Universidade de São Paulo

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Programa de Pós-Graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas

Quantificação de lesões em DNA e RNA em cultura de células expostas a tetraidrofurano

CARLA FERNANDA BAQUEDANO FRANÇA

Dissertação para obtenção do grau de MESTRE

Orientadora:

Profª. Dra. Ana Paula de Melo Loureiro

São Paulo

2012

CARLA FERNANDA BAQUEDANO FRANÇA

QUANTIFICAÇÃO DE LESÕES EM DNA E RNA EM CULTURA DE CÉLULAS EXPOSTAS A TETRAIDROFURANO

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:

Profª. Dra. Ana Paula de Melo Loureiro

SÃO PAULO

2012

Carla Fernanda Baquedano França

Quantificação de lesões em DNA e RNA em cultura de células expostas a tetraidrofurano

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Ana Paula de Melo Loureiro
orientador/presidente

_____
1°. Examinador

_____
2°. Examinador

São Paulo, Junho de 2012.

À Deus, meu maior e grande mestre.

Aquele que me proporcionou essa oportunidade

e me direcionou durante esse projeto.

AGRADECIMENTOS

Meus agradecimentos devem iniciar glorificando a Deus. Foi Ele quem desde o ínicio me apresentou pessoas maravilhosas como minha orientadora e todos aqueles que tive a oportunidade de trabalhar. Foi Ele quem abriu essa porta de oportunidade. E sei que Ele encerrará essa e abrirá muitas outras portas que me farão sentir realizada e feliz com aquilo que amo fazer e trabalhar. Obrigada Deus! Pois esse foi um sonho que o Senhor cumpriu em minha vida. Não existem palavras para expressas a minha gratidão e alegria em estar cumprindo com excelencia essa oportunidade dada por ti.

Também tenho imensa gratidão aos meus pais, Juan Carlos e Veronica, por toda ajuda financeira, todo apoio emocional, pela educação e amor concedido. Vocês são meus maiores exemplos de amor, esforço e perseverança, a conclusão e vitória desse trabalho dedico a vocês. Obrigada por acreditarem e investirem o melhor em mim. Ao meu esposo Diogo por todo apoio e amor quando estava cansada e desanimada, afinal, viajar todos os dias 5 horas por dia para ir trabalhar não é fácil, e voce sempre me estimulou e me apoio pra que esse projeto fosse concluído. Aos meus irmãos que me apoiaram indiretamente porém foram essenciais para essa conquista, Juan Marcos, Fábio, Juan Pablo, Cláudia, Tuca e Patricia obrigada por todo o apoio, todo carinho e compreensão. Foram dois anos de muito esforço e dedicação e toda minha familia participou demais dessa minha etapa e meu crescimento.

Agradeço a todos os meus amigos de laboratório, Tiago e André Cando por toda ajuda, auxilio e também pelos almoços na Física, o churrasquinho vai fazer falta rsrs. À Fabiana, Anax e Rafaela por proporcionarem os meus dias mais alegres e divertidos no meio de tanta tensão, foi muito bom e divertido trabalhar com voces, vou levar essa amizade e cumplicidade para sempre. Valeu a pena cada conversa, cada estudo, cada cafézinho na copa, valeu a pena cada dia em que tive voces ao meu lado. Muito obrigada pela amizade sincera e verdadeira. Também quero deixar meus agradecimento a Beatriz, Luma e Lorena (LAT), Isabel, Zeca, Simoninha e Thaisa pelas boas conversas, almoços, ajuda, auxilio e momentos de alegria que voces me proporcionaram enquantos estivemos juntos.

À professora Ana Paula de Melo Loureiro pela orientação cedida sempre com muita atenção e dedicação. Voce é uma pessoa maravilhosa e torço muito pra que alcance todos os seus sonhos e objetivos. Obrigada pela oportunidade !

À profa. Dra. Marisa H. G. Medeiros (IQ/USP) por permitir o uso de seus equipamentos em seu laboratório. Ao técnico Osmar pelo auxílio e atenção na utilização dos equipamento. Ao prof. Dr. Paolo Di Mascio (IQ/USP) pelo uso dos equipamentos HPLC/MS/MS e MALDI/TOF/MS. Agradeço à todos que contribuíram diretamente e indiretamente durante esses 2 anos de estudo.

Meus agradecimentos a CAPES, CNPQ e FAPESP pelo apoio fincanceiro.

APOIO FINANCEIRO

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

CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

Pró-reitoria de Pesquisa da Universidade de São Paulo

“Bem-aventurado aquele que teme ao SENHOR e anda nos seus caminhos.
Pois comerás do trabalho das tuas mãos; feliz serás, e te irá bem.
(Salmos 128.1-2)”

RESUMO

Tetraidrofurano (THF) é um solvente muito utilizado industrialmente, com demonstrada ação carcinogênica em animais experimentais, mas pouco se sabe sobre sua toxicidade celular, danos a biomoléculas e genotoxicidade. Em trabalho anterior realizado no laboratório, foi verificado que adutos de DNA são formados a partir da reação de THF oxidado com 2'-desoxiguanosina (dGuo), 2'-desoxiadenosina (dAdo) e 2'-desoxicitidina (dCyd) *in vitro*. A ocorrência dessas lesões em sistemas biológicos expostos a THF nunca foi demonstrada e pode indicar uma via de ação genotóxica desse solvente, até o momento não considerada nos estudos de carcinogênese e toxicidade.

Neste trabalho foi investigada a indução de lesões em DNA e RNA de sistemas biológicos expostos ao THF, assim como alterações epigenéticas. Como sistemas biológicos foram utilizados homogenato de fígado de camundongos, cultura de células HepG2 e fígado e rim de camundongos que foram, em trabalho anterior, expostos a vapores do solvente. Métodos de HPLC-ESI-MS/MS foram validados para quantificação de todas as lesões em DNA. Foi verificado que THF é um solvente de baixa citoxicidade para células HepG2, sendo necessárias concentrações acima de 50 mM por período de incubação superior a 24 h para ser observada perda de viabilidade. Houve indução de dano oxidativo em DNA de células HepG2 e de fígado de camundongos expostos. Uma vez que o solvente esteja oxidado, a espécie reativa THF-OH presente no meio de cultura é capaz de reagir com RNA e DNA das células e DNA de homogenato de fígado de camundongos, gerando adutos com dAdo, dGuo e Ado. A espécie reativa possui maior afinidade por dGuo que por dAdo no DNA. Entretanto, as células HepG2 não biotransformaram THF para o intermediário reativo. Além disso, THF induziu hipermetilação no DNA das células HepG2 expostas a 50 e 100 mM do solvente e em DNA de fígado de camundongos fêmeas C57BL/6J expostos a vapores de THF (vapor de 1 mL/h, 6h/dia, 5 dias). Este estudo mostra pela primeira vez a reatividade do solvente THF oxidado (contendo THF-OH) com DNA e RNA em sistemas biológicos, assim como alteração epigenética induzida pelo solvente, e servirá para uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na indução de câncer por THF.

ABSTRACT

Tetrahydrofuran (THF) is a widely used industrial solvent with demonstrated carcinogenic action in experimental animals, but little is known about its cellular toxicity and genotoxic damage to biomolecules. Previous work of this group showed that DNA adducts are formed from the reaction of oxidized THF with 2'-deoxyguanosine (dGuo), 2'-deoxyadenosine (dAdo), and 2'-deoxycytidine (dCyd) *in vitro*. The occurrence of these lesions in biological systems exposed to THF has never been demonstrated and may indicate a genotoxic pathway of this solvent, so far not considered in carcinogenesis and toxicity studies.

It was investigated here the induction of DNA and RNA lesions in biological systems exposed to THF, as well as epigenetic changes. The biological systems used were mice liver homogenate, HepG2 cell culture, and liver and kidney of mice that were exposed to solvent vapors in a previous work. HPLC-ESI-MS/MS methods were validated for quantitation of all lesions in DNA. It was found that THF is of low cytotoxicity to HepG2 cells, requiring concentrations above 50 mM for incubation period over 24 h to induce loss of viability. DNA oxidative damage was induced in HepG2 cells and liver of exposed mice. Once the solvent is oxidized, the reactive species THF-OH present in the culture medium is able to react with DNA and RNA of HepG2 cells and DNA from mice liver homogenate, generating adducts with dAdo, dGuo and Ado. The reactive species has higher affinity for dGuo than for dAdo in DNA. However, HepG2 cells were not able to activate THF to the reactive intermediate. In addition, THF induced DNA hypermethylation in HepG2 cells exposed to 50 and 100 mM of the solvent and in liver of C57BL/6J female mice exposed to THF vapors (1 mL vapor / h 6h/dia, 5 days). This study shows for the first time the reactivity of oxidized THF (containing THF-OH) with DNA and RNA in biological systems, as well as epigenetic change induced by the solvent, and may contribute for a better understanding of the mechanisms involved in the induction of cancer by THF.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Adutos de DNA-THF caracterizados no laboratório (HERMIDA *et al.*, 2006).

Figura 2: Hidroperóxido do THF formado pelo contato do solvente com o ar e luz e possíveis produtos de sua quebra encontrados no solvente não destilado (Hermida et al., 2006).

Figura 3: Estrutura molecular da 8-oxo-dGuo.

Figura 4: Estruturas moleculares das lesões em DNA a serem quantificadas neste estudo.

Figura 5: Fatores indutores de formação de ROS em nosso organismo (ilustração adaptada de AUGUSTO (2006)).

Figura 6: Reações de oxidação da 2'-desoxiguanosina (dGuo) para geração de 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina (8-oxodGuo) utilizada como marcador de dano oxidativo em DNA (BERRA, MENCK, DI MASCIO, 2006).

Figura 7: Etapas da carcinogênese.

Figura 8: Células HepG2 cultivadas no laboratório.

Figura 9: Procedimento utilizado para incubação de células HepG2 com diferentes concentrações de THF para os ensaios de citotoxicidade. Foram distribuídos 200 µL de meio por poço.

Figura 10: Estruturas dos adutos Guo-THF e Ado-THF antes e após redução com $NaBH_3CN$ (HERMIDA *et al.*, 2006).

Figura 11: Estruturas dos adutos dGuo-THF, dAdo-THF antes e após redução com $NaBH_3CN$ (HERMIDA *et al.*, 2006).

Figura 12: Concentração de THF remanescente no meio de cultura após diferentes períodos de incubação a 37 ^{o}C. A quantificação do solvente foi realizada por *Headspace*-GC-MS. Os valores foram considerados significativos em relação ao controle de cada tempo pela análise One-way ANOVA: refere-se *** a $p<0,0001$, ** a $p<0,01$ e * a $p<0,05$.

Figura 13: Citotoxicidade do THF avaliada pelo ensaio do CVD. Células HepG2 (1 x 10^4 células/poço, N = 5) foram incubadas com diferentes concentrações de THF por 5, 24, 48 e 72 horas, sendo realizada a troca do meio contendo THF 2 vezes ao dia após a incubação de 5 h. Os valores foram considerados significativos em relação ao controle

de cada tempo pela análise One-way ANOVA: refere-se *** a p<0,0001, ** a p<0,01 e * a p<0,05.

Figura 14: Citotoxicidade do THF avaliada pelo ensaio do XTT. Células HepG2 (1 x 10^4 células/poço, N = 5) foram incubadas com diferentes concentrações de THF por 5, 24, 48 e 72 horas, sendo realizada a troca do meio contendo THF 2 vezes ao dia após a incubação de 5 h. CTLE = controle. Os valores foram considerados significativos em relação ao controle de cada tempo pela análise One-way ANOVA: refere-se *** a p<0,0001, ** a p<0,01 e * a p<0,05.

Figura 15: Cromatogramas e espectros de absorbância dos padrões de adutos dAdo-THF e [$^{15}N_5$]-dAdo-THF. Foi utilizado o sistema HPLC/PDA, método 4 (λ = 286 nm).

Figura 16: Cromatogramas e espectros de absorbância dos padrões de adutos dGuo-THF e [$^{15}N_5$]-dGuo-THF. Foi utilizado o sistema HPLC/PDA, método 4 (λ = 255 nm).

Figura 17: Cromatograma e espectro de absorbância do padrão [$^{15}N_5$]-1,N^6-εdAdo. Foi utilizado o sistema HPLC/PDA, método 3, sistema 3 (λ = 275 nm).

Figura 18: Cromatograma e espectro de absorbância do padrão [$^{15}N_5$]-1,N^2-εdGuo. Foi utilizado o sistema HPLC/PDA, método 3, sistema 3 (λ = 284 nm).

Figura 19: Cromatograma e espectro de absorbância do padrão [$^{15}N_5$]-8-oxodGuo. Foi utilizado o sistema HPLC/PDA, método 3, sistema 2 (λ = 250 nm).

Figura 20: Cromatogramas de DNA de timo de bezerro (comercial) contaminado com as quantidades indicadas dos padrões de adutos. Foi utilizado o método 1 do equipamento de HPLC-PDA-ESI-MS/MS descrito no item 3.2.1.

Figura 21: Curvas de calibração de 8-oxodGuo, 1,N^2-εdGuo, 1,N^6-εdAdo, dAdo-THF e dGuo-THF obtidas por HPLC-ESI-MS/MS-MRM como descrito no item 3.2.1.

Figura 22: Níveis de 1,N^6-εdAdo e 8-oxodGuo em DNA de células HepG2 incubadas com THF não oxidado nas concentrações indicadas em meio de cultura completo por 24 h.

Figura 23: Níveis de 1,N^6-εdAdo, 8-oxodGuo, dAdo-THF e dGuo-THF em DNA de células HepG2 incubadas com THF não oxidado (50 mM) e THF oxidado (1,6 mM THF-OH) por 2 h.

Figura 24: Níveis de dGuo-THF e dAdo-THF em DNA de homogenato de fígado de camundongo (1500 µL, 0,1 g) incubado com THF oxidado (100 mM contendo 3,2 mM de THF-OH) por 1 h a 37 ^{o}C.

Figura 25: Cromatogramas obtidos por GC-MS mostrando em A o pico correspondente ao solvente puro (THF) e em B a fração oxidada para THF-OH.

Figura 26: Níveis de 1,N^6-εdAdo, 1,N^2-εdGuo e 8-oxodGuo em DNA de fígado (N = 5) e rim (N = 6) de camundongos fêmeas C57BL/6J expostos a THF por inalação (vapor de 1 mL/h, 6h/dia, 5 dias).

Figura 27: Cromatogramas obtidos por HPLC/PDA (λ = 254 nm) dos adutos puros Guo-THF e Ado-THF reduzidos com $NaBH_3CN$.

Figura 28: Espectro de ^{1}H RMN do aduto Ado-THF reduzido e respectiva estrutura.

Figura 29: Espectro de ^{1}H-^{1}H RMN (COSY) do aduto Ado-THF reduzido.

Figura 30: Espectro de ^{1}H RMN do aduto Guo-THF reduzido e respectiva estrutura.

Figura 31: Níveis de Ado-THF em: A) RNA de células HepG2 incubadas com THF não oxidado nas concentrações indicadas, em meio de cultura completo por 24 h (N = 5); B) RNA de células HepG2 incubadas com THF não oxidado (50 mM) e THF oxidado (1,6 mM THF-OH) em PBS por 2h (N = 4).

Figura 32: Níveis de 5-metil-dC em DNA de células HepG2 incubadas com 10, 50 e 100 mM de THF por 24 e 48 h.

Figura 33: Níveis de 5-metil-dC em DNA de fígado e rim de camundongos fêmeas C57BL/6J expostos a THF por inalação (vapor de 1 mL/h, 6h/dia, 5 dias). As análises foram repetidas 3 vezes.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Procedimento utilizado para incubação de células HepG2 com diferentes concentrações de THF para extração do DNA utilizando-se meio de cultura com incubação por 48 h. Foram distribuídos 25 mL de meio por garrafa.

Tabela 2: Procedimento utilizado para incubação de células HepG2 com diferentes concentrações de THF para extração do DNA utilizando-se PBS como veículo com incubação por 2 h. Foram distribuídos 25 mL de meio por garrafa.

Tabela 3: Concentração de peróxidos em diversas amostras do solvente THF.

Tabela 4: Procedimento utilizado para incubação de meio de cultura contaminado com diferentes concentrações do solvente THF. Foram distribuídos 2 mL de meio por poço.

Tabela 5: Precisão, exatidão e recuperação do método utilizando extração em fase sólida para quantificação dos adutos 1,N^6-εdAdo, 1,N^2-εdGuo, dAdo-THF e dGuo-THF em DNA. Foi utilizado o sistema cromatográfico 2 de HPLC-PDA-ESI-MS/MS descrito no item 3.2.1.

Tabela 6: Precisão e exatidão do método sem extração em fase sólida para quantificação dos adutos 1,N^6-εdAdo, 1,N^2-εdGuo, 8-oxodGuo, dAdo-THF e dGuo-THF em DNA. Foi utilizado o sistema cromatográfico 1 de HPLC-PDA-ESI-MS/MS descrito no item 3.2.1.

Tabela 7: Deslocamentos químicos no espectro de ^{1}H RMN do aduto Ado-THF reduzido em DMSO-d_6.

Tabela 8: Deslocamentos químicos no espectro de ^{1}H RMN do aduto Guo-THF reduzido em DMSO-d_6.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ado – *Adenosina*

ACN – *Acetonitrila*

β-Me – *Beta-mercaptoetanol*

CVD – *corante cristal violeta (Crystal Violet Dye)*

Cyd – *Citosina*

dAdo – *2'-desoxiadenosina*

dCyd – *2'-desoxicitidina*

dGuo – *2'-desoxiguanosina*

DMEM – *Meio Eagle Modificado por Dulbecco*

DMSO – *dimetil sulfóxido-d6*

DNA – *ácido desoxirribonucléico*

EPI – *equipamento de proteção individual*

ESI- *ionização por eletrospray (electrospray ionization)*

Guo – *Guanosina*

HPLC – *cromatografia líquida de alta performance (high performance liquid chromatography)*

HPLC-ESI-MS/MS – *cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massa com ionização por eletrospray*

MS – *espectrometria de massas (mass spectrometry)*

$NaBH_3CN$ – *Cianoborohidreto de sódio*

PBS - *tampão salina fosfato*

PDA – *arranjo de fotodiodo (photodiode array)*

PDE – *phosphodiesterase*

pH – *potencial hidrogeniônico*

PPM – *parte por milhão*

RMN – *ressonância magnética nuclear*

RNA – *ácido ribonucléico*

SFB – *soro fetal bovino*

SPE – *extração em fase sólida*

THF – *tetraidrofurano*

UV – *ultravioleta*

Vis – *visível*

XTT – *sal de tetrazólio 2,3-bis[2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil]-2H-tetrazolium-5-carboxanilida de sódio*

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

8-oxoGuo – *8-oxo-7,8-dihidro-guanosina*

5-metil-dC – *5-metil-2'-desoxicitidina*

1,N^6-εdAdo – 1,N^6*-eteno-2'-desoxiadenosina*

1,N^2-εdGuo – 1,N^2*-eteno-2'-desoxiguanosina*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO ---------- 18
1.1 Tetraidrofurano ---------- 19
1.2 Lesões em DNA ---------- 23
1.2.1 Importância de estudos em RNA ---------- 25
1.3 Radicais livres, estresse oxidativo e biomarcadores ---------- 26
1.4 Mutagênese e carcinogênese ---------- 30
1.5 Mecanismos epigenéticos ---------- 31
2. OBJETIVO ---------- 34
3. MATERIAIS E MÉTODOS ---------- 35
3.1 Reagentes ---------- 35
3.2 Equipamentos ---------- 35
3.2.1 Análises por HPLC/PDA---------- 36
3.2.2 Análises por HPLC-ESI-MS/MS ---------- 38
3.2.3 Ressonância Magnética Nuclear (RMN) ---------- 40
3.3 Síntese e purificação dos padrões de adutos ---------- 40
3.3.1 Síntese e purificação do padrão [$^{15}N_5$]8-oxodGuo ---------- 40
3.3.2 Síntese e purificação do padrão [$^{15}N_5$]1,N^6-εdAdo---------- 41
3.3.3 Síntese e purificação dos padrões dAdo-THF, [$^{15}N_5$]dAdo-THF, dGuo-THF e [$^{15}N_5$]dGuo-THF ---------- 41
3.3.4 Síntese e purificação dos padrões Ado-THF e Guo-THF---------- 42
3.4 Validação de métodos para quantificação de 8-oxodGuo, 1,N^2-εdGuo, 1,N^6-εdAdo, dGuo-THF e dAdo-THF em DNA ---------- 42
3.5 Células HepG2 ---------- 43
3.6 Cultura de células HepG2 ---------- 44
3.7 Ensaios de citotoxicidade ---------- 44
3.7.1 XTT ---------- 45
3.7.2 CVD ---------- 46
3.8 Extração e hidrólise do DNA de células HepG2 incubadas com THF ---------- 47
3.9 Extração e hidrólise do RNA de células HepG2 incubadas com THF ---------- 49
3.10 Extração e hidrólise do DNA de homogenato de fígado incubado com THF--- 50
3.11 Extração em fase sólida (SPE) ---------- 51

3.12 Determinação da concentração de peróxidos em diferentes amostras de THF para utilização nas incubações in vitro ---------- 52
3.13 Incubações de ribonucleosídeos com THF oxidado ---------- 53
3.13.1 Redução com $NaBH_3CN$ ---------- 53
3.14 Quantificação THF (CG/MS) ---------- 55
3.15 Pureza THF (CG/MS) ---------- 56
3.16 Comparativo DNA-THF e RNA-THF in vitro 57
3.17 Análise de 5-metil-dC ---------- 57
3.17.1 Células HepG2 ---------- 57
3.17.2 Fígado e rim de camundongos expostos a vapores de THF ---------- 57
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO ---------- 59
4.1 Avaliação da citotoxicidade do THF em células HepG2 ---------- 59
4.2 Validação de métodos para quantificação de 1,N^2-εdGuo, 1,N^6-εdAdo, 8-oxodGuo, dGuo-THF e dAdo-THF em DNA ---------- 62
4.3 Quantificação de lesões em DNA de sistemas biológicos ---------- 71
4.3.1 Análise dos adutos em DNA de células HepG2 e de homogenato de fígado de camundongos ---------- 71
4.3.2 Análise dos adutos em DNA de fígado e rim de camundongos expostos a vapores de THF ---------- 74
4.4 Quantificação de Guo-THF e Ado-THF em RNA de células HepG2 incubadas com THF ---------- 75
4.4.1 Síntese, purificação e caracterização estrutural de adutos Ado-THF e Guo-THF para servirem de padrões para as quantificações em RNA ---------- 75
4.4.2 Análise dos adutos Ado-THF e Guo-THF em RNA de células HepG2 -------- 82
4.5 Análise da metilação global do DNA (5-metil-dC) ---------- 84
5. CONCLUSÃO ---------- 86
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS ---------- 87
7. ANEXOS ---------- 95

1. INTRODUÇÃO

Uma pesquisa realizada pela OMS (Organização Mundial da Saúde) indica o câncer como a terceira causa de óbitos no mundo, com uma média de 0,6 milhões de mortes por ano. No Brasil, o câncer é apontado como a segunda causa de morte (INCA, 2010). Há décadas, temos informações de que certas susbtâncias apresentam a capacidade de induzir lesões no DNA, levar a mutações e aumentar o risco de desenvolvimento de câncer (MARNETT, PLASTARAS, 2001).

O tetraidrofurano é um solvente orgânico muito utilizado em indústrias e pesquisas. Entretanto, alguns estudos relatam sua ação carcinogênica em ratos e camundongos (CHHABRA *et al.* 1991) e a formação de adutos em DNA (HERMIDA *et al.*, 2006). Adutos de DNA servem para a identificação da atividade genotóxica de substâncias, podendo ser utilizados como biomarcadores para o monitoramento da exposição humana a agentes genotóxicos. Um estudo realizado neste laboratório por HERMIDA *et al.* (2006) permitiu a caracterização de três adutos de DNA a partir de reações *in vitro* com THF oxidado, sendo denominados 2'-desoxiguanosina-THF (dGuo-THF), 2'-desoxiadenosina-THF (dAdo-THF) e 2'-desoxicitidina-THF (dCyd-THF). Também foi verificado que o sistema enzimático microssomal é capaz de oxidar o THF, formando um intermediário reativo que leva à formação desses adutos (HERMIDA *et al.*, 2006). Porém, como são poucas as informações sobre a toxicidade celular, dano a biomoléculas e genotoxicidade induzidos pelo solvente, é importante a investigação da formação dessas lesões em sistemas biológicos. Outro mecanismo que leva a lesões no DNA é a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), podendo ser aumentada na presença de algum xenobiótico, aumentando o risco de ocorrência de mutações e câncer. O nível de dano ao DNA devido ao estresse oxidativo pode ser determinado quantificando-se as lesões 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina (8-oxodGuo), 1,N^2-eteno-2'-desoxiguanosina (1,N^2-εdGuo) e 1,N^6-eteno-2'-desoxiadenosina (1,N^6-εdAdo), entre outras (LOUREIRO *et al.*, 2002).

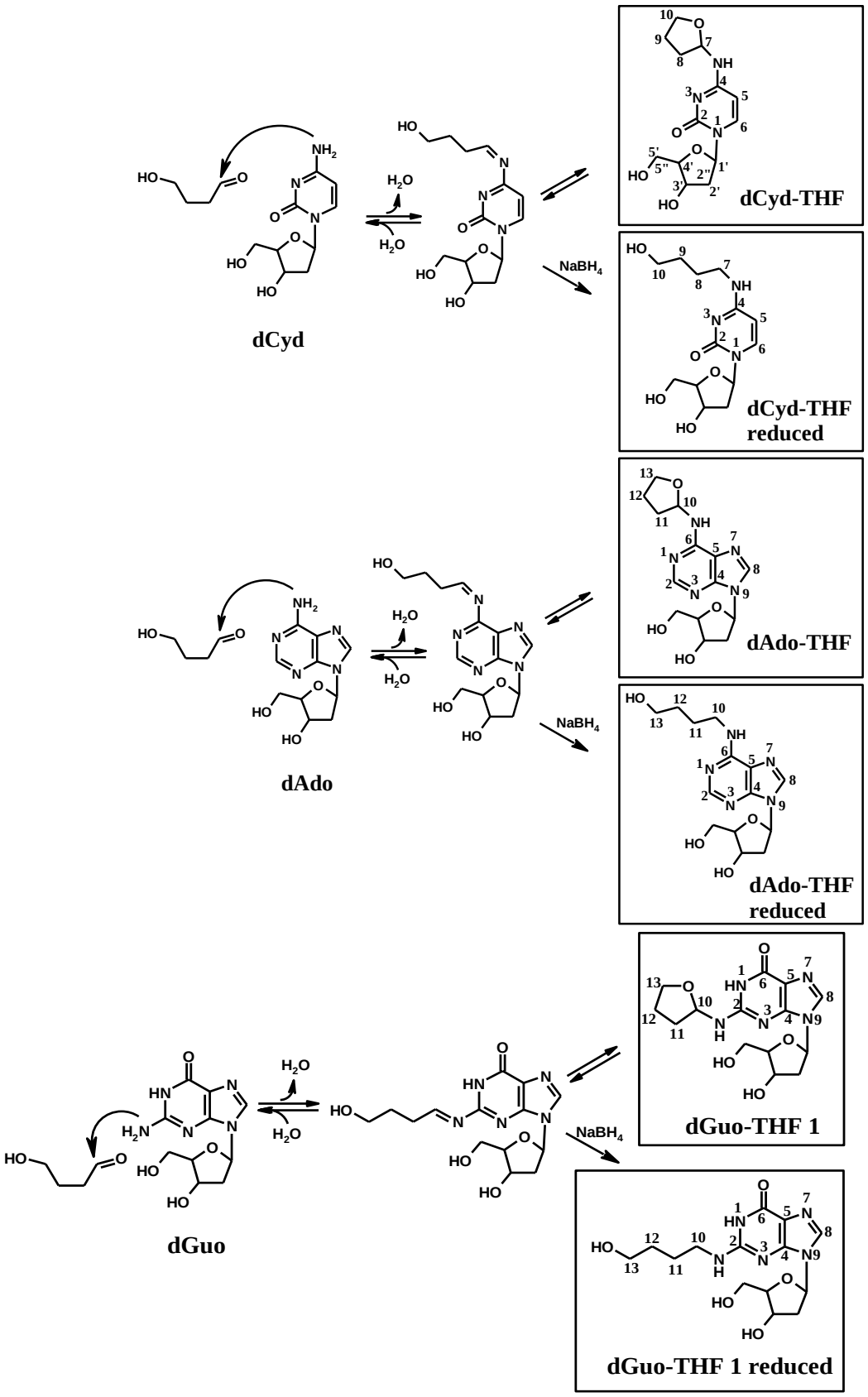


Figura 1: Adutos de DNA-THF caracterizados no laboratório (HERMIDA *et al.*, 2006).

Neste trabalho foi investigada a formação dos adutos dGuo-THF, dAdo-THF e de marcadores de dano oxidativo (8-oxodGuo, 1,N^2-εdGuo, 1,N^6-εdAdo) em DNA de células humanas em cultura expostas a diferentes concentrações de THF, quantificando-se essas lesões. Foi também iniciado um estudo visando a quantificação de adutos de RNA induzidos por THF e comparação com os níveis dos adutos de DNA em células em cultura, com o intuito de melhor compreender os mecanismos envolvidos na indução de câncer por THF.

1.1 Tetraidrofurano

O Tetraidrofurano (THF) é um solvente orgânico incolor, volátil e amplamente utilizado em indústrias e pesquisa. Pertence ao grupo dos éteres cíclicos, com fórmula molecular C_4H_8O, massa molecular de 72,11 Da, densidade de 0,889 g/L, ponto de ebulição entre 65-67ºC, pressão de vapor de 176 mmHg (25°C) e facilmente dissolvido em água e solventes orgânicos. Em contato com o ar e luz, moléculas do solvente podem ser oxidadas para peróxidos, que podem ser clivados e originar outros produtos, radicalares ou não, que contribuem para sua toxicidade (Figura 2). O solvente THF é utilizado na fabricação de tintas, colas, vernizes, como agente dispersante na indústria têxtil, na fabricação de artigos de embalagem, transporte e armazenamento de alimentos e amplamente utilizado como um agente de revestimento de óxido de ferro utilizado na produção de fitas de áudio e vídeo. Também tem a capacidade de dissolver diversos tipos de plásticos, como cloreto de polivinila, poliuretanos, compostos epóxi, resina de celulose e uma gama de compostos orgânicos (ONG, *et al.* 1991; CARTIGNY, *et al.*, 2001; DROZA, *et al.*, 1999; RAVENZWAAY, 2003).

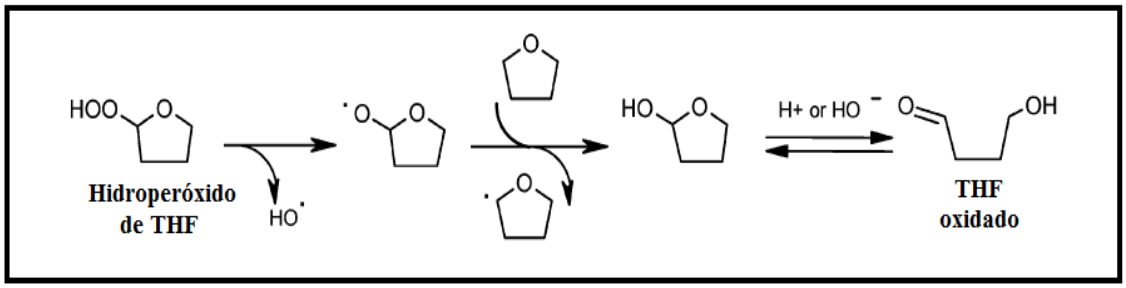


Figura 2: Hidroperóxido do THF formado pelo contato do solvente com o ar e luz e possíveis produtos de sua quebra encontrados no solvente não destilado (HERMIDA, *et al.*, 2006).

A Conferência Americana de Higienistas Industriais Governamentais (ACGIH) estipulou um limite para exposição a curto prazo ao THF de 250 ppm. Já na Alemanha, foi estipulado um limite de 1000 ppm por 30 minutos, duas vezes ao dia no máximo (DROZA *et al.*, 1999). Esses países determinaram necessário um controle de exposição ao THF pela facilidade de absorção pela membrana alveolar, trato gastrointestinal e pele, além de ser extremamente irritante para olhos, pele e mucosas. O solvente pôde ser encontrado em urina, sangue e ar exalado de indivíduos expostos. Embora ainda sejam poucas as informações sobre sua toxicocinética, acredita-se ser de baixa toxicidade, com meia vida aproximada de 30 minutos (CARTIGNY *et al.*, 2001).

De acordo com MOODY (1991), existem dois sinais de intoxicação: narcose e disfunção hepatocelular, capazes de ocorrer com metade da dose letal. O autor também afirma não haver evidências de genotoxicidade causada pelo THF, porém, afirma que o THF tem a capacidade de interagir com componentes celulares provocando: *a)* inibição de uma série de reações enzimáticas em concentrações entre 10 e 100 mM, principalmente a ação do citocromo P450; *b)* aumento da toxicidade de alguns compostos (efeito de solvente) através do estímulo da absorção de metabólitos reativos.

Alguns estudos sobre efeitos da exposição ao THF foram realizados. Ensaios de genotoxicidade realizados *in vitro* e *in vivo* (utilizando *Salmonella typhimurium*, células de ovário de hamster chinês, *Drosophila melanogaster*, células da medula óssea de camundongo e eritrócitos de camundongo) não apontaram o THF como mutagênico ou genotóxico (NTP, 1998). Porém, em outro estudo realizado por CHHABRA *et al.* (1998), grupos de 50 ratos e camundongos foram expostos ao THF por inalação, 6 horas/dia, 5 dias por semana durante 105 semanas. O estudo confirmou a ação carcinogênica em ratos e camundongos, tendo sido observado aumento da incidência de neoplasia hepatocelular em camundongos fêmeas expostos a 1800 ppm de THF e aumento da incidência de adenoma tubular renal ou carcinoma em rim de ratos machos expostos de 600 a 1800 ppm de THF. Irritação do trato respiratório superior, lesões em fígado e rim de ratos expostos a concentrações maiores que 3000 ppm, 8 horas/dia, durante 20 dias, além da capacidade de produzir anestesia em cães e ratos em concentrações maiores que 25000 ppm também foram observados em outros estudos (ELOVAARA *et al.*, 1984; HELLWIG *et al.*, 2002; NTP, 1998). A provável dose oral letal em humanos é de 50-500 mg/Kg. Devido a poucas informações a respeito da toxicocinética e toxicidade celular do THF e poucos estudos envolvendo análise

genotóxica, torna-se difícil estabelecer um mecanismo que explique os efeitos observados em ratos e camundongos.

Em outro estudo, realizado por ONG *et al.* (1991), 58 trabalhadores do sexo masculino de um fábrica de fita de áudio e vídeo foram acompanhados. Ar alveolar, urina e sangue venoso foram coletados para análise da concentração do THF. O estudo sugeriu a urina como importante matriz para avaliação da exposição ao THF, sendo a matriz que apresentou maior concentração do solvente. Alguns sintomas relatados pelos trabalhadores após a exposição ao THF foram náusea, cefaléia, visão turva, vertigem, fadiga, zumbido, dor no peito e tosse. Foram também observadas irritações no trato respiratório superior, pele e mucosas.

GARNIER *et al.* (1989) relataram dois casos de intoxicação após a exposição ao THF. O primeiro caso foi de um homem de 35 anos, previamente saudável que não fazia uso de álcool nem drogas nos últimos três meses. Ele era um encanador que ficou confinado por um período de 8 horas/dia durante três dias utilizando uma cola que continha o solvente THF; vale ressaltar que o homem não fez uso de nenhum equipamento de proteção individual (EPI). Ao se apresentar para os analistas, declarou sentir náusea, cefaléia, visão turva, tontura, dor torácica e muita tosse. Foram realizados alguns exames que diagnosticaram irritação pulmonar e alterações em enzimas hepáticas (AST (aspartato aminotransferase), ALT (alanina aminotransferase) e GGT (gama glutamil transpeptidase)). Todos os sintomas clínicos cessaram após dois dias e as enzimas do fígado voltaram ao normal somente após duas semanas. O segundo caso foi de um homem de 55 anos que também era encanador e também era aparentemente saudável. Ele também ficou confinado por causa de seu trabalho utilizando uma cola que continha THF e também não fazia uso de EPI. Relatou sintomas como dor de cabeça, tontura, dor torácica, dispnéia e dor epigástrica. Foi submetido a exames clínicos que apontaram normalidade. Somente no dia seguinte, após coleta de sangue, foi observado um aumento de AST (aspartato aminotransferase), ALT (alanina aminotransferase) e GGT (gama glutamil transpeptidase), sendo 25, 15 e 9 vezes respectivamente maiores que os valores normais. As enzimas do fígado também, como no primeiro caso, voltaram ao normal dentro de duas semanas. Os dois trabalhadores apresentaram aparentemente os mesmos sintomas e pode-se concluir que o THF foi certamente o responsável pelos efeitos apresentados.

A partir do exposto é possível verificar a escassez de dados para a proposição de modos de ação tóxica desse solvente amplamente utilizado. A compreensão dos

possíveis mecanismos de ação e de sua importância em sistemas biológicos é um passo necessário para que se possa considerar ou não um determinado modo de ação. Uma vez que os únicos dados sobre formação de adutos de DNA por THF até o momento foram obtidos a partir de incubações *in vitro* (HERMIDA *et al.*, 2006), faz-se necessário avaliar a possibilidade de formação desses adutos em sistemas biológicos. Além disso, lesões em DNA devidas a estresse oxidativo podem também contribuir para a ocorrência de mutações e aumento do risco de câncer. Em conjunto com as alterações genotóxicas, alterações epigenéticas do DNA podem levar à alteração da expressão de genes e, assim, favorecer o desenvolvimento de tumores. Não há informação na literatura sobre alteração da metilação global do DNA por THF. Dessa forma, pretende-se que os dados gerados neste trabalho contribuam para apontar vias pelas quais o solvente THF possa levar ao desenvovimento de câncer.

1.2 Lesões em DNA

Lesões em DNA podem ocorrer por duas fontes. Uma delas é a fonte endógena, onde podemos incluir, por exemplo, ataques de espécies reativas de oxigênio, e a outra seria exógena, como, por exemplo, lesões causadas por diversos xenobióticos. A grande maioria das lesões no DNA afeta a estrutura primária da dupla hélice, ou seja, as bases do DNA, onde ocorre quimicamente uma modificação por possuírem alta densidade eletrônica. A guanina é a base mais atrativa e suscetível a esse ataque por apresentar menor potencial de oxidação entre as bases nitrogenadas, embora as lesões ocorram em todas as demais bases do DNA (LUCH, 2005; PELTONEN, DIPLLE, 1995). Essas lesões no DNA estão diretamente ligadas ao surgimento de mutações, que podem ou não levar ao desenvolvimento de tumores. Sendo assim, esses adutos podem ser utilizados como bioindicadores de risco de desenvolvimento de doenças (MARNETT, PLASTARAS, 2001). Um exemplo de utilização de adutos de DNA como bioindicadores de exposição a um xenobiótico e risco de desenvolvimento de câncer é o caso do monitoramento da exposição a aflatoxina B1 em populações da Ásia e África. A exposição a aflatoxina B1 eleva o risco de desenvolvimento de carcinoma hepatocelular, reagindo com a base guanina do DNA e levando à formação de um aduto que pode ser quantificado na urina de indivíduos expostos (WOGAN *et al.*, 2004).

A manutenção da integridade do DNA é de fundamental importância para todos os organismos. Por esta razão, os seres vivos possuem eficientes e complexos

mecanismos para proteção do seu material genético, como por exemplo o sistema de reparo do DNA. É um conjunto de processos nos quais a célula identifica e corrige os danos gerados, sendo que na falta dessa correção o funcionamento do organismo pode ser grandemente afetado. Algumas lesões são capazes de alterar ou eliminar a capacidade de a célula transcrever o DNA de forma correta (LOEB, *et al.*, 2003; KNAAPEN *et al.*, 2006).

Uma lesão importante já caracterizada é a 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina (8-oxodGuo, Figura 3). Essa lesão é gerada por ataque de radical hidroxila ($HO^{\cdot}$) ou oxigênio singlete ($^1O_2$) à base guanina do DNA. É considerada como um marcador de dano oxidativo por ser facilmente detectável. Além disso, também apresenta caráter mutagênico, levando à transversão G → T (LOUREIRO *et al.*, 2002).

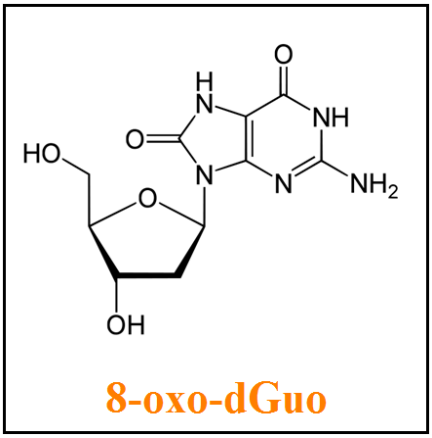


Figura 3: Estrutura molecular da 8-oxo-dGuo.

Em um estudo realizado neste laboratório por HERMIDA *et al.* (2006) foram caracterizados três adutos de DNA induzidos por THF: 2'-desoxiguanosina-THF (dGuo-THF), 2'-desoxiadenosina-THF (dAdo-THF) e 2'-desoxicitidina-THF (dCyd-THF). A possível ocorrência dessas lesões em sistemas biológicos expostos ao THF aponta para uma via de ação genotóxica até o momento não considerada nos estudos de carcinogênese e toxicidade. Em outros estudos foram identificados e quantificados adutos DNA-THF em fígado de ratos tratados com N-nitrosopirrolidina (NPYR). Nitrosaminas cíclicas carcinogênicas, como a NPYR, são encontradas na dieta, fumaça de cigarro e formadas endogenamente em humanos por nitrosação das aminas cíclicas. A NPYR é um carcinógeno capaz de induzir tumores hepáticos em ratos e tumores do trato respiratório em camundongos e hamster. Para observar os efeitos mutagênicos é necessária a ativação metabólica da NPYR, catalisada pelo citocromo P450, gerando α-

hidroxi-NPYR (WANG *et al.*, 2007; LOUREIRO *et al.*, 2009), responsável por gerar outros intermediários como o THF-OH, originando adutos de DNA iguais aos adutos caracterizados por HERMIDA *et al.* (2006).

Uma vez que lesões em DNA induzidas por THF podem estar envolvidas em sua carcinogenicidade, investigaremos neste trabalho a possibilidade de formação das lesões indicadas na Figura 4 em DNA de células expostas a diferentes concentrações desse solvente. Para isso, métodos analíticos altamente sensíveis e específicos precisam ser utilizados.

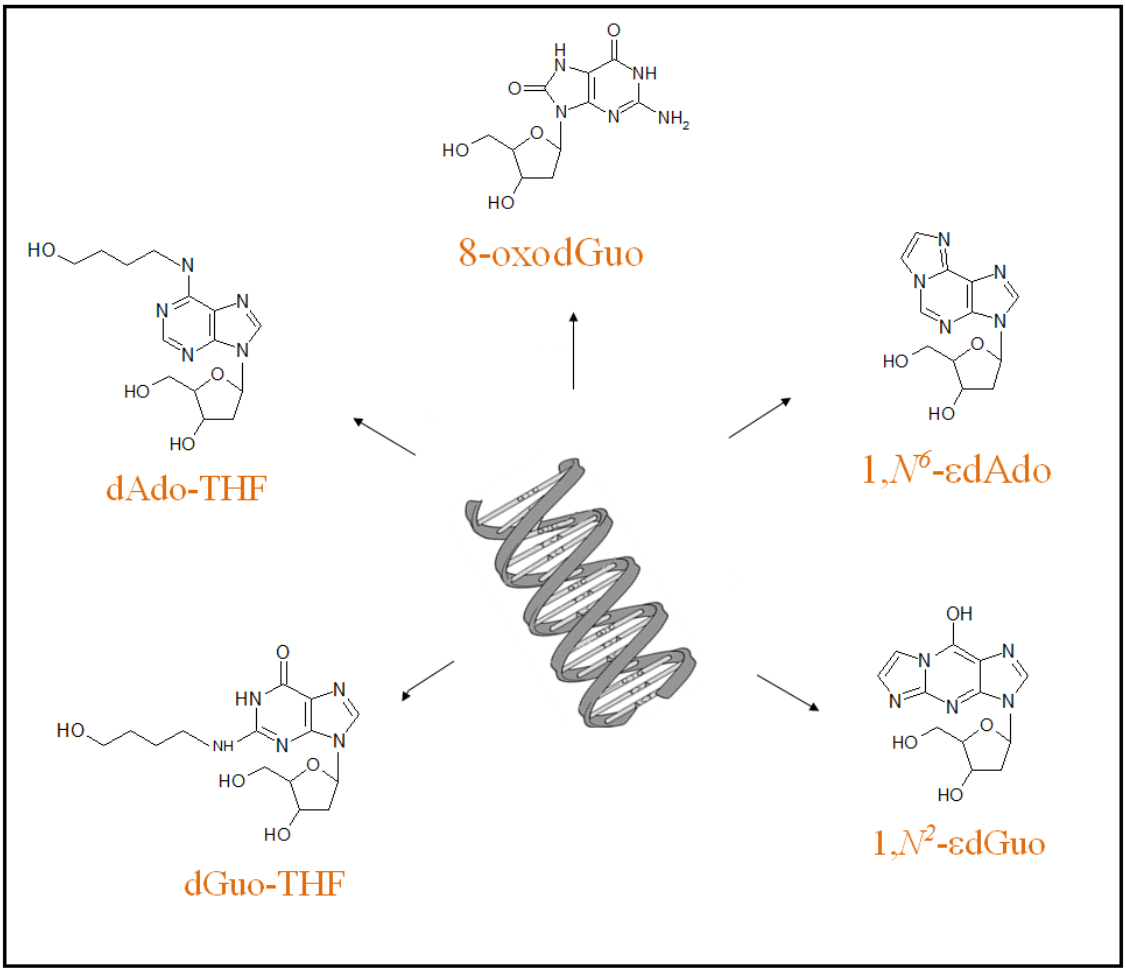


Figura 4: Estruturas moleculares das lesões em DNA a serem quantificadas neste estudo.

1.2.1 Importância de estudos em RNA

O RNA pode ser mais susceptível ao ataque de qualquer substância por não estar devidamente empacotado e por estar presente tanto no citoplasma quanto no núcleo da

célula, além de ser menos prontamente reparado que os adutos de DNA. Sendo assim, mesmo que as lesões em RNA não levem a mutações e conhecendo-se muito pouco sobre os efeitos de lesões em RNA, adutos de RNA podem ser considerados biomarcadores de exposição bem mais sensíveis que os adutos de DNA (SOTOMAYOR *et al.*, 2003, ZHU *et al.*, 2006).

Há diferentes tipos de RNA, como o mRNA, tRNA, de ribossomos e ribozimas, com diferentes funções celulares. A formação de adutos de RNA pode ser tóxica para as células, induzindo a apoptose ou interferindo na função do mRNA. Tais lesões podem induzir respostas epigenéticas, como modulação da transcrição e tradução levando à expressão alterada de proteínas, interferir na ligação entre RNA e suas proteínas ligantes e abolir efeitos catalíticos de ribozimas (ZHU *et al.*, 2006).

1.3 Radicais livres, estresse oxidativo e biomarcadores

Os radicais livres são moléculas que possuem um ou mais elétrons desemparelhados (AUGUSTO, 2006). A geração de radicais livres no organismo pode ser desencadeada por diversos fatores, como exemplificado na Figura 5. Podem ser gerados no citoplasma, nas mitocôndrias ou em seu alvo celular, como proteínas, lipídeos, carboidratos e DNA (BIANCH, ANTUNES, 1999). No entanto, enquanto lipídeos, proteínas e açúcares podem ser removidos por degradação, o mesmo não ocorre com o DNA, já que é uma molécula responsável por todas as informações genéticas do organismo vivo (BERRA, *et al.*, 2006).

O oxigênio é considerado um radical livre por apresentar desemparelhamento de elétrons na sua última camada, o que lhe confere propriedade reativa. Chamamos de espécie reativa de oxigênio (ROS) todas as moléculas derivadas do oxigênio, com capacidade reativa, encontradas no organismo. Em condições fisiológicas, o oxigênio sofre redução para água, o que dá origem a alguns reativos intermediários como: radicais superóxido ($O_2^{\bullet-}$), hidroperoxila ($HO_2^{\bullet}$), hidroxila ($HO^{\bullet}$) e também o não radical peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (BARREIROS, DAVI, 2006).

Em nosso organismo, ocorre a produção de ROS todo o tempo. Essas moléculas podem danificar as células do nosso corpo, porém, nosso organismo possui enzimas específicas e um mecanismo de desintoxicação (antioxidantes) capazes de prevenir e reparar esses danos (AUGUSTO, 2006). Danos oxidativos resultantes da geração de ROS podem participar de todas as fases do processo do câncer (ZHOU *et al.*, 2011).

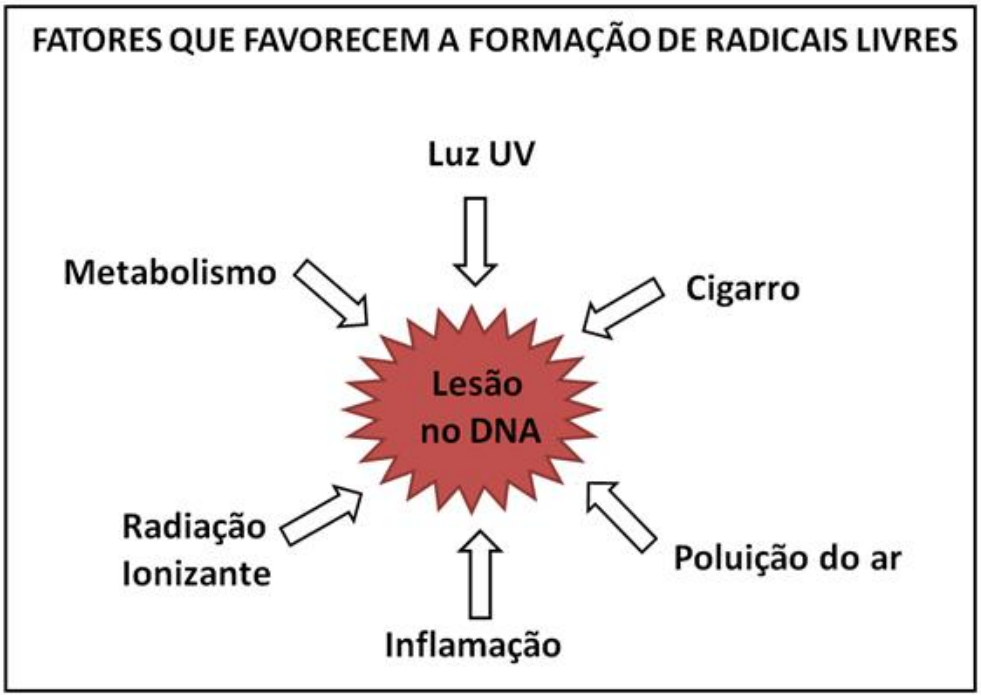


Figura 5: Fatores indutores de formação de ROS em nosso organismo (ilustração adaptada de AUGUSTO (2006)).

Reações de oxidação são essenciais à vida aeróbica. As ROS geradas nesses processos são importantes para nosso organismo e encontram-se envolvidas no combate a organismos estranhos, na regulação do crescimento celular e síntese de substâncias biológicas importantes. No entanto, se a geração de ROS ocorrer de forma descontrolada, podem ser desencadeados efeitos prejudiciais como, por exemplo, lesões ao DNA. Quando o tipo e a quantidade de danos superam a capacidade de reparo, pode haver morte celular ou incorporação de mutações no genoma, que podem gerar instabilidade genômica e possivelmente aparecimento de câncer (BERRA, MENCK, DI MASCIO 2006). Assim, ROS estão relacionadas com diversas patologias, podendo ser a causa ou um fator agravante do quadro (BIANCH, ANTUNES, 1999; BARREIROS, DAVI, 2006).

O estresse oxidativo ocorre quando há aumento da produção de ROS não acompanhado pelo aumento das defesas antioxidantes, ou seja, se dá em uma condição biológica onde ocorre um desequilíbrio entre a produção de ROS e o reparo ou desintoxicação através do sistema biológico. Como resultado, ocorrem danos em diversas biomoléculas, como a oxidação de bases do DNA e RNA, de ácidos graxos poliinsaturados nas membranas celulares, de aminoácidos nas proteínas (AUGUSTO,

2006). Na Figura 6 são apresentadas algumas vias para formação de 8-oxodGuo, um marcador de dano oxidativo ao DNA.

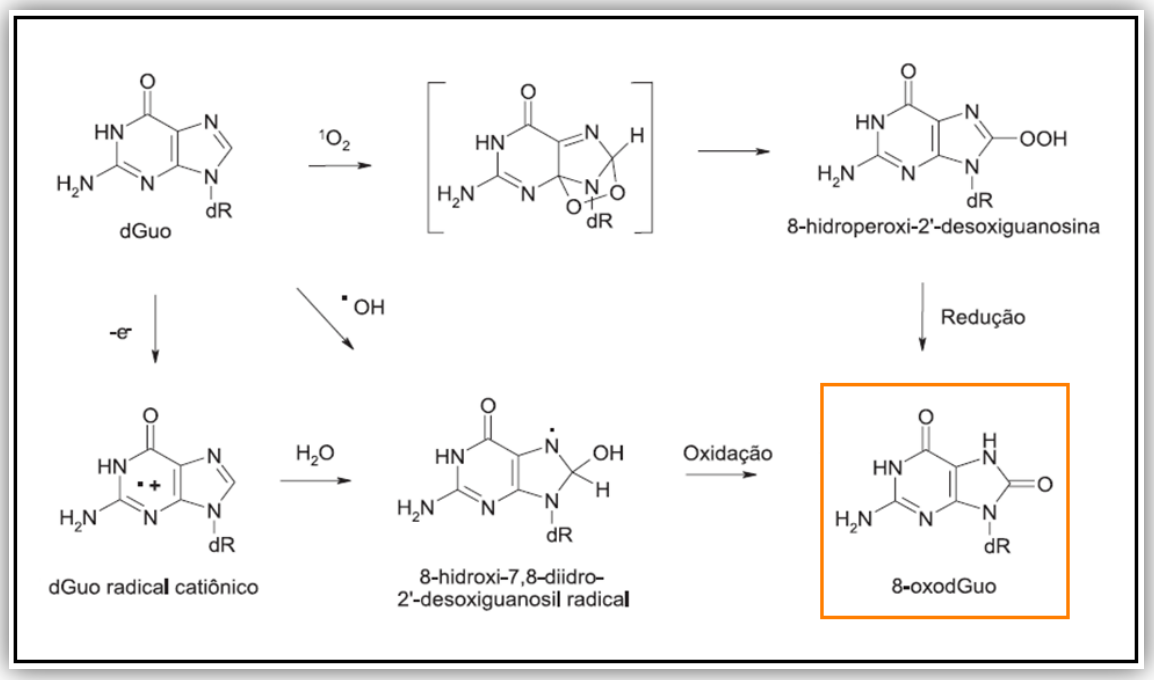


Figura 6: Reações de oxidação da 2'-desoxiguanosina (dGuo) para geração de 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina (8-oxodGuo) utilizada como marcador de dano oxidativo em DNA (BERRA *et al.*, 2006).

Danos ao DNA que podem ter sua frequência aumentada como resultado da exposição a xenobióticos incluem depurinação, desaminação, oxidação e formação de adutos com produtos gerados endogenamente (ex., aldeídos resultantes do processo de peroxidação lipídica). As lesões mutagênicas geradas por espécies reativas de oxigênio/nitrogênio e produtos de peroxidação lipídica são de grande interesse, uma vez que através da indução de defesas antioxidantes é possível intervir na sua formação, sendo que tal intervenção pode ser importante para prevenção do envelhecimento, câncer e outras condições degenerativas (DE BONT E VAN LAREBEKE, 2004).

Devido à sua abundância nas células e susceptibilidade à oxidação, os ácidos graxos poliinsaturados são alvos importantes para os oxidantes. Como essa oxidação desencadeia uma cascata autocatalítica que gera numerosas substâncias genotóxicas, tais danos aos lipídios têm grandes implicações para a integridade do DNA. De fato, a peroxidação lipídica tem sido associada ao desenvolvimento de condições patológicas induzidas por exposição a agentes oxidantes. Nesse processo são gerados aldeídos α,β-

insaturados, variantes estruturais dos mesmos (tais como 4-hidroxialcenais e epoxialdeídos) e malonaldeído, os quais são agentes alquilantes com capacidade de se ligarem covalentemente a grupos nucleofílicos presentes em DNA, peptídeos e proteínas, provocando alterações nas funções dessas moléculas. Reações de aldeídos resultantes do processo de peroxidação lipídica com bases do DNA dão origem a diversos adutos exocíclicos denominados propanoadutos, etenoadutos e adutos de malonaldeído. Publicações recentes têm apontado os adutos exocíclicos de DNA de origem endógena como ferramentas potenciais para o estudo do estresse oxidativo, da etiologia do câncer e para a avaliação da eficácia de agentes quimiopreventivos contra danos em DNA. Muito esforço tem sido feito no sentido de elucidar as fontes, o significado toxicológico e as consequências genéticas dessas lesões de DNA; os tipos de fatores exógenos ou condições patofisiológicas que levam ao seu aumento; e se esses adutos, quando gerados através de reações mediadas por estresse oxidativo, desempenham um papel na carcinogênese humana ou em outras doenças degenerativas (MARNETT E PLASTARAS, 2001). Dentre essas lesões, temos dado atenção especial aos etenoadutos 1,N^2-εdGuo e 1,N^6-εdAdo, os quais resultam da reação de diversos aldeídos α,β-insaturados, resultantes da peroxidação lipídica, com as respectivas bases guanina e adenina no DNA (Figura 4).

Por motivos de saúde pública, torna-se de extrema importância a avaliação da exposição a certos xenobióticos, tendo em vista a possibilidade de prevenção ou minimização da incidência de mortes ou desenvolvimento de doenças. A exposição pode ser avaliada através da monitorização ambiental ou biológica. Na monitorização biológica é analisada a substância de interesse em diversas amostras, como urina, sangue ou ar exalado. Porém, para realizar essa monitorização, devem-se obter informações sobre o mecanismo de ação do xenobiótico e/ou a toxicocinética (AMORIM, 2003).

Para que um biomarcador seja validado, é necessária a realização de estudos *in vitro*, em animais e estudos epidemiológicos em humanos, para que ele possa ser utilizado para avaliar a relação entre a exposição humana e o desenvolvimento de alguma patologia (JESUS, CARVALHO, 2008).

Neste trabalho investigaremos a possibilidade de o THF modificar biomoléculas em sistemas biológicos, através da detecção e quantificação de alguns adutos em DNA e RNA de células expostas a esse solvente. Este é um passo inicial para averiguarmos a

possibilidade de uso desses adutos como marcadores de dose efetiva em amostras de DNA de indivíduos expostos ao solvente.

1.4 Mutagênese e carcinogênese

Já se sabe que certas substâncias endógenas ou exógenas podem causar alterações celulares, podendo desencadear um processo de mutagênese ou carcinogênese. Lesões geradas em nosso DNA podem ser mutagênicas, dependendo de sua localização no genoma e da eficiência de reparo. O mecanismo de reparo varia de organismo para organismo e com alguns fatores como idade, sexo, condições genéticas, entre outros. Conforme MARNETT e PLASTARAS (2001), a perda da regulação celular na maioria das vezes é provocada pelo excesso de lesões celulares.

É importante compreender a diferença entre lesões no DNA e mutações. As lesões geradas no DNA podem ser reconhecidas por enzimas e corretamente reparadas. De outro modo, caso o sistema de reparo não seja eficiente, pode haver bloqueio no processo de transcrição, tradução e replicação, levando à morte celular e impedindo a produção de células mutagênicas. Porém, quando o mecanismo de reparo não ocorre corretamente e as células se replicam, as mutações podem ser fixadas e estas levam ao surgimento de consequências, como o câncer (DE BONT; VAN LAREBEKE, 2004; WOGAN *et al.*, 2004).

A principal ação dos agentes mutagênicos é alterar a seqüência das bases do DNA. Após passar por várias divisões, uma célula já alterada pode ter um desequilíbrio no controle da divisão celular, aumento da produção de novas células aberrantes e desreguladas, levando ao desenvolvimento de câncer. Ao nível celular, as mutações podem causar alterações na função de diversas proteínas (RIBEIRO *et al.*, 2003).

Como já dito, falhas no mecanismo de reparo de lesões em DNA podem resultar em mutações e dar início ao processo de carcinogênese (WOGAN *et. al*, 2004). Esse processo pode levar anos para sua formação e manifestação. Antes de chegar ao estágio de tumor, temos o processo de iniciação, que é o primeiro estágio da carcinogênese, onde as células já se encontram geneticamente alteradas; a segunda etapa é a promoção, onde a célula iniciada se replica e origina um tumor ainda reversível; e terceiro e último processo é a progressão, onde já pode ser observado um crescimento desregulado das células. Nessa última etapa o processo é irreversível e o câncer está formado (ALMEIDA *et al.*, 2003).

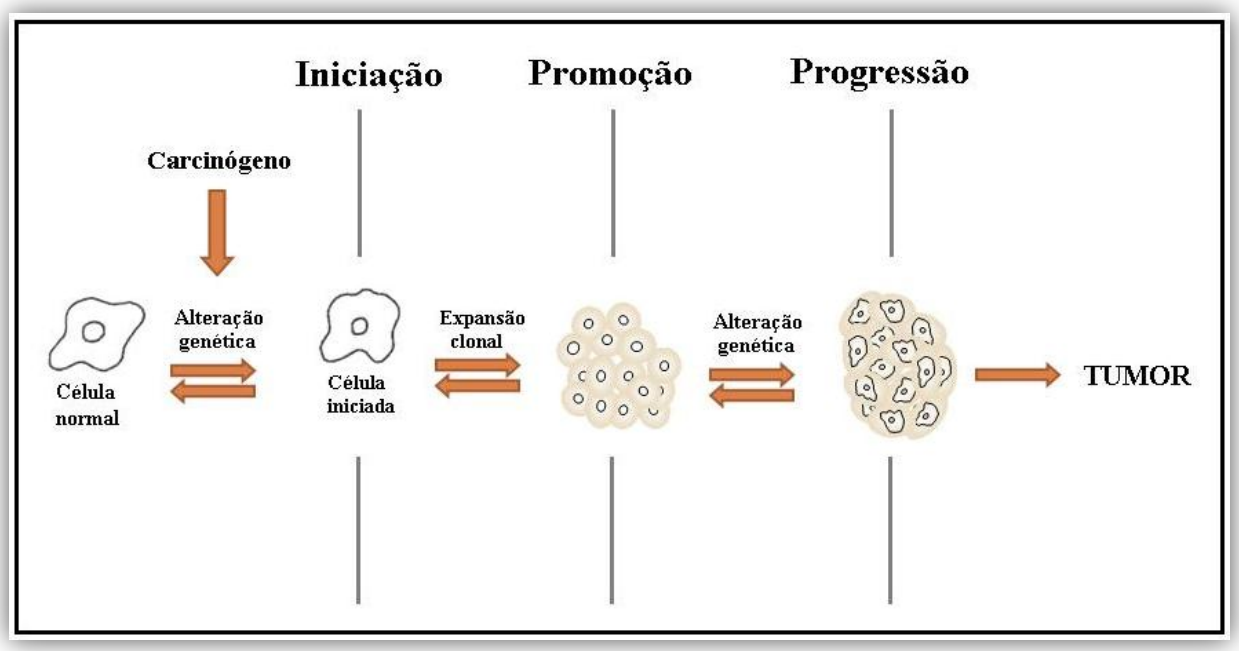


Figura 7: Etapas da carcinogênese.

1.5 Mecanismos epigenéticos

As células de um organismo possuem informações genéticas, estruturas e funções específicas que se devem a uma expressão diferencial do genoma, a qual é regulada principalmente por mecanismos epigenéticos (RODRIGUES, 2010).

Alterações epigenéticas são modificações na estrutura da cromatina, herdáveis durante a divisão celular, porém sem provocarem alterações na sequência de nucleotídeos do DNA, podendo ser consideradas como modificações reversíveis. São conhecidas três formas principais de controle epigenético da expressão gênica: metilação do DNA, modificações de histonas e ação de RNAs não codificadores. Entretanto, a metilação do DNA é a modificação epigenética melhor caracterizada até o momento (CHAUFFAILLE, 2006; GOUVEIA, 2007).

Os mecanismos epigenéticos regulam funções celulares crucias e determinantes para a regulação da expressão gênica como: estrutura da cromatina, inativação do cromossomo X, silenciamento de elementos repetitivos do genoma, *imprinting* gênico, diferenciação celular auxiliando na formação de tecidos, no processo de desenvolvimento embrionário (LACERDA, 2010; MULLER, PRADO, 2008; ZIMBARDI, 2010; FRAGA, *et al.* 2002, RODRIGUEZ, 2010), na compartimentalização do genoma em regiões ativas e condensadas, na inativação de

oncogenes e na repressão da expressão de genes supressores de tumor (GOUVEIA, 2007).

A metilação do DNA ocorre bioquimicamente pela adição de um grupo metil (CH_3), através da enzima DNA metil-transferase, à posição C-5 da citosina, originando 5-metil-2'-desoxicitidina (5-metil-dC). Para que ocorra essa adição, é necessário que haja um doador de CH_3, que neste caso é o S-adenosil-metionina (SAM) (BENDER, 2004; CHAUFFAILLE, 2006; ROBERTSON, WOLFFE, 2000). A metilação ocorre exclusivamente em citosinas que precedem uma guanina, sendo frequentemente denominadas de ilhas CpG. Essas ilhas CpG estão próximas a regiões promotoras dos genes, estendendo-se muitas vezes ao primeiro éxon. Apresentam tamanho igual ou superior a 200 pares de bases (pb), ocorrendo 10 vezes mais metilação nessa região que em outras regiões do genoma (MULLER, PRADO, 2008). Além disso, para que a citosina presente no genoma seja metilada, é necessário que esteja no sentido 5'- 3' (GOUVEIA, 2007; RODRIGUEZ, 2010).

A metilação do DNA em mamíferos é essencial para o desenvolvimento embrionário, sendo necessária para a viabilidade do embrião. Além disso, também é importante no desempenho das funções do genoma, estando relacionada com o processo de regulação gênica, estabilidade cromossômica e *imprinting* parental. No processo de regulação da expressão gênica, a metilação atua impedindo a ligação de enzimas, levando consecutivamente à repressão da transcrição (silenciamento) do gene, assim como auxiliando a cromatina a permanecer no seu estado inativo. As alterações do padrão de metilação do DNA estão associadas com diferentes doenças, principalmente relacionadas com os processos de transformação celular. Assim, diversas evidências têm mostrado a importância dos mecanismos epigenéticos na regulação de genes envolvidos no desenvolvimento de tumores (RODRIGUEZ, 2010; MULLER, PRADO, 2008).

Alterações da metilação do DNA, seja hipometilação ou hipermetilaçao de genes que participam de funções e mecanismos importantes no reparo e regulação do crescimento celular, podem promover a formação de células tumorais (RODRIGUEZ, 2010). Tanto a hipometilação quanto a hipermetilação nas ilhas CpG localizadas em regiões promotoras de genes apresentam importante papel no desenvolvimento de câncer e podem ocorrer de forma individual e simultânea (MULLER, PRADO, 2008; GOUVEIA, 2007).

De acordo com PIERRE e KANTARJIAN (2009), as ilhas CpG de regiões promotoras de genes em tecidos normais encontram-se hipometiladas e ilhas CpG

dispersas pelo genoma encontram-se hipermetiladas. Já em células tumorais é encontrada uma hipermetilação nas regiões promotoras e hipometilação global. Sendo assim, a co-existência de uma hipometilação global e hipermetilação regional dentro de uma mesma célula, ocorrendo simultaneamente e independentemente, sugere que o padrão de metilaçao do DNA é determinado por múltiplos fatores.

Outro estudo realizado por RODRIGUEZ (2010) relata a importância de detectar alterações epigenéticas em vários tipos de câncer, como estômago, próstata, mama e tireóide. Nesse estudo foi observada alteração da metilação em regiões promotoras de genes que codificam proteínas específicas da tireóide, provocando um silenciamento desses genes. O mesmo autor relata a importância de dois grupos de genes: oncogenes e genes supressores tumorais, sendo que a ativação ou inativação desses genes está diretamente relacionada com a transformação celular em células normais ou tumorais.

Os genes supressores tumorais atuam reprimindo o crescimento celular. Uma hipermetilação do DNA nas ilhas CpG próximas à região promotora causa um silenciamento específico desses genes, levando à perda de sua função e favorecendo a proliferação com consequente formação de tumores (CHRISTMAN *et al.* 1995, CHAUFFAILLE, 2006). Em alguns estudos foi possível caracterizar a presença de tumores em seres humanos através da determinação dos níveis de 5-metil-dC (FRAGA, *et al.,* 2002; RODRIGUEZ, 2010).

Os proto-oncogenes atuam favorecendo o crescimento celular de forma ordenada. Uma hipometilação no DNA leva a instabilidade genômica, inativando a função desses genes e levando ao crescimento descontrolado e desordenado de células, favorecendo a formação de tumores (MULLER, PRADO, 2008; RODRIGUEZ, 2010).

2. OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a possibilidade do THF induzir lesões em DNA e RNA de sistemas biológicos expostos ao solvente, assim como alterações epigenéticas. Como sistemas biológicos utilizamos homogenato de fígado de camundongos, cultura de células HepG2 e fígado e rim de camundongos que foram, em trabalho anterior, expostos a vapores do solvente.

Temos o seguinte plano de metas e objetivos para esse trabalho:

1. Realização de ensaios de citotoxicidade em células HepG2 utilizando diferentes concentrações de THF;
2. Validação de um método para quantificação das lesões 8-oxodGuo, 1,N^2-εdGuo, 1,N^6-εdAdo, dGuo-THF e dAdo-THF em DNA por HPLC-ESI-MS/MS;
3. Quantificação dos adutos de THF em DNA extraído de células incubadas com diferentes concentrações do solvente e em DNA de homogenato de fígado de camundongo incubado com o solvente;
4. Análise de dano oxidativo (8-oxodGuo, 1,N^2-εdGuo e 1,N^6-εdAdo) no DNA das células para comparação com o nível de adutos de THF;
5. Análise de dano oxidativo (8-oxodGuo, 1,N^2-εdGuo e 1,N^6-εdAdo) em DNA de figado e rim de camundongos expostos a vapores de THF;
6. Síntese, purificação e caracterização estrutural de adutos Ado-THF e Guo-THF para servirem de padrões para as quantificações em RNA;
7. Quantificação dos adutos de THF em RNA extraído de células incubadas com diferentes concentrações do solvente, utilizando o mesmo método validado para as análises de adutos de DNA e os padrões internos [$^{15}N_5$]-dGuo-THF e [$^{15}N_5$]-dAdo-THF;
8. Análise do nível de 5-metil-dC em células HepG2, figado e rim de camundongos expostos ao THF.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Reagentes

Os reagentes utilizados para o desenvolvimento deste projeto foram: fosfato de potássio, hidróxido de sódio, acetato de sódio, bicarbonato de sódio, cloreto de sódio, cloreto de potássio, fosfato de sódio, ácido acético, tetraidrofurano, carbonato de sódio, ferro, ácido sulfúrico e alaranjado de xilenol que foram adquiridos da empresa Merck (Darmstad, Alemanha). Ácido clorídrico, metanol e clorofórmio foram obtidos da empresa Carlo Erba Reagents (Itália). Corante cristal violeta, antibiótico (composto por penicilina e estreptomicina), guanosina, adenosina, 8-oxodGuo, 1,N^6-εdAdo, dimetil sulfóxido, dimetil sulfóxido-*d6*, cianoborohidreto de sódio e 2,6-di-tert-butyl-4-methylphenol (BHT) foram adquiridos da empresa Sigma – Aldrich (St. Louis, USA). O padrão [$^{15}N_5$]1,N^2-εdGuo foi gentilmente doado pela Profa. Marisa Helena Gennari de Medeiros e Dra. Camila Carrião Machado Garcia (IQ USP). Os kits para extração de DNA e RNA foram obtidos da empresa QIAGEN (Valencia, CA). Meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM), tripsina e soro fetal bovino, foram obtidos da empresa Atena Biotecnologia (Campinas-SP-Brasil). O kit de reagente XTT foi adquirido da empresa Xenometrix (Allschwil, Suiça). A água utilizada foi purificada em um sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, MA) e todos os materiais utilizados para manipulação das células eram estéreis. Todos os reagente citados foram utilizados para experimentos de bancada. Os solventes utilizados nos métodos de HPLC foram acetonitrila e metanol Carlo Erba Reagents (Itália)

3.2 Equipamentos

Quanto aos equipamentos, fizemos uso de uma microcentrifuga de bancada para centrifugações de tubos de 1,5 e 2 ml da marca Hettich Zentrifugen Mikro 120 (Alemanha) e uma centrifuga para tubos de 15 e 50 ml da marca Eppendorf modelo Centrifuge 5702 R. Utilizamos uma incubadora com controle de temperatura e agitação da Labnet International - modelo Vortemp 56 (Woodbridge, USA), agitador de tubos (vórtex) da Phoenix AP56 (Araraquara, SP, Brasil), balança semi-analítica da Bioprecisa FA2104N (Tóquio, Japão), banho maria da Cientec - modelo 245 (Piracicaba, SP, Brasil) e potenciômetro digital PHTEK modelo PHS-3B (São Paulo, Brasil). Para preparo de soluções foi utilizado um agitador magnético da Biomixer 78hW-1 Constant Temperature Magnetic Stirrer. Para armazenamento das células

tratadas utilizamos uma incubadora de CO_2 da Thermo Electron Corporation (USA), microscópio invertido Leica CTR 4000 (Alemanha) para contagem e observação celular e um fluxo laminar vertical da Pachane modelo PCR-2 (Piracicaba, SP, Brasil) para manipulação das células. Os espectros de absorbância foram obtidos através de um espectrofotômetro (UV/VIS) da Analítica - modelo Biochrom Libra S12 (Inglaterra) com software BioDC versão 2.0. e para leitura das placas de 96 poços utilizamos um leitor de ELISA da marca Power Wave modelo X340 (Winooski, USA). Para purificação dos adutos Guo-THF e Ado-THF foi necessária a utilização de um liofilizador de bancada com bomba à vácuo modelo Liotop L101 (Liobras Ind. Com. Serv. Liofilizadores Ltda.) e do equipamento Speed Vac Concentrator da Thermo Electron Corporation modelo SPD 1010 (USA) para obtenção de uma amostra sólida/seca.

3.2.1 Análises por HPLC/PDA

HPLC/PDA método 1:

Foi utilizado um sistema de HPLC/PDA da Shimadzu (Kyoto, Japão) constituído por duas bombas LC-20AT, um injetor automático SIL-20AC, um forno para colunas CTO-10AS/VP, um degaseificador DGU-20A5, um detector de arranjo de fotodiodos SPD-M20A, tudo controlado por um módulo de comunicação CBM-20A acoplado ao software LC Solution. As análises e coletas dos adutos referentes às incubações de Guo com THF e Ado com THF foram feitas através de uma coluna analítica Luna C18(2) 250 mm x 4,6 mm id, 5 µm da Phenomenex (Torrance, CA) eluída com um gradiente de água e acetonitrila (ACN) com fluxo de 1 mL/min a 30°C nas seguintes condições: 0-5 minutos (5% ACN), 5-30 minutos (5 a 20% ACN), 30-50 minutos (20 a 40% ACN), 50-55 minutos (40 a 5% ACN), 55-65 minutos (5% ACN). Nessas condições o pico de Guo-THF reduzido aparece em 19 minutos e de Ado-THF reduzido em 26 minutos.

HPLC/PDA método 2:

Utilizamos um sistema de HPLC/PDA igual ao descrito no método 1, utilizando a mesma coluna analítica, porém eluída com ácido fórmico 0,1% em água (Solução A) e uma mistura 1:1 de metanol : água, com 0,1% de ácido fórmico (Solução B) a um fluxo de 1 mL/min, 25 ºC, nas seguintes condições: 0 – 28 min, (0 a 36% Solução B); 28 –30 min, (36 a 0% Solução B) e de 30 – 42 min, (0% Solução B). O detector DAD foi

fixado em 260 nm para a identificação dos nucleosídeos normais (dCyd, dAdo e dGuo) e 286 nm para a identificação de 5-metil-dC**.** Curvas de calibração foram injetadas no intervalo de 5 a 30 nmol para quantificação dos nucleosídeos normais e no intervalo de 0,025 a 0,25 nmol para a quantificação de 5-metil-dC. O padrão 5-metil-dC foi obtido por purificação a partir de dCyd adquirida comercialmente. Essa purificação foi realizada no laboratório pelo aluno de doutorado Tiago Franco de Oliveira. A identidade do padrão foi confirmada por espectrofotometria e espectrometria de massas. Os níveis de 5-metil-dC são expressos em porcentagem do nível total de dCyd (dCyd + 5-metil-dC) presente no DNA.

HPLC/PDA método 3:

Utilizou-se um sistema de HPLC/PDA igual ao descrito em método 1, para análise e purificação dos padrões de adutos 1,N^2-εdGuo, [$^{15}N_5$]8-oxodGuo e [$^{15}N_5$]1,N^6-εdAdo. Os sistemas de eluição foram:

Sistema 1 - Coluna Luna C18 (2) 250 mm x 4,6 mm ID, 5 µm (Phenomenex, Torrance, CA) eluída com fase móvel constituída de 5% ACN em tampão fosfato de potássio (KH_2PO_4 - 25 mM), pH 5,5 (corrigido com hidróxido de sódio) em modo isocrático (tempo de corrida 25 minutos), à 30 ºC, com fluxo de 0,350 mL/min. O detector PDA foi fixado em 250 nm**.**

Sistema 2 - Coluna Luna C18 (2) 250 mm x 4,6 mm ID, 5 µm (Phenomenex, Torrance, CA) eluída com fase móvel constituída de 5% ACN e água em modo isocrático (tempo de corrida 25 minutos), à 30 ºC, com fluxo de 0,350 mL/min. O detector PDA foi fixado em 250 nm**.**

Sistema 3 - Coluna Luna C18 (2) 250 mm x 4,6 mm ID, 5 µm (Phenomenex, Torrance, CA) eluída com um gradiente de água e ACN nas seguintes condições: 0 – 30 minutos (5 - 50% ACN), 30 – 31 minutos (50 – 5% ACN) e 31 – 40 minutos (5% ACN), à 30 ºC, com fluxo de 1 mL/min. O detector PDA foi fixado em 260 nm.

HPLC/PDA método 4:

Utilizamos um sistema de HPLC/PDA igual ao descrito em método 1, utilizando a mesma coluna analítica eluída com água e metanol, fluxo de 1 mL/min à 30°C nas seguintes condições: 0-50 minutos (5 a 84% MeOH l), 50-52 minutos (84 a 5% MeOH), 52-62 minutos (5% MeOH).

3.2.2 Análise por HPLC-ESI-MS/MS

HPLC-PDA-ESI-MS/MS-MRM

Para análises dos níveis de 8-oxodGuo, 1,N^6-εdAdo, 1,N^2-εdGuo, dGuo-THF e dAdo-THF em amostras de DNA foi utilizado um sistema de HPLC-ESI-MS/MS disponível no laboratório do Professor Paolo Di Mascio (IQ USP, São Paulo, Brasil). O sistema de HPLC da Agilent série 1200 (Wilmington, USA) é constituído por duas bombas, sendo uma bomba binária (Agilent 1200 G1312B) e uma bomba isocrática (Agilent 1200 G1310A), um forno para colunas (Agilent 1200 G1316B), um detector de arranjo de diodos (Agilent 1200 DAD G1315C) e um auto injetor (Agilent 1200 G1367C), acoplado a um espectrômetro de massas *Linear Quadrupole Ion Trap*, modelo 4000 QTRAP, da Applied Biosystems Sciex Instruments (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA). As análises por ESI-MS foram realizadas em modo positivo, utilizando-se os seguintes parâmetros otimizados: gás de nebulização, 20 psi; gás na fonte de íons, 50 psi; gás de dissociação induzida por colisão, LOW; temperatura da fonte do ESI, 550 ºC; potencial de dissociação, 46 V; potencial de entrada ,10 V; energia de colisão, 17 eV, potencial de saída da célula, 52 V; e tensão do spray de íons, 5500 V.

Para análise dos níveis de adutos em amostras de DNA, foi utilizado o modo de monitoramento de reação múltipla (MRM) para detecção e quantificação de 8-oxodGuo, 1,N^6-εdAdo, 1,N^2-εdGuo, dGuo-THF e dAdo-THF, sendo utilizadas as seguintes fragmentações: *m/z* 284 $[M+H]^+ \rightarrow$ *m/z* 168 $[M-2'\text{-desoxirribose}+H]^+$ e *m/z* 289 $[M+H]^+ \rightarrow$ *m/z* 173 $[M-2'\text{-desoxirribose}+H]^+$ para a detecção de 8-oxodGuo e respectivo padrão interno $[^{15}N_5]$-8-oxodGuo, *m/z* 276 $[M+H]^+ \rightarrow$ *m/z* 160 $[M-2'\text{-desoxirribose}+H]^+$ e *m/z* 281 $[M+H]^+ \rightarrow$ *m/z* 165 $[M-2'\text{-desoxirribose}+H]^+$ para a detecção de 1,N^6-εdAdo e respectivo padrão interno $[^{15}N_5]$-1,N^6-εdAdo, *m/z* 292 $[M+H]^+ \rightarrow$ *m/z* 176 $[M-2'\text{-desoxirribose}+H]^+$ e *m/z* 297 $[M+H]^+ \rightarrow$ *m/z* 181 $[M-2'\text{-desoxirribose}+H]^+$ para a detecção de 1,N^2-εdGuo e respectivo padrão interno $[^{15}N_5]$-1,N^2-εdGuo, *m/z* 324 $[M+H]^+ \rightarrow$ *m/z* 208 $[M-2'\text{-desoxirribose}+H]^+$ e *m/z* 329 $[M+H]^+ \rightarrow$ *m/z* 213 $[M-2'\text{-desoxirribose}+H]^+$ para a detecção de dAdo-THF e respectivo padrão interno $[^{15}N_5]$dAdo-THF, *m/z* 340 $[M+H]^+ \rightarrow$ *m/z* 224 $[M-2'\text{-desoxirribose}+H]^+$ e *m/z* 345 $[M+H]^+ \rightarrow$ *m/z* 229 $[M-2'\text{-desoxirribose}+H]^+$ para a detecção de dGuo-THF e respectivo padrão interno $[^{15}N_5]$dGuo-THF. As razões entre as áreas (aduto/padrão interno) foram utilizadas para quantificação. Curvas de calibração

foram injetadas no intervalo de 25 a 250 fmol de 8-oxodGuo (1000 fmol de [$^{15}N_5$]8-oxodGuo), 5 a 150 fmol de 1,N^6-εdAdo, 1,N^2-εdGuo, dAdo-THF e dGuo-THF (200 fmol de [$^{15}N_5$]1,N^6-εdAdo, [$^{15}N_5$]1,N^2-εdGuo, [$^{15}N_5$]dAdo-THF e [$^{15}N_5$]dGuo-THF).

Para análises dos níveis de Guo-THF e Ado-THF em amostras de RNA, também foi utilizado o modo de monitoramento de reação múltipla (MRM) para detecção e quantificação dos níveis dos adutos de RNA-THF, porém sendo utilizadas as seguintes fragmentações: *m/z* 340 $[M+H]^+ \rightarrow$ *m/z* 208 $[M-ribose+H]^+$ e *m/z* 329 $[M+H]^+ \rightarrow$ *m/z* 213 $[M-2'\text{-desoxirribose}+H]^+$ para a detecção de Ado-THF e respectivo padrão interno [$^{15}N_5$]dAdo-THF, *m/z* 356 $[M+H]^+ \rightarrow$ *m/z* 224 $[M-ribose+H]^+$ e *m/z* 345 $[M+H]^+ \rightarrow$ *m/z* 229 $[M-2'\text{-desoxirribose}+H]^+$ para a detecção de Guo-THF e respectivo padrão interno [$^{15}N_5$]dGuo-THF. As razões entre as áreas (aduto/padrão interno) foram utilizadas para quantificação. Curvas de calibração foram injetadas no intervalo de 5 a 80 fmol de Ado-THF e Guo-THF (200 fmol de [$^{15}N_5$]dAdo-THF e [$^{15}N_5$]dGuo-THF).

Os dados de ambas análises foram processados utilizando-se o software Analyst 1.4 (Applied Biosystems, USA). As seguintes condições cromatográficas foram utilizadas:

Método 1: Coluna Luna C18 (2) 150 mm x 2,0 mm ID, 3 µm (Phenomenex, Torrance, CA) com uma pré-coluna C18 4,0 x 3,0 mm (Phenomenex, Torrance, CA) eluída com um gradiente de ácido fórmico 0,1% em água (Solução A) e metanol com 0,1% de ácido fórmico (Solução B), a um fluxo de 200 µL/min, 25 ºC, nas seguintes condições: 0 – 30 min, (0 – 18% MeOH); 30 – 31 min, (18 – 80% MeOH); 31 – 33 min, (80% MeOH); 33 – 34 min, (80 – 0% MeOH); 34 – 46 min, (0% MeOH). O detector PDA foi fixado em 260 nm para a identificação e quantificação de dGuo e dAdo utilizando-se curva de calibração no intervalo de 2,5 a 15 nmol. Frações molares 8-oxodGuo/dGuo, 1,N^2-εdGuo/dGuo, 1,N^6-εdAdo/dAdo, dGuo-THF/dGuo e dAdo-THF/dAdo foram então determinadas.

Método 2: Coluna Luna C18 (2) 150 mm x 2,0 mm ID, 3 µm (Phenomenex, Torrance, CA) com uma pré-coluna C18 4,0 x 3,0 mm (Phenomenex, Torrance, CA) eluída com um gradiente de 5% MeOH em solução de ácido fórmico 0,1% (Solução A) e MeOH com 0,1% de ácido fórmico (Solução B), a um fluxo de 200 µL/min, 25 ºC, nas

seguintes condições: 0 – 10 min, (0% B); 10 – 11 min, (0 – 25% B); 11 – 25 min, (25 % B), 25 – 26 min, (25 – 95% B); 26 – 30 min (95 % B); 30 – 31 min, 95 – (0% B) e 31 – 44 min, (0% B). Frações molares de aduto/desoxinuclesídeo normal presentes em cada amostra foram determinadas utilizando-se em conjunto os dados obtidos no sistema HPLC-PDA método 2 descrito acima.

3.2.3 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os adutos Ado-THF e Guo-THF reduzidos foram purificados para caracterização estrutural por RMN. Após liofilização do concentrado obtido, as amostras foram separadamente ressuspensas em aproximadamente 700 μL de dimetil sulfóxido-*d6* (DMSO-*d6*) e enviadas à Central Analítica do Instituto de Química da USP, onde foram obtidos espectros de ^{1}H RMN e COSY em um espectrômetro DRX-500 MHz (Bruker, MA).

3.3 Síntese e purificação dos padrões de adutos

Os padrões dAdo-THF, [^{15}N$_5$]dAdo-THF, dGuo-THF, [^{15}N$_5$]dGuo-THF foram sintetizados e purificados anteriormente no laboratório de acordo com os procedimentos descritos em HERMIDA *et al.*, (2006). A pureza e identidade dos adutos foram verificadas por HPLC/PDA e HPLC-ESI/MS/MS. Os padrões [^{15}N$_5$]8-oxodGuo e [^{15}N$_5$]1,N^6-εdAdo foram sintetizados e purificados pelo aluno de doutorado do laboratório Tiago Franco de Oliveira. O padrão 1,N^2-εdGuo é proveniente de um estoque disponível no laboratório, sintetizado e purificado anteriormente pela Profa. Ana Paula M. Loureiro. As concentrações de 1,N^2-εdGuo e [^{15}N$_5$]1,N^2-εdGuo foram determinadas pela absorbância em 285 nm ($\varepsilon_{285\ nm}$ = 16785 M^{-1} cm^{-1}, pH 7,4).

3.3.1 Síntese e purificação do padrão [^{15}N$_5$]8-oxodGuo

Alíquotas de 200 μg de [^{15}N$_5$]dGuo foram solubilizadas em 400 μL de água deionizada. Foram adicionados a cada incubação 5 μL de uma solução contendo sulfato de cobre 0,2 M, 50 μL de uma solução de ácido ascórbico 2 M e 50 μL de peróxido de hidrogênio (30%, v:v). As alíquotas foram submetidas a uma vigorosa agitação por 60 segundos e incubadas à temperatura de -4 °C por 15 minutos. Em seguida o produto da reação de oxidação foi purificado por HPLC utilizando-se o sistema 1 do método 3, descrito no item 3.2.1. O pico com $\lambda_{max..}$ em 294 nm foi coletado, liofilizado e

ressuspenso em água. Alíquotas dessa nova solução foram injetas no sistema 2 do método 3 descrito no item 3.2.1 para a remoção do sal da amostra. O pico com espectro de absorbância correspondente ao aduto foi coletado, seco e ressuspenso em 200 μL de água. A concentração foi determinada pela absorbância em 294 nm ($\varepsilon_{294\ nm}$ = 9700 M^{-1} cm^{-1}). A identidade e a pureza isotópica foram confirmadas por análises de HPLC-ESI-MS/MS.

3.3.2 Síntese e purificação do padrão [$^{15}N_5$]1,N^6-εdAdo

Alíquotas de 3 mg de [$^{15}N_5$]dAdo foram solubilizadas em 750 μL de tampão fosfato de potássio (KH_2PO_4 – 0,1 M – ph 6,0). Foram adicionados a cada incubação 15 μL de solução de cloroacetaldeído 2,0 M e as soluções foram incubadas a 37 °C por 18 horas. O produto da reação foi purificado por HPLC utilizando-se o sistema 3 do método 3, descrito no item 3.2.1. O pico com $\lambda_{max.}$ em 275 nm correspondente ao [$^{15}N_5$]1,N^6-εdAdo foi coletado, liofilizado e ressuspenso em água. A identidade e a pureza isotópica do aduto foram confirmadas por análises de HPLC-ESI-MS/MS. As concentrações de 1,N^6-εdAdo e [$^{15}N_5$]-1,N^6-εdAdo foram determinadas pela absorbância em 260 nm ($\varepsilon_{260\ nm}$ = 10300 M^{-1} cm^{-1}, pH 7,4).

3.3.3 Síntese e purificação dos padrões dAdo-THF, [$^{15}N_5$]dAdo-THF, dGuo-THF e [$^{15}N_5$]dGuo-THF

Os padrões [$^{15}N_5$]dGuo-THF e [$^{15}N_5$]dAdo-THF foram obtidos por reação de [$^{15}N_5$]dGuo e [$^{15}N_5$]dAdo com THF oxidado, como descrito em HERMIDA et al. (2006) para os desoxinucleosídeos normais. A síntese, caracterização e purificação desses padrões no laboratório foram realizadas pela estudante de Iniciação Científica Mariana Silveira Pedrosa (FCF USP). Foram adicionados 180 μL de THF contendo 11 mM de peróxidos às soluções de [$^{15}N_5$]dGuo e [$^{15}N_5$]dAdo preparadas em 300 μL de tampão fosfato 0,2 M em pH 7,4. Passada uma noite de incubação a 37ºC sob agitação, foram realizadas extrações com volume igual de clorofórmio e posteriormente as fases coletadas foram injetadas no sistema HPLC/PDA método 4. Os adutos foram coletados, liofilizados e ressuspensos em 1 mL de tampão fosfato 0,2 M, pH 7,4 e 50 μL de solução aquosa de $NaBH_4$ (90 mg/mL) e deixados à temperatura ambiente por uma noite. Os adutos reduzidos foram repurificados pelo sistema HPLC/PDA método 4. As

concentrações foram determinadas pela absorbância em 254 nm (dGuo-THF, $\varepsilon_{254\ nm}$ = 7991 M^{-1} cm^{-1}, pH 7,4) e 286 nm (dAdo-THF, $\varepsilon_{286\ nm}$ = 31460 M^{-1} cm^{-1}, pH 7,4).

3.3.4 Síntese e purificação dos padrões Ado-THF e Guo-THF

Os padrões de Guo-THF e Ado-THF foram obtidos por reação dos nucleosídeos com THF oxidado, como descrito em HERMIDA et al. (2006) apenas substituindo os desoxinucleosídeos pelos ribonucleosídeos. A síntese desses padrões foi realizada utilizando-se 1 mg de cada ribonucleosídeo isolado, 360 µL de THF contendo 11 mM de peróxidos e 600 µL de tampão fosfato 50 mM em pH 7,4. Passada uma noite de incubação a 37ºC sob agitação, foram realizadas extrações com volume igual de clorofórmio e posteriormente as fases coletadas foram injetadas no sistema HPLC/PDA método 1. Os adutos foram coletados, liofilizados e ressuspensos em 1 mL de tampão fosfato 0,2 M, pH 7,4 e 50 µL de solução aquosa de cianoborohidreto de sódio (90 mg/mL) e deixados à temperatura ambiente por uma noite. Os adutos reduzidos foram repurificados pelo sistema HPLC/PDA método 1. As concentrações foram determinadas pela absorbância em 254 nm (Guo-THF, $\varepsilon_{254\ nm}$ = 7991 M^{-1} cm^{-1}, pH 7,4) e 286 nm (Ado-THF, $\varepsilon_{286\ nm}$ = 31460 M^{-1} cm^{-1}, pH 7,4).

3.4 Validação de métodos para quantificação de 8-oxodGuo, 1,N^2-εdGuo, 1,N^6-εdAdo, dGuo-THF e dAdo-THF em DNA

As validações foram realizadas com a participação do aluno de doutorado do laboratório, Tiago Franco de Oliveira. Foi utilizado DNA de timo de bezerro (80 µg ou 30 µg) contaminado com quantidades conhecidas dos adutos de interesse (4 a 80 fmol dos adutos e 25 a 250 fmol de 8-oxodGuo) e os padrões internos (1000 fmol de [$^{15}N_5$]8-oxodGuo, 200 fmol de [$^{15}N_5$]1,N^6-εdAdo, [$^{15}N_5$]1,N^2-εdGuo, [$^{15}N_5$]dAdo-THF e [$^{15}N_5$]dGuo-THF) no volume de injeção. Após realização da hidrólise enzimática e extração em fase sólida (esta etapa apenas para as amostras de 80 µg de DNA), como descrito adiante, foram feitas as análises como descrito no item 3.2.1 (HPLC-PDA-ESI-MS/MS-MRM**,** métodos 1 e 2) e foram calculadas a precisão (coeficiente de variação % ou CV %), exatidão e recuperação. A recuperação foi calculada apenas para os casos de extração em fase sólida (SPE). Para isso foram feitas análises de amostras de DNA contaminadas no início da hidrólise com 40 fmol de cada aduto e as quantidades

indicadas de cada padrão interno (com excessão de 8-oxodGuo, que não é recuperada da SPE) concomitantemente com amostras de DNA contaminadas com 40 fmol dos adutos no início da hidrólise, mas com adição dos padrões internos apenas após a realização da SPE.

3.5 Células HepG2

A linhagem de células HepG2 é proveniente de carcinoma hepatocelular humano (Figura 3). Tais células oferecem vantagens de fácil manipulação, manutenção e rápida replicação (NOOR *et al.*, 2009).

Existem diversas linhagens de células disponíveis para análise de mecanismos de toxicidade, entretanto, a linhagem celular HepG2 é a que apresenta melhor indicação e caracterização no que diz respeito a testes e mecanismos de hepatotoxicidade. Também tem sido amplamente utilizada em estudos de metabolismo hepático, toxicidade de xenobióticos, além de serem úteis para aplicações na descoberta de drogas, analisando a indução enzimática ou avaliando o potencial hepatotóxico de medicamentos (NIKLAS *et al.*, 2009).

Essa linhagem apresenta diversas funções hepáticas específicas. Expressam enzimas de biotransformação de fase I e fase II, incluindo citocromo P450 (TORRES *et al.*, 2004; DONATO *et al.*, 2008), além de manter muitas funções do fígado humano normal, incluindo síntese de albumina, lipoproteínas e inúmeras outras funções hepáticas, tornando-se um modelo ideal de testes *in vitro.*

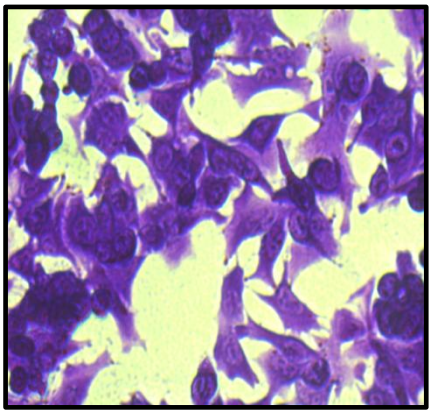


Figura 8: Células HepG2 cultivadas no laboratório.

3.6 Cultura de células HepG2

A linhagem de células HepG2 é derivada de carcinoma hepatocelular humano e possui sistema de biotransformação ativo (Fase 1 e Fase 2). Essa linhagem é frequentemente empregada para avaliação de toxicidade de várias substâncias *in vitro* e também muito utilizada em pesquisas na área de toxicologia, pois possui a vantagem de ser facilmente cultivada, estável, derivada de humano, órgão específico, além de ter uma rápida replicação.

Essas células foram gentilmente fornecidas pela Profa. Mari C. Sogayar (IQ USP, São Paulo, Brasil) e Profa. Terezinha de Jesus Andreoli Pinto (FCF USP, São Paulo, Brasil). A cultura foi mantida em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 10 U/mL de penicilina, 0,1 mg/mL de sulfato de estreptomicina e 1,2 mg/mL de bicarbonato de sódio. Utilizou-se filtro com membrana de 0,22 μm (TPP, Suiça) para esterilização do meio de cultura. As células foram incubadas a 37ºC, em atmosfera contendo 5% de CO_2.

O repique das células foi feito periodicamente da seguinte forma: foi retirado todo o meio de cultura da garrafa onde as células estavam aderidas e estas lavadas cuidadosamente 2x com tampão salina fosfato (PBS). Em seguida, foram adicionados 2 mL de solução de tripsina e, após 5 minutos, as células foram ressuspensas no meio de cultura e transferidas para outras garrafas de cultura para adesão e crescimento ou para tubos estéreis para realização de diluição e contagem utilizando câmara de Neubauer. Após contagem, número adequado de células foi transferido para placas de 96 poços para os ensaios de citotoxicidade. As células foram manipuladas dentro de um fluxo laminar utilizando somente materais estéreis.

3.7 Ensaios de citotoxicidade

Para obtenção de dados sobre a citotoxicidade do THF foram avaliadas a atividade da cadeia respiratória mitocondrial através do ensaio XTT, e a proliferação/morte celular utilizando o ensaio com corante cristal violeta. As leituras de

absorbância foram feitas em um leitor de ELISA Power Wave modelo X340 (Winooski, USA).

Para a realização dos ensaios, as células foram transferidas para placas de 96 poços com meio de cultura DMEM suplementado com 10% SFB e mantidas por 20 h em uma incubadora a 37°C em atmosfera contendo 5% de CO_2. Após o período de incubação, o meio de cultura foi removido e as células foram expostas ao solvente THF, nas concentrações apresentadas na Figura 9.

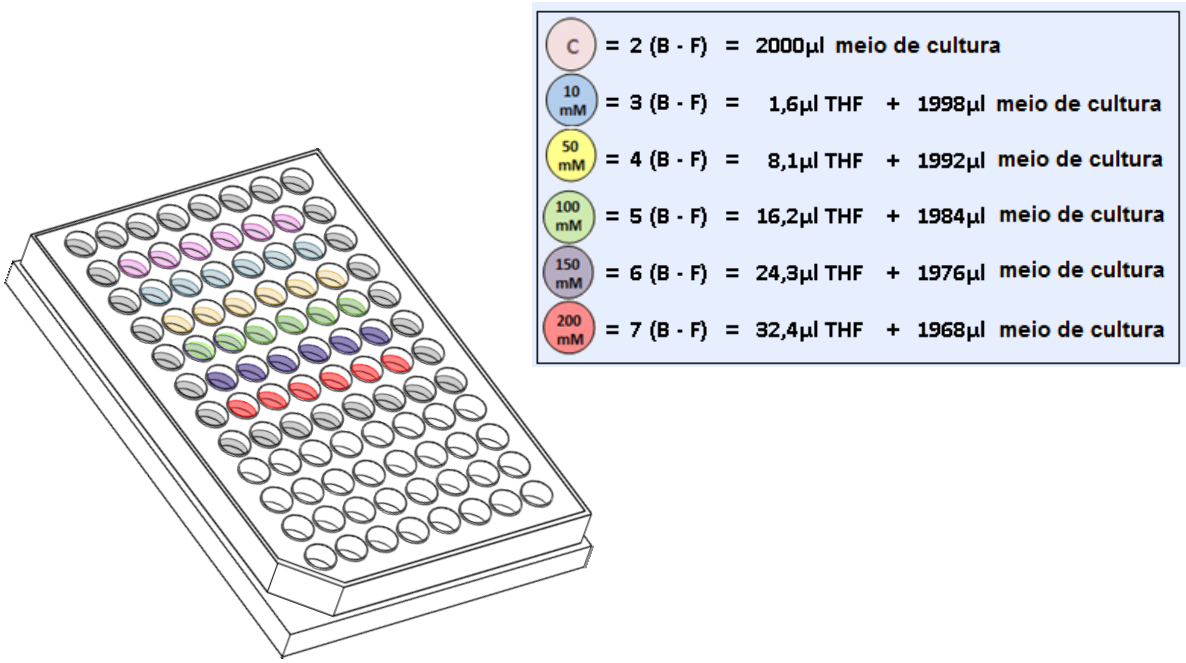


Figura 9: Procedimento utilizado para incubação de células HepG2 com diferentes concentrações de THF para os ensaios de citotoxicidade. Foram distribuídos 200 µL de meio por poço.

Dois testes foram realizados, sendo diferenciados por tempo de exposição. O primeiro teste foi realizado após um período de 24 h de exposição ao THF, sendo plaqueadas 5 x 10^4 células/poço (200 µL). O segundo teste foi realizado pelo período de 5, 24, 48 e 72 h de exposição ao THF, tendo sido plaqueadas 1 x 10^4 células/poço (200 µL) em virtude do período mais longo de incubação. Passado o período de exposição, o meio de cultura foi removido e as células submetidas aos ensaios de citotoxicidade descritos abaixo. Devido à volatilidade do THF, nas incubações pelos períodos de 5 a 72 h foi feita renovação do meio de cultura das células por novo meio com a mesma

concentração de THF após 6 h, 24 h, 30 h, 48 h e 54 h do início da incubação, para garantir a presença de THF em contato com as células por todo o período de incubação.

3.7.1 XTT

O sal de tetrazólio 2,3-bis[2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil]-2H-tetrazolium-5-carboxanilida de sódio (XTT) é utilizado para verificar a atividade da cadeia respiratória mitocondrial. O sal de tetrazólio é reduzido a formazam pela enzima succinato desidrogenase mitocondrial, que está ativa em células com cadeia respiratória intacta. A quantidade de formazam produzida é proporcional ao número de células viáveis presentes, sendo quantificada espectrofotometricamente.

Após o término da incubação das células com THF, foi retirado o meio de cultura da placa, as células foram lavadas 1x com PBS e foi adicionado um novo meio de cultura contendo 5% de SFB. Uma solução pré-formulada de 50 µL do reagente XTT (reagente XTT : tampão = 100:1) foi então adicionada a cada poço e a placa de cultura foi incubada por 1 hora a 37ºC, 5% de CO_2. Os valores da absorbância (OD = OD450 nm - OD690 nm) foram aferidos fazendo-se a leitura no comprimento de onda de 450 nm, com a leitura de referência no comprimento de onda de 690 nm, usando-se um espectrofotômetro com leitor de microplaca. Os resultados foram expressos em porcentagem relativa ao grupo controle.

3.7.2 CVD

O corante cristal violeta (CVD) é utilizado para quantificar células aderidas à placa de cultura. Como as células mortas não se aderem às placas, é possível avaliar a sobrevivência celular através do CVD, que se acumula no núcleo celular. O corante fixado é analisado espectrofotometricamente, sendo possível correlacioná-lo com a quantidade de DNA e consequentemente com o número de células vivas.

Após o término da incubação das células com THF, foi retirado o meio de cultura da placa e as células foram lavadas cuidadosamente 2x com 200 µL de PBS. Em seguida foram adicionados 100 µL de metanol para lavagem e fixação das células. Retirado o metanol, as células foram coradas com 100 µL da solução preparada de CVD (1% de CVD em metanol 20%) e deixadas interagir por 10 minutos a 37°C em atmosfera contendo 5% de CO_2. Passados os 10 minutos, o corante foi retirado e as células foram lavadas por 4x com 200 µL de PBS. A seguir, foram adicionados 200 µL

de ácido acético 30% e as placas deixadas em repouso por um período de 10 minutos para solubilização do corante. Os valores de absorbância (OD = OD570 nm - OD690 nm) foram aferidos fazendo-se a leitura teste no comprimento de onda de 570 nm e a leitura de referência no comprimento de onda de 690 nm usando-se um espectrofotômetro com leitor de microplaca. Os resultados foram expressos em porcentagem relativa ao grupo controle.

3.8 Extração e hidrólise do DNA de células HepG2 incubadas com THF

O procedimento iniciou-se com o repique das células HepG2 para 16 garrafas plásticas de 175 cm^2 (600mL) para crescimento celular. Após atingirem a confluência, as células foram incubadas com as diferentes concentrações de THF indicadas na Tabela 1 pelo período de 48 horas, sendo feita renovação do meio com as mesmas concentrações de THF após 24 h do início. Também foram realizadas incubações com THF oxidado e não oxidado utilizando PBS como veículo por tempo de incubação de 2 h (Tabela 2). Terminado o período de incubação de cada experimento foi realizado o processo de extração do DNA.

Tabela 1: Procedimento utilizado para incubação de células HepG2 com diferentes concentrações de THF para extração do DNA utilizando-se meio de cultura com incubação por 48 h. Foram distribuídos 25 mL de meio por garrafa.

48 horas de incubação (Meio de Cultura)				
4 garrafas (Controle)	sem THF	+	100 mL de meio	
4 garrafas (10 mM)	80 µL de THF	+	99,92 mL meio	0,08% (800 ppm) de THF
4 garrafas (50 mM)	405 µL de THF	+	99,60 mL meio	0,4% (4000 ppm) de THF
4 garrafas (100 mM)	810 µL de THF	+	99,20 mL meio	0,8% (8000 ppm) de THF

Tabela 2: Procedimento utilizado para incubação de células HepG2 com diferentes concentrações de THF para extração do DNA utilizando-se PBS como veículo com incubação por 2 h. Foram distribuídos 25 mL de meio por garrafa.

2 horas de incubação (PBS)				
4 garrafas (Controle)	sem THF	+	100 mL de meio	
4 garrafas (50 mM) THF não oxidado	405 µL de THF	+	99,92 mL meio	0,4% (4000 ppm) de THF
4 garrafas (10 mM) THF oxidado	80 µL de THF	+	99,60 mL meio	0,08% (800 ppm) de THF

O procedimento de extração de DNA das células foi realizado como indicado no kit Gentra PureGene da QIAGEN® (Valencia, CA). Após crescimento das células, o meio de cultura foi descartado e as células foram ressuspensas em 10 mL de um novo meio de cultura sem SFB. A solução com as células foi acondicionada em um tubo de centrifugação, onde as células foram precipitadas a 300 x *g* por 5 minutos. Retirado o sobrenadante, foram adicionados 3 mL da solução de lise de células (Gentra Puregene® Kit) e 30 µL de RNAse (15 mg/mL) com incubação de 1 hora a 37°C. A remoção das proteínas ocorreu com a adição de 1 mL da solução de precipitação de proteínas (Gentra Puregene® Kit) e centrifugação por mais 10 minutos a 2000 x *g*. O sobrenadante foi transferido para outro tubo contendo 5 mL de isopropanol gelado e a solução foi homogenizada para garantir total precipitação do DNA. O DNA foi lavado com 3 mL de etanol 70% e mais uma vez centrifugado a 2000 x *g* por 3 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado de DNA foi seco em temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados 100 µL de desferroxamina 0,1 mM e os tubos mantidos sob refrigeração por 1 noite. Após completa solubilização do DNA, a concentração foi aferida com leitura de absorbância em 260 nm e sua pureza pela razão das absorbâncias em 260 e 280 nm. As amostras de DNA foram congeladas a – 20 °C.

O processo de hidrólise do DNA foi realizado da seguinte forma: foi adicionada uma alíquota da solução contendo 100 µg de DNA em 3,75 µL de tampão Tris/$MgCl_2$ 200 mM (pH 7,4). Em seguida foi adicionada DNAse 1 (10 unidades) e as amostras incubadas a 37 °C por 1 hora. Foram então adicionadas 0,004 unidade de fosfodiesterase 1 (PDE1) e 10 unidades de fosfatase alcalina e novamente as amostras incubadas a 37 °C por 1 hora. Em seguida foram realizadas 3 adições de $NaBH_3CN$ intercaladas de 30 minutos. Posteriormente foram adicionados 1,4 µL de uma solução preparada com 250 fmol/µL de cada um dos padrões internos [$^{15}N_5$]1,N^6-εdAdo e [$^{15}N_5$]1,N^2-εdGuo e 1,4 µL de outra solução preparada com 250 fmol/µL de cada um dos padrões internos [$^{15}N_5$]dGuo-THF e [$^{15}N_5$]dAdo-THF. Finalizamos a hidrólise ajustando a solução para um volume final de 150 µL com água deionizada. Foram separados 10 µL da solução resultante para injeção no HPLC/PDA equipamento 2 e os 140 µL restantes foram utilizados para extração em fase sólida (SPE), seguindo o procedimento descrito adiante. Após secagem, a amostra foi ressuspensa em 78,8 µL de água deionizada e injetado um volume de 50 µL no método 2 do equipamento de HPLC-PDA-ESI-MS/MS-MRM descrito no item 3.2.1.

Para as análises de 8-oxodGuo, foram hidrolisados 30 µg de DNA seguindo-se o procedimento acima, mas sem realizar as adições de $NaBH_3CN$ e extração em fase sólida. Os volumes dos reagentes foram ajustados para a quantidade de DNA a ser hidrolisada e volume final de 75 µL. Nessas amostras foram adicionados os padrões internos [$^{15}N_5$]8-oxodGuo, [$^{15}N_5$]1,N^6-εdAdo e [$^{15}N_5$]1,N^2-εdGuo de forma a serem injetados 1000 fmol de [$^{15}N_5$]8-oxodGuo e 200 fmol de [$^{15}N_5$]1,N^6-εdAdo e [$^{15}N_5$]1,N^2-εdGuo no método 1 do equipamento de HPLC-PDA-ESI-MS/MS-MRM descrito no item 3.2.1 (volume de injeção = 50 µL)**.**

3.9 Extração e hidrólise do RNA de células HepG2 incubadas com THF

O procedimento teve início com a incubação das células HepG2 com solvente THF igualmente como descrito no item anterior (3.7). Foram realizados 2 testes. O primeiro utilizando meio de cultura como veículo pelo período de incubação de 24 h e o segundo utilizando PBS como veículo por período de 2h. Após término do período de incubação foi realizado o processo de extração do RNA como descrito abaixo.

O procedimento de extração de RNA das células foi realizado como indicado no kit RNeasy Midi Kit (50) da QIAGEN® (Valencia, CA). Após crescimento das células, o meio de cultura foi descartado e as células foram ressuspensas em 10 mL de um novo meio de cultura contendo 10% de SFB. A solução com as células foi acondicionada em um tubo de centrifugação de 15 mL, onde as células foram precipitadas a 300 x *g* por 5 minutos. Descartado o sobrenadante, foram adicionados 2 mL de Tampão RLT (*lysis buffer)* e 20 µL de β-Me (1%). Posteriormente, com o auxilio de uma agulha e seringa os grumos formados foram desfeitos. Após homogeinização da solução, foram adicinados 2 mL de uma solução de etanol 70% e transferido todo o conteúdo para coluna RNeasy 15 mL fornecido no Kit e centrifugado por 5 minutos a 5000 x *g*. Em seguida todo o sobrenadante foi descartado e trabalhamos em cima do precipitado que foi conservado na coluna. Foram adicionados 4 mL de Tampão RW1 (*wash buffer*), centrifugado por 5 minutos a 5000 x *g* e descartado o sobrenadante, em seguida foi adicionado 4 mL de Tampão RPE (*wash buffer with ethanol*), centrifugado por 2 minutos a 5000 x *g*, e novamente adicionado 2,5 mL de Tampão RPE (*wash buffer with ethanol*) e centrifugado por 5 minutos a 5000 x *g*. A coluna RNeasy foi transferida para um tubo de coleta estéril, fornecido no Kit, e adicinados 250 µL de água livre de RNase

(*RNase free water)* e centrifugado por 3 minutos a 5000 x *g*. Após repouso de 1 minuto, novamente foram adicionados 150 µL de água livre de RNase (*RNase free water)* e centrifugado por 3 minutos a 5000 x *g*. Em seguida a coluna foi descartada e a concentração foi aferida com leitura de absorbância em 260 nm e sua pureza pela razão das absorbâncias em 260 e 280 nm. As amostras de RNA foram congeladas a – 80 °C.

O processo de hidrólise do DNA foi realizado da seguinte forma: foi adicionada uma alíquota da solução contendo 50 µg de RNA em 5,6 µL de tampão Tris/$MgCl_2$ 200 mM (pH 7,4). Em seguida foi adicionada RNAse 1 (5 unidades) e as amostras incubadas a 37 °C por 1 hora. Em seguida adicionadas 0,002 unidade de fosfodiesterase 1 (PDE1) e 5 unidades de fosfatase alcalina e novamente as amostras incubadas a 37 °C por 1 hora. Adições de $NaBH_3CN$ foram feitas 3 vezes intercaladas por 30 minutos cada. Posteriormente foram adicionados 1,8 µL de uma solução preparada com 250 fmol/µL de cada um dos padrões internos [$^{15}N_5$]dGuo-THF e [$^{15}N_5$]dAdo-THF de forma a serem injetados 200fmol. Finalizamos a hidrólise ajustando a solução para um volume final de 200 µL com água deionizada. Foram separados 10 µL da solução resultante para injeção no HPLC/PDA método 2 e os 190 µL restantes foram utilizados para extração em fase sólida (SPE), seguindo o procedimento descrito adiante. Após secagem, a amostra foi ressuspensa em 83,1 µL de água deionizada e injetado um volume de 50 µL no método 2 do equipamento de HPLC-PDA-ESI-MS/MS-MRM descrito no item 3.2.1**.** Curvas de calibração das bases Guo e Ado foram injetadas com concentrações que variam de 0,5 a 8 nmol e analisados através do sistema HPLC/PDA método 1.

3.10 Extração e hidrólise de DNA de homogenato de fígado incubado com THF

Foi gentilmente fornecido pelo laboratório da Profª Sandra H. P. Farsky (FCF USP) aproximadamente 1 g de fígado de camundongos, que foram homogeneizados em 15 mL de PBS. Foram então coletados 1500 µL da solução de homogenato de fígado e incubados com 16,2 µL de THF, o que equivale à concentração de 130 mM de THF. As incubações foram feitas em triplicata para controle, THF super oxidado e THF recém adquirido. Após 1 hora de incubação, foi realizada a extração do DNA das amostras. Para isso, foram adicionados 15 mL de solução de lise de células (Gentra Puregene® Kit) e 150 µL de proteinase K (20 mg/mL). Após homogeneização e incubação à temperatura ambiente por 1 noite, foram adicionados 40 µL de RNase A (15 mg/mL)

com subsequente incubação por 2 horas em temperatura ambiente. Posteriormente foram adicionados 5 mL de solução de precipitação de proteínas (Gentra Puregene® Kit), a amostra agitada vigorosamente e centrifugada por 10 minutos a 2000 x *g*. Em seguida, o sobrenadante foi vertido sobre 20 mL de isopropanol gelado para precipitação do DNA. Após centrifugação por 10 minutos a 2000 x *g*, o DNA precipitado foi lavado com 10 mL de etanol 70% e mais uma vez centrifugado por 3 minutos a 2000 x *g*. O sobrenadante foi descartado e o precipitado de DNA foi seco ao ar. Em seguida, foram adicionados 200 µL de desferroxamina 0,1 mM e os tubos mantidos sob refrigeração por 1 noite. Após completa solubilização do DNA, a concentração foi aferida com leitura de absorbância em 260 nm e sua pureza pela razão das absorbâncias em 260 e 280 nm. As amostras de DNA foram congeladas a – 20 °C.

O processo de hidrólise do DNA foi realizado da seguinte forma: foi adicionada uma alíquota da solução contendo 300 µg de DNA em 5,6 µL de tampão Tris/$MgCl_2$ 200 mM (pH 7,4). Em seguida foi adicionada DNAse 1 (30 unidades) e as amostras incubadas a 37 °C por 1 hora. Foram então adicionadas 0,012 unidade de fosfodiesterase 1 (PDE1) e 30 unidades de fosfatase alcalina e as amostras foram novamente incubadas a 37 °C por 1 hora. Em seguida foram realizadas 3 adições de $NaBH_3CN$ intercaladas de 30 minutos. Posteriormente foram adicionados 1,4 µL de uma solução preparada com 250 fmol/µL de cada um dos padrões internos [$^{15}N_5$]1,N^6-εdAdo e [$^{15}N_5$]1,N^2-εdGuo e 1,4 µL de outra solução preparada com 250 fmol/µL de cada um dos padrões internos [$^{15}N_5$]dGuo-THF e [$^{15}N_5$]dAdo-THF. Finalizamos a hidrólise ajustando a solução para um volume final de 150 µL com água deionizada. Foram separados 10 µL da solução resultante para injeção no HPLC/PDA método 2 e os 140 µL restantes foram utilizados para extração em fase sólida (SPE), seguindo o procedimento descrito adiante. Após secagem, a amostra foi ressuspensa em 78,8 µL de água deionizada e injetado um volume de 50 µL no método 2 do equipamento de HPLC-PDA-ESI-MS/MS-MRM descrito no item 3.2.1.

3.11 Extração em fase sólida (SPE)

A pré-purificação das amostras foi realizada através de extração em fase sólida (SPE) com cartucho de SPE-C18 (30 mg/mL, 33 µm, 1 mL, Strata-X, Phenomenex, Torrance, CA). Os cartuchos foram inicialmente condicionados com 1 mL de metanol e 1 mL de água. Em seguida as amostras foram aplicadas e os cartuchos lavados com 1

mL de água, 1 mL de metanol 10% em água e 1 mL de metanol 15% em água. A eluição dos adutos foi então realizada com 1 mL de metanol. Essa fração foi coletada, liofilizada e ressuspensa nos volumes correspondente a cada experimento e injetados no método 2 de HPLC-DAD-ESI-MS/MS-MRM.

3.12 Determinação da concentração de peróxidos em diferentes amostras de THF para utilização nas incubações in vitro

A concentração de peróxidos no THF foi determinada pelo ensaio do Fe^{2+}/alaranjado de xilenol (JIANG *et al.*, 1991). Este método se baseia na rápida oxidação de Fe^{2+}, mediada por hidroperóxidos, sob condições ácidas ($Fe^{2+} + ROOH \rightarrow Fe^{3+} + RO^{\bullet} + OH^{-}$). Fe^{3+} forma um cromóforo com o alaranjado de xilenol que absorve fortemente em 560 nm.

Para os ensaios, foi preparada uma solução aquosa contendo 250 µM de Fe^{2+}, 25 mM de H_2SO_4, 100 µM de alaranjado de xilenol e 4 mM de BHT (a solução original de Fe^{2+} foi preparada em H_2SO_4 para evitar a sua autoxidação, e a solução mãe de BHT foi preparada em metanol). Após preparo da solução, realizamos uma diluição de 10x das amostras de THF utilizando a própria solução como diluente e aferimos a absorbância em 560 nm ($\varepsilon = 4{,}3 \times 10^4\ M^{-1}\ cm^{-1}$). A Tabela 3 apresenta os resultados obtidos.

Tabela 3: Concentração de peróxidos em diversas amostras do solvente THF.

Amostras	nm	Diluição	Absorbância	ε	[peróxidos]	Resultado
THF 1	560	10 x	0,076	43000	1,76744E-06	17,6 µM
THF 2	**560**	**10 x**	**0,384**	**43000**	**8,93023E-06**	**89,3 µM**
THF 3	560	10 x	0,077	43000	1,7907E-06	17,9 µM
THF 4	560	10 x	0,058	43000	1,34884E-06	13,4 µM
THF 5	560	10 x	0,058	43000	1,34884E-06	13,4 µM
THF 6	560	10 x	0,108	43000	2,51163E-06	25,1 µM
THF 7	560	10 x	0,066	43000	1,53488E-06	15,3 µM
THF 8	560	10 x	0,077	43000	1,7907E-06	17,9 µM
THF 9	560	10 x	0,293	43000	6,81395E-06	68,1 µM

3.13 Incubações de ribonucleosídeos com THF oxidado

A incubação de ribonucleosídeos com THF oxidado foi realizado conforme descrito em HERMIDA et al. (2006), apenas substituindo os desoxirribonucleosídeos pelos ribonucleosídeos.

As incubações foram inicialmente realizadas em três diferentes tampões para verificação do rendimento das reações: tampão acetato de sódio (50 mM, pH 4), fosfato de potássio (50 mM, pH 7,4) e carbonato de sódio (50 mM, pH 11). Os ribonucleosídeos Guo e Ado (1 mg) foram solubilizados isoladamente em cada tampão (600 µL) e, em seguida, foram adicionados 360 µL de THF, com incubação por 1 noite a 37 °C. Foram adicionados então 700 µL de clorofórmio para extração do THF. Após centrifugação (1000 rpm, 5 min), a fase aquosa foi transferida para outro tubo e congelada. Alíquotas dessas amostras foram posteriormente injetadas no sistema HPLC/PDA método 1 (item 3.2.1) para análise dos produtos resultantes das incubações, onde o tampão fosfato de potássio (50 mM, pH 7,4) apresentou melhor rendimento.

3.13.1 Redução com $NaBH_3CN$

Os adutos de THF só são estáveis após redução da ligação -N=C- entre a base e o anel adicionado (Figura 10 e 11). Sabendo-se disso, as soluções das incubações acima que apresentaram rendimento significativo de adutos foram reduzidas com $NaBH_3CN$ para estabilização das estruturas. Para cada 250 µL de solução obtida após incubação com THF, como descrito acima, foram adicionados 50 µL de $NaBH_3CN$ (250 mg/mL) e as amostras incubadas à temperatura ambiente por 1 noite. Após incubação, as amostras foram analisadas por HPLC/PDA sistema 1 (item 3.2.1). Os produtos resultantes foram purificados até obtenção de massa suficiente para as análises de ^{1}H RMN e COSY.

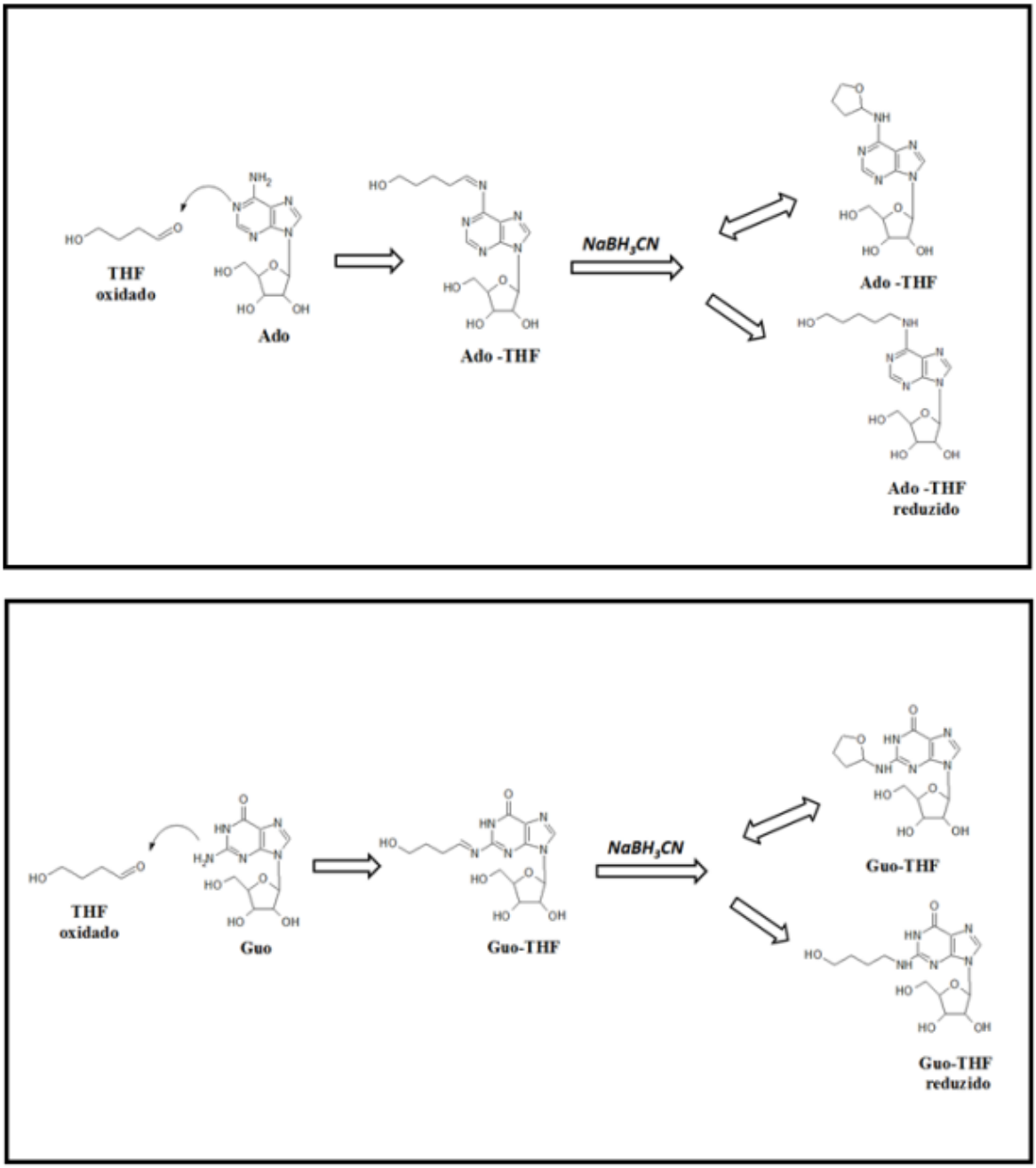
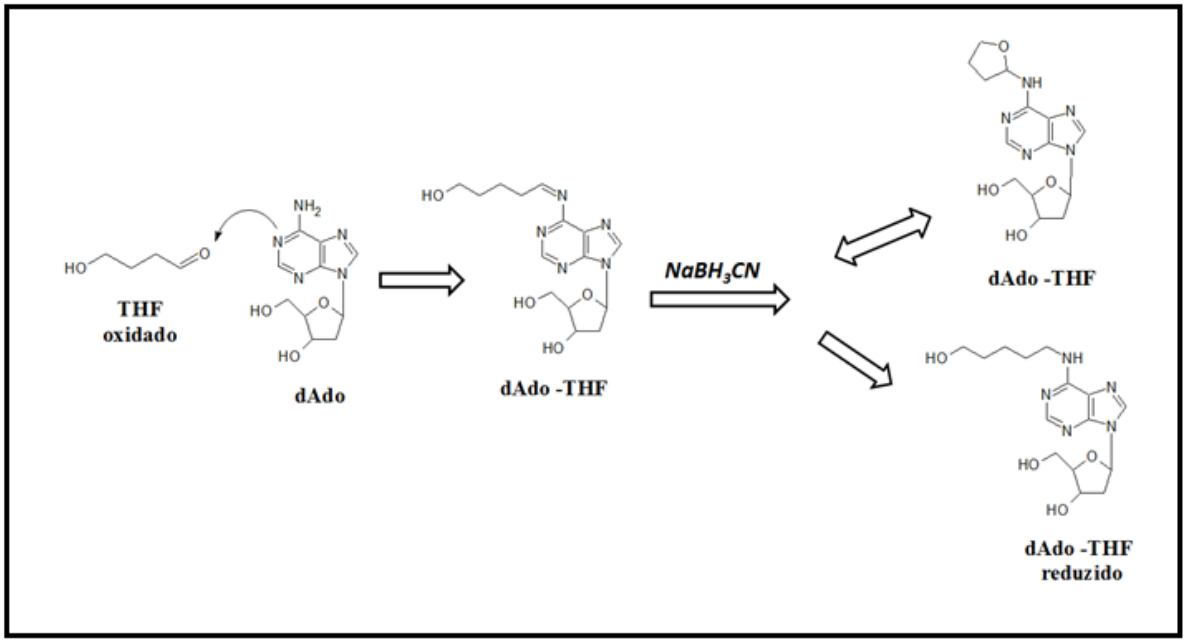


Figura 10: Estruturas dos adutos Guo-THF e Ado-THF antes e após redução com $NaBH_3CN$ (HERMIDA *et al.*, 2006).



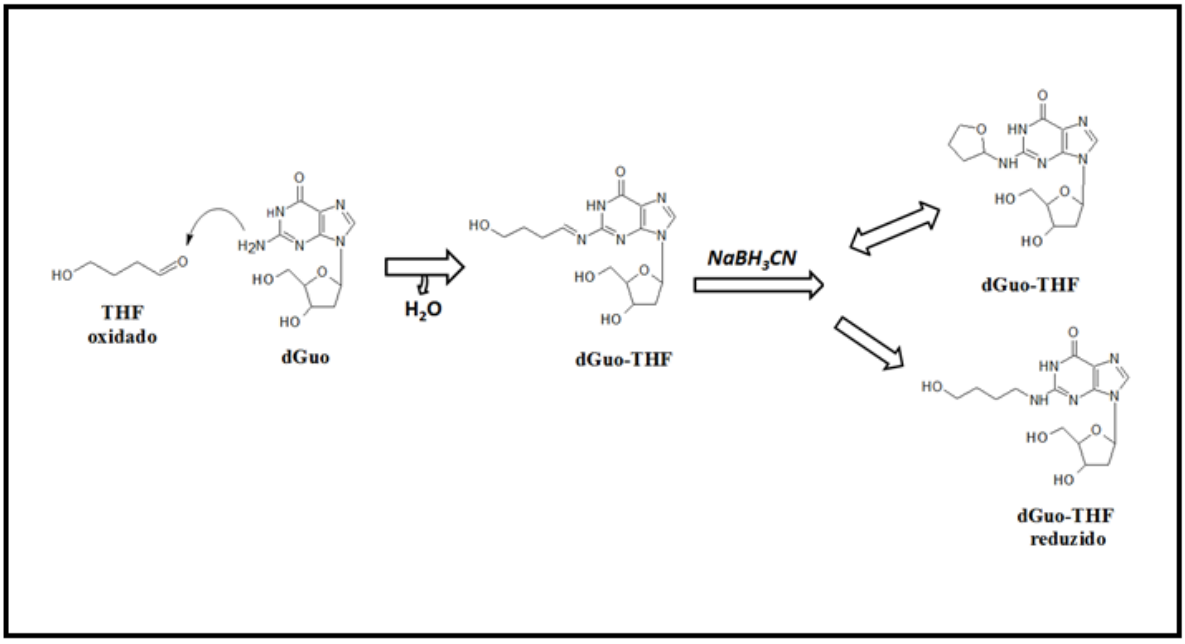


Figura 11: Estruturas dos adutos dGuo-THF, dAdo-THF antes e após redução com $NaBH_3CN$ (HERMIDA *et al.*, 2006).

3.14 Quantificação THF (CG/MS)

Para a análise do solvente THF foi necessária ajuda da técnica e farmacêutica Beatriz Aparecida Passos Bismara, responsável pelo Laboratório de Análises Toxicológicas – LAT. Utilizou-se um sistema de cromatografia gasosa (GC) da marca Hewlett Packard HP6890series (Palo Alto, CA, EUA) com detector de ionização de chamas (FID -Flame ionization detector). Foi utilizado o software HP Chemstation GC Systems para análise dos resultados. Foi injetado manualmente 50µL (vapor) do tetraidrofurano através de uma seringa gas tight (headspace) para as análises. A coluna capilar utilizada no estudo foi CP- PoraBOND Q Fused Silica (10m x 0,32mm de diâmetro) da marca Varian (Palo Alto, CA, EUA). As condições do método foram: temperatura inicial do forno 165°C mantendo por 10 minutos. Temperatura do injetor foi de 200°C no modo split. Fluxo foi mantido constante (1,0ml/min) e a temperatura do detector foi de 250°C. A condição em que a estufa foi utilizada para aquecimento e conservação das amostras foi de 70ºC.

A quantificação do solvente THF presente no meio de cultura de incubação das células foi realizada em placas de 24 poços contendo 2 mL de meio de cultura contaminado com as determinadas concentrações do solvente THF como demonstrado na tabela 4. Foram analisados períodos de 1, 5, 24 e 48 horas de incubação a fim de verificar por quanto tempo o solvente permaneceria no meio de cultura. Curvas de calibração foram injetadas no intervalo de 1 a 190 mM de THF.

Tabela 4: Procedimento utilizado para incubação de meio de cultura contaminado com diferentes concentrações do solvente THF. Foram distribuídos 2 mL de meio por poço.

Placa de 24 poços - 2ml/pço			
Controle	10 ml de meio de cultura		
10 mM	10 ml de meio de cultura	+	8 µL THF
50 mM	10 ml de meio de cultura	+	40,5 µL THF
100 mM	10 ml de meio de cultura	+	81 µL THF
150 mM	10 ml de meio de cultura	+	121,5 µL THF
200 mM	10 ml de meio de cultura	+	162 µL THF

3.15 Pureza THF (CG/MS)

Para detectar a pureza do THF, utilizou-se um sistema de GC-MS da marca Thermo Electron Corporation (Itália), constituído por um cromatógrafo Focus GC acoplado em um espectrometro Polaris Q utilizando o software X Calibur. Foram injetados manualmente 50 µL do tetraidrofurano através de uma seringa gas tight (headspace) para as análises. A coluna capilar utilizada no estudo foi HP-5MS (30m x 0,250mm diâmetro, 0,10 µm) da Agilent Technologies (EUA). As condições do método foram: temperatura inicial do forno 30°C mantendo por 2 minutos, aumentando 5°C/min até a temperatura de 220°C mantido por 1 minuto. Temperatura do injetor a 200°C no modo split. Fluxo foi mantido constante (0,6ml/min) e a temperatura da linha de transferência a 220°C. Para a fragmentação dos íons foi utilizada a ionização eletrônica e um analisador do tipo ion trap, sendo monitorada a faixa de íons de massa de 35-120. A temperatura da fonte foi de 200°C no modo positivo. Foram analisadas amostras de THF SOP e THF garrafa.

3.16 Comparativo DNA-THF e RNA-THF in vitro

Foram incubados os nucleosídeos dGuo, dAdo, Guo e Ado (1 mg), diluídos em 600 µL de tampão fosfato (pH 7,4), com 360 µL de THF. Após 24 horas de incubação a 37ºC em 90 rpm foi realizada extração com clorofórmio e separada a fase aquosa que foi posteriormente analisada por HPLC/PDA utilizando o método 1.

3.17 Análise de 5-metil-dC

3.17.1 Células HepG2

Foram feitas análises de 5-metil-dC em DNA extraído e hidrolisado de células HepG2 incubadas com THF conforme descrito no item 3.7. Alíquotas de 6 µL das amostras de DNA foram injetadas no sistema HPLC/PDA método 2 (descrito no item 3.2.1).

3.17.2 Fígado e rim de camundongos expostos a vapores de THF

Foram feitas análises de 5-metil-dC em amostras de DNA que foram extraídas de fígado e rim de camundongos fêmeas C57Bl/6J expostos a vapores de THF (vapor de 1 mL/h, 6 h/dia, 5 dias) durante o trabalho de mestrado da Mestre Silvia Araújo da Silva

Hermida no laboratório. Os procedimentos para exposição dos animais e extração do DNA estão descritos em sua dissertação. Naquele momento o DNA foi extraído de fígado e rim de 6 animais expostos e 6 controles e armazenado a – 20 ^{o}C. Dessa forma, foi possível utilizar essas amostras neste momento para quantificação de 5-metil-dC por HPLC/PDA e dos adutos de DNA pelo método de HPLC-ESI-MS/MS validado.

Para a hidrólise enzimática foi adicionada uma alíquota da solução contendo 150 µg de DNA em 5,6 µL de tampão Tris/$MgCl_2$ 200 mM (pH 7,4). Em seguida foi adicionada DNAse 1 (15 unidades) e as amostras incubadas a 37 °C por 1 hora. Foram então adicionadas 0,006 unidade de fosfodiesterase 1 (PDE1) e 15 unidades de fosfatase alcalina e novamente as amostras foram incubadas a 37 °C por 1 hora. Em seguida foram realizadas 3 adições de $NaBH_3CN$ intercaladas de 30 minutos. Posteriormente foram adicionados 1,4 µL de uma solução preparada com 250 fmol/µL de cada um dos padrões internos [$^{15}N_5$]1,N^6-εdAdo e [$^{15}N_5$]1,N^2-εdGuo e 1,4 µL de outra solução preparada com 250 fmol/µL de cada um dos padrões internos [$^{15}N_5$]dGuo-THF e [$^{15}N_5$]dAdo-THF. Finalizamos a hidrólise ajustando a solução para um volume final de 150 µL com água para DNA de fígado e 200 µL para DNA de rim. Foram separados 10 µL para injeção de 6 µL no HPLC/PDA equipamento 2 e o volume restante foi submetido à extração em fase sólida (SPE) seguindo o procedimento descrito no item 3.9. Após secagem, a amostra foi ressuspensa em 78,8 µL de água deionizada e injetado um volume de 50 µL no método 2 do equipamento de HPLC-PDA-ESI-MS/MS-MRM descrito no item 3.2.1.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Avaliação da citotoxicidade do THF em células HepG2

Inicialmente, células HepG2 foram incubadas com diferentes concentrações de THF (10, 50, 100, 150 e 200 mM) por períodos de 5, 24, 48 e 72 horas para uma triagem inicial de citotoxicidade através dos ensaios do corante cristal violeta e XTT. Foi realizado um teste com 1 x 10^4 células/poço que foram expostas por 5, 24, 48 e 72 horas ao solvente. Devido à volatilidade do THF (Figura 12), o meio de cultura foi renovado 2 vezes ao dia após as primeiras 5 horas de incubação, para garantir o contato das células com as concentrações indicadas do solvente.

Como observado na Figura 12, após a primeria hora de incubação do THF em meio de cultura há perda de aproximadamente 10% da concentração do solvente, e após 5 horas essa perda chega a 50%. Após 24 e 48 horas observa-se total perda do solvente. Esse resultado ressalta a importância da troca do meio de cultura nos experimentos com longos períodos de incubação com o THF, sendo que a troca e re-incubação favorecem um maior contato do solvente com as células HepG2 (Figura 12).

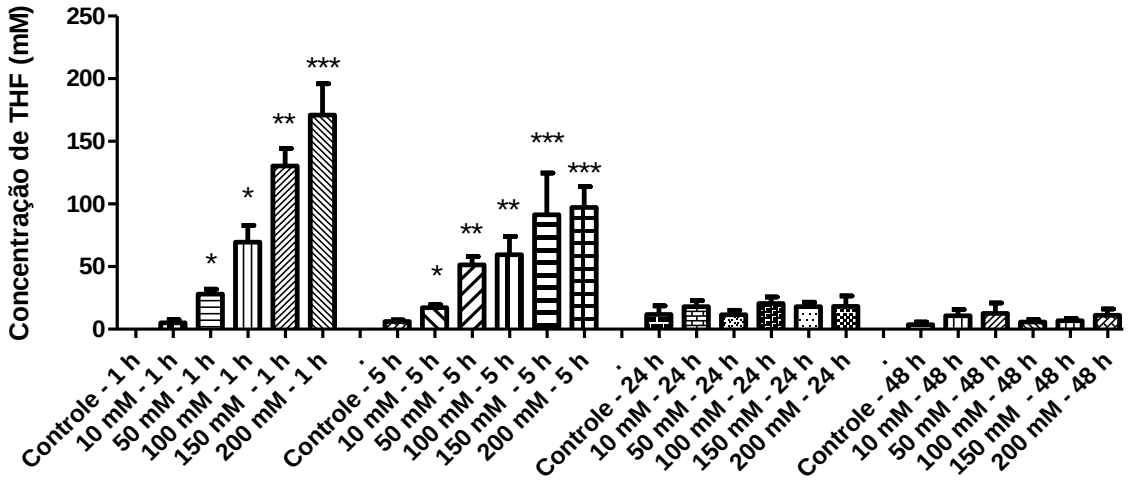


Figura 12: Concentração de THF remanescente no meio de cultura após diferentes períodos de incubação a 37 ^{o}C. A quantificação do solvente foi realizada por *Headspace*-GC-MS. Os valores foram considerados significativos em relação ao

controle de cada tempo pela análise One-way ANOVA: refere-se *** a p<0,0001, ** a p<0,01 e * a p<0,05 .

Observou-se, através do ensaio CVD, morte significativa das células no período de 5 a 72 h de incubação com as concentrações de 100, 150 e 200 mM de THF. Nas incubações com 200 mM do solvente, foi observada morte celular a partir de 24 h (Figura 13). Como resultado do ensaio XTT, pode-se observar que no período de 72 h a partir da concentração de 100 mM já é possível observar alteração da atividade enzimática mitocondrial das células (Figura 14).

Verifica-se, dessa forma, que altas concentrações de THF são necessárias para induzir morte celular. Anteriormente foi relatado que o THF inibe uma série de reações enzimáticas em concentrações entre 10 e 100 mM (MOODY, 1999).

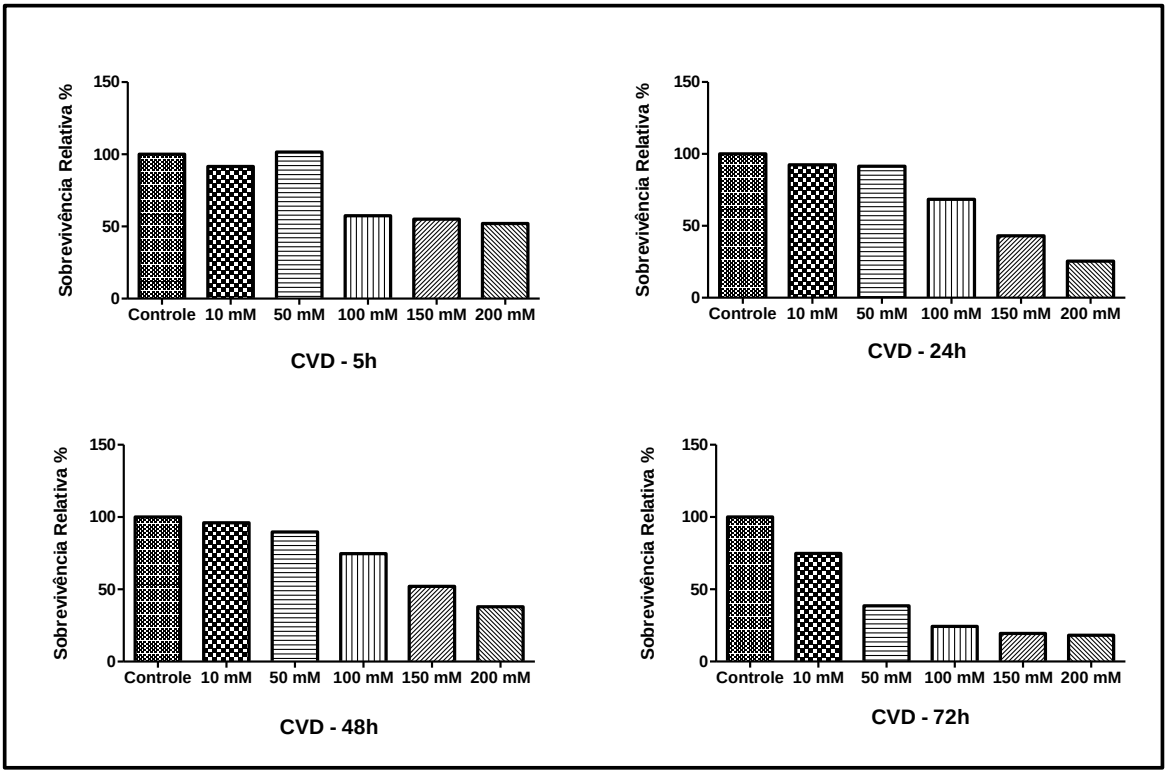


Figura 13: Citotoxicidade do THF avaliada pelo ensaio do CVD. Células HepG2 (1 x 10^4 células/poço, N = 5) foram incubadas com diferentes concentrações de THF por 5, 24, 48 e 72 horas, sendo realizada a troca do meio contendo THF 2 vezes ao dia após a incubação de 5 h. Os valores foram considerados significativos em relação ao controle de cada tempo pela análise One-way ANOVA: refere-se *** a p<0,0001, ** a p<0,01 e * a p<0,05.

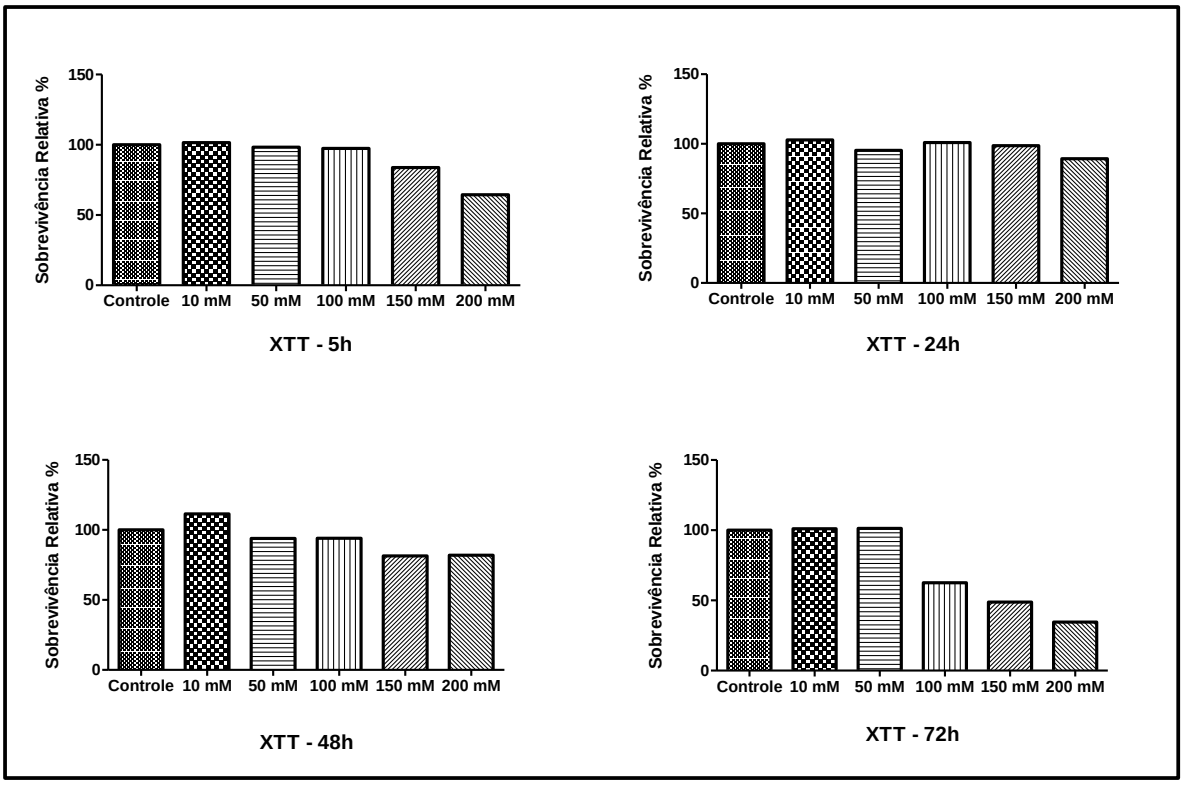


Figura 14: Citotoxicidade do THF avaliada pelo ensaio do XTT. Células HepG2 (1 x 10^4 células/poço, N = 5) foram incubadas com diferentes concentrações de THF por 5, 24, 48 e 72 horas, sendo realizada a troca do meio contendo THF 2 vezes ao dia após a incubação de 5 h. CTLE = controle. Os valores foram considerados significativos em relação ao controle de cada tempo pela análise One-way ANOVA: refere-se *** a p<0,0001, ** a p<0,01 e * a p<0,05.

A partir dos dados de citotoxicidade, selecionou-se as concentrações de 10, 50 e 100 mM de THF para incubação das células por 24 h ou 48 h e extração do DNA para análise de lesões (1,N^2-εdGuo, 1,N^6-εdAdo, 8-oxodGuo, dGuo-THF e dAdo-THF) e do padrão de metilação global (5-metil-dCyd). Foram realizadas também incubações das células com THF e THF oxidado em solução salina (PBS) por 2 h. Para quantificação das lesões em DNA, métodos de HPLC-ESI-MS/MS foram validados como apresentado abaixo.

4.2 Validação de métodos para quantificação de 1,N^2-εdGuo, 1,N^6-εdAdo, 8-oxodGuo, dGuo-THF e dAdo-THF em DNA

Em trabalho anterior realizado por HERMIDA *et al.* (2006) no laboratório foi verificado que THF oxidado reage com desoxirribonucleosídeos (dGuo, dAdo e dCyd) *in vitro*, formando adutos de DNA (dGuo-THF, dAdo-THF e dCyd-THF). É também conhecido que aldeídos resultantes da peroxidação lipídica podem ser convertidos para derivados epoxidados tanto enzimaticamente como via reação com hidroperóxidos de ácidos graxos endógenos ou H_2O_2. A reação desses produtos com bases do DNA leva à formação de etenoadutos, como 1,N^6-εdAdo e 1,N^2-εdGuo, que levam à incorporação errônea de bases após a replicação ou transcrição (MARTINEZ *et al.*, 2003). Nesta etapa do trabalho foi feita a quantificação dessas lesões em DNA de sistemas biológicos incubados com THF para que pudéssemos avaliar tanto a capacidade de reação de THF oxidado com DNA nesses sistemas, quanto a indução de dano oxidativo pelo solvente.

Para a validação de métodos de HPLC-ESI-MS/MS para quantificação dessas lesões em DNA foi necessário que tivéssemos primeiramente todos os padrões com concentrações conhecidas, incluindo os padrões internos. Como descrito no item Materiais e Métodos, os padrões 8-oxodGuo e 1,N^6-εdAdo foram obtidos comercialmente. O padrão [$^{15}N_5$]1,N^2-εdGuo foi gentilmente doado pela Profª Dra. Marisa Helena Gennari de Medeiros (IQ USP). Os padrões [$^{15}N_5$]8-oxodGuo e [$^{15}N_5$]1,N^6-εdAdo foram sintetizados e purificados pelo aluno de doutorado do laboratório Tiago Franco de Oliveira. O padrão 1,N^2-εdGuo é proveniente de um estoque disponível no laboratório, sintetizado e purificado anteriormente pela Profa. Ana Paula M. Loureiro. Os padrões dGuo-THF, dAdo-THF, [$^{15}N_5$]dGuo-THF e [$^{15}N_5$]dAdo-THF foram obtidos anteriormente no laboratório pela estudante de Iniciação Científica Mariana Silveira Pedrosa (FCF USP), por reação de dGuo, dAdo, [$^{15}N_5$]dGuo e [$^{15}N_5$]dAdo com THF oxidado, como descrito em HERMIDA et al. (2006) para os desoxinucleosídeos normais. Nas Figuras 15 a 19 são apresentados os cromatogramas nos quais se observam as purezas dos padrões sintetizados.

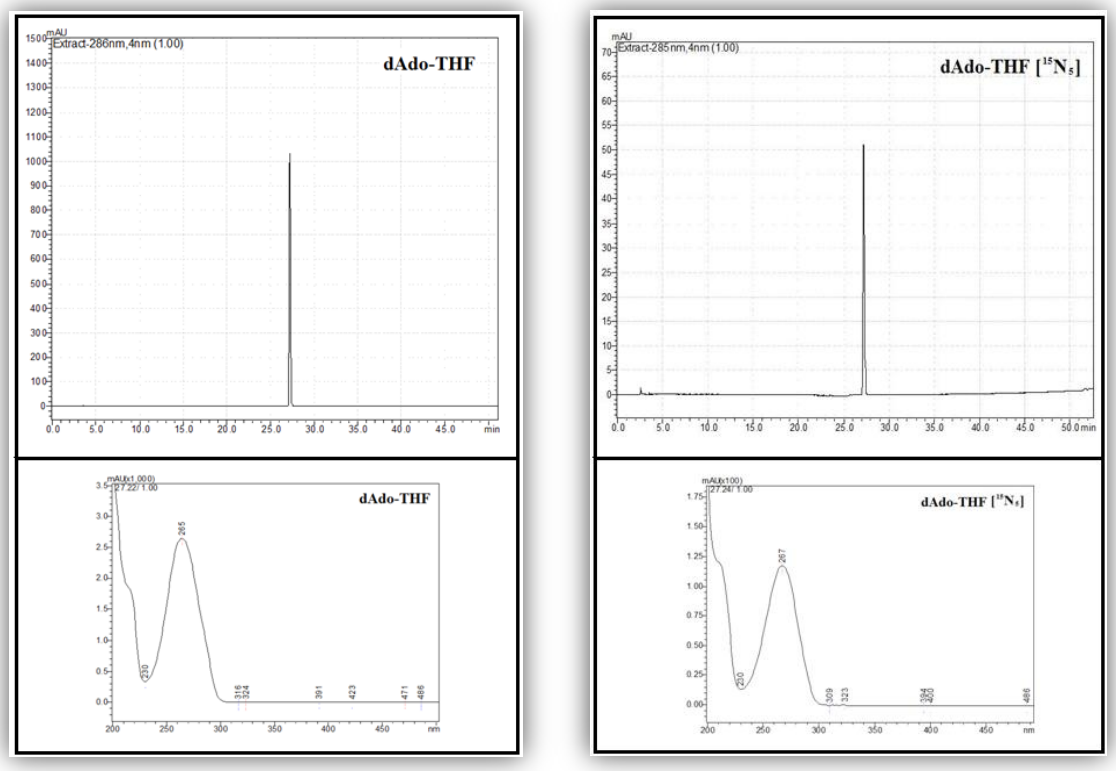


Figura 15: Cromatogramas e espectros de absorbância dos padrões de adutos dAdo-THF e [$^{15}N_5$]-dAdo-THF. Foi utilizado o sistema HPLC/PDA, método 4 (λ = 286 nm).

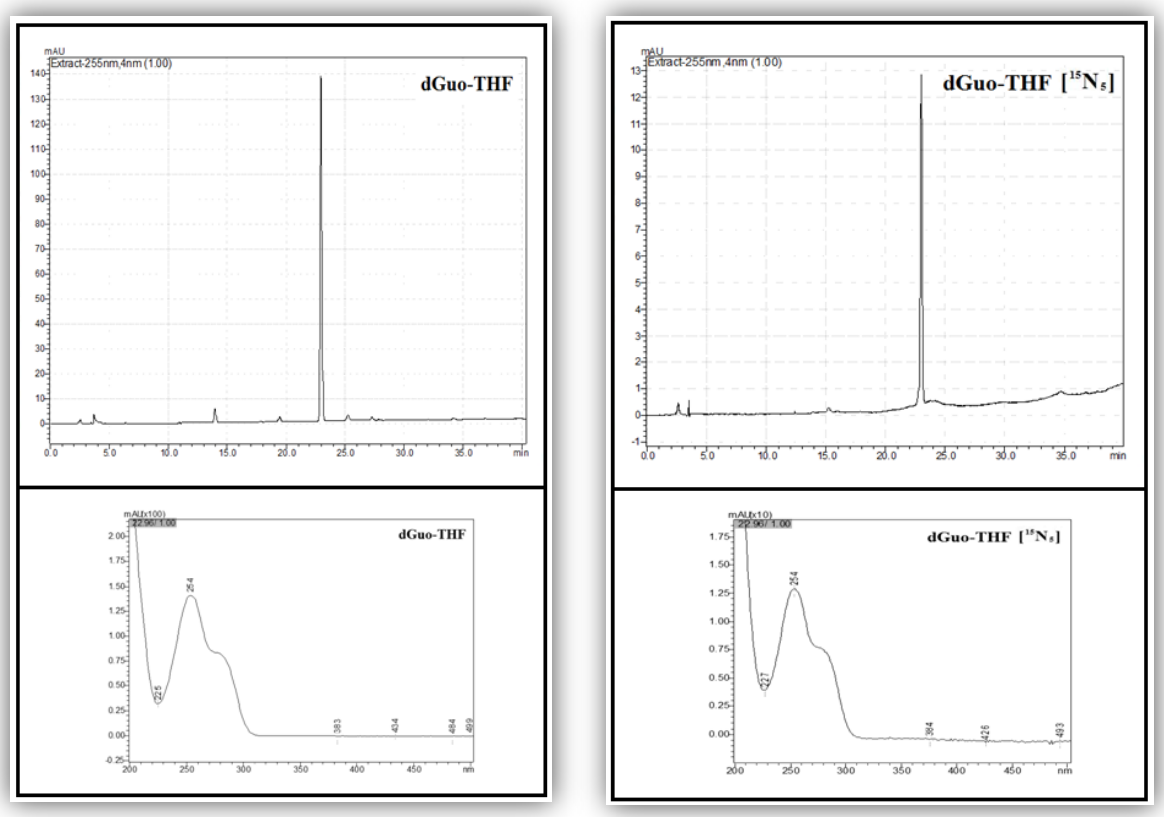


Figura 16: Cromatogramas e espectros de absorbância dos padrões de adutos dGuo-THF e [$^{15}N_5$]-dGuo-THF. Foi utilizado o sistema HPLC/PDA, método 4 (λ = 255 nm).

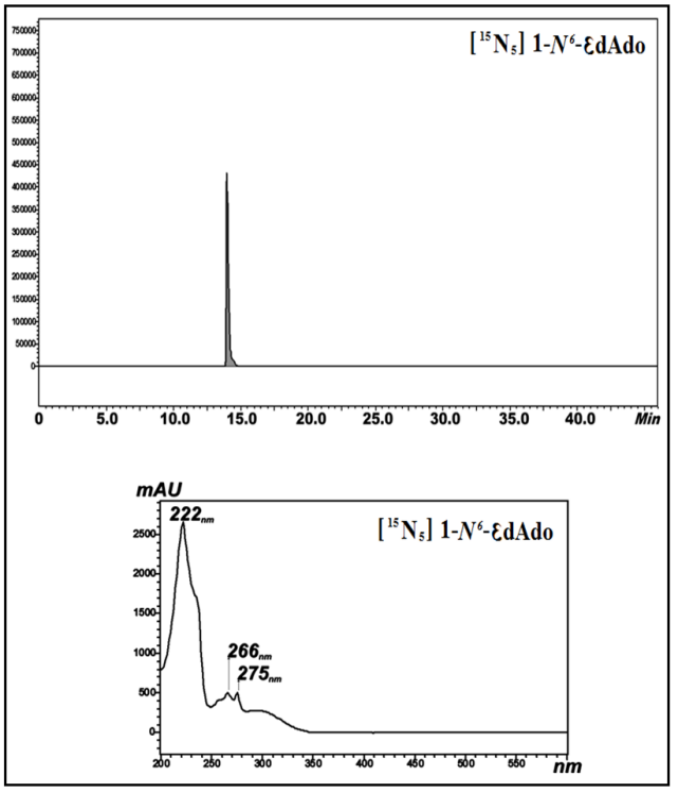


Figura 17: Cromatograma e espectro de absorbância do padrão [$^{15}N_5$]-1,N^6-εdAdo. Foi utilizado o sistema HPLC/PDA, método 3, sistema 3 (λ = 275 nm).

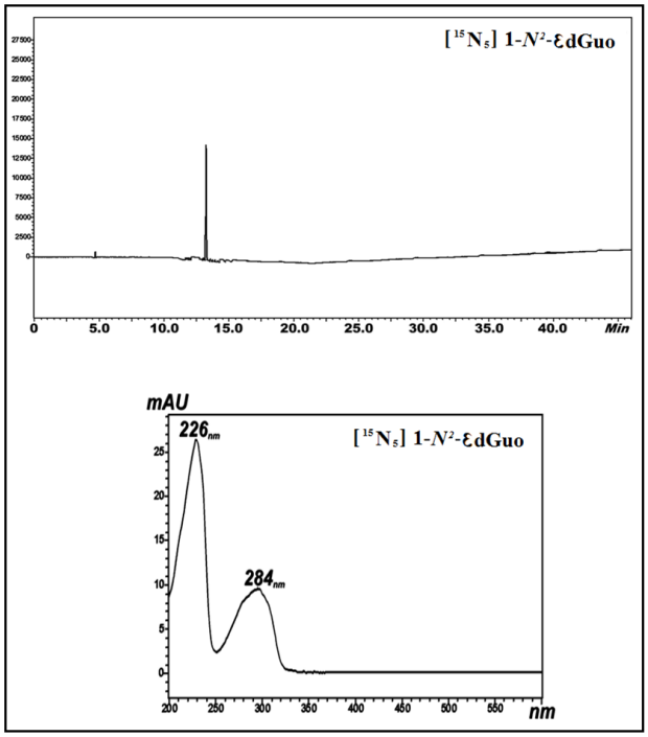


Figura 18: Cromatograma e espectro de absorbância do padrão [$^{15}N_5$]-1,N^2-εdGuo. Foi utilizado o sistema HPLC/PDA, método 3, sistema 3 (λ = 284 nm).

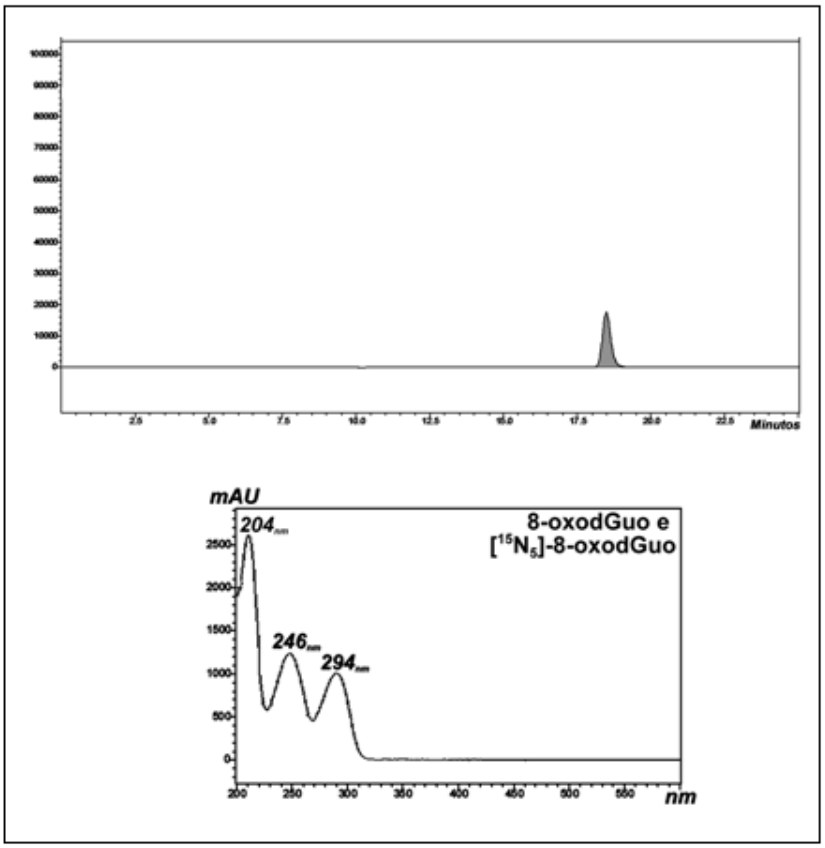


Figura 19: Cromatograma e espectro de absorbância do padrão [$^{15}N_5$]-8-oxodGuo. Foi utilizado o sistema HPLC/PDA, método 3, sistema 2 (λ = 250 nm).

Foram padronizadas duas condições de HPLC-PDA-ESI-MS/MS descritas no item 3.2.1, que nos permitiram sensibilidade para detecção de 0,5 fmol dos adutos dAdo-THF, dGuo-THF, 1,N^6-εdAdo e 1,N^2-εdGuo e 20 fmol de 8-oxodGuo. Na Figura 20 são apresentados os cromatogramas obtidos a partir do método 1, utilizando-se DNA de timo de bezerro (comercial) hidrolisado enzimaticamente e contaminado com as quantidades indicadas dos padrões.

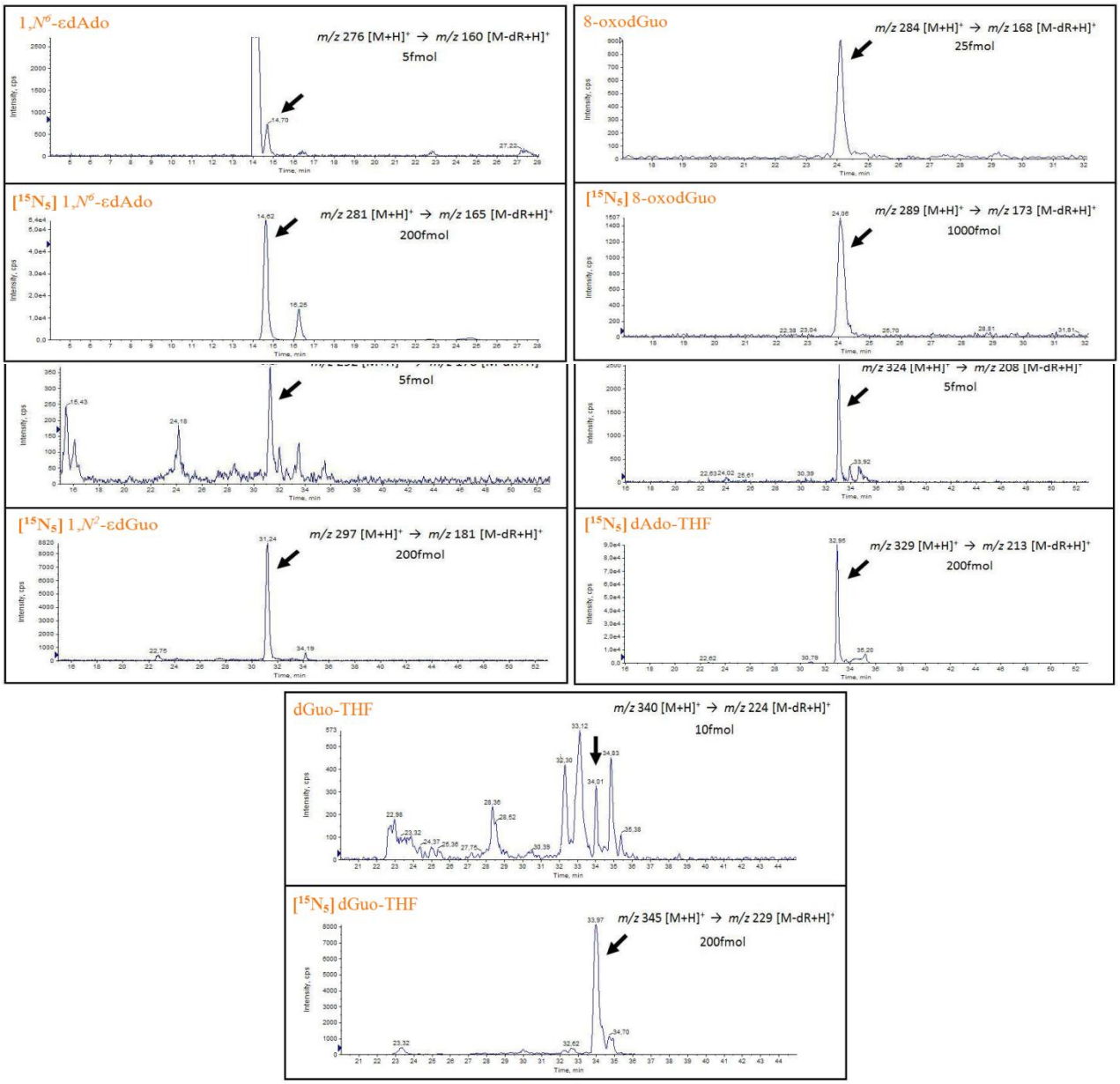


Figura 20: Cromatogramas de DNA de timo de bezerro (comercial) contaminado com as quantidades indicadas dos padrões de adutos. Foi utilizado o método 1 do equipamento de HPLC-PDA-ESI-MS/MS descrito no item 3.2.1.

Considerando a sensibilidade dos métodos e sabendo-se que os níveis dos etenoadutos em amostras de DNA estão na ordem de 5 – 200 lesões a cada 10^8 respectivos desoxinucleosídeos normais, decidiu-se inicialmente utilizar de 80 a 100 µg de DNA para as análises dos adutos. Entretanto, a dimensão da coluna cromatográfica utilizada não permitia a injeção dessas quantidades de DNA no sistema, ocorrendo grande prejuízo das separações. Decidiu-se, portanto, realizar extrações em fase sólida para pré-purificação das amostras de DNA, eliminando interferências dos desoxinucleosídeos normais no método cromatográfico. O método de extração em fase sólida foi padronizado pelo estudante de doutorado do grupo, Tiago Franco de Oliveira, e foi utilizado como descrito no item 3.10. Uma desvantagem dessa pré-purificação é a impossibilidade de quantificar 8-oxodGuo nas amostras que passam por SPE, uma vez que essa lesão é eluída dos cartuchos juntamente com os desoxinucleosídeos normais na condição utilizada. Os dados de validação do método utilizando-se o método 2 de HPLC-PDA-ESI-MS/MS estão apresentados na Tabela 5. Foi utilizado DNA de timo de bezerro contaminado com quantidades conhecidas dos adutos de interesse (10, 20, 40 e 80 fmol). Após realização da hidrólise enzimática e extração em fase sólida, as amostras foram processadas e foram calculadas a precisão, exatidão e recuperação como descrito no item 3.4. O método mostrou-se preciso e exato para todos os adutos. Apesar da baixa recuperação do aduto 1,N^2-εdGuo, a precisão e exatidão para sua quantificação foram adequados. Tivemos problemas para quantificação dos níveis mais baixos de 1,N^6-εdAdo. Isso se deve ao fato de haver a eluição de uma outra molécula um pouco antes da eluição do aduto que, nos cromatogramas do DNA contaminado com 10 e 20 fmol, atrapalhou as integrações. O problema foi resolvido ao utilizarmos o método 1, como apresentado no primeiro cromatograma da Figura 20.

Tabela 5: Precisão, exatidão e recuperação do método utilizando extração em fase sólida para quantificação dos adutos 1,N^6-εdAdo, 1,N^2-εdGuo, dAdo-THF e dGuo-THF em DNA. Foi utilizado o sistema cromatográfico 2 de HPLC-PDA-ESI-MS/MS descrito no item 3.2.1.

		Coeficiente de variação (%) N = 4	**Exatidão (%) N = 4**	**Recuperação (%) N = 4**
1,N^6-εdAdo	40 fmol	15,4	90,0	91,8
	80 fmol	11,7	102,1	
1,N^2-εdGuo	10 fmol	9,7	91,0	
	20 fmol	6,0	98,5	
	40 fmol	5,9	111,2	70,4
	80 fmol	8,4	98,6	
dGuo-THF	10 fmol	4,8	102,0	
	20 fmol	6,7	105,5	
	40 fmol	3,3	101,5	83,3
	80 fmol	3,3	96,4	
dAdo-THF	10 fmol	5,4	101,0	
	20 fmol	5,5	103,0	
	40 fmol	2,9	96,8	83,1
	80 fmol	1,1	98,3	

Para as análises de 8-oxodGuo, podemos utilizar menores quantidades de DNA (30 µg), uma vez que os níveis basais encontrados estão na ordem de 1000 lesões a cada 10^8 dGuo. Dessa forma, calculamos a precisão e exatidão do método para quantificação dessa lesão utilizando-se 30 µg de DNA sem pré-purificação por SPE. Simultaneamente aproveitamos para verificar os mesmos dados de validação para os outros adutos sem utilização de SPE. Os resultados estão apresentados na Tabela 6. Como pode ser observado, perdemos exatidão para quantificação do aduto dGuo-THF ao não utilizarmos SPE. Como pode ser observado na Figura 20, esse aduto elui em uma região na qual uma série de interferentes prejudica sua integração. Esses interferentes não aparecem ao se analisar amostras que passaram por SPE. A precisão do método foi adequada para todas as lesões.

Tabela 6: Precisão e exatidão do método sem extração em fase sólida para quantificação dos adutos 1,N^6-εdAdo, 1,N^2-εdGuo, 8-oxodGuo, dAdo-THF e dGuo-THF em DNA. Foi utilizado o sistema cromatográfico 1 de HPLC-PDA-ESI-MS/MS descrito no item 3.2.1.

		Coeficiente de variação (%) N = 4	**Exatidão (%) N = 4**
1,N^6-εdAdo	4 fmol	4,0	83,5
	8 fmol	10,8	109,3
	20 fmol	13,6	127,9
	40 fmol	4,9	115,8
1,N^2-εdGuo	4 fmol	10,4	88,5
	8 fmol	10,6	93,9
	20 fmol	7,8	103,6
	40 fmol	3,6	94,7
8-oxodGuo	25 fmol	11,3	68,8
	50 fmol	4,0	87,1
	100 fmol	3,6	99,9
	250 fmol	10,9	108,0
dGuo-THF	4 fmol	6,8	100,4
	8 fmol	5,8	63,5
	20 fmol	4,6	41,9
	40 fmol	3,1	35,1
dAdo-THF	4 fmol	4,3	89,8
	8 fmol	4,3	84,2
	20 fmol	3,5	85,7
	40 fmol	8,7	91,5

Na Figura 21 são apresentadas as curvas de calibração das lesões, obtidas por HPLC-ESI-MS/MS-MRM, utilizando-se o método 1 para 8-oxodGuo e 2 para as demais lesões.

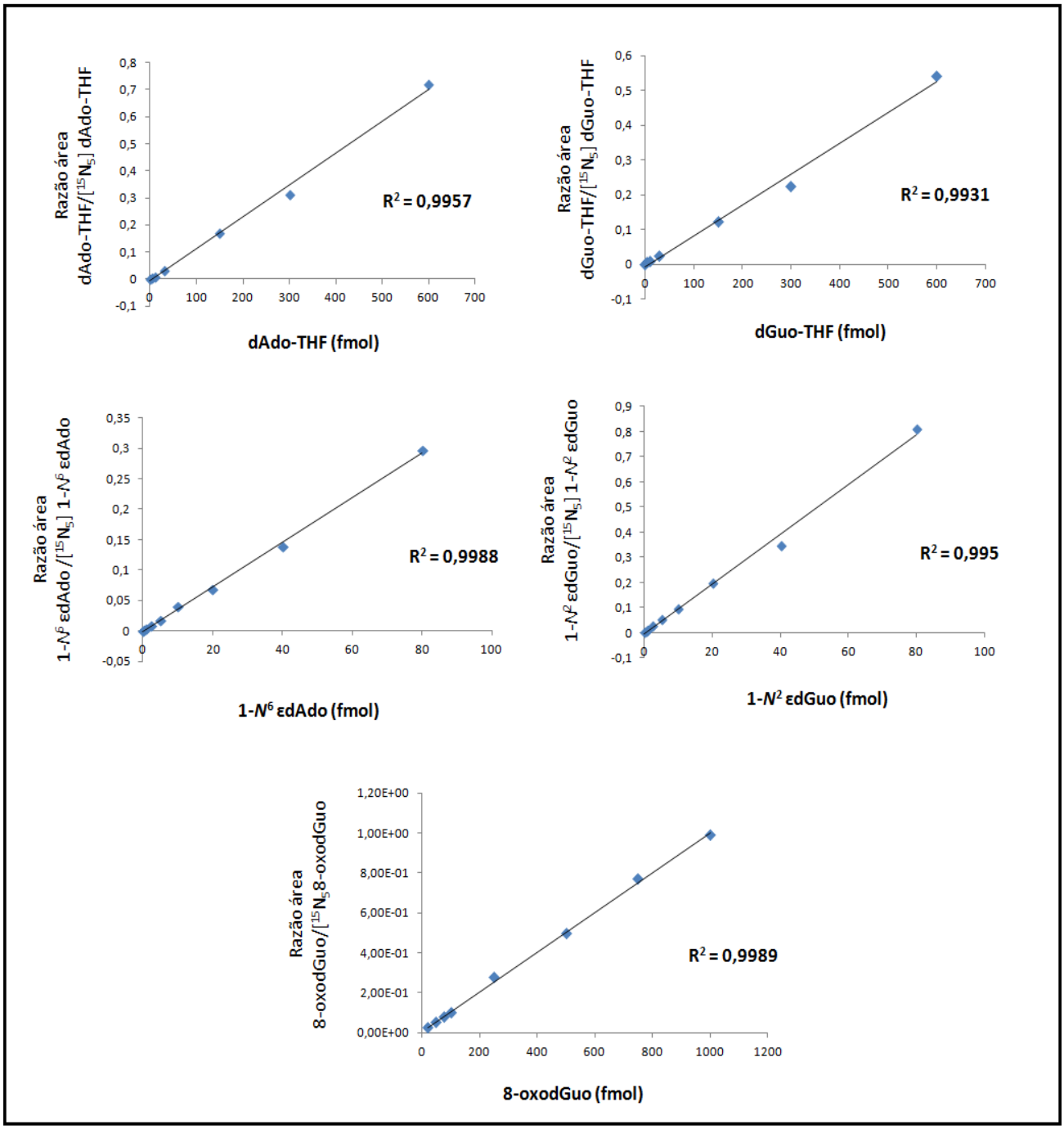


Figura 21: Curvas de calibração de 8-oxodGuo, 1,N^2-εdGuo, 1,N^6-εdAdo, dAdo-THF e dGuo-THF obtidas por HPLC-ESI-MS/MS-MRM como descrito no item 3.2.1.

4.3 Quantificação de lesões em DNA de sistemas biológicos

4.3.1 Análise dos adutos em DNA de células HepG2 e de homogenato de fígado de camundongos

Serão apresentados a seguir os resultados das quantificações dos adutos 1,N^6-εdAdo, 8-oxodGuo, dGuo-THF e dAdo-THF em DNA de células HepG2 incubadas com THF em duas condições diferentes: 1) meio de cultura completo por 24 h (Figura 22); 2) PBS por 2 h (Figura 23). Nas incubações das células em PBS foi utilizado THF não oxidado e THF oxidado contendo THF-OH. Os adutos dGuo-THF e dAdo-THF só foram detectados nas incubações com THF contendo THF-OH.

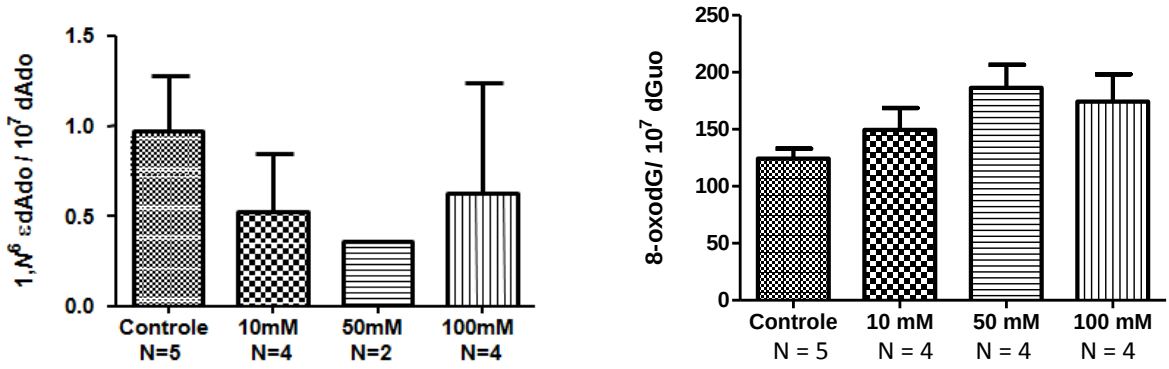


Figura 22: Níveis de 1,N^6-εdAdo e 8-oxodGuo em DNA de células HepG2 incubadas com THF não oxidado nas concentrações indicadas em meio de cultura completo por 24 h.

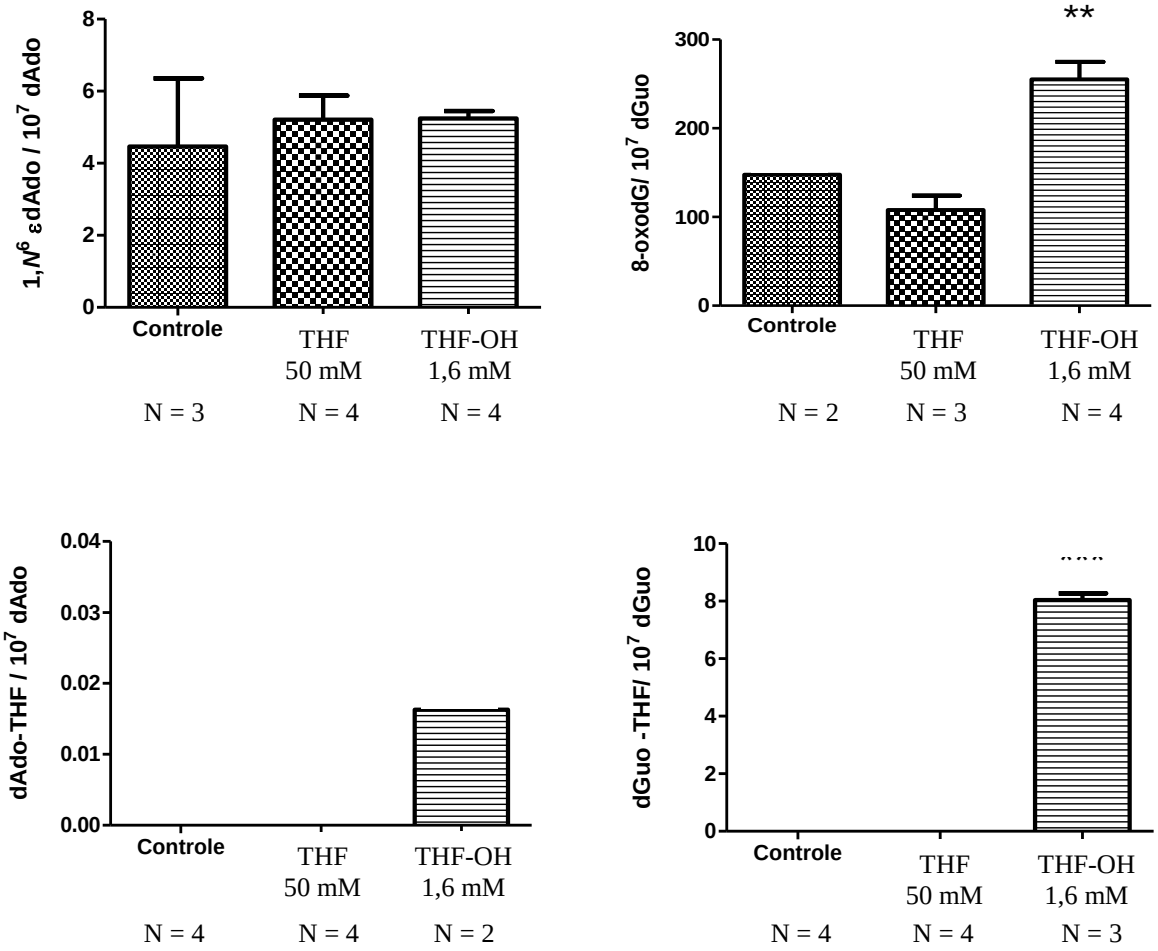


Figura 23: Níveis de 1,N^6-εdAdo, 8-oxodGuo, dAdo-THF e dGuo-THF em DNA de células HepG2 incubadas com THF não oxidado (50 mM) e THF oxidado (50 mM contendo 1,6 mM THF-OH) por 2 h.

Os dados acima mostram que THF não foi biotransformado pelas células HepG2 para o intermediário reativo capaz de chegar ao núcleo e se ligar ao DNA originando os adutos dAdo-THF e dGuo-THF. Entretanto, uma vez que a espécie reativa esteja presente (THF-OH estava presente no solvente oxidado e foi detectado por GC/MS, como apresentado na Figura 23), esta é capaz de chegar ao núcleo das células e reagir com o DNA. Observa-se maior formação do aduto dGuo-THF em relação ao aduto dAdo-THF.

Além da formação dos adutos de THF, o solvente oxidado levou ao aumento do nível de 8-oxodGuo no DNA das células, sugerindo a ocorrência de estresse oxidativo. Apesar de não ter sido significativo, observa-se nas incubações em meio de cultura completo por 24 h uma tendência de aumento dos níveis de 8-oxodGuo com as diferentes concentrações de THF utilizadas.

Para testarmos a possibilidade de THF oxidado reagir com DNA em um sistema com diversos constituintes teciduais, foi feita a incubação de homogenato de fígado de camundongos (1500 µL, 0,1 g, N = 3) com THF oxidado (100 mM) por 1 h a 37 ^{o}C. O DNA foi extraído e analisado quanto à formação dos adutos dAdo-THF e dGuo-THF, tendo sido detectados níveis altíssimos dos mesmos (Figura 24). Os dados mostram também a formação do aduto preferencialmente com dGuo no sistema biológico testado. O nível de dGuo-THF foi cerca de 3600 vezes superior ao nível encontrado de dAdo-THF.

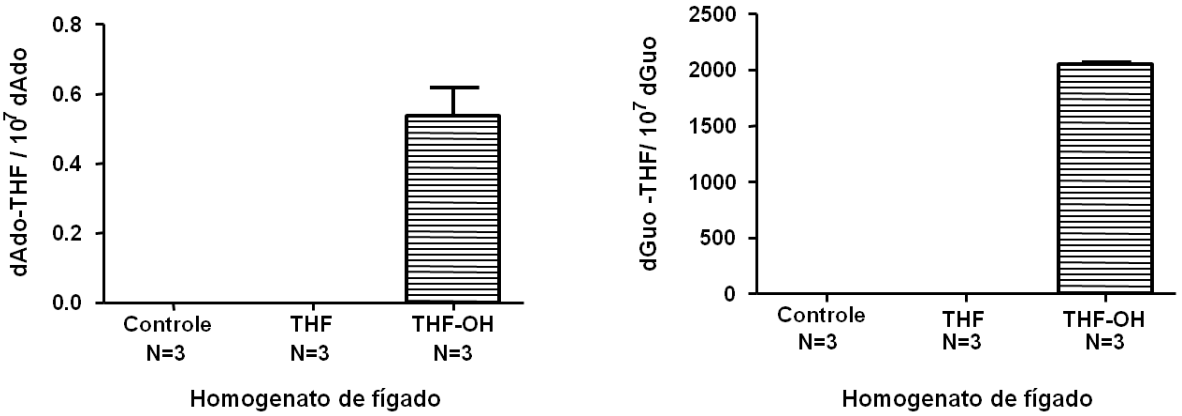


Figura 24: Níveis de dGuo-THF e dAdo-THF em DNA de homogenato de fígado de camundongo (1500 µL, 0,1 g) incubado com THF oxidado (100 mM contendo 3,2 mM de THF-OH) por 1 h a 37 ^{o}C.

O THF não oxidado não levou à formação dos adutos no mesmo sistema. Entretanto, o tempo de incubação foi de apenas 1 h e o homogenato, apesar de preparado na hora, pode não ser adequado para as reações de biotransformação necessárias para formação da espécie reativa.

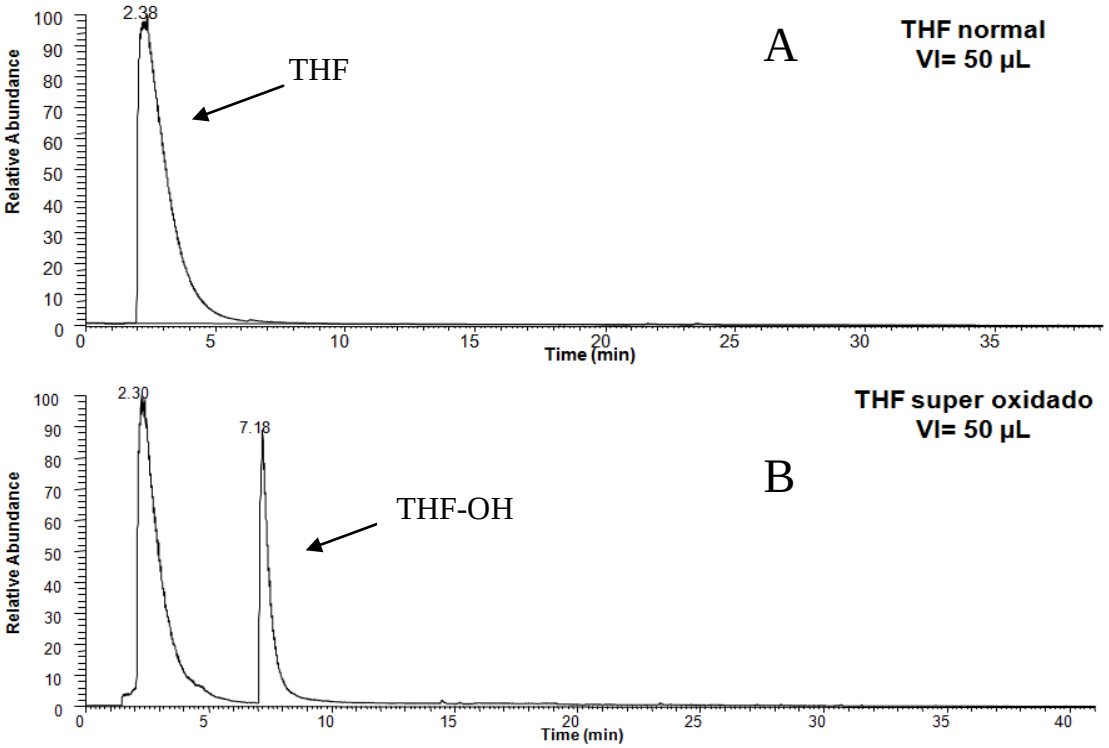


Figura 25: Cromatogramas obtidos por GC-MS mostrando em A o pico correspondente ao solvente puro (THF) e em B a fração oxidada para THF-OH.

4.3.2 Análise dos adutos em DNA de fígado e rim de camundongos expostos a vapores de THF

No trabalho de mestrado da Mestre Silvia Araújo da Silva Hermida no laboratório, camundongos fêmeas C57BL/6J foram expostos por inalação a THF (vapor de 1 mL/h, 6h/dia, 5 dias) e o DNA de fígado e rim extraído e armazenado a -20 ^{o}C. Nesta etapa do trabalho, alíquotas dessas amostras de DNA foram processadas para análise de lesões (1,N^2-εdGuo, 1,N^6-εdAdo, 8-oxodGuo, dGuo-THF e dAdo-THF) da mesma forma que foi feito com o DNA das células. Não foi possível observar em nenhuma amostra de DNA a formação dos adutos dGuo-THF e dAdo-THF. Os níveis de 1,N^2-εdGuo, 1,N^6-εdAdo e 8-oxodGuo após 2 repetições das análises estão apresentados na Figura 26. Os dados mostram aumento de dano oxidativo (εdA, εdG) no

fígado dos camundongos que inalaram THF. Tais alterações genotóxicas podem contribuir para a carcinogênese observada em camundongos expostos a THF por inalação.

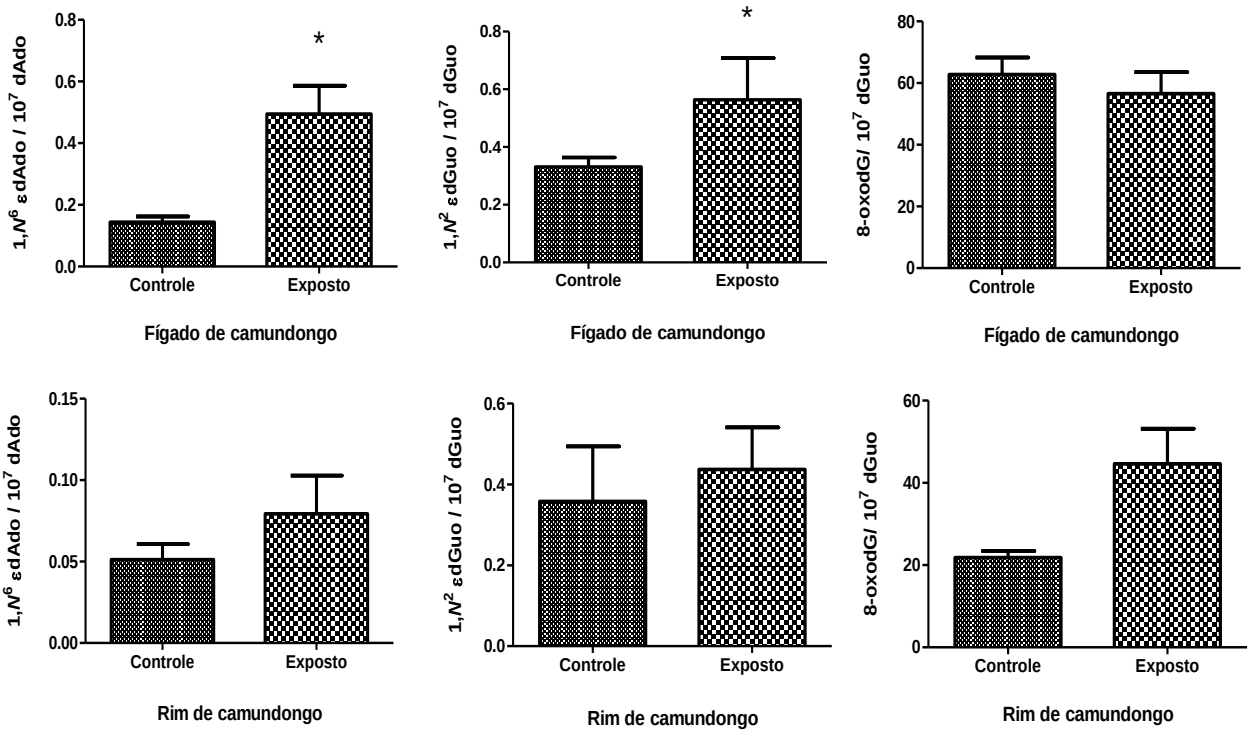


Figura 26: Níveis de 1,N^6-εdAdo, 1,N^2-εdGuo e 8-oxodGuo em DNA de fígado (N = 5) e rim (N = 6) de camundongos fêmeas C57BL/6J expostos a THF por inalação (vapor de 1 mL/h, 6h/dia, 5 dias).

4.4 Quantificação de Guo-THF e Ado-THF em RNA de células HepG2 incubadas com THF

4.4.1 Síntese, purificação e caracterização estrutural de adutos Ado-THF e Guo-THF para servirem de padrões para as quantificações em RNA

Para avaliação dos níveis dos adutos de THF (Guo-THF e Ado-THF) em RNA, inicialmente foram feitas reações *in vitro* de Guo e Ado com THF oxidado para obtenção de padrões puros dos adutos, como explicado no item 3.12. Os produtos da reação foram submetidos à redução com $NaBH_3CN$ para estabilização dos adutos na forma de cadeia aberta, assim como realizado anteriormente para os adutos de DNA (HERMIDA *et al.*, 2006). Cromatogramas dos adutos reduzidos puros estão

apresentados na Figura 27. Os espectros de massas dos adutos purificados revelaram os íons esperados para o aduto Guo-THF reduzido (*m/z* 356 $[M+H]^+$, *m/z* 224 $[M-ribose+H]^+$) e Ado-THF reduzido (*m/z* 340 $[M+H]^+$, *m/z* 208 $[M-ribose+H]^+$). Espectros de ^1H RMN e COSY foram também obtidos para o aduto Ado-THF reduzido, permitindo sua completa caracterização estrutural (Figuras 28 e 29 e Tabela 7), bem como para o aduto Guo-THF (Figura 30 e Tabela 8).

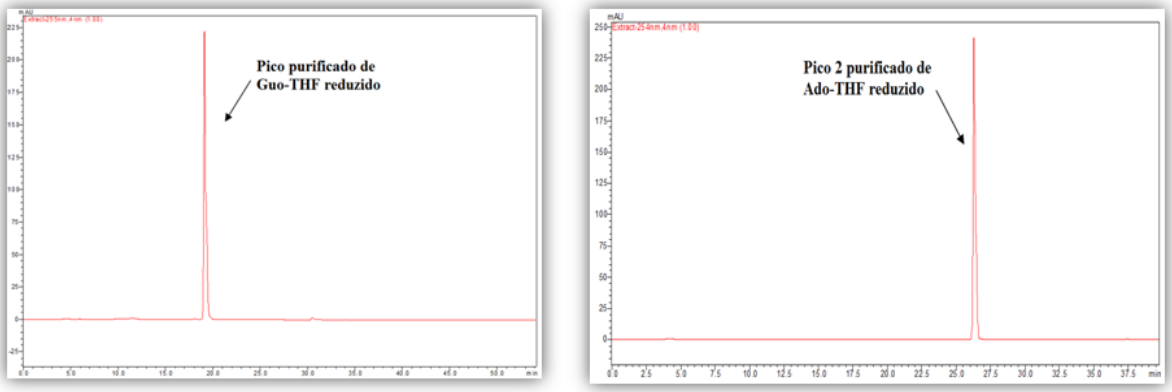


Figura 27: Cromatogramas obtidos por HPLC/PDA (λ = 254 nm) dos adutos puros Guo-THF e Ado-THF reduzidos com $NaBH_3CN$.

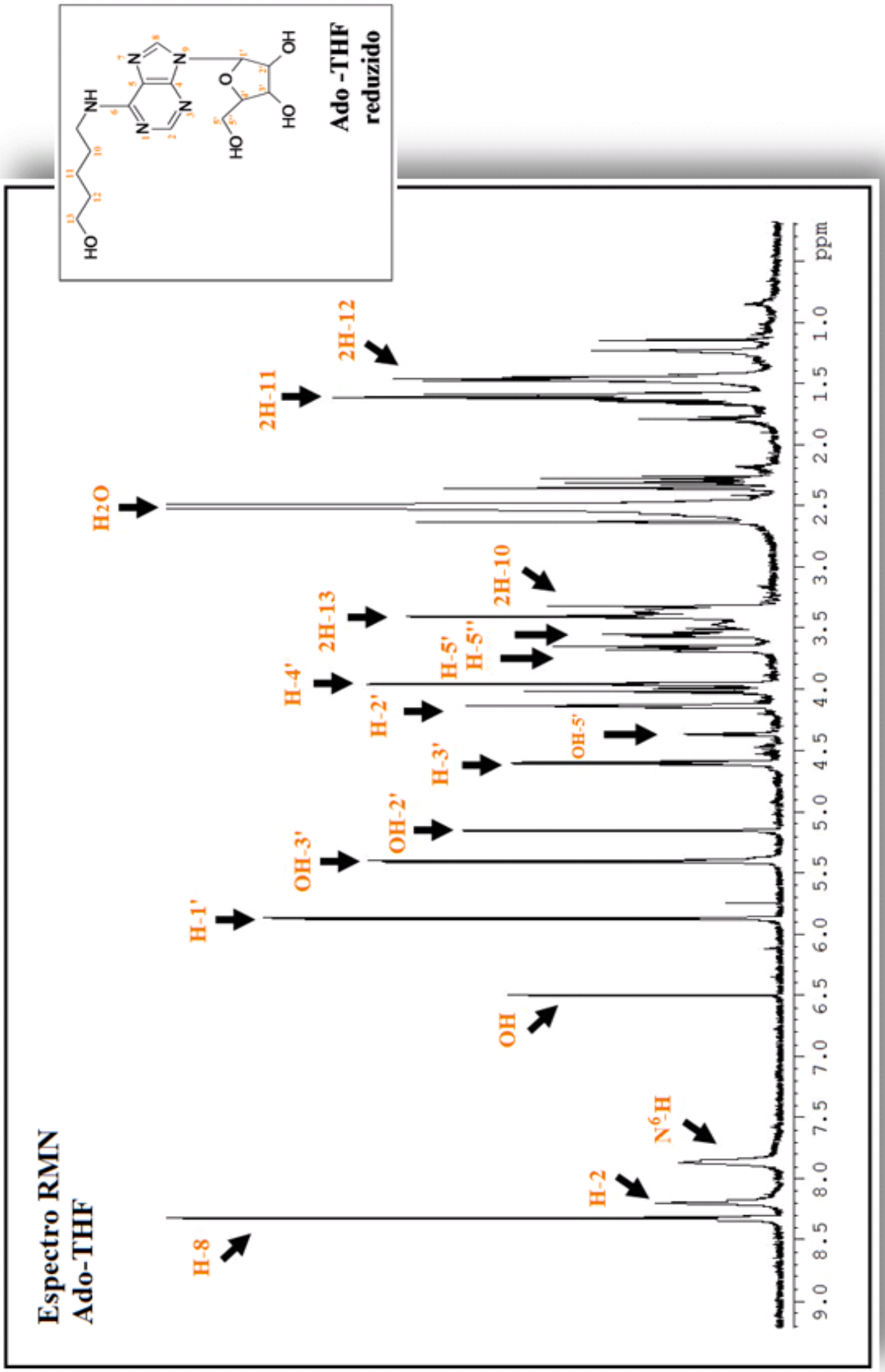


Figura 28: Espectro de ^{1}H RMN do aduto Ado-THF reduzido e respectiva estrutura.

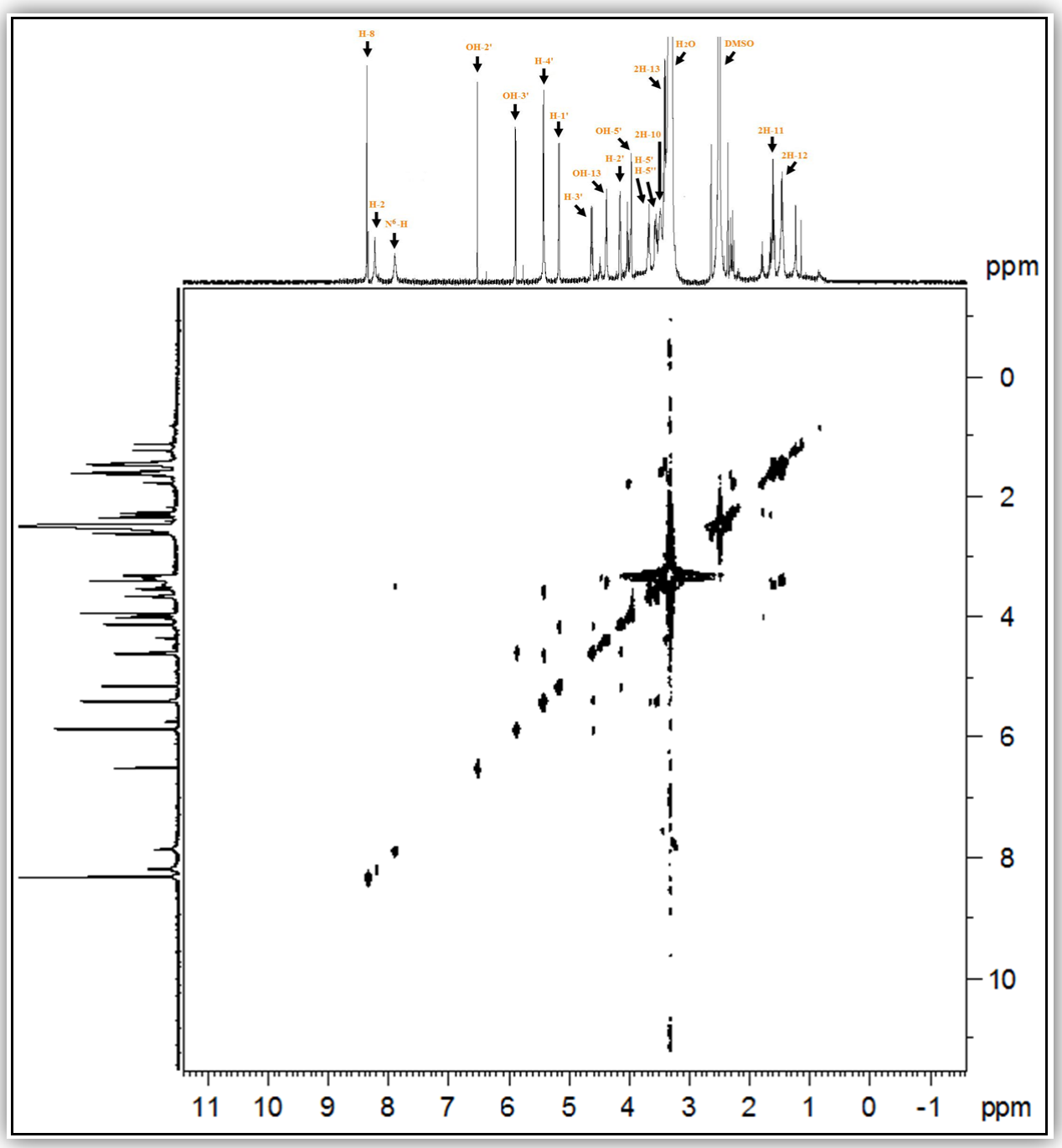


Figura 29: Espectro de ^{1}H-^{1}H RMN (COSY) do aduto Ado-THF reduzido.

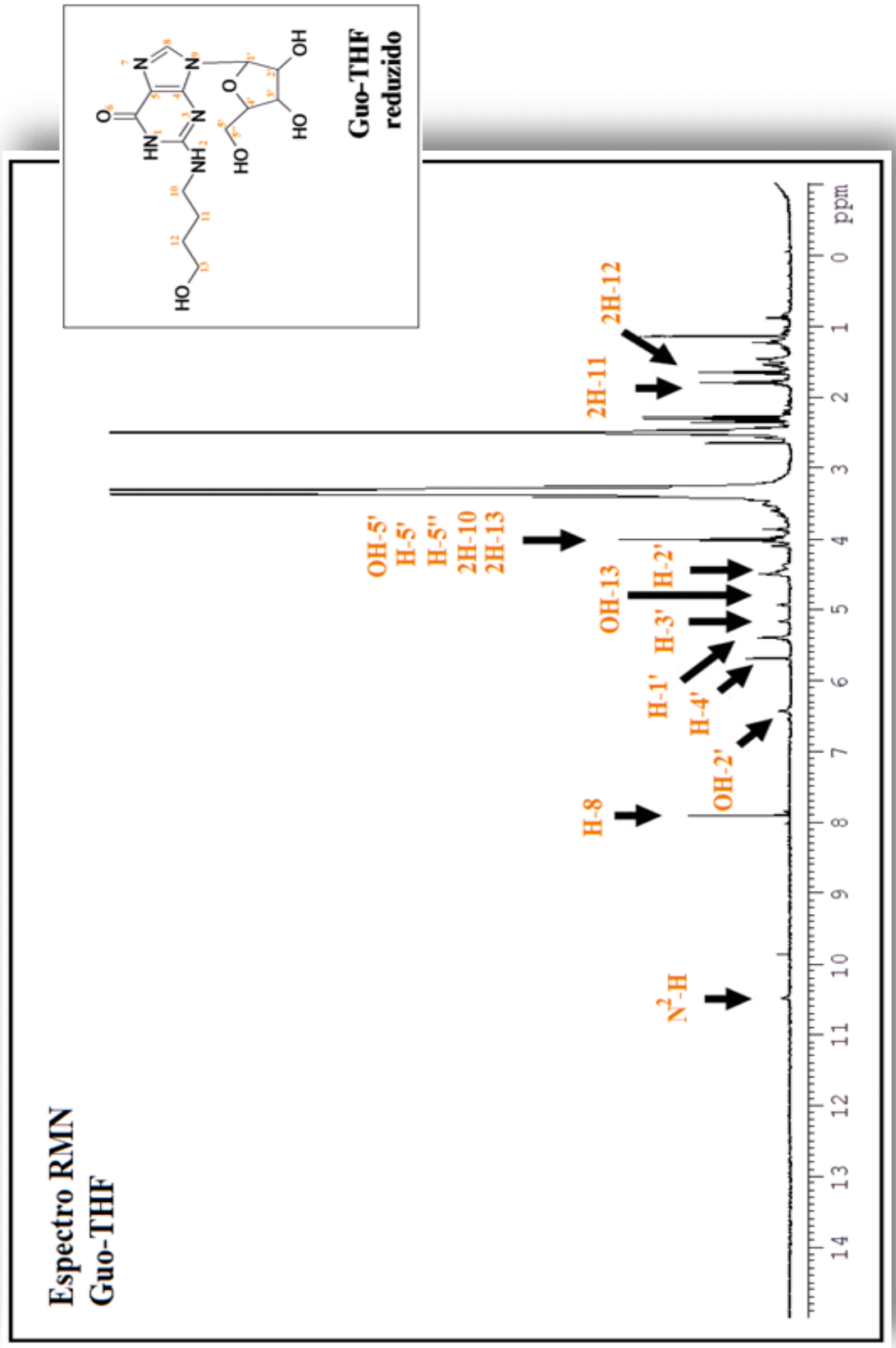


Figura 30: Espectro de ^{1}H RMN do aduto Guo-THF reduzido e respectiva estrutura.

Tabela 7: Deslocamentos químicos no espectro de ^{1}H RMN do aduto Ado-THF reduzido em DMSO-d_6.

Ado-THF reduzido			
	δ ppm		**Tipo**
H-1'	5.15 - 5.14	d	N-C<u>H</u>-O
H-2'	4.12 - 4.15	m	HO-C<u>H</u>
H-3'	4.59 4.62	m	HO-C<u>H</u>
H-4'	5.39 – 5.41	t	O-C<u>H</u>
H-5'	3.64 - 3.68	m	HO-CH_2
H-5''	3.50 - 3.57	m	HO-CH_2
H-8	8.31	s	N=C<u>H</u>-N
H-2	8.19	s	N=C<u>H</u>-N
***N*^{6}-H**	7.8	s (largo)	<u>H</u>N-C=N
2H-10	3.47	s	HN-C<u>H_2</u>-CH_2
2H-11	1.58 - 1.67	m	CH_2- C<u>H_2</u>- CH_2
2H-12	1.43 - 1.48	m	CH_2- C<u>H_2</u>- CH_2
2H-13	3.35 - 3.42	t	HO- C<u>H_2</u>- CH_2
OH-2'	6.5	s	HO-C<u>H</u>
OH-3'	5.88 - 5.86	d	HO-C<u>H</u>
OH-5'	5.95 – 5.98	m	HO-C<u>H_2</u>- CH_2
OH-13	4.35 – 4.37	t	HO-C<u>H_2</u>- CH_2

m, multiplete; t, triplete; d, dublete; s, singlete

Tabela 8: Deslocamentos químicos no espectro de ^{1}H RMN do aduto Guo-THF reduzido em DMSO-d_6.

Guo-THF reduzido			
	δ ppm		**Tipo**
H-1'	5.40	s	N-C<u>H</u>-O
H-2'	4.50 - 4.45	m	HO-C<u>H</u>
H-3'	5.16 – 5.14	s	HO-C<u>H</u>
H-4'	5.70 – 5.68	d	O-C<u>H</u>
H-5'	4.05 – 4.03	m	HO-CH_2
H-5''	3.98 - 3.95	m	HO-CH_2
H-8	7.9	s	N=C<u>H</u>-N
***N*^{2}-H**	10.50	s	N=C<u>H</u>-N
2H-10	4.01	s	HN-C<u>H</u>$_2$-CH_2
2H-11	1.81 – 1.75	m	CH_2- C<u>H</u>$_2$- CH_2
2H-12	1.68 - 1.62	m	CH_2- C<u>H</u>$_2$- CH_2
2H-13	3.99 - 3.97	m	HO- C<u>H</u>$_2$- CH_2
OH-2'	6.4	s	HO-C<u>H</u>
OH-5'	4.10		HO-C<u>H</u>$_2$- CH_2
OH-13	4.93	s	HO-C<u>H</u>$_2$- CH_2

m, multiplete; t, triplete; d, dublete; s, singlete

Com a completa caracterização estrutural dos adutos, foram obtidas soluções estoques de cada um com concentrações calculadas a partir de curvas de calibração construídas em HPLC/UV com os adutos dGuo-THF e dAdo-THF já utilizados como padrões no laboratório. Os estoques dos adutos Guo-THF e Ado-THF foram utilizados para obtenção das curvas de calibração no sistema de HPLC-ESI-MS/MS, sendo que os padrões internos utilizados foram [$^{15}N_5$]dGuo-THF e [$^{15}N_5$]dAdo-THF. Com pequenas adaptações no método de HPLC-ESI-MS/MS já utilizado para quantificação dos adutos de DNA, foi possível quantificar os adutos de RNA. As curvas de calibração apresentaram-se lineares no intervalo de 0 a 80 fmol de cada um dos adutos (Guo-THF e Ado-THF), com R^2 = 0,999.

4.4.2 Análise dos adutos Ado-THF e Guo-THF em RNA de células HepG2

Células HepG2 foram então incubadas novamente com THF em duas condições diferentes para extração do RNA: 1) meio de cultura completo por 24 h; 2) PBS por 2 h. Nas incubações das células em PBS foi utilizado THF não oxidado e THF oxidado contendo THF-OH. O RNA foi extraído utilizando-se Kit da QIAGEN e observou-se um rendimento aproximadamente 5 vezes inferior ao rendimento de DNA a partir da mesma quantidade de células. Tal fato desfavorece o uso do RNA para análises de adutos, uma vez que uma das limitações que temos é a sensibilidade para detecção de níveis baixíssimos de lesões. O RNA extraído foi hidrolisado enzimaticamente utilizando-se RNAse / fosfodiesterase / fosfatase alcalina, reduzido com $NaCNBH_3$ para estabilização das lesões e, após pré-purificação por SPE, submetido à análise por HPLC-ESI-MS/MS.

Surpreendeu-nos o fato de o aduto Ado-THF estar presente em todas as amostras de RNA analisadas, sendo inequivocamente identificado em virtude da intensidade do pico. Ainda assim, no entanto, foi possível observar um aumento do nível desse aduto no RNA das células incubadas em PBS com THF oxidado. As células incubadas com THF não oxidado em PBS ou em meio de cultura completo não tiveram os níveis de Ado-THF alterados em seu RNA (Figura 31). A quantificação do aduto Guo-THF no RNA das células não foi possível em virtude de co-eluição de alguma substância que acabou levando à supressão do sinal nas amostras de RNA.

Comparando-se as análises em DNA (dAdo-THF, Figura 23) e em RNA (Ado-THF, Figura 31) verifica-se um nível 100 vezes maior do aduto em RNA. Entretanto, a maior dificuldade de obtenção de grandes quantidades de RNA somada ao fato de ter sido observado um nível basal já alto do aduto em RNA desfavorecem o uso de RNA para esse tipo de análise. Não foi possível ainda verificar se o nível basal detectado se deve a algum constituinte do kit de extração do RNA. Testes serão feitos para avaliar essa possibilidade antes de considerarmos a existência de um nível basal dessa lesão no RNA das células.

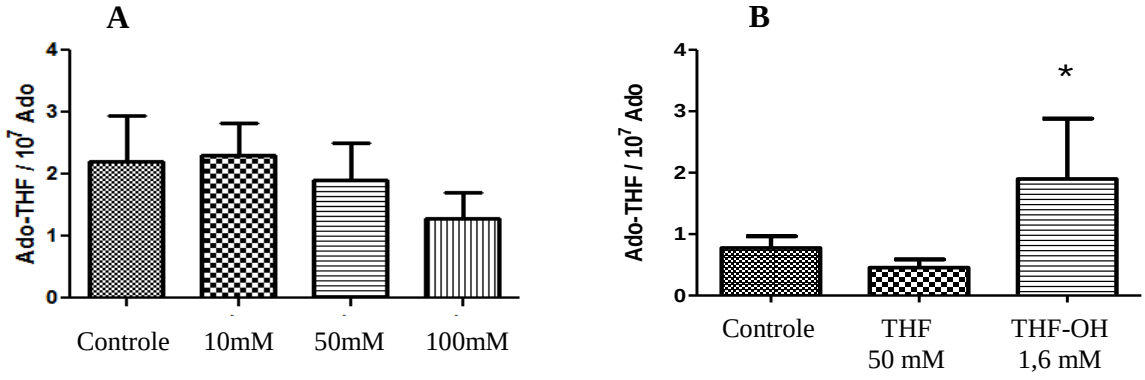


Figura 31: Níveis de Ado-THF em: A) RNA de células HepG2 incubadas com THF não oxidado nas concentrações indicadas, em meio de cultura completo por 24 h (N = 5); B) RNA de células HepG2 incubadas com THF não oxidado (50 mM) e THF oxidado (50 mM contendo 1,6 mM THF-OH) em PBS por 2 h (N = 4).

Foi realizado um experimento a fim de comparar o rendimento dos adutos de THF com os nucleosídeos de DNA e RNA. O experimento foi realizado igualmente com todos os nucleosídeos (Guo, Ado, dGuo e dAdo) e a mesma concentração e volume do solvente THF. Em análise através de HPLC/PDA utilizando o método 1 como descrito no item 3.2.1, foi possível verificar que os adutos de RNA (Ado-THF e Guo-THF) apresentam rendimento levemente maior que os de DNA. Para quantificar esse rendimento, foi feita aferição da área do pico de cada aduto dividida pela área total. Quando comparados Ado-THF e dAdo-THF, o aduto de RNA apresentou 78,4% de rendimento, enquanto o aduto de DNA apresentou 76,9%. Comparando Guo-THF e dGuo-THF, o aduto de RNA novamente apresentou maior rendimento, com 18,8%, enquanto o aduto de DNA apresentou 15,6%. Essa diferença de reatividade com nucleosídeos de DNA e de RNA pode levar a diferenças de reatividade com os diferentes ácidos nucleicos, podendo por exemplo ser favorecida a reação com o RNA das células. Entretanto, apesar de nas incubações *in vitro* o rendimento de dAdo-THF ser maior que o rendimento de dGuo-THF, o inverso foi observado no DNA das células incubadas com THF oxidado.

4.5 Análise da metilação global do DNA (5-metil-dC)

Como citado por RODRIGUES (2010), a alteração da metilação do DNA em genes importantes pode acarretar no desenvolvimento de tumores. Tanto a hipermetilação quanto a hipometilação têm consequências prejudiciais ao organismo, podendo ser muitas das vezes irreversíveis.

Uma hipermetilação pode acarretar no silenciamento de genes supressores de tumor e uma hipometilação pode levar à instabilidade genômica, favorecendo o crescimento descontrolado e desordenado das células e a formação de tumores (MULLER, PRADO, 2008; CHRISTMAN et al. 1995, CHAUFFAILLE, 2006).

Além da indução de lesões em DNA, substâncias podem levar a alterações epigenéticas que podem contribuir para o desenvolvimento de doenças. Padrões de metilação do DNA são alterados em tecidos de câncer e após exposição a agentes genotóxicos, podendo propagar-se em novas gerações celulares (YAUK *et al.*, 2008).

Avaliou-se, portanto, a metilação global do DNA das células incubadas com as diferentes concentrações de THF testadas. Como apresentado na Figura 32, observa-se que o solvente nas concentrações de 50 e 100 mM provoca hipermetilação do DNA após 48 h de incubação.

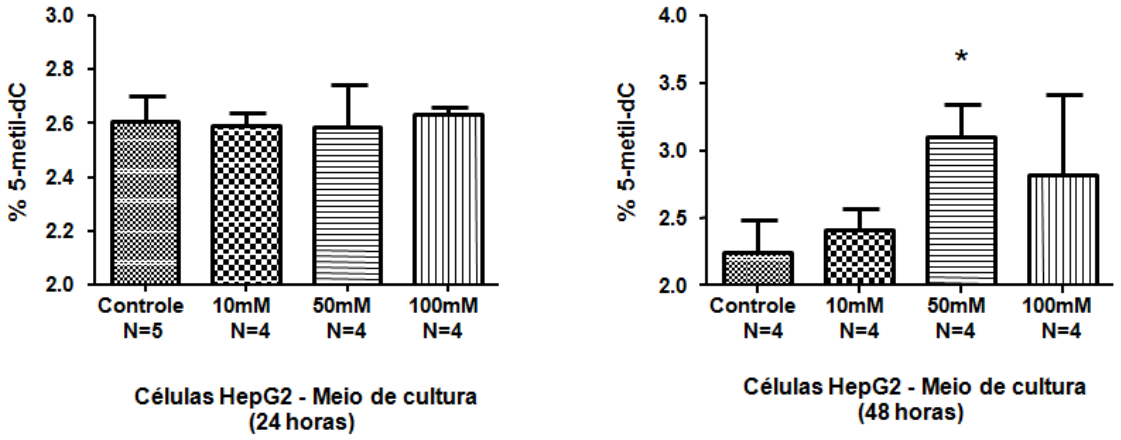


Figura 32: Níveis de 5-metil-dC em DNA de células HepG2 incubadas com 10, 50 e 100 mM de THF por 24 e 48 h.

Amostras de DNA de fígado e rim de camundongos expostos a vapores de THF, como descrito acima, também foram analisadas para quantificação de 5-metil-dC. Foi observada hipermetilação do DNA de fígado, enquanto que o nível de 5-metil-dC em DNA de rim se manteve inalterado (Figura 33).

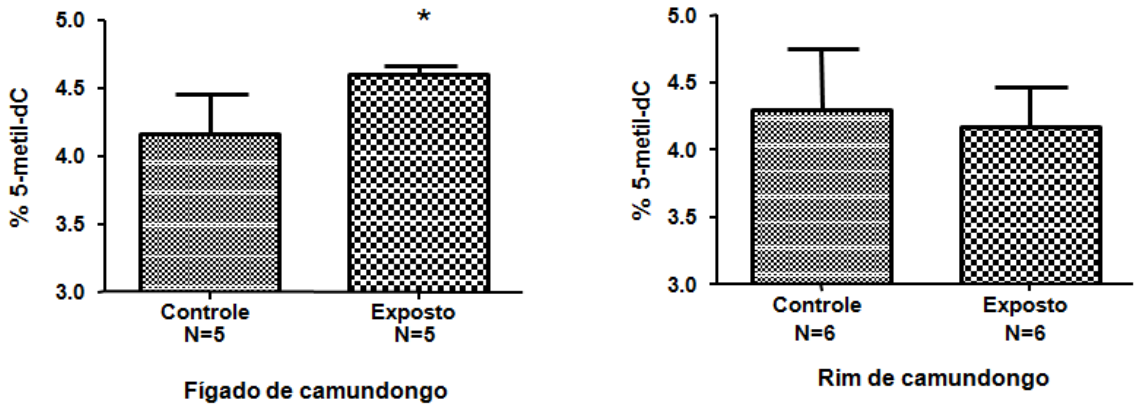


Figura 33: Níveis de 5-metil-dC em DNA de fígado e rim de camundongos fêmeas C57BL/6J expostos a THF por inalação (vapor de 1 mL/h, 6h/dia, 5 dias). As análises foram repetidas 3 vezes.

A metilação do DNA é um evento regulado pela ação de DNA metil-transferases (DNMTs). Tais enzimas estão mais ativas quando ocorrem danos no DNA e ligam-se com maior afinidade a muitas lesões (JAMES et al., 2003). Há a hipótese de que DNMT1 seja de fato uma enzima de reparo do DNA conservada ao longo da evolução (ROBERTS, 1995). Com o aumento dos níveis de lesões em DNA em decorrência da exposição a poluentes, o aumento da atividade de DNMTs leva também à hipermetilação ao longo do tempo (YAUK et al., 2008). A hipermetilação do DNA pode ser associada a alterações estruturais na cromatina, diminuição da expressão gênica e diminuição da frequência de movimento de transposons (ROBERTSON, 2005, SLOTKIN E MARTIENSSEN, 2007, JIRTLE E SKINNER, 2007). Como a metilação global não fornece informação a respeito do estado de metilação de genes ativos, é importante que a análise seja aprofundada através da investigação da modulação da metilação em genes específicos.

5. CONCLUSÃO

Os dados apresentados mostram que:

1- THF é um solvente de baixa citoxicidade para células HepG2, sendo necessárias concentrações acima de 50 mM por período de incubação superior a 24 h para ser verificada perda de viabilidade das células.
2- THF induz dano oxidativo em DNA de células HepG2 e em fígado de camundongos expostos por inalação.
3- Uma vez que o solvente esteja oxidado, a espécie reativa THF-OH presente no meio de cultura é capaz de reagir com RNA e DNA das células, gerando adutos com dAdo, dGuo e Ado. A espécie reativa possui maior afinidade por dGuo que por dAdo no DNA. Entretanto, as células HepG2 não biotransformaram THF para essa espécie reativa.
4- Para a quantificação das lesões em DNA e RNA, métodos de HPLC-ESI-MS/MS foram validados.
5- THF induz hipermetilação em DNA de células HepG2 expostas a 50 e 100 mM do solvente e em DNA de fígado de camundongos fêmeas C57BL/6J expostos a vapores de THF (vapor de 1 mL/h, 6h/dia, 5 dias).
6- THF oxidado reage com os ribonucleosídeos Ado e Guo *in vitro*, gerando os mesmos adutos observados com os desoxirribonucleosídeos. Os adutos Ado-THF e Guo-THF reduzidos foram purificados e os dois adutos foram caracterizados espectroscopicamente.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS

ALMEIDA, E.A.; MARQUES, S.A.; KLIZTKE, C.F; BAINY, A.C.D.; MEDEIROS, M.H.G.; DI MASCIO, P.; LOUREIRO, A.P.M. DNA damage in digestive gland and mantle tissue of the mussel *Perna perna. Comparative Biochemistry and Physiology Part C 135, 295–303,* 2003.

AMORIM, L.C.A. Os biomarcadores e sua aplicação na avaliação da exposição aos agentes químicos ambientais. *Revista Brasileira de Epidemiologia, volume 6, supl. 1,* 2003.

ATKINS, P.; JONES, L. Princípios de química: questionando a vida moderna e o meio ambiente. Ed. Bookman, 2001.

AUGUSTO, O. Radicais livres bons, maus e naturais. *São Paulo: Oficina de Texto*, 2006.

BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.M. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Quimica Nova,* Vol. 29, No. 1, 113-123, 2006.

BENDER, J. DNA methylation and epigenetics. *Annu. Rev. Plant Biol*, 55:41–68, 2004.

BERRA, C.M.; MENCK, C.F.M.; DI MASCIO, P. Estresse oxidativo, lesões no genoma e processos de sinalização no controle do ciclo celular. Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, Brasil. *Quimica Nova*, Vol. 29, No. 6, 1340-1344, 2006.

BIANCHI, M.L.P.; ANTUNES, L.M.G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. *Revista de Nutrição, Campinas,* 12(2): 123-130, maio/ago, 1999.

CARTIGNY, B.; AZAROUAL, N.; IMBENOTTE, M.; SADEG, N.; TESTART, F. RICHECOEUR, J.; VERMEERSCH, G.; LHERMITTE, M. 1H NMR Spectroscopic Investigation of Serum and Urine in a Case of Acute Tetrahydrofuran Poisoning. *Journal of Analytical Toxicology*, Vol. 25, May/June 2001.

CHAUFFAILLE, M.L.L.F. Alterações moleculares em síndrome mielodisplásica. *Rev. bras. hematol. hemoter*; 28(3):188-193, 2006.

CHHABRA, R.S.; HEBERT, R.A.; ROYCROFT, J.H.; CHOU, B.; MILLER, R.A.; RENNE, R.A. Carcinogenesis Studies of Tetrahydrofuran Vapors in Rats and Mice. *Toxicological Sciences* 41, 183-188, 1998.

CHRISTMAN, J.K.; SHEIKHNEJAD, G.; MARASCO, C.J.; SUFRINI, J.R. 5-Methyl-2'-deoxycytidine in single-stranded DNA can act in cis to signal de novo DNA methylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 92, pp. 7347-7351, August 1995.

DE BONT, R.; VAN LAREBEKE, N. Endogenous DNA damage in humans: a review of quantitative data. *Mutagenesis*, v.19, p.169-185, 2004.

DONATO, M.T.; LAHOZ, A.; CASTELL, J.V.; GÓMEZ-LECHÓN, M.J. Cell Lines: A Tool for *In Vitro* Drug Metabolism Studies. *Current Drug Metabolism*, 2008.

DROZA, P.O.; BERODEA, M.; JANGB, J.Y. Biological Monitoring of Tetrahydrofuran: Contribution of a Physiologically Based Pharmacokinetic Model. *American Industrial Hygiene Association (AIHA) Journal*, 1999.

ELOVAARA, E.; PFAFFLI, P.; SAVOLAINEN, H. Burden and biochemical effects of extended tetrahydrofuran vapour inhalation of three concentration levels. *Acta Pharmacol. Toxicol. 54,221-226*, 1984.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo, 1997.

FOX, J.J.; PRAAG, D.V.; WEMPENI, I.; DOEER, I.L.; CHEONG, L.; KNOLL, J.E.; EIDINOFFA, M.L.; BENDICH, A.; BROWN, G.B. Synthesis of 5-Methyl-2 '-deoxycytidine and Related Pyrimidine Nucleosides, 1958.

FRAGA, M.F.; URIOL, E.; DIEGO, L.B.; BERDASCO, M.; ESTELLERS, M.; CANAL, M.J.; RODRIGUEZ, R. High-performance capillary electrophoretic method

for the quantification of 5-methyl 2'-deoxycytidine in genomic DNA: Application to plant, animal and human cancer tissues. *Electrophoresis, 23,* 1677–1681, 2002.

GARNIER, R.; ROSENBERG, N.; PUISSANT, J.M.; CHAUVET, J.P.; EFTHYMIOU, M.L. Tetrahydrofuran poisoning after occupational exposure. *British Journal ofIndustrial Medicine*, 1989.

GOUVEIA, M.E. Análise do padrão de metilação em genes supressores de tumor na leucemia mielóide e cronica. *Universidade federal fluminense - Instituto de biologia programa de neuroimunologia,* 2007.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Free Radicals in Biology and Medicine. *Cell Biology International, Vol. 24, No. 10, 764,* 2000.

HELLWIGA, J.; GEMBARDTA, C.; JASTIB, S. Tetrahydrofuran: two-generation reproduction toxicity in Wistar rats by continuous administration in the drinking water. *Food and Chemical Toxicology* 40, 1515–1523, 2002.

HERMIDA, S.A.S.; POSSARI, E.P.M.; SOUZA, D.B.; CAMPOS, I.P.A.; GOMES, O.F.; DI MASCIO, P.; MEDEIROS, M.H.G.; LOUREIRO, A.P.M. 2,,-Deoxyguanosine, 2,,-Deoxycytidine, and 2,,-Deoxyadenosine adducts resulting from the reaction of tetrahydrofuran with DNA bases. *Chemical Research in Toxicology,* v.19, p.927-936, 2006.

JAMES, S.J., POGRIBNY, I.P., POGRIBNA, M., MILLER, B.J., JERNIGAN, S., MELNYK, S. Mechanisms of DNA damage, DNA hypomethylation, and tumor progression in the folate/methyl-deficient rat model of hepatocarcinogenesis. *J. Nutr.* 133, 3740S–3747S, 2003.

JESUS, T.B., CARVALHO, C.E.V. Utilização dos biomarcadores em peixes como ferramenta para avaliação de contaminação ambiental por mercúrio (Hg). *Oecol. Bras., 12 (4): 680-693,* 2008.

JIANG, Z.Y.; WOOLLARD, A.C.; WOLFF, S.P. Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe^{2+} in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and an iodometric method. *Lipids, 26,10,853-6,* 1991.

JIRTLE, R.L., SKINNER, M.K. Environmental epigenomics and disease susceptibility. *Nat. Rev. Genet.* 8, 253–262, 2007.

JUDITH K. CHRISTMAN, T.F.; GHOLAMREZA, S. MARASCO, C.J.; SUFRINI, J.R. 5-Methyl-2'-deoxycytidine in single-stranded DNA can act in cis to signal *de novo* DNA methylation. *Biochemistry, vol. 92, pp. 7347-7351, August* 1995.

KUMAR, S.; HORTON, J.R.; JONES, G.D.; WALKER, E.T.; ROBERTS, R.J.; CHENG, X. DNA containing 4-thio-2-deoxycytidine inhibits methylation by Hhal methyltransferase. *Nucleic Acids Research, Vol. 25, No. 14 2773–2783,* 1997.

LACERDA, V.A.M. Impactos do uso da procaína como agente desmetilante de dna no sistema de cultivo celular de bovinos. *Universidade de brasília - Departamento de biologia celular*, 2010.

LOUREIRO, A.P.M.; DI MASCIO, P.; MEDEIROS, M.H.G. Formação de adutos exocíclicos com bases de DNA: implicações em mutagênese e carcinogênese. Química Nova, v.25, n.5, p.777-793, 2002.

LOUREIRO, A.P.M.; CAMPOS, I.P.A, GOMES, O.F.; POSSARI, E.P.M.; DI MASCIO, P. ; MEDEIROS, M.H.G. Structural Characterization of an Etheno-2¢-deoxyguanosine Adduct Modified by Tetrahydrofuran. *Chem. Res. Toxicol.* 18, 290-299, 2005.

LOUREIRO, A.P.M.; ZHANG, W.; KASSIE, F.; ZHANG, S.; VILLALTA, P.W.; WANHG, M.; HECHT, S.S. Mass Spectrometric Analysis of a Cyclic 7,8-butanoguanine Adduct of N-Nitrosopyrrolidine: Comparison to Other N-Nitrosopyrrolidine Adducts in Rat Hepatic DNA. *Chem. Res. Toxicol.* 22, 1728–1735, 2009.

LUCH, A. Lessons from chemical carcinogenesis. *Nature and nurture* – câncer, volume 5, february 2005.

MARNETT, L.J.; PLASTARAS, J.P. Endogenous DNA damage and mutation. *Trends in Genetics*, v.17, p.214-221, 2001.

MARTINET, W.; MEYER, G.R.Y.; HERMAN, A.G.; KOCKX, M.M. Blackwell Publishing, Ltd. Reactive oxygen species induce RNA damage in human atherosclerosis. *European Journal of Clinical Investigation* 34, 323–327, 2004.

MARTINEZ, G.R., LOUREIRO, A.P.M., MARQUES, S.A., MIYAMOTO, S., YAMAGUCHI, L.F., ONUKI, J., GARCIA, C.C.M., BARBOSA, L.F., MEDEIROS, M.H.G., DI MASCIO, P. Oxidative and alkylating damage in DNA. *Mutation Research-Reviews in Mutation Research* 544, 115-127, 2003.

MOODY, D.E. The Effect of Tetrahydrofuran on Biological Systems: Does a Hepatotoxic Potential Exist ? *Drug and Chemical Toxicology*, vol. 14, No. 4, Pages 319-342, 1991.

MULLER, H.R.; PRADO, K.B. Epigenética: um novo campo da genética. RUBS, Curitiba, v.1, n.3, p.61-69, set./dez. 2008.

NAIR, U., BARTSCH, H.; NAIR, J. Lipid peroxidation-induced DNA damage in cancer-prone inflammatory diseases: a review of published adduct types and levels in humans. *Free radical biology & Medicine*, 43, 1109-1120, 2007.

NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM (NTP) Toxicology and carcinogenesis studies of tetrahydrofuran in F344/N rats and B6C3F1 mice. *Technical Report Series* No. 475. NIH Publication No.98-3965. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes ofHealth, Research Triangle Park, NC, 1998.

NIKLAS, J.; NOOR, F.; HEINZLE, E. Effects of drugs in subtoxic concentrations on the metabolic fluxes in human hepatoma cell line Hep G2. *Toxicology and Applied Pharmacology* 240, 327–336, 2009.

NOOR, F.; NIKLAS, J.; MÜLLER-VIEIRA, U.; HEINZLE, E. An integrated approach to improved toxicity prediction for the safety assessment during preclinical drug development using Hep G2 cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 237, 221–231, 2009.

OLIVEIRA, N.F.P.; PLANELLO, A.C.; ANDIA, D.C.; PARDO, A.P.S. Metilação de DNA e Câncer. *Revista Brasileira de Cancerologia*, 56(4): 493-499, 2010.

ONG, C.N.; CHIA, S.E.; PHOON, W.H.; TAN, K.T. Biological monitoring of occupational exposure to Tetrahydrofuran. *British Journal of Industrial Medicine*;48:616-621, 1991.

PELTONEN, K.; DIPLLE, A. Polycyclic aromatic hydrocarbons: Chemistry of DNA adduct formation. *Journal of Occupational and Environmental Medicine*, 37 (1): 52-58, 1995.

PIERRE, J.J.I.; KANTARJIAN, H.M. Targeting DNA Methylation. *Clinical Cancer Research;* 15:3938-3946, 2009.

RAVENZWAAY, B.V.; GAMER, E.A.O.; LEIBOLD, E.E.; KAUFMANN, W. Effect of cytochrome P-450 inhibition on tetrahydrofuran-induced hepatocellular proliferation in female mice. 2003.

RIBEIRO, L.R.; SALVADORI, D.M.F.; MARQUES, E.K. Mutagenese ambiental, editora da ULBRA, 2003.

ROBERTS, R.J. On base flipping. *Cell* 82, 9–12, 1995.

ROBERTSON, K.D. DNA methylation and human disease. *Nat. Rev. Genet.* 6, 597–610, 2005.

ROBERTSON, K.D.; WOLFFE, A.P. DNA methylation in health and disease. *Nature reviews - genetics volume* 1, october 2000.

RODRIGUEZ, M.T.M. Metilación y expresión de genes en el cáncer diferenciado de tiroides. *Revista Cubana de Endocrinología;* 21(3)340-350; 2010.

SLOTKIN, R.K., MARTIENSSEN, R. (2007) Transposable elements and the epigenetic regulation of the genome. *Nat. Rev. Genet.* 8, 272–285.

SOTOMAYOR, R.E.; WASHINGTON, M.; NGUYEN, L.; NYANG'ANYI, R.; HINTON, D.M.; CHOU, M. Effects of intermittent exposure to aflatoxin B1 on DNA and RNA adduct formation in rat liver: dose-response and temporal patterns. Toxicological sciences 73, 329–338, 2003.

TORRES, M.C.L.; SOARES, N.F.F.; MAIA, J.F. Parâmetros cinéticos da glutationa s-transferase e sua ativação por extratos de vegetais. *Ciências de Tecnologia de Alimentos*, Campinas, 24(2): 243-248, abr.-jun., 2004.

VALENÇA, R.M.B.; GUERRA, M.M.P. Espécies reativas ao oxigenio (ROS) e a utilização de antioxidantes na criopreservação do sêmen suíno. *Rev. Bra. Reprodução animal,* vol. 31, pág. 47-53, Belo Horizonte, 2007.

ZHU, P.; LEE, S.H.; WEHRLI, S.; BLAIR, I.A. Characterization of a Lipid Hydroperoxide-Derived RNA-Adduct in Rat Intestinal Epithelial Cells. *Chem Res Toxicol*. 19(6): 809–817, jun., 2006.

ZIMBARDI. D. Identificação de perfis diferenciais de metilação do dna na endometriose. *Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - Instituto de Biociências, Botucatu* – SP, 2010.

ZHOU, S.; PU, X.; WANG, Z.; KLAUNIG, J.E. Oxidative stress and oxidative damage in chemical carcinogenesis. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2011.

WANG, M.; LAO, Y.;CHENG, G.; SHI, Y.; VILLALTA, P.W.; NISHIKAWA, A.; HECHT, S. Analysis of Adducts in Hepatic DNA of Rats Treated with N-Nitrosopyrrolidine. *Chem. Res. Toxicol.20, 634-640,* 2007.

WILKENING, S.; STAHL, F.; BADER, A. Comparison of primary human hepatocytes and hepatoma cell line hepg2 with regard to their biotransformation properties. *The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics*, vol. 31, 2003.

WOGAN, G.N.; HECHT, S.S.; FELTON, J.S.; CONNEY, A.H.; LOEB, L.A. Environmental and chemical carcinogenesis. *Seminars in Cancer Biology*, v.14, n.6, p.473-486, 2004.

YAO, Y.; GUAN, J.; TANG, P.; JIAO, H.; LIN, C.; WANG, J.; LU, Z.; MIN, H.; GAO, H. Assessment of toxicity of tetrahydrofuran on the microbial community in activated sludge, 2010.

YAUK, C., POLYZOS, A., ROWAN-CARROLL, A., SOMERS, C.M., GODSCHALK, R.W., VAN SCHOOTEN, F.J., BERNDT, M.L., POGRIBNY, I.P., KOTURBASH, I., WILLIAMS, A., DOUGLAS, G.R., OLGA KOVALCHUK, O. Germ-line mutations, DNA damage, and global hypermethylation in mice exposed to particulate air pollution in an urban/industrial location. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.; 1*05, 605-610, 2008.

7. ANEXOS

Carla Fernanda Ibarra Baquedano
Bolsista de Mestrado do CNPq
Graduada no curso de Farmáia e Bioquímica pela Universidade Católica de Santos, atualmente realizando mestrado em toxicologia e analises toxicologicas na Universidade de São Paulo
(Texto informado pelo autor)
Última atualização do currículo em 07/01/2010
Endereço para acessar este CV:
http://lattes.cnpq.br/3235129580963866

Certificado pelo autor em 07/01/10

Dados pessoais

Nome Carla Fernanda Ibarra Baquedano

Nome em citações bibliográficas BAQUEDANO, C. F. I.

Sexo Feminino

Formação acadêmica/Titulação

2006 - 2009 Graduação em Farmacia e Bioquimica .
Universidade Católica de Santos, UNISANTOS, Brasil.
Título: Perspectivas no uso terapêutico do canabinóide Δ9-tetrahidrocanabinol no tratamento da Doença de Alzheimer..
Orientador: Fabrício dos Santos Cirino.

2003 - 2005 Ensino Médio (2º grau) .
Universidade Santa Cecilia.

1995 - 2002 Ensino Fundamental (1º grau) .
Universidade Santa Cecilia.

Atuação profissional

Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

Vínculo institucional

2010 - Atual Vínculo: Mestranda, Enquadramento Funcional: Mestranda, Carga horária: 40, Regime: Dedicação exclusiva.

Atividades

2010 - Atual Atividades de Participação em Projeto, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, .

Projetos de pesquisa
Quantificação de lesões em DNA e RNA de células HepG2 expostas a tetraidrofurano.

Projetos de Pesquisa

2010 - Atual Quantificação de lesões em DNA e RNA de células HepG2 expostas a tetraidrofurano.

Situação: Em andamento; *Natureza:* Pesquisa.
Integrantes: Carla Fernanda Ibarra Baquedano - Coordenador.
.

Áreas de atuação

1. *Grande área:* Ciências da Saúde / *Área:* Farmácia / *Subárea:* Análise Toxicológica.

Idiomas

Inglês Compreende Razoavelmente, Fala Pouco, Lê Pouco, Escreve Pouco.

Espanhol Compreende Bem, Fala Bem, Lê Bem, Escreve Bem.

Português Compreende Bem, Fala Bem, Lê Bem, Escreve Bem.

Eventos

Participação em eventos

1. II Jornada Científica da Saúde. 2008. (Outra).

2. Curso de Perícia Criminal (Toxicologia Forense). 2008. (Outra).

3. Jornada de Toxicologia e Toxicologia Clínica. 2008. (Outra).

4. XV Congresso Paulista de Farmacêuticos e VII Seminário Internacional de Farmacêuticos. 2007. (Congresso).

5. Jornada Científica da Saúde da Universidade Católica de Santos. 2007. (Outra).

6. XII Jornada Farmacêutica da Universidade Católica de Santos. 2006. (Outra).

7. Curso de Farmacologia do Medicamento Homeopático. 2006. (Outra).