peroxynitrite mediated oxidation of purine bases of nucleosides and isolated DNA. *Free Rad. Res.* **24**, 369-380.

Douki, T., Bretonniere, Y. e Cadet, J. (2000) Protection against radiation-induced degradation of DNA bases by polyamines. *Rad. Res.* **153**, 29-35.

Douki, T., Delatour, T., Paganon, F. e Cadet, J. (1996) Measurement of oxidative damage at pyrimidine bases in γ -irradiated DNA. *Chem. Res. Toxicol.* **9**, 1145-1151.

Douki, T., Martini, R., Ravanat, J.-L., Turesky, R.J. e Cadet, J. (1997) Measurement of 2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine and 8-oxo-7,8-dihydroguanine in isolated DNA exposed to gamma radiation in aqueous solution. *Carcinogenesis* **18**, 2385-2391.

Dover, S.B., Graham, A., Fitsimoses, E., Moore, M.R. e McColl, K.E.L. (1991) Haem arginate plus tin-protoporphyrin for acute hepatic porphyria. *Lancet* **338**, 263.

Dubiel, S.M., Zablotna-Rypien, B. e Mackey, J.B. (1999) Magnetic properties of human liver and brain ferritin. *Eur. Biophys. J.* **28**, 263-267.

Duncan, B.K. e Weiss, B. (1982) Specific mutator effects of ung (uracil-DNA-glycosylase) mutations in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **151**, 750-755.

Eder, E., Deininger, C., Neudecker, T e Deininger, D. (1992) Mutagenicity of β -alkyl substituted acrolein congeners in the *Salmonella typhimurium* strain TA100 and genotoxicity-testing in the SOS chromotest. *Environ. Mol. Mutag.* **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.

Eder, E., Schuler, D. e Budiawan, (1999) Cancer risk assessment for crotonaldehyde and 2-hexenal: an approach. In Singer, B. e Bartsch, H. (eds) *Exocyclic DNA adducts in mutagenesis and carcinogenesis*. IARC Sci. Pub., Lyon, **150**, p. 219-231.

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.

Engel, A. e Wallquist, E. (1935) Till frågan om en hereditär porfyrinurisdjukdom (To the question of hereditary porphyria). *Nord. Med. Tidskrift* **10**, 1521.

Epe, B., Pflaum, M. e Boiteux, S. (1993) DNA damage induced by photosensitization in cellular and cell-free systems. *Mutat. Res.* **299**, 135-145.

Epstein, O., Lavah, M., Schoenfeld, N., Nemesh, L., Shaklai, M., e Atsmon, A. (1983) Erythrocyte uroporphobilinogen synthase activity as possible diagnostic aid in the diagnosis of lymphoproliferative diseases. *Cancer* **52**, 828-832.

Esterbauer, H. (1985) Lipid peroxidation products: formation, chemical properties and biological activities. In Poli, G., Cheesman, K.H., Dianzani, M.U. e Slater, T.F. (eds) *Free Radicals in Liver Injury*. IRL Press, Oxford, p. 29-47.

Esterbauer, H., Eckl, P. e Ortner, A. (1990) Possible mutagens derived from lipid and lipid precursors. *Mutat. Res.* **238**, 223-233.

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.

Evans, J., Maccabee, M., Hatahet, Z., Courcelle, J., Bockrath, R., Ide, H. e Wallace, S.S. (1993) Thymine ring saturation and fragmentation products: lesion bypass, misinsertion and implicatons for mutagenesis. *Mutat. Res.* **299**, 146-147.

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

Fearon, E.R. (1997) Human cancer syndromes: clues to the origin and nature of cancer. *Science* **278**, 1043-1050.

Feig, D.I., Reid, T.M. e Loeb, L.A. (1994) Reactive oxygen species in tumorigenesis. *Cancer Res. Suppl.* **54**, 1890-1894.

Fenton, H.J.H. (1894) *J. Chem. Soc.* **65**, 899-910.

Fiedler, D.M., Eckl, P.M. e Krammer, B. (1996) Does δ -Aminolaevulinic acid induce genotoxic effects ? *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **33**, 39-44.

Fishel, R., Lescoe, R.K., Rao, M.R.S., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Garber, J., Kane, M. e Kolodner, R. (1993) The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cell* **75**, 1027-1038.

Floyd, R. (1990) The role of 8-hydroxyguanine in carcinogenesis. *Carcinogenesis* **11**, 1447-1450.

Floyd, R.A., Watson, J.J., Harris, J., West, M. e Wong, P.K. (1986) Formation of 8-hydroxydeoxyguanosine, hydroxyl free radical adduct of DNA in granulocytes exposed to the tumor promoter, tetradecanoylphorbolacetate. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **137**, 841-846.

Floyd, R.A., West, M.S., Eneff, K.L. e Schneider, J.E. (1990) Mediation of 8-hydroxyguanine formation in DNA by thiazin dyes plus light. *Free Rad. Biol. Med.* **8**, 327-330.

Floyd, R.A., West, M.S., Eneff, K.L., Hogsett, W.E. e Tingey, D.T. (1988) Hydroxyl free radical mediated formation of 8-hydroxyguanine in isolated DNA. *Arch. Biochem. Biophys.* **262**, 266-272.

Folkes, L.K., Candeias, L.P. e Wardman, P. (1995) Kinetics and mechanisms of hypochlorous acid reactions. *Arch. Biochem. Biophys.* **323**, 120-126.

Foot, C.S. (1986) Photosensitized oxidation and singlet oxygen: consequences in biological systems In Pryor, W.A. (ed) *Free radicals in biology*. Academic Press, New York, **2**, p. 85-133.

Fowler, R.G., Amutan, M.V. e Isbell, R.J. (1992) The interaction of the *Escherichia coli* *mutD* and *mutT* pathways in the prevention of A:T- G:C transversions. *Mutat. Res.* **284**, 307-319.

Fraga, C.G., Shigenaga, M.K., Park, J-W., Degan, P. e Ames, B.N. (1990) Oxidative damage to DNA during aging: 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in rat DNA and urine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 4533-4537.

Frenkel, K. (1992) Carcinogens-mediated oxidant formation and oxidative DNA damage. *Pharmac. Ther.* **53**, 127-166.

Frenkel, K., Cummings, A., Solomon, J., Cadet, J., Steinberg, J.J. e Teebor, G.W. (1985) Quantitative determination of the 5-(hidroxymethyl)uracil moiety in the DNA of γ -irradiated cells. *Biochemistry* **24**, 4527-4533.

Frenkel, K., Wei, L. e Wei, H. (1995) 7,12-Dimethylbenz(a)anthracene (DMBA) induces oxidative DNA modifications in vivo. *Free Rad. Biol. Med.* **19**, 373-380.

Frenkel, K., Zhong, Z., Wei, H., Karkoszka, J., Patel, U., Rashid, K., Georgescu, M. e Solomon, J.J. (1991) Quantitative high performance liquid chromatography analysis of DNA oxidized *in vitro* and *in vivo*. *Anal. Biochemistry* **196**, 126-136.

Fridovich, I. (1995) Superoxide radical and superoxide dismutase. *Annu. Rev. Biochem.* **64**, 97-112.

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

Fuchs, J., Weber, S. e Kaufmann, R. (2000) Genotoxic potential of porphyrin type photosensitizers with particular emphasis on 5-aminolevulinic acid: implications for clinical photodynamic therapy. *Free Rad. Biol. Med.* **28**, 537-548.

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.

Fung, H.F., Kow, Y.W., Van Houten, B. e Mossman, B.T. (1997) Patterns of 8-hydroxydeoxyguanosine formation in DNA and indications of oxidative stress in rat and human pleural mesothelial cells after exposure to crocidolite asbestos. *Carcinogenesis* **18**, 825-832.

Ghissassi, F.E.L., 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.

Gilbert, D.L. (ed) (1981) *Oxygen and Living Process: an Inter-disciplinary approach*. Springer, New York.

Gollnick, K. (1968) Photoxygenation reactions in solution. *Adv. Photochem.* **6**, 1-122.

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.

Gorchein, A. e Webber, R. (1984) δ -Aminolevulinic acid in plasma, cerebrospinal fluid, saliva and erythrocytes: studies in normal, uraemic and porphyric subjects. *Clin. Sci.* **72**, 103-112.

Görner, H. (1994) Photochemistry of DNA and related biomolecules: quantum yields and consequences of photoionisation. *J. Photochem. Photobiol. B* **26**, 117-139.

Gowen, L.C., Avrutskaya, A.V., Latour, A.M., Koller, B.H. e Leadon, S.A. (1998) *BRCA1* required for transcription-coupled repair of oxidative DNA damage. *Science* **281**, 1009-1012.

Grandchamp, B., Verneuil, H., Beaumont, C., Chrétien, S. Walter, O. e Nordmann, Y. (1987) Tissue-specific expression of porphobilinogen deaminase. Two isoenzymes from a single gene. *Eur. J. Biochem.* **162**, 105-110.

Granick, S. (1966) The induction *in vitro* of the synthesis of δ -aminolevulinic acid synthetase in chemical porphyria: A response to certain drugs, sex hormones, and foreign chemicals. *J. Biol. Chem.* **241**, 1359-1375.

Granick, S. e Michaelis, L. (1943) Ferritin II. Apoferritin of horse spleen. *J. Biol. Chem.* **147**, 91-97.

Green, M.H.L. (1978) Mechanisms of bacterial mutagenesis and properties of mutagenesis tester strains. *Arch. Toxicol.* **39**, 241-248.

Greene, L.A. e Tischler, A.S. (1976) Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **73**, 2424-2428.

Gubler, J.G., Bargetzi, M.J. e Meyer, U.A. (1990) Primary liver carcinoma in two sisters with acute intermittent porphyria. *Am. J. Med.* **89**, 540-541.

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.

Günther, H. (1925) Hämatoporphyrin. In Schittenhelm A. (ed) *Handbuch der Krankheiten des Blutes und der blutbildenden Organe*. Julius Springer, Berlin, p. 2.

Gupta, P.K. e Sirover, M. (1981) Stimulation of the nuclear uracil DNA glycosylase in proliferating human fibroblasts. *Cancer Res.* **41**, 3133-3136.

Gupta, R.C. (1984) Nonrandom binding of the carcinogen *N*-hydroxy-2-acetylaminofluorene to repetitive sequences of rat liver DNA *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 6943-6947.

Haddow, A. e Horning, E.S. (1960) On the carcinogenicity of an iron dextran complex. *J. Natl. Cancer Inst.* **24**, 109-147.

Hadler, H.I. e Daniel, B.G. (1973) A correlation between the carcinogenicity of isomeric *N*-hydroxy-*N*-acetylaminofluorenes and their *in vitro* effect on mitochondria. *Cancer Res.* **33**, 117-122.

Hadler, H.I., Dimitrijevic, B. e Mahalingam, T. (1983) Mitochondrial DNA and nuclear DNA from normal rat liver have a common sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **80**, 6495-6499.

Hadley, H. e Draper, H.H. (1990) Isolation of a guanine-malondialdehyde adduct from rat and human urine. *Lipids* **25**, 82-85.

Haeger, B. (1958) Urinary delta-aminolevulinic acid and porphobilinogen in different types of porphyria. *Lancet*, **ii**, 606-608.

Halliwell, B. (1978) Superoxide-dependent formation of hydroxyl radicals in the presence of iron chelates: is it a mechanism for hydroxyl radical production in biochemical systems? *FEBS Lett.* **92**, 321-326.

Halliwell, B. (1987) Oxidants and human diseases: some new concepts. *FASEB J.* **1**, 358-364.

Halliwell, B. e Gutteridge, J.M.C. (1990) The antioxidants of human extracellular fluids. *Arch. Biochem. Biophys.* **280**, 1-8.

Halliwell, B. e Gutteridge, J.M.C. (1999) *Free Radical in Biology and Medicine*. Clarendon Press, Oxford.

Halliwell, B., Gutteridge, J.M. e Cross, C.E. (1992) Free radicals, antioxidants and human diseases. Where are we now? *J. Lab. Clin. Med.* **119**, 598-620.

Hamfelt, A. e Wetterberg, L. (1969) Pyridoxal phosphate in acute intermittent porphyria. *Ann. NY Acad. Sci.* **166**, 361-364.

Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *E. coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**, 557-580.

Hang, B., Chenna, A., Rao, S. e Singer, B. (1996) 1,*N*⁶-Ethenoadenine and 3,*N*⁴-ethenocytosine are excised by separated human DNA glycosylases. *Carcinogenesis* **17**, 155-157.

Hang, B., Singer, B., Margison, G.P. e Elder, R.H. (1997) Targeted deletion of alkylpurine-DNA-*N*-glycosylase in mice eliminates repair of 1,*N*⁶-ethenoadenine and hypoxanthine but not 3,*N*⁴-ethenocytosine or 8-oxoguanine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 12869-12874.

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.

Hansen, N.J.V., Kristensen, P., Lykke, J., Mortensen, K.K. e Clark, B.F.C. (1995) A fast, economical and efficient method for DNA purification by use of a homemade bead column. *Biochem. Mol. Biol. Intl.* **35**, 461-465.

Hara, S., Yamaguchi, M., Takemori, Y., Yoshitake, T. e Nakamura, M. (1988) 1,2-Diamino-4,5-methylenedioxybenzene as a highly sensitive fluorogenic reagent for α -dicarbonyl compounds. *Anal. Chim. Acta* **215**, 267-276.

Hardell, L. (1986) *Aspects of primary liver cancer and its relation to porphyria cutanea tarda and porphyria acute intermittens*. IARC Sci. Publ., Lyon, **77**, p. 591-592.

Hardell, L., Bengtsson, N.O., Jonsson, U., Eriksson, S. e Larsson, L.G. (1984) Aetiological aspects on primary liver cancer with special regard to alcohol, organic solvents and acute intermittent porphyria-an epidemiological investigation. *Br. J. Cancer* **50**, 389-397.

Härtel, H., Walter, G., Haseloff, R.F., Hoffman, P. e Renger, G. (1996) Photochemical and non-photochemical energy dissipation in response to 5-aminolevulinic acid-induced photosensitization of green leaves of wheat (*Triticum aestivum*, L.) and lettuce (*Lactuca sativa* L.). *J. Photochem. Photobiol. B: Biology*. **32**, 115-126.

Hasegawa, K., Fujimoto, 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.

Hatahet, Z., Kow, Y.W., Purmall, A.A., Cunningham, R.P. e Wallace, S.S. (1994) New substrates for old enzymes. *J. Biol. Chem.* **269**, 18814-18820.

Hayakawa, M., Hattori, K., Sugiyama, S. e Ozawa, T. (1992) Age-associated oxygen damage and mutations in mitochondrial DNA in human hearts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **189**, 979-985.

Hayes, R.C. e LeClerc, J.E. (1986) Sequence dependence for bypass of thymine glycols in DNA by DNA polymerase I. *Nucleic Acids Res.* **14**, 1045-1061.

Hegler, J., Bittner, D., Boiteux, S. e Epe, B. (1993) Quantification of oxidative DNA modifications in mitochondria. *Carcinogenesis* **14**, 2309-2312.

Helson, L., Braverman, S. e Mangiardi, J. (1993) Delta-aminolevulinic acid effects on neuronal and glial tumor cell lines. *Neurochem. Res.* **18**, 1255-1258.

Henderson, B.W. e Dougherty, T.J. (1992) How does photodynamic therapy work? *Photochem. Photobiol.* **55**, 145-157.

Henderson, L.M. e Chappell, J.B. (1996) NADPH oxidase of neutrophils. *Biochim. Biophys. Acta* **1273**, 87-107.

Henner, W.D., Grunberg, S.M. e Haseltine, W.A. (1983) Enzyme action at 3'-termini of ionizing radiation-induced DNA strand breaks. *J. Biol. Chem.* **258**, 711-713.

Hermes-Lima, M. (1995) How Ca^{2+} and 5-aminolevulinic acid-derived oxyradicals promote injury to isolated mitochondria? *Free Rad. Biol. Med.* **19**, 381-390.

Hermes-Lima, M., Castilho, R.F., Valle, V.G.R., Bechara, E.J.H. e Vercesi, A.E. (1992) Calcium-dependent mitochondrial oxidative damage promoted by 5-aminolevulinic acid. *Biochim. Biophys. Acta* **1180**, 201-206.

Hermes-Lima, M., Pereira, B. e Bechara, E.J.H. (1991b) Are free radicals involved in lead poisoning? *Xenobiotica* **21**, 1085-1090.

Hermes-Lima, M., Valle, V.G.R., Vercesi, A.E. e Bechara, E.J.H. (1991a) Damage to rat liver mitochondria promoted by δ -aminolevulinic acid-generated reactive oxygen species: connections with acute intermittent porphyria and lead poisoning. *Biochim. Biophys. Acta* **1056**, 57-63.

Hillegersberg, R., van Kort, W.J. e Wilson, J.H.P. (1994) Current status of photodynamic therapy in oncology. *Drugs* **48**, 510-527.

Hindmarsh, J.T. (1986) The porphyrias: recent advances. *Clin. Chem.* **32**, 1255-1263.

Hiraku, Y. e Kawanishi, S. (1996) Mechanism of oxidative DNA damage induced by δ -aminolevulinic acid in the presence of copper ion. *Cancer Res.* **56**, 1786-1793.

Hruszkewycz, A.M. (1988) Evidence for mitochondrial DNA damage by lipid peroxidation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **153**, 191-197.

Hruszkewycz, A.M. (1992) Lipid peroxidation and mtDNA degeneration. A hypothesis. *Mutat. Res.* **275**, 243-248.

Iancu, T.C., Rabinowitz, H., Brissot, P., Guilouzo, A., Deughier, Y. e Bourel, M. (1985) Iron overload of the liver in the baboon: an ultrastructural study. *J. Hepatol.* **1**, 261-275.

Ide, H., Kow, Y.W. e Wallace, S.S. (1985) Thymine glycols and urea residues in M13 DNA constitute replicative blocks *in vivo*. *Nucleic Acids Res.* **13**, 8035-8052.

Ilin, L. (1964) On porphyria and the etiology of werewolfs. *Proc. R. Soc. Med.* **57**, 23-26.

Jaffe, E.K. e Rajagopalan, J.S. (1990) Nuclear magnetic resonance studies of 5-aminolevulinate demonstrate multiple forms in aqueous solution. *Bioorg. Chem.* **18**, 381-394.

Jiang, D., Hatahet, Z., Melamede, R.J., Kow, Y.W. e Wallace, S.S. (1997) Characterization of Escherichia coli endonuclease VIII. *J. Biol. Chem.* **272**, 32230-32239.

Jiricny, J. (1994) Colon cancer and DNA repair: have mismatches met their match? *Trends Genet.* **10**, 164-168.

Jurado, J., Saparbaev, M., Matray, T.J., Greenberg, M.M. e Laval, J. (1998) The ring fragmentation product of thymidine C5 hydrate when present in DNA is repaired by the *Escherichia coli* Fpg and Nth proteins. *Biochemistry.* **37**, 7757-7763.

Kado, N.Y., Langley, D. e Eisenstadt, E. (1983) A simple modification of the *Salmonella* liquid incubation assay. *Mutat. Res.* **121**, 25-32.

Kappas, A., Sassa, S., Galbraith, R.A. e Nordmann, Y. (1995) The porphyrias. In Scriver, C.R., Beudet, A.L., Sly, W.S. e Valle, D. (eds) *The Metabolic Basis of Inherited Diseases*. McGraw-Hill, New York, p. 2103-2159.

Kasai, H. e Nishimura, S. (1984a) DNA damage induced by asbestos in the presence of hydrogen peroxide. *Gann* **75**, 841-844.

Kasai, H. e Nishimura, S. (1984b) Hydroxylation of deoxyguanosine at the C-8 position by ascorbic acid and other reducing agents. *Nucleic Acids Res.* **12**, 2137-2145.

Kasai, H. Nishimura, S., Kurokawa, Y. e Hayashi, Y. (1987) Oral administration of the renal carcinogen, potassium bromate, specifically produces 8-hydroxydeoxyguanosine in rat target organ DNA. *Carcinogenesis* **12**, 1959-1961.

Kasai, H., Crain, P.F., Kuchino, Y., Nishimura, S., Ootsuyama, A. e Tanooka, H. (1986) Formation of 8-hydroxyguanine moiety in cellular DNA by agents producing oxygen radicals and evidence of its repair. *Carcinogenesis* **7**, 1849-1851.

Kasai, H., Tanooka, H. e Nishimura, S. (1984) Formation of 8-hydroxyguanine residues in DNA by X-irradiation. *Gann* **75**, 1037-1039.

Kasai, H., Yamaizumi, Z., Berger, M. e Cadet, J. (1992) Photosensitized formation of 7,8-dihydro-8-oxo-2'-deoxyguanosine (8-hydroxy-2'-deoxyguanosine) in DNA by riboflavin: a non singlet oxygen mediated reaction. *J. Am. Chem. Soc.* **114**, 9692-9694.

Kaappinen, R. e Mustajoki, P. (1988) Acute hepatic porphyria and hepatocellular carcinoma. *Br. J. Cancer* **57**, 117-120.

Kaappinen, R. e Mustajoki, P. (1992) Prognosis of acute porphyria: occurrence of acute attacks, precipitating factors, and associated diseases. *Medicine* **71**, 1-13.

Kaappinen, R., Mustajoki, S., Pihlaja, H., Peltonen, L. e Mustajoki, P. (1995) Acute intermittent porphyria in Finland: 19 mutations in the uroporphobilinogen deaminase gene. *Hum. Mol. Genet.* **4**, 215-222.

Kaappinen, R., Timonen, K. e Mustajoki, P. (1994) Treatment of the porphyrias. *Ann. Med.* **26**, 31-38.

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

Kennedy, J.C. e Pottier, R.H. (1992) Endogenous protoporphyrin IX, a clinically useful photosensitizer for photodynamic therapy. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **14**, 275-292.

Khan, A.U. e Wilson, T. (1995) Reactive oxygen species as cellular messengers. *Chem. Biol.* **2**: 437-445.

King, P.H. e Bragdon, A.C. (1991) MRI reveals multiple reversible cerebral lesions in an attack of acute intermittent porphyria. *Neurology* **41**, 1300-1302.

Kirtikar, D. e Goldthwait, D.A. (1974) The enzymatic release of O^6 -methylguanine and 3-methyladenine from DNA reacted with the carcinogen *N*-methyl *N*-nitrosourea. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **71**, 2022-2026.

Knoll, A.H. (1991) End of the proterozoic eon. *Sci. Am.* **265**, 64-73.

Kow, Y.W. e Wallace, S.S. (1985) Exonuclease III recognizes uracil residues in oxidized DNA. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **82**, 8354-8358.

Kow, Y.W., Wallace, S.S. e Van Houten, B. (1990) UvrABC nuclease complex repairs thymine glycol, an oxidative DNA base damage. *Mutat. Res.* **235**, 147-156.

Kowalski, D. (1979) A procedure for the quantitation of relaxed closed circular DNA in the presence of superhelical DNA: an improved fluorometric assay for nicking-closing enzyme. *Annal. Biochem* **93**, 346-354.

Krinsky, N.I. (1977) Singlet oxygen in biological systems. *Trends Biochem. Sci.* **2**, 35-38.

Krinsky, N.I. (1993) Actions of carotenoids in biological systems. *Annu. Rev. Nutr.* **13**, 561-587.

Kristal, B.S., Park, B.K. e Yu, B.P. (1996) 4-Hydroxynonenal is a potent inducer of the mitochondrial permeability transition. *J. Biol. Chem.* **271**, 6033-6038.

Kuchino, Y., Mori, F., Kasai, H., Inoue, H., Iwai, S., Miura, K., Ohtsuka, E. e Nishimura, S. (1987) Misreading of DNA templates containing 8-hydroxydeoxyguanosine at modified base and at adjacent residues. *Nature* **327**, 77-79.

Kukielka, E. e Cederbaum, A.I. (1994) Ferritin stimulation of hydroxyl radical production by rat liver nuclei. *Arch. Biochem. Biophys.* **308**, 70-77.

Kunkel, T.A., Schaaper, R.M. e Loeb, L.A. (1983) Depurination-induced infidelity of deoxyribonucleic acid synthesis with purified deoxyribonucleic acid replication proteins *in vitro*. *Biochemistry* **22**, 2378-2384.

Laiwah, A.A., Mactier, R., McColl, K.E., Moore, M.R. e Goldberg, A. (1983) Early-onset chronic renal failure as a complication of acute intermittent porphyria. *Q. J. Med.* **52**, 92-98.

Lamon, J.M., Frykholm, B.C., Herrera, W. e Tschudy, D.P. (1979) Danazol administration to females with menses-associated exacerbations of acute intermittent porphyria. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **48**, 123-126.

Lannfelt, L., Wetterberg, L., Lilius, L., Thunell, S. e Gellefors, P. (1989) ELISA for measuring uroporphobilinogen deaminase in human erythrocytes. *Chim. Acta* **183**, 227-237.

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.

Leadon, S.A., Barbee, S.L. e Dunn, A.-B. (1995) The yeast *RAD2*, but not *RAD1*, gene is involved in the transcription-coupled repair of thymine glycols. *Mutat. Res.* **337**, 169-178.

LeDoux, S.P., Driggers, W.J., Hollensworth, B.S. e Wilson, G.L. (1999) Repair of alkylation and oxidative damage in mitochondrial DNA. *Mutat. Res.* **434**, 149-159.

LeDoux, S.P., Wilson, G.L., Beecham, E.J., Stevnsner, T., Wassermann, K. e Bohr, V.A. (1992) Repair of mitochondrial DNA after various types of DNA damage in Chinese hamster ovary cells. *Carcinogenesis* **13**, 1967-1973.

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

Levin, C.J. e Zimmerman, S.B. (1976) A DNA ligase from mitochondria of rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **69**, 514-520.

Levin, D. E., Hollstein, M., Christman, M. F., Schwiers, E. A., and Ames, B. N. (1982) A new Salmonella tester strain (TA102) with A:T base pair at the site of mutation detects oxidative mutagens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 7445-7449.

Levin, D. E., Marnett, L. J., and Ames, B. N. 1984 Spontaneous and mutagen-induced deletions: mechanistic studies in Salmonella tester strain TA102. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **81**, 4457-4461.

Lindahl, T., Ljungquist, S., Siebert, W., Nyberg, B. e Sperens, B. (1977) DNA N-glycosylase from Escherichia coli. *J. Biol. Chem.* **252**, 3286.

Lindberg, R.L., Porcher, C., Grandchamp, B., Ledermann, B., Burki, K., Brandner, S., Aguzzi, A. e Meyer, U.A. (1996) Porphobilinogen deaminase deficiency in mice causes a neuropathy resembling that of human hepatic porphyria. *Nat. Genet.* **12**, 195-199.

Lip, G.Y., McColl, K.E. e Moore, M.R. (1993) The acute porphyrias. *Br. J. Clin. Pract.* **47**, 38-43.,

Lip, G.Y., McColl, K.E., Goldberg, A. e Moore, M.R. (1991) Smoking and recurrent attacks of acute intermittent porphyria. *BMJ.* **302**, 507.

Lithner, F. e Wetterberg, L. (1984) Hepatocellular carcinoma in patients with acute intermittent porphyria. *Acta Med. Scand.* **215**, 271-274.

Litman, D.A. e Correia, M.A. (1983) L-Tryptophan: a common denominator of biochemical and neurological events of acute hepatic porphyria. *Science* **222**, 1031-1033.

Little, J.W. e Mount, D.W. (1982) The SOS regulatory system in *E.coli*. *Cell* **29**, 11-22.

Lloyd, R.S., Haidle, C.W. e Robberson, D.L. (1978) Bleomycin-specific fragmentation of double-stranded DNA. *Biochemistry* **17**, 1890-1896.

Loeb, L.A. e Preston, B.D. (1986) Mutagenesis by apurinic/aprimidinic sites. *Annu. Rev. Genet.* **20**, 201-230.

Loft, S. e Poulsen, H.E. (1996) Cancer risk and oxidative DNA damage in man. *J. Mol. Med.* **74**, 297-312.

Loft, S., Vistisen, K., Ewertz, M., Tjønneland, A., Overvad, K. e Poulsen, H.E. (1992) Oxidative DNA damage estimated by 8-hydroxydeoxyguanosine excretion in humans: influence of smoking, gender and body mass index. *Carcinogenesis* **13**, 2241-2247.

Loftus, L.S. e Arnold, W.N. (1991) Vincent van Gogh's illness: Acute intermittent porphyria? *Br. Med. J.* **303**, 1589-1591.

Loureiro, A.P.M., Di Mascio, P., Gomes, O.F. e Medeiros, M.H.G. (2000) *Trans, trans*-2,4-decadienal-induced 1,*N*²-etheno-2'-deoxyguanosine adduct formation. *Chem. Res. Toxicol.*

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. e Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.

Luft, R. (1995) The development of mitochondrial medicine. *Biochim. Biophys. Acta* **1271**, 1-6.

Lundin, G. (1996) *Genetic investigation and regulation of porphobilinogen deaminase gene*. Karolinska Institutet, Stockholm.

Magnussen, C.R., Levine, J.B., Doherty, J.M., Cheesman, J.O. e Tschudy, D.P. (1974) A red cell enzyme method for the diagnosis of acute intermittent porphyria. *Blood* **44**, 857-868.

Maguire, J., Kellog, E. W. e Packer, L. (1982) Protection against free radical formation by protein bound iron. *Toxicol. Lett.* **14**, 27-34.

Maki, H. e Sekiguchi, M. (1992) MutT protein specifically hydrolyses a potent mutagenic substrate for DNA synthesis. *Nature* **355**, 273-275.

Malins, D. e Haimanot, R. (1991) Major alterations in the nucleotide structure in DNA in cancer of the female breast. *Cancer Res.* **51**, 5430-5432.

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.

Maron, D.M. e Ames, B.N. (1983) Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat. Res.* **113**, 173-215.

Maroulis, A., Voulgaropoulos, A.N. e Hadjiantoniou-Maroulis, C.P. (1985) Fluorometric determination of biacetyl. *Talanta* **32**, 504-506.

Marsh, E.N.G; (1995) A radical approach to enzyme catalysis. *BioEssays* **17**, 431-441.

Matijasevic, Z., Sekiguchi, M e Ludlum, D.B. (1992) Release of N²,3-ethenoguanine from chloroacetaldehyde-treated DNA by Escherichia coli 3-methyladenine DNA glycosylase II. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 9331-9334.

Maxam, A.M. e Gilbert, W. (1980) Sequencing end-labeled DNA with base-specific chemical cleavage. *Meth. Enzymol.* **65**, 499-560.

May, B.K., Dogra, S.C., Sadlon, T.J., Bhasker, C.R., Cox, T.C. e Bottomley, S.S. (1995) Molecular regulation of heme biosynthesis in higher vertebrates. *Prog. Nucl. Acid. Res. Mol. Biol.* **51**, 1-51.

Mazur, A., Baez, S. e Shorr, E. (1955) The mechanism of iron release from ferritin as related to its biological properties. *J. Biol. Chem.* **213**, 147-160.

McCann, J., Choi, E., Yamazaki, E. e Ames, B.N. (1975b) Detection of carcinogens as mutagens in the Salmonella/microsome test: assay of 300 chemicals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**, 5135-5139.

McCann, J., Spingarn, N.E., Kabori, J. e Ames, B.N. (1975a) Detection of carcinogens as mutagens: Bacterial tester strain with R factor plasmids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**, 979-983.

McColl, K.E.L., Wallace, A.M., Moore, M.R., Thompson, G.G. e Goldberg, A. (1982) Alterations in haem biosynthesis during the human menstrual cycle: studies in normal subjects and patients with latent and active acute intermittent porphyria. *Clin. Sci.* **62**, 183-191.

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

McGillion, F.B., Thompson, G.G. e Goldberg, A. (1975) Tissue uptake of δ -aminolevulinic acid. *Biochem. Pharmac.* **24**, 299-301.

McGillion, F.B., Thompson, G.G., Moore, M.R. e Goldberg, A. (1974) The passage of δ -aminolevulinic acid across the blood brain barrier of the rat: effect of ethanol. *Biochem. Pharmac.* **23**, 472-474.

McLellan, A.C. e Thornalley, P.J. (1992) Synthesis and chromatography of 1,2-diamino-4,5-dimethoxybenzene, 6,7-dimethoxy-2-methylquinoxaline and 6,7-dimethoxy-2,3-dimethylquinoxaline for use in a liquid chromatographic fluorimetric assay of methylglyoxal. *Anal. Chim. Acta* **263**, 137-142.

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

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-decadial. *Free Rad. Res. Commun* **16** (Suppl), 19.13.

Meissler, M., Wanner, L., Eddy, R.E. e Shows, T.B., (1980) The UPS locus encoding uroporphyrinogen 1 synthase is located on human chromosome 11. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **95**, 170-176.

Mellac, S., Fazakerley, G.V. e Sowers, L.C. (1993) Structures of base pairs with 5-(hydroxymethyl)-2'-deoxyuridine in DNA determined by NMR spectroscopy. *Biochemistry* **32**, 7779-7786.

Meneghini, R. (1987) Toxicidade do oxigênio. *Ciência Hoje* **28**, 57-62.

Meneghini, R., Benfato, M.S., Bertoncini, C.R., Carvalho, H., Gurgueira, S., Robalinho, R., Teixeira, H.D., Wendel, C. e Nascimento, A.L.T.O. (1995) Iron metabolism and DNA oxidative damage. *Ciência e Cultura* **47**, 320-324.

Michaels, M.L., Cruz, C., Grollman, A.P. e Miller, J.H. (1992) Evidence that MutY and MutM combine to prevent mutations by an oxidatively damaged form of guanine in DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 7022-7025.

Michaels, M.L., Pham, L., Cruz, C. e Miller, J.H. (1991) MutM, a protein that prevents G:C-T:A tranversions, is formamidopyridine-DNA glycosilase. *Nucleic Acids Res.* **19**, 3629-3632.

Miller, J. (1972) *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, New York.

Minder, E.I. (1986) Measurement of 5-aminolevulinic acid with reversed phase HPLC and fluorescence detection. *Clin. Chem. Acta* **161**, 11-18.

Minotti, G. (1992) The role of an endogenous nonheme iron in microsomal redox reactions. *Arch. Biochem. Biophys.* **271**, 189-198.

Miquel, J. (1992) An update on the mitochondrial DNA mutation hypothesis of cell aging. *Mutat. Res.* **275**, 209-216.

Mitchell, G.A., Lambert, M. e Tanguay, R.M. (1995) Hypertyrosinemia. In Scriver, C.R., Beudet, A.L., Sly, W.S. e Valle, D. (eds) *The Metabolic Basis of Inherited Diseases*. McGraw-Hill, New York, p. 1077-1106.

Moncada, S. e Higgs, E.A. (1995) Molecular mechanisms and therapeutic strategies related to nitric oxide. *FASEB J.* **9**, 1319-1330.

Monroe, B.M. (1985) Singlet oxygen in solutions: lifetimes and reaction rate constants. In Frimer, A.A. (ed) *Singlet Oxygen*. CC Press, Boca Raton, I, p. 177-224.

Monteiro, H.P. e Winterbourn, C.C. (1989) Release of iron from ferritin by divicine, isouramil, acid-hydrolyzed vicine, and dialuric acid and initiation of lipid peroxidation. *Arch.Biochem. Biophys.* **271**, 536-545.

Monteiro, H.P., Abdalla, D. S.P., Faljoni-Alário, A. e Bechara, E.J.H. (1986) Generation of active oxygen species during coupled autoxidation of oxyhemoglobin and δ -aminolevulinic acid. *Biochem. Biophys. Acta* **881**, 101-106.

Monteiro, H.P., Abdalla, D.S.P., Augusto, O. e Bechara, E.J.H. (1989) Free radical generation during δ -aminolevulinic acid autoxidation: induction by hemoglobin and connections with porphyriopathies. *Arch. Biochem. Biophys.* **271**, 206-216.

Monti-Bragadin, C., Babudri, N. e Samer, L. (1976) Expression of the plasmid pKM101-determined repair system in *recA*⁻ and *lexA*⁻ strains of *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* **145**, 303-306.

Moore, M.R. (1990) In Dailey, H.A. (ed) Biosynthesis of heme and chlorophylls. McGraw-Hill, New York, p 1-54.

Morgan-Hughes, J.A., Sweeney, M.G., Cooper, J.M., Hammans, S.R., Brockington, M., Schapira, A.H.V., Harding, A. E. e Clark, J.B. (1995) Mitochondrial DNA (mtDNA) diseases: correlation of genotype to phenotype. *Biochim. Biophys. Acta* **1271**, 135-140.

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

Moriya, M., Ou, C., Bodepudi, V., Johnson, F., Takeshita, M. e Grollman, A.P. (1991) Site-specific mutagenesis using a gapped duplex vector: a study of translesion synthesis past 8-oxodeoxyguanosine in *E. coli*. *Mutat. Res.* **254**, 281-288.

Morris, D.I; Dudley, M.D. e Pearson, R.D. (1981) Coagulopathy associated with hematin treatment for acute intermittent porphyria. *Ann. Intern. Med.* **95**, 700-701.

Morris, J. G. (1976) Oxygen and the obligate anaerobes *J. Appl. Bacteriol.* **40**, 229-244.

Mortelmans, K.E. e Stocker, B.A.D. (1976) Ultraviolet light protection, enhancement of ultraviolet light mutagenesis, and mutator effect of plasmid R46 in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **128**, 271-282.

Mosmann, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* **65**, 55-63.

Murata Kamiya, N., Kamiya, H., Muraoka, M., Kaji, H. e Kasai, H. (1997) Comparison of oxidation products from DNA components by gamma-irradiation and Fenton-type reactions. *J. Radiat. Res.* **38**, 121-131.

Mustajoki, P. e Desnick, R. J. (1985) Genetic heterogeneity in acute intermittent porphyria: characterization and frequency of porphobilinogen deaminase mutations in Finland. *Br. Med. J. Clin. Res. Ed.* **291**, 505-509.

Mustajoki, P. e Nordmann, Y. (1993) Early administration of heme arginate for acute porphyric attacks. *Arch. Inter. Med.* **153**, 2004-2008.

Mustajoki, P., Timonen, K., Gorchein, A., Seppalainen, A.M., Matikainen, E. e Tenhunen R. (1992) Sustained high plasma 5-aminolaevulinic acid concentration in a volunteer: no porphyric symptoms. *Eur. J. Clin. Invest.* **22**, 407-411.

Myers, K.A., Saffhill, R. e O'Connor, P.J. (1988) Repair of alkylated purines in the hepatic DNA of mitochondria and nuclei in the rat. *Carcinogenesis* **9**, 285-292.

Nakayama, T., Kaneko, M. e Kodama, M. (1986) Detection of DNA damage in cultured human fibroblasts induced by methyl linoleate hydroperoxide. *Agric. Biol. Chem.* **50**, 261-262.

Namba, H., Narahara, K., Tsuji, K., Yokohama, Y. e Seino, Y. (1991) Assignment of human porphobilinogen deaminase to 11q24.1-q24.2 by in situ hybridization and gene dosage studies. *Cytogenet. Cell Genet.* **57**, 105-108.

Nassi-Calo, L., Mello-Filho, A.C. e Meneghini, R. (1989) *o*-Phenanthroline protects mammalian cells from hydrogen peroxide-induced gene mutation and morphological transformation. *Carcinogenesis* **10**, 1055-1057.

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.

Nathanson, J.A. e Bloom, F.E. (1975) Lead-induced inhibition of brain adenylycyclase. *Nature* **255**, 419-420.

Neal, R., Yang, P., Fiechtel, J., Yildiz, D., Gurer, H. e Ercal, N. (1997) Pro-oxidant effects of δ -aminolevulinic acid (δ -ALA) on chinese hamster ovary (CHO) cells. *Toxicol. Let.* **91**, 169-178.

Nghiem, Y., Cabrera, M., Cupples, C.G. e Miller, J.H. (1988) The *mutY* gene: a mutator locus in *Escherichia coli* that generates G:C-T:A transversions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 2709-2713.

Ni, T.T., Marsischky, G.T. e Kolodner, R.D. (1999) MSH2 and MSH6 are required for removal of adenine misincorporation opposite 8-oxo-guanine in *S. cerevisiae*. *Mol. Cell* **4**, 439-444.

Niranjan, B.G., Bhat, N.K. e Avadhani, N.G. (1992) Preferential attack of mitochondrial DNA by aflatoxin B1 during hepatocarcinogenesis. *Science* **215**, 73-75.

Nishikimi, M. e Yagi, K. (1996) Biochemistry and molecular biology of ascorbic acid biosynthesis. In Harris, R.J. (ed) Subcellular biochemistry. Plenum Press, New York, p. 17.

Oesch, F., Adler, S., Rettelbach, R. e Doerjerr, G. (1986) Repair of etheno DNA adducts by *N*-glycosylases. In Singer, B. e Bartsch, H. (eds) *The role of cyclic nucleic acid adducts in carcinogenesis and mutagenesis. IARC Sci. Publ.* **70**, Lyon, p.373-379.

Oesch, F., Weiss, C.M. e Klein, S. (1994) Use of oligonucleotides containing ethenoadenine to study the repair of this DNA lesion. Determination of individual and collective repair activities. *Arch. Toxicol.* **68**, 358-363.

Ortel, B., Tanew, A. e Hönigsmann, H. (1993) Lethal photosensitization by endogenous porphyrins of PAM cells modification by desferrioxamine. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **17**, 273-278.

Osiewacz, H.D. e Esser, K. (1984) The mitochondrial plasmid of *Podospora anserina*: a mobile intron of mitochondrial gene. *Curr. Genet.* **8**, 299-305.

Ostrowski, J., Kostrzewska, E., Michalak, T., Zawirska, B., Medrzejewski, W. e Gregor, A. (1983) Abnormalities in liver function and morphology and impaired aminopyrine metabolism in hereditary hepatic porphyrias. *Gastroenterology* **85**, 1131-1137.

Oteiza, P. e Bechara, E.J.H. (1993) 5-Aminolevulinic acid induces lipid peroxidation in cardiolipin-rich liposomes. *Arch. Biochem. Biophys.* **305**, 282-287.

Oteiza, P.I., Kleinman, C.G., Demasi, M. e Bechara, E.J.H. (1995) 5-Aminolevulinic acid induces iron release from ferritin. *Arch. Biochem. Biophys.* **316**, 314-317.

Palmer, R.M.J., Ferrige, A.G. e Moncada, S. (1987) Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* **327**, 524-526.

Pederson, P.L. (1978) Tumour mitochondria and bioenergetics of cancer cells. *Prog. Exp. Tumor. Res.* **22**, 190-274.

Peng, Q., Berg, K., Moan, J., Kongshaug, M. e Nesland, J.M. (1997) 5-Aminolevulinic acid-based photodynamic therapy: principles and experimental research. *Photochem. Photobiol.* **65**, 235-251.

Pereira, B., Curi, E., Kokubun, E. e Bechara, E.J.H. (1992) 5-Aminolevulinic acid-induced alterations of oxidative metabolism in sedentary and exercise-trained rats. *J. Appl. Physiol.* **72**, 226-230.

Phaneuf, D., Hadchouel, M., Tanguay, R.M., Bréchet, C. e Ferry, N. (1995) Correction of fumarylacetoacetate hydrolase deficiency (type I tyrosinemia) in cultured human fibroblasts by retroviral-mediated gene transfer. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **208**, 957-963.

Pierlot, C., Aubry, J.-M., Briviba, K., Sies, H. e Di Mascio, P. (2000) Naphthalene endoperoxides as generators of singlet oxygen in biological media. In: Packer, L. e Sies, H. (eds) *Singlet Oxygen, UV-A & Ozone. Methods in Enzymology* **319**, 3-20.

Piomelli, S., Seaman, C., Zullo, D., Curran, A. e Davidow, B (1982) Threshold for lead damage to heme synthesis in urban children. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 3335-3339.

Porra, R.J., Klein, O., Dörnemann, D. e Senger, H. (1980a) A simple method for the rapid determination of 4,5-dioxovaleric acid in the presence of 2-oxoglutarate and other 2-oxocarboxylic acids. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **361**, 187-190.

Porra, R.J., Klein, O., Dörnemann, D. e Senger, H. (1980b) A fast and convenient assay for 4,5-dioxovaleric acid in biological systems. *Int. J. Biochem.* **12**, 735-737.

Povirk, L.F. e Goldberg, I.H. (1987) A role for oxidative DNA sugar damage in mutagenesis by neocarzinostatin and bleomycin. *Biochimie* **69**, 815-823.

Princ, G., Juknat, A.A., Amitrano, A.A. e Batlle, A. (1998) Effect of reactive oxygen species promoted by δ -aminolevulinic acid on porphyrin biosynthesis and glucose uptake in rat cerebellum. *Gen. Pharmac.* **31**, 143-148.

Purmal, A.A., Kow, Y.W. e Wallace, S.S. (1994) Major oxidative products of cytosine, 5-hydroxycytosine and 5-hydroxyuracil exhibit sequence context dependent mispairing *in vitro*. *Nucleic Acids Res.* **22**, 72-78.

Puy, H., Deybach, J.C., Beaudry, P., Callier, J., Touitou, Y. e Nordmann, Y. (1993) Decreased nocturnal plasma melatonin levels in patients with recurrent acute intermittent porphyria attacks. *Life Sci.* **53**, 621-627.

Puy, H., Deybach, J.C., Bogdan, A., Callier, J., Baumgartner, M., Voisin, P., Nordmann, Y. e Touitou, Y. (1996) Increased δ -aminolevulinic acid and decreased pineal melatonin production – A common event in acute porphyria studies in rat. *J. Clin. Invest.* **97**, 104-110.

Radicella, J.P., Dhérin, C., Desmaze, C., Fox, M.S. e Boiteux, S. (1997) Cloning and characterization of *hOGG1*, a human homolog of the *OGG1* gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 8010-8015.

Raju, T.N.K., Langerberg, P., Bhutani, V. e Quinn, G.E. (1997) Vitamin E prophylaxis to reduce retinopathy of prematurity: A reappraisal of published trials. *J. Pediat.* **134**, 844-850.

Ravanat, J.-L., Berger, M., Boiteux, S., Laval, J. e Cadet, J. (1993) Excision of 7,8-dihydro-8-oxoguanine from DNA by the Fpg protein. *J. Chem. Phys.* **90**, 871-879.

Ravanat, J.-L. e Cadet, J. (1995) Reaction of singlet oxygen with 2'-deoxyguanosine and DNA. Isolation and characterization of the main oxidation products. *Chem. Res. Toxicol.* **8**, 379-388.

Reid, R. (1983) Can migratory mitochondrial DNA activate oncogenes? *TIBS*, 190-191.

Reid, T.J. III, Murthy, M.R., Sicignano, A., Tanaka, N., Musick, W.D. e Rossmann, M.G. (1981) Structure and heme environment of beef liver catalase at 2.5 Å resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 4767-4771.

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

Reiter, R.J. (1995) Oxidative process and antioxidative defense mechanisms in the aging brain. *FASEB J.* **9**, 526-533.

Ribeiro, D.T., Madzak, C., Sarasin, A., Di Mascio, P., Sies, H. e Menck, C.F.M. (1992) Singlet oxygen induced DNA damage and mutagenicity in a single-strand SV40-based shuttle vector. *Photochem. Photobiol.* **55**, 39-45.

Ribeiro, D.T., Bourre, F., Sarasin, A., Di Mascio, P. e Menck, C.F.M. (1992a) DNA synthesis blocking lesions induced by singlet oxygen are targeted to deoxyguanosines. *Nucleic Acids Res.* **20**, 2465-2469.

Richter, C., Gogvadze, V., Laffranchi, R., Schlapbach, R., Schweizer, M., Suter, M., Walter, P. e Yaffee, M. (1995) Oxidants in mitochondria: from physiology to diseases. *Biochim. Biophys. Acta* **1271**, 67-74.

Richter, C., Park, J.-W. e Ames, B.N. (1988) Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 6465-6467.

Richter, G.W. (1961) Intranuclear aggregates of ferritin in liver cells of mice treated with saccharated iron oxide: their possible relation to nuclear protein synthesis. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **9**, 263-270.

Riesz, P., Kondo, T. e Krishna, C.M. (1990) Sonochemistry of volatile and non-volatile solutes in aqueous solutions: epr and spin trapping studies. *Ultrasonics* **28**, 295-303.

Rifkind, A. B. (1976) Drug induced exacerbations of porphyria. *Prim. Care* **3**, 665-685.

Rocha, M.E.M., Ferreira, A.M.D.C. e Bechara, E.J.H. (2000) Roles of phosphate and an enoyl radical in ferritin iron mobilization by 5-aminolevulinic acid. *Free Rad. Biol. Med.* (in press).

Rogers, P.D. (1997) Cimetidine in the treatment of acute intermittent porphyria. *Ann. Pharmacol.* **31**, 365-367.

Rogers, P.D. (1997) Cimetidine in the treatment of acute intermittent porphyria. *The Ann. Pharmacother.* **31**, 365-367.

Rosemarin, J.I., Nigro, E.J., Levere, R.D. e Mascarenhas, B.R. (1982) Systemic lupus erythematosus and acute intermittent porphyria: coincidence or association? *Arthritis Rheum.* **25**, 1134-1137.

Roth, R.N. e Weiss, L.D. (1994) Hyperbaric oxygen and wound healing. *Clin. Dermatol.* **12**, 141-156.

Rouet, P. e Essigmann, J.M. (1985) Possible role of thymine glycol in the selective inhibition of DNA synthesis on oxidized DNA templates. *Cancer Res.* **45**, 6113-6118.

Rupp, W.D. e Howard-Flanders, P. (1968) Discontinuities in the DNA synthesized in an excision-defective strain of *Escherichia coli* following ultraviolet irradiation. *J. Molec. Biol.* **31**, 291-304.

Sacks, G.H. (1990) Acute intermittent porphyria. *J. Am. Med. Assoc.* **264**, 1290-1293.

Salata, H., Cortes, J.M., Enriquez de Salamanca, R., Oliva, H., Castro, A., Kusak, E., Carreno, V. e Hernandez Guio, C. (1985) Porphyrin cutanea tarda and hepatocellular carcinoma, frequency and occurrence of related factors. *J. Hepatol.* **5**, 477-487.

Salazar, J. e Van Houten, B. (1997) Preferential mitochondrial DNA injury caused by glucose oxidase as a steady generator of hydrogen peroxide in human fibroblasts. *Mutat. Res.* **385**, 139-149.

Sancar, A. (1996) DNA excision repair. *Annu. Rev. Biochem.* **65**, 43-81.

Saparbaev, M. e Laval, J. (1998) 3,*N*⁴-Ethenocytosine, a highly mutagenic adduct, as a primary substrate for *Escherichia coli* double-strand uracil-DNA glycosylase and human mismatch-specific thymine-DNA glycosylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 8508-8513.

Saparbaev, M., Kleibl, K. e Laval, J. (1995) *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, rat and human 3-methyladenine DNA glycosylases repair 1,*N*⁶-ethenoadenine when present in DNA. *Nucleic Acids Res.* **23**, 3750-3755.

Sassa, S. e Granick, S. (1970) Induction of δ -aminolevulinic acid synthetase in chick embryo liver cells in culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **67**, 517-522.

Sassa, S. e Kappas, A. (1981) The porphyrias, In Harris, H. e Hirschhorn, K. (eds) *Advances in Human Genetics*. Plenum Press, New York, **2**, p. 121.

Sassa, S. e Kappas, A. (2000) Molecular aspects of the inherited porphyrias. *J. Int. Med.* **247**, 169-178.

Sawyer, D.T. e Valentine, J.S. (1981) How super is superoxide? *Acc. Chem. Res.* **14**, 393.

Schapira, A.H.V. (1996) Entering the powerhouse. *Odyssey* **2**, 8.

Schneider, J.E., Price, S., Maidt, L., Gutteridge, J.M.C. e Floyd, R.A. (1990) Methylene blue plus light mediates 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine formation in DNA preferentially over strand breakage. *Nucleic Acids Res.* **18**, 631-635.

Schöneich, C., Asmus, K.D., Dillinger, U. e von Bruchhausen, F. (1989) Thyl radical attack on polyunsaturated fatty acids: a possible route to lipid peroxidation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **161**, 113-120.

Schreiber, W.E., Fong, F. e Jamani, A. (1994) Molecular diagnosis of acute intermittent porphyria by analysis of DNA extracted from hair roots. *Clin. Chem.* **40**, 1744-1748.

Scott, A.D., Neishabury, M., Jones, D.H., Reed, S.H., Boiteux, S. e Waters, R. (1999) Spontaneous mutation, oxidative DNA damage and the roles of base and nucleotide excision repair in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **15**, 205-218.

Segerbäck, D. (1983) Alkylation of DNA and hemoglobin in the mouse following exposure to ethene and ethene oxide. *Chem.-Biol. Interact.* **45**, 139-151.

Shager, D. e Strauss, B. (1983) Insertion of nucleotides opposite apurinic/apyrimidinic sites in deoxyribonucleic acid during *in vitro* synthesis. Uniqueness of adenine nucleotides. *Biochemistry* **22**, 4518-4526.

Shapiro, R. e Hachmann, J. (1966) The reaction of guanine derivatives with 1,2-dicarbonyl compounds. *Biochemistry* **5**, 2799-2807.

Shapiro, R., Cohen, B.I., Shiuey, S.-J. e Mauer, H. (1968) On the reaction of guanine with glyoxal, pyruvaldehyde, and kethoxal, and the structure of the acylguanines. A new synthesis of *N*²-alkylguanines. *Biochemistry* **8**, 238-245.

Shay, J.W. e Werbin, H. (1987) Are mitochondrial mutations involved in the carcinogenesis process? *Mutat. Res.* **186**, 149-160.

Shibutani, S., Bodepudi, V., Johnson, F. e Grollman, A.P. (1993) Translesional synthesis on DNA template containing 8-oxo-7,8-dihydrodeoxyadenosine. *Biochemistry* **32**, 4625-4621.

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.

Shigenaga, M.K. e Ames, B.N. (1991) Assays for 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine: a biomarker of *in vivo* oxidative DNA damage. *Free Rad. Biol. Med.* **10**, 211-216.

Shigenaga, M.K., Hagen, T.M. e Ames, B.N. (1994) Oxidative damage and mitochondrial decay in aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 10771-10778.

Sies, H. (1991) *Oxidative stress, oxidants and antioxidants*. Academic Press, New York.

Slupska, M.M., Baikalov, C., Luther, W.M., Chiang, J.H., Wei, W.F. e Miller, J.H. (1996) Cloning and sequencing a human homolog (*hMYH*) of the *Escherichia coli mutY* gene whose function is required for the repair of oxidative DNA damage. *J. Bacteriol.* **178**, 3885-3892.

Smith, A.G., Cabral, J.R.P., Carthew, P., Francis, J.E. e Manson, M.M. (1989) Carcinogenicity of iron in conjunction with a chlorinated environmental chemical, hexachlorobenzene, in C57BL/10ScSn mice. *Int. J. Cancer* **43**, 492-496.

Smith, A.G., Carthew, P., Francis, J.E., Richard, E.E. e Dinsdale, D. (1990a) Characterization and accumulation of ferritin hepatocyte nuclei of mice with iron overload. *Hepatology* **12**, 1399-1405.

Smith, A.G., Francis, J.E. e Carthew, P. (1990b) Iron as a synergist for hepatocellular carcinoma induced by polychlorinated biphenyls in *Ah*-responsive C57BL/10ScSn mice. *Carcinogenesis* **11**, 437-444.

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 Research* **48**, 320-323.

Sodum, R.S. e Chung, F.-L. (1991) Stereoselective formation of *in vitro* nucleic acid adducts by 2,3-epoxy-4-hydroxynonan. *Cancer Research* **51**, 137-143.

Solomons, T.W.G. (1996) *Organic Chemistry*. John Wiley & Sons, Inc., New York.

Spencer, J.P., Jenner, A., Chimel, K., Aruoma, O.I., Cross, C.E., Wu, R. e Halliwell, B. (1995) DNA damage in human respiratory tract epithelial cells: damage by gas phase cigarette smoke apparently involves attack by reactive nitrogen species in addition to oxygen radicals. *FEBS Lett.* **375**, 179-182.

Spencer, J.P., Wong, J., Jenner, A., Aruoma, O.I., Cross, C.E. e Halliwell, B. (1996) Base modification and strand breakage in isolated calf thymus DNA and in DNA from human skin epidermal keratinocytes exposed to peroxynitrite or 3-morpholinocydnimine. *Chem.Res. Toxicol.* **9**, 1152-1158.

Srivastava, G., Borthwick, I.A., Brooker, J.D., Wallace, J.C., May, B.K. e Elliott, W.H. (1983) Hemin inhibits tranfer of pre- δ -aminolevulinate synthase in to chicken embryo liver mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **117**, 344-349.

Srivastava, G., Brooker, J.D., May, B.K. e Elliott, W.H. (1980) Haem control in experimental porphyria. The effect of haemin on the induction of delta-aminolaevulinate synthase in isolated chick embryo liver cells. *Biochem. J.* **188**, 781-788.

Stadtman, E. R. (1992) Protein oxidation and aging. *Science* **257**, 1220-1224.

Stadtman, E.R. (1990) Metal ion-catalyzed oxidation of proteins: biochemical mechanism and biological consequences. *Free Rad. Biol. Med.* **9**, 315-325.

Stein, J. e Tschudy, D. (1970) Acute intermittent porphyria. A clinical and biochemical study of 46 patients. *Medicine* **49**, 1-16.

Stokvis, B.J. (1889) Over twee zeldzame kleurstoffen in urine van zieken. *Weekblad Nederlandsch Tijdschrift Geneeskunde* **2**, 409-417.

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.

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. (1994b) Effects of dietary polyunsaturated fats and vitamin E on aging and peroxidative damage to DNA. *Arch. Biochem. Biophys.* **233**, 408-416.

Sutton, H.C. e Winterbourn, C.C. (1989) On the participation of higher oxidation states of iron and copper in the Fenton reactions. *Free Rad. Biol. Med.* **6**, 53-60.

Swenberg, J.A., Fedtke, N., Cirousel, 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.

Szatrowski, T.P. e Nathan, C.F. (1991) Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells. *Cancer Res.* **51**, 794-798.

Tajiri, T., Maki, H. e Sekiguchi, M. (1995) Functional cooperation of MutT, MutM and MutY proteins in preventing mutations caused by spontaneous oxidation of guanine nucleotide in *Escherichia coli*. *Mutat. Res.* **336**, 257-267.

Takao, M., Aburatani, H., Kobayashi, K. e Yasui, A. (1998) Mitochondrial targeting of human DNA glycosilases for repair of oxidative DNA damage. *Nucleic Acids Res.* **26**, 2917-2922.

Tchou, J., Bodepudi, S. Shibutani, I., Antoshechkin, J., Miller, A.P., Grollman, F. e Johnson, F. (1994) Substrate specificity of fpg protein. *J. Biol. Chem.* **269**, 15318-15324.

Theil, E.C. (1983) Ferritin: structure, function, and regulation. In: Theil, E.C., Eichhorn, G.L. e Marzil, L.G. (eds) *Iron binding proteins without cofactors or sulfur clusters*. Elsevier, New York York, p. 1-38.

Thomas, C.E., Morehouse, L.A. e Aust, S.D. (1985) Ferritin and superoxide-dependent lipid peroxidation. *J. Biol. Chem.* **260**, 3275-3280.

Thomas, D., Scot, A.D., Barbey, R., Padula, M e Boiteux, S. (1997) Inactivation of OGG1 increases the incidence of GT→TA transversions in *Saccharomyces cerevisiae*: evidence for endogenous oxidative damage to DNA in eukaryotic cells. *Mol. Gen. Genet.* **254**, 171-178.

Thunell, S., Andersson, C., Carlmark, B., Floderus, Y., Gronqvist, S.O., Harper, P., Henrichson, A. e Lindh, U. (1995) Markers for vulnerability in acute porphyria. A hypothesis paper. *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* **33**, 179-194.

Thunell, S., Andersson, D., Harper, P., Henrichson, A., Floderus, Y. e Lindh, U. (1997) Effects of administration of antioxidants in acute intermittent porphyria. *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* **35**, 427-433.

Thunell, S., Floderus, Y., Henrichson, A., Moore, M.R., Meissner, P., e Sinclair, J. (1992) Alcoholic beverages in acute porphyria. *J. Stud. Alcohol* **53**, 272-276.

Thunnissen, P.L., Meyer, J. e de Koning, R.W. (1991) Acute intermittent porphyria and primary liver-cell carcinoma. *Neth. J. Med.* **38**, 171-174.

Thyagarajan, B., Padua, R.A. e Campbell, C. (1996) Mammalian mitochondrial possess homologous DNA recombination activity. *J. Biol. Chem.* **271**, 27536-27543.

Toyokuni, S. e Sagripanti, J.-L. (1994) Increased 8-hydroxydeoxyguanosine in kidney and liver of rats continuously exposed to copper. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **126**, 91-97.

Toyokuni, S. e Sagripanti, J.-L. (1996) Association between 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine formation and DNA strand breaks mediated by copper and iron. *Free Rad. Biol. Med.* **20**, 859-864.

Tschudy, D.P., Valsamis, M. e Magnussen, C.R. (1975) Acute intermittent porphyria: clinical and selected research aspects. *Ann. Inter. Med.* **83**, 851-864.

Turrens, J.F. (1997) Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *Biosci. Rep.* **17**, 3-8.

Umemura, T., Sai, K., Takagi, A., Hasegawa, R. e Kurakawa, Y. (1990) Formation of 8-hydroxy-deoxyguanosine (8-OH-dG) in rat kidney DNA after intraperitoneal administration of ferric nitrilotriacetate (Fe-NTA). *Carcinogenesis* **11**, 345-347.

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

Vaca, C.E., Vodicka, P. e Hemminki, K. (1992) Determination of malondialdehyde modified 2'-deoxyguanosine-3'-monophosphate and DNA by ³²P-postlabeling. *Carcinogenesis* **13**, 593-599.

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

Vercesi A.E., Castilho, R.F., Meinicke, A.K., Valle, V.G.R., Hermes-Lima, M. e Bechara, E.J.H. (1994) Oxidative damage of mitochondria induced by 5-aminolevulinic acid: role of Ca²⁺ ions and membrane proteins thiols. *Biochim. Biophys. Acta* **1188**, 86-92.

Victorin, K. (1992) Review of the genotoxicity of ozone. *Mutat. Res.* **277**, 221-238.

Von Sonntag, C. (1987) *The Chemical Basis of Radiation Biology*. Taylor & Francis. London.

Wallace, S. (1988) AP endonucleases and DNA glycosylases that recognize oxidative DNA damage. *Environ. Mol. Mut.* **12**, 431-477.

Wands, J.R. e Blum, H.E. (1991) Primary hepatocellular carcinoma [editorial]. *N. Engl. J. Med.* **325**, 729-731.

Warner, H.R., Demple, B.F., Dutsch, W.A., Kane, C.M. e Linn, S. (1980) Apurinic/aprimidinic endonucleases in repair of pyrimidine dimers and other lesions in DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 4602-4606.

Warren, M.J., Jay, M., Hunt, D.M., Elder, G.H. e Röhl, J.C.G. (1996) The maddening bussiness of King George III and porphyria. *TIBS* **21**, 229-234.

Weiss, B. (1991) Exodeoxyribonucleases of *Escherichia coli*. In Boyle, P.D. (ed) *The enzymes*. Academic Press, New York, **14**, p. 203.

Welland, F.H., Hellman, E.S., Gaddis, E.M., Collins, A., Hunter, G.W. e Tschudy D.P. (1964) Factors affecting the excretion of porphyrin precursors by patients with acute intermittent porphyria. 1. Effect of diet. *Metabolism* **13**, 232.

Wetterberg, L. (1967) *A neuropsychiatric and genetic investigation of acute intermittent porphyria*: Svenska Bolförlaget/Norstedts, Stockholm.

Wetterberg, L., Waldenström, J. e Lannfelt, L. (1991) Akut intermittent porfyri – klinisk, kemisk och molekylärbilogisk forskning förr och nu. *Läkartidningen* **88**, 3580-3584.

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.

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.

Wiseman, H., Kaur, H. e Halliwell, B. (1995) DNA damage and cancer: measurement and mechanism. *Cancer Lett.* **93**, 113-120.

Witkin, E.M. (1976) Ultraviolet mutagenesis and unducible DNA repair in *Escherichia coli*. *Bact. Ver.* **40**, 869-907.

Wolcott, R.G., Franks, B.S., Hannum, D.M. e Hurst, J.K. (1994) Bactericidal potency of hydroxyl radical in physiological enviroments. *J. Biol. Chem.* **269**, 9721-9728.

Wolter, J.R. Clark, R.L. e Kallet, H.A. (1972) Ocular involvement in acute intermittent porphyria. *Am. J. Ophthalmol.* **74**, 666-674.

Wood, M.L., Dizdaroglu, M., Gajewski, E. e Essigman, J.M. (1990) Mechanistic studies of ionizing radiation and oxidative mutagenesis: genetic effects of a single 8-hydroxy-guanine

(7-hydro-8-oxoguanine) residue inserted at a unique site in a viral genome. *Biochemistry* **29**, 7024-7032.

Wynder, E.L., Goodman, D.A. e Hoffmann, D. (1965) Ciliotoxic compounds in cigarette smoke. II. Carboxylic acids and aldehydes. *Cancer* **18**, 505-509.

Yakes, F.M. e Van Houten, B. (1997) Mitochondrial DNA damage is more extensive and persists longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 514-519.

Yamauchi, K., Hayashi, N. e Kikuchi, G. (1980) Translocation of δ -aminolevulinate synthase from the cytosol to the mitochondria and its regulation by haem. *J. Biol. Chem.* **235**, 1746-1751.

Yang, M.-H. e Schaich, M. (1996) Factors affecting DNA damage caused by lipid hydroperoxides and aldehydes. *Free Rad. Biol. Med.* **20**, 225-236.

Yanofsky, C., Cox, E.C. e Horn, V. (1966) The unusual mutagenic specificity of an *E.coli* mutator gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **55**, 274-281.

Yermilov, V., Yoshie, Y. Rubio, J. e Ohshima, H. (1996) Effects of carbon dioxide/bicarbonate on induction of DNA single-strand breaks and formation of 8-nitroguanine, 8-oxoguanine and base-propenal mediated by peroxynitrite. *FEBS Lett.* **399**, 67-70.

Yeung Laiwah A.C., Moore, R.M. e Goldberg, A. (1987) Pathogenesis of acute porphyria. *Quart. J. Med.* **241**, 377-391.

Yusof, M., Yildiz, D. e Ercal, N. (1999) *N*-acetyl-*L*-cysteine protects against δ -aminolevulinic acid-induced 8-hydroxydeoxyguanosine formation. *Toxicol. Lett.* **106**, 41-47.

CURRICULUM VITÆ

JANICE ONUKI

LOCAL E DATA DE NASCIMENTO

São Paulo, SP, 06 de agosto de 1973

Formação acadêmica

1988 - 1990 - Colégio Bandeirantes, São Paulo, SP

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

1995 - 2000 – Pós-Graduação (Doutorado sanduíche)
Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo
Orientação: Prof. Dr. Paolo Di Mascio
Bolsista da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP
Sealy Center for Molecular Science – University of Texas Medical Branch
Orientação: Dr. Bennett Van Houten

PUBLICAÇÕES

- Cadet J., Douki, T., Pouget, J-P, Ravanat, J-L, Sauvaigo, S., Teixeira, P.C., Onuki J., Medeiros, M.H.G., Bechara, E.J.H. e Di Mascio P., “Role of metals in oxidative base and sugar damage to DNA” (capítulo a ser publicado no livro “*Trace Elements in Biology*” Smith-Gordon, London)
- Di Mascio. P., Teixeira, P.C., Onuki, J., Medeiros, M.H.G., Dörnemann, D., Douki, T. e Cadet, J. DNA damage by 5-aminolevulinic acid

and 4,5-dioxovaleric acids in the presence of ferritin. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **373**, 2, 368-374, 2000.

- Cadet, J., Carvalho, V.M., Onuki, J., Douki, T., Medeiros, M.H.G. e Di Mascio, P. Purine DNA adducts of 4,5-dioxovaleric acid and 2,4 decadienal. In Singer, B. e Bartsch, H. (eds) *Exocyclic DNA Adducts in Mutagenesis and Carcinogenesis, IARC Scientific Publications no 150*, International Agency for Research on Cancer, Lyon, France, 103-113, 1999.

- Ummus, R.E., Onuki, J., Dörnemann, D., Medeiros, M.H.G. e Di Mascio, P. Measurement of 4,5-dioxovaleric acid by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography B* **729**, 237-243, 1999.

- Douki, T., Onuki, J., Medeiros, M.H.G., Bechara, E.J.H., Cadet, J. e Di Mascio, P. Hydroxyl radicals are involved in the oxidation of isolated and cellular DNA bases by 5-aminolevulinic acid. *FEBS Letters*, 428 93-96, 1998.

- Douki, T., Onuki, J., Medeiros, M.H.G., Bechara, E.J.H., Cadet, J. e Di Mascio, P. DNA alkylation by 4,5-dioxovaleric acid, the final oxidation product of 5-aminolevulinic acid. *Chemical Research in Toxicology* **11** (2), 150-157, 1998.

- Onuki, J., Ribas, A.V., Medeiros, M.H.G., Araki, K., Toma, H.E., Catalani, L.H. e Di Mascio, P. Supramolecular cationic tetra-ruthenated porphyrin induces single strand breaks and 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine DNA. *Photochemistry and Photobiology* **63** (3), 272-277, 1996.

- Bechara, E.J.H., Medeiros, M.H.G., Catalani, L.H., Soares, C.H.L., Monteiro, H.P., Abdalla, D.S.P., Hermes-Lima, M., Pereira, M., Demasi, M., Costa, C.A., Di Mascio, P., Wendel, C.M.A., Onuki, J. e Penatti, C.A.A. Enolizable carbonyl and imino metabolites may act as endogenous sources of reactive oxygen species. *Ciência e Cultura* **47** (5/6), 346-357, 1995.

- Fraga, C., Onuki, J., Lucesoli, F. e Di Mascio, P. 5-Aminolevulinic acid and Fe^{2+} ions mediate 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine formation in rat liver DNA. *Carcinogenesis* **15** (10), 2241-2244, 1994.

- Onuki, J., Medeiros, M.H.G., Bechara, E.J.H. e Di Mascio, P. 5-Aminolevulinic acid induces single-strand breaks in plasmid pBR322 DNA in the presence of Fe^{2+} ions. *Biochimica et Biophysica Acta* **1225**, 259-263, 1994.

- Bechara, E.J.H., Medeiros, M.H.G., Monteiro, H.P., Hermes-Lima, M., Pereira, B., Demasi, M., Costa, C.A., Abdalla, D.S.P., Onuki, J., Wendel, C.M.A. e Di Mascio P. A free radical hypothesis of lead poisoning and inborn porphyrias associated with aminolevulinic acid overload. *Química Nova*, **16** (4), 385-392, 1993.

PRÊMIOS

- Prêmio Mutagênese 99 outorgado pela Sociedade Brasileira de Mutagênese, Carcinogênese e Teratogênese Ambiental no IV Congresso da SBMTA (Águas de São Pedro, SP, dezembro/1999)

- Auxílio financeiro à pesquisa "Fundo Bunka de Pesquisa - Banco Sumitomo" outorgado pela Sociedade Brasileira de Cultura Japonesa (São Paulo, SP - outubro/1995)

- Prêmio "Luiz Renato Caldas" outorgado pela Universidade Federal do Rio de Janeiro na IX Reunião Anual da FESBE (Caxambu, MG - agosto/1994)