Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Toxicologia e
Análises Toxicológicas

***Adutos de 2'-desoxiadenosina e 2'-desoxicitidina induzidos por
tetraidrofurano: caracterização estrutural e detecção em DNA***

SILVIA ARAÚJO DA SILVA HERMIDA

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:
Profa. Dra. Ana Paula de Melo Loureiro

São Paulo
2007

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Toxicologia e
Análises Toxicológicas

***Adutos de 2'-desoxiadenosina e 2'-desoxicitidina induzidos por
tetraidrofurano: caracterização estrutural e detecção em DNA***

SILVIA ARAÚJO DA SILVA HERMIDA

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:
Profa. Dra. Ana Paula de Melo Loureiro

São Paulo
2007

SILVIA ARAÚJO DA SILVA HERMIDA

***Adutos de 2'-desoxiadenosina e 2'-desoxicitidina induzidos por
tetraidrofurano: caracterização estrutural e detecção em DNA***

Comissão Julgadora da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

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

Profa. Dra. Sayuri Miyamoto

1º. examinador

Prof. Dr. Marco Antonio Stephano

2º. examinador

São Paulo, 04 de dezembro de 2007.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Relatório de Defesa

Relatório de defesa pública de Dissertação do(a) Senhor(a) Sílvia Araújo da Silva Hermida no Programa: Toxicologia e Análises Toxicológicas, do(a) Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

Aos 4 dias do mês de dezembro de 2007, no(a) Anfiteatro - Bloco 13A realizou-se a Defesa da Dissertação do(a) Senhor(a) Sílvia Araújo da Silva Hermida, apresentada para a obtenção do título de Mestre em Toxicologia e Análises Toxicológicas, intitulada:

"Adutos de 2'-desoxiadenosina e 2'-desoxicitidina induzidos por tetraidrofurano: caracterização estrutural e detecção em DNA"

Após declarada aberta a sessão, o(a) Sr(a) Presidente passa a palavra aos examinadores para as devidas arguições que se desenvolvem nos termos regimentais. Em seguida, a Comissão Julgadora proclama o resultado:

Nome dos Participantes da Banca	Vínculo do Docente	Sigla da Unidade	Resultado
Ana Paula de Melo Loureiro	Presidente	FCF - USP	APROVADA
Sayuri Miyamoto	Titular	IQ - USP	A PROVA DA
Marco Antonio Stephano	Titular	FCF - USP	A PROVA DA
Resultado Final:			
Parecer da Comissão Julgadora *			

FAZER AS CORREÇÕES SUGERIDAS PELA BANCA ANTES DA ENTREGA DO VOLUME FINAL DA TESE.

Comentários da Defesa (opcional)

Eu, Maria Roseli Ramos, Secretária, lavrei a presente ata, que assino juntamente com os(as) Senhores(as). São Paulo, aos 4 dias do mês de dezembro de 2007.

Sayuri Miyamoto

Marco Antonio Stephano

Ana Paula de Melo Loureiro
Ana Paula de Melo Loureiro
Orientador(a)

* Obs: Se o candidato for reprovado por algum dos membros, o preenchimento do parecer é obrigatório.

Nos termos do artigo 110, do RG-USP, encaminhe-se o presente relatório à CPG, para homologação.

Impresso em: 12/11/2007

“...a fé é o firme fundamento das coisas que se esperam e a
prova das coisas que não se vêem...”

Hebreus 11:1

Dedicatória

A Manuel Hermida, meu esposo, com amor, gratidão e
admiração por sua compreensão, carinho, paciência e apoio
durante todo o período de execução deste trabalho.

Agradecimentos

Aos meus pais, por estarem sempre do meu lado, me apoiando e auxiliando durante toda a minha vida.

Ao meu marido, pelo carinho e apoio incondicionais em todos os momentos.

A Profa. Dra. Ana Paula de Melo Loureiro, pela orientação, paciência e por todas oportunidades que me foram concedidas durante a execução deste projeto.

A Profa. Dra. Marisa H. G. Medeiros e Prof. Dr. Paolo Di Mascio, pela colaboração e por colocar a disposição a área experimental e o laboratório.

Aos amigos do laboratório, Paula, Igo, Rafael, Ediliz, Denise e Julita, pela sincera amizade e apoio. Em especial a Julita pelo ombro amigo, por me ouvir sempre, pelo carinho e amizade demonstrados.

Ao Osmar F. Gomes, pela ajuda com os equipamentos e toda disposição e auxílio dispensados durante a execução dos experimentos.

A Fernanda Manso Prado, pelo apoio e orientação no uso dos equipamentos.

A Suéllen Cristine Moreira Vaz, pela colaboração nos experimentos com os animais e pelo apoio sempre.

Aos Professores da Farmácia – Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, da Biologia e do Instituto de Ciências Biomédicas, por todo apoio e aprendizado.

Aos Professores de outras unidades e departamentos da Usp por todo apoio e aprendizado.

A Andréa Ramirez, por ter despertado em mim o desejo de estudar biologia, por me apoiar, por ser uma verdadeira amiga e por me ouvir sempre.

Ao Prof. Joaquim Moraes de Oliveira, que sempre foi um exemplo de perseverança, carinho e amizade desde a minha graduação, e que muito me ensinou contribuindo para o meu crescimento científico e intelectual.

Aos meus irmãos e irmã, por estarem sempre por perto e por despertarem em mim o desejo de melhorar sempre.

Aos meus familiares que me acompanharam e estimularam sempre com seu carinho.

Apoio Financeiro

CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

Pró-Reitoria de Pesquisa – Universidade de São Paulo

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

SUMÁRIO

ÍNDICE DE FIGURAS.....	i
ÍNDICE DE TABELAS.....	iv
ABREVIACÕES.....	v
RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	xi
1. INTRODUÇÃO.....	02
1.1 Carcinogênese Química.....	02
1.1.1 Vias de ativação de xenobióticos	06
1.2 Fontes exógenas e endógenas de danos em DNA.....	13
1.3 Adutos de DNA como biomarcadores.....	18
1.4 Estudos sobre a toxicidade do tetraidrofurano.....	24
2. OBJETIVOS.....	31
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
3.1 Reagentes.....	33
3.2 Equipamentos.....	33
3.3 Determinação da concentração de peróxidos no THF.....	35
3.4 Preparação e purificação dos adutos dAdo-THF e dCyd-THF.....	36
3.5 Caracterização dos adutos.....	36
3.5.1 – Condição de HPLC para obtenção dos espectros de massas por HPLC/ESI/MS.....	37

3.5.2 - Condição de HPLC para detecção dos adutos por HPLC/ESI/MS-MS.....	37
3.6 Reação de THF oxidado com DNA de timo de bezerro.....	39
3.7 Exposição de camundongos a vapor de THF.....	40
3.8 Extração do DNA de órgãos dos camundongos.....	41
3.9 Hidrólise enzimática do DNA para análise de 8-oxodGuo.....	42
3.10 Análise de 8-oxodGuo em DNA extraído de fígado e rim dos camundongos.....	43
4. RESULTADOS e DISCUSSÃO.....	45
4.1 Reação de dCyd e dAdo com THF oxidado – Caracterização dos adutos formados.....	45
4.2 Formação dos adutos após reação <i>in vitro</i> de DNA com THF oxidado.....	56
4.3 Indução de dano oxidativo em fígado e rim de camundongos expostos a vapor de THF.....	59
5. CONCLUSÕES.....	65
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67
7. CURRÍCULO.....	78
8. ANEXO – Artigo Publicado.....	81

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema exemplificando as etapas da carcinogênese química.....	05
Figura 2 – Exemplos de biotransformação de fase I e II.....	08
Figura 3 – Conversão enzimática de alguns pró-carcinógenos humanos para os metabólitos reativos com DNA. As setas vermelhas apontam à posição do ataque nucleofílico (DNA, proteína), adaptado de (LUCH, 2005).....	09
Figura 4 – Fontes de lesões em biomoléculas.....	15
Figura 5 - Processo de validação de biomarcadores em animais experimentais e em estudos epidemiológicos em humanos (adaptado de WOGAN et al., 2004).....	21
Figura 6: Epidemiologia molecular promovendo a abertura da “caixa preta” da relação causal entre a exposição a xenobióticos e o desenvolvimento de câncer (adaptado de CHEN; HUNTER, 2005).....	23

Figura 7 – Detecção de GHB indicando a biotransformação do THF por uma via oxidativa (CARTIGNY et al., 2001).....	28
Figura 8 – Esquema da exposição dos camundongos ao vapor de THF....	41
Figura 9 – Cromatogramas de (A) dAdo e (B) dCyd com THF obtidos pelo HPLC (sistema 1 conforme descrito no item 3.2) mostrando os produtos das incubações de dAdo e dCyd com THF.....	46
Figura 10 – Espectros de absorbância dos adutos de dCyd-THF e dAdo-THF antes e após a redução com NaBH ₄ . Os espectros foram obtidos por HPLC/PDA. Os espectros de absorbância dos desoxirribonucleosídeos normais estão apresentados para comparação.....	47
Figura 11 – Espectros de massa dos adutos dAdo-THF e dCyd-THF (dR=desoxirribose).....	48
Figura 12- Espectros de massa de dCyd-THF e dAdo-THF após reação com NaBH ₄ (dR=desoxirribose).....	49
Figura 13 - Espectros de ¹ H RMN de dATHF reduzido.....	51
Figura 14 - Espectros de ¹ H RMN de dCTHF reduzido.....	54

Figura 15 – Estruturas e mecanismo para formação e redução de dCyd-THF e dAdo-THF.....	55
Figura 16 – Cromatogramas obtidos por HPLC/ESI/MS-MS, mostrando a formação dos adutos dCyd-THF e dAdo-THF em DNA incubado com THF oxidado <i>in vitro</i> . O DNA foi hidrolisado enzimaticamente antes da injeção no sistema	58
Figura 17 – Níveis de 8-oxodGuo em fígado e rim de camundongos tratados com THF e controles.....	60

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Deslocamentos Químicos nos Espectros de ^1H NMR do Aduto de dAdo-THF (reduzido) em $\text{DMSO}-d_6^{a, b}$	50
--	----

Tabela 2: Deslocamentos Químicos nos Espectros de ^1H NMR do Aduto de dCyd-THF (reduzido) em $\text{DMSO}-d_6^{a, b}$	53
--	----

ABREVIações

Abs	Absorbância
ABT	1-aminobenzotriazol
AFB ₁	Aflatoxina B1
AFB ₁ -N ⁷ -gua	Aduto aflatoxina-N ⁷ -guanina
AAF	2-acetilaminofluoreno
BP	Benzo[a]pyrene
BPDE	Benzo [a]pireno diol epóxido
ALA	Ácido delta amino-levulínico
ALA-D	Enzima ácido delta aminolevulínico desidratase
BER	Reparo por excisão de base
CYP	Citocromo P450
COHb	Carboxiemoglobina
COSY	Espectroscopia de RMN de correlação bidimensional ¹ H- ¹ H
dAdo	2'-desoxiadenosina
dCyd	2'-desoxicitidina
dGuo	2'-desoxiguanosina
8-oxodG	8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina
1,N ² -εdGuo	1, N ² -eteno-2'-desoxiguanosina
dAdo-THF	Aduto de 2'-desoxiadenosina – Tetraidrofurano
dCyd-THF	Aduto de 2'-desoxicitidina – Tetraidrofurano

Da	Daltons
DEC	Dicloroetano
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNase	Desoxirribonuclease
DMSO- <i>d</i> ₆	Dimetilsulfóxido deuterado
EC	Eletroquímico
EROD	Etoxiresorufina- <i>O</i> -deetilase
EROs	Espécies reativas de oxigênio
ESI	Ionização por electrospray
ESI/MS-MS	Espectrometria de massas – espectrometria de massas com ionização por electrospray
EDTA	Ácido etilenodiaminotetraacético
εdAdo	1, <i>N</i> ⁶ -eteno-2'-desoxiadenosina
εdCyd	3, <i>N</i> ⁴ -eteno-2'-desoxicitidina
GC	Cromatografia Gasosa
GHB	Gamahidroxibutirato
GSH	Glutationa reduzida
GSSG	Glutationa oxidada
GST	Glutationa S-transferase
GT DP	Glutamil transpeptidase, dipeptidase
HMBC	Correlação heteronuclear bidimensional ¹ H- ¹³ C a longa distância

HMQC	Correlação heteronuclear bidimensional ^1H - ^{13}C a curta distância
HNE	4-hidroxi-2-nonenal
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance
HPAs	Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos
LC	Cromatografia líquida
LOOH	Hidroperóxido lipídico
MDA	Malonaldeído
MRM	Monitoramento de reação múltipla
MS	Espectrometria de massas
NaBH_4	Boroidreto de Sódio
NaCl	Cloreto de Sódio
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (reduzido)
NAT	N-acetiltransferase
NER	Reparo por excisão de nucleotídeos
$N^2,3$ - ϵ dGuo	$N^2,3$ -eteno-2'-desoxiguanosina
NNN	N^7 -nitrosonornicotina
pH	Potencial hidrogeniônico
ppm	Partes por milhão
ppb	Partes por bilhão
PROD	Pentoxiresorufina-O-depentilase
RMN	Ressonância magnética nuclear
RNAse	Ribonuclease

rpm	Rotações por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SULT	Sulfotransferase
TCE	Tricloroetileno
THF	Tetraidrofurano
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
UV	Ultravioleta

Adutos de 2'-desoxiadenosina e 2'-desoxicitidina induzidos por tetraidrofurano: caracterização estrutural e detecção em DNA

Resumo

É grande a preocupação na identificação de compostos envolvidos no desenvolvimento de processos deletérios, como o câncer. O tetraidrofurano (THF) é um solvente amplamente utilizado em indústria e pesquisa e estudos recentes indicaram uma atividade carcinogênica em animais experimentais, incentivando a investigação da sua possível interação com biomoléculas. Adutos de DNA servem como marcadores para a identificação da atividade genotóxica de substâncias e para o monitoramento da exposição humana aos agentes genotóxicos.

Estudos realizados *in vitro*, em células em cultura, bem como em animais experimentais, permitem que mecanismos sejam desvendados e metodologias sejam desenvolvidas para uma posterior avaliação da exposição humana. O contínuo desenvolvimento de técnicas de análise de adutos em DNA para monitoramento biológico constitui importante preocupação para pesquisadores envolvidos com a saúde ocupacional e a medicina preventiva.

No presente trabalho foi investigada a reação de produtos de oxidação do THF com os nucleosídeos 2'-desoxiadenosina (dAdo) e 2'-desoxicitidina (dCyd). As estruturas dos adutos formados foram elucidadas

por análises de espectros de massas (ESI/MS-MS) e ressonância magnética nuclear (RMN) após purificação de quantidade suficiente dos produtos por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Com isso, foi aberta a possibilidade de validação de novos marcadores de exposição a THF. Tais lesões foram detectadas em DNA incubado com THF oxidado *in vitro*, após o desenvolvimento de uma metodologia sensível e seletiva baseada em HPLC/ESI/MS-MS.

Além disso, camundongos foram expostos a vapor de THF e foi feita análise de dano oxidativo (8-oxo-2'-desoxiguanosina) no DNA de fígado e rim. Um aumento de aproximadamente oito vezes no nível de 8-oxo-2'-desoxiguanosina foi observado no DNA dos órgãos dos camundongos expostos ao THF.

Nossos estudos *in vitro* apontam para a possibilidade de ação genotóxica do THF oxidado (formação de adutos com o DNA). A ocorrência dessa via *in vivo* será investigada em estudos posteriores. Adicionalmente, há aumento de dano oxidativo em órgãos alvos de carcinogênese induzida por esse solvente.

Palavras-chave: DNA, Adutos, Tetraidrofurano, Biomarcador, Xenobióticos.

2'-desoxyadenosina and 2'-desoxycitidina adducts induced by tetrahydrofuran: structural characterization and detection in DNA

Abstract

There is a huge concern to identify compounds involved in the development of harmful processes, like cancer. Tetrahydrofuran (THF) is a solvent widely used in industries and recent researches and studies indicated a carcinogenic activity in experimental animals, instigating the investigation of its possible interaction with biomolecules. DNA adducts are used as markers for the identification of genotoxic activity of substances and monitoring the human exposition to genotoxic agents.

Studies carried out *in vitro*, in culture cells and in experimental animals allow to disclose mechanisms and develop methodologies for a posterior evaluation of the human exposition. The continuous development of techniques for the analysis of DNA adducts for biological monitoring constitutes a remarkable concern for the researchers involved with occupational health and preventive medicine.

In the present paper, the reaction of THF oxidation products with the nucleosides 2'-deoxyadenosine (dAdo) and 2'-deoxycytidine (dCyd) were investigated. The structures of the formed adducts were elucidated by mass spectra analysis (ESI/MS-MS) and nuclear magnetic resonance (RMN) after purification of sufficient quantities of the products by high-

performance liquid chromatography (HPLC). Thus, the validation of new markers of exposition to THF was made possible. Such damages were detected in DNA incubated with oxidized THF *in vitro*, after the development of a sensible and selective methodology based on HPLC/ESI/MS-MS.

Moreover, mice were exposed to THF vapors and an oxidative damage analysis (8-oxo-2'-deoxyguanosine) was carried out on DNA from liver and kidney. An approximate 8-fold increase in the level of 8-oxo-2'-deoxyguanosine was observed on DNA from the mice's organs exposed to THF.

Our *in vitro* studies indicate the possibility of oxidized THF genotoxic action (formation of adducts with DNA). The occurrence of this path *in vivo* will be investigated in future studies. In addition, the oxidative damage in target organs of carcinogenesis induced by this solvent was increased.

Keyword: ADN, Adducts, Tetrahydrofuran, Biomarker, Xenobiotics.

INTRODUÇÃO

1. Introdução

Há muito tempo é observado que a exposição dos seres humanos a determinadas substâncias presentes no meio ambiente ou no seu local de trabalho pode levar ao desenvolvimento de câncer, tendo sido identificadas muitas substâncias carcinogênicas. Atualmente sabe-se que o DNA, juntamente com outros componentes celulares, pode ser modificado por substâncias eletrofilicas tanto de origem exógena como endógena, sendo que as lesões geradas podem ser mutagênicas e contribuir para o processo de carcinogênese (MARNETT e PLASTARAS, 2001; FETT-CONTE *et al.*, 2000).

As alterações genéticas que originam o câncer alteram várias propriedades fundamentais das células, permitindo que elas escapem aos controles normais de crescimento e exibam o fenótipo completo do câncer. Essas células, em geral, têm alterado as interações com as células que as cercam e/ou com a matriz extracelular, e se dividem mais rapidamente (COUPIER e PUJOL, 2005).

Estudar como ocorrem às lesões em DNA é importante, pois a elucidação de mecanismos que geram lesões e o que pode ser feito para evitá-las podem auxiliar na prevenção de doenças como o câncer, por exemplo, e as lesões podem ser usadas como biomarcadores de exposição.

1.1. Carcinogênese Química

Identificar compostos capazes de alterar a informação genética, compreender os mecanismos pelos quais essa informação é alterada, e como a lesão do DNA pode ser corrigida, são fundamentais para a compreensão da estabilidade genética e manutenção da vida. Os carcinógenos químicos aceleram

o aparecimento de mutações, que são associadas ao desenvolvimento de neoplasias (LUCH, 2005). Os conceitos de iniciação, promoção, progressão e manifestação do tumor surgiram a partir de estudos realizados em carcinogênese química.

A iniciação corresponde ao primeiro estágio do processo, em que ocorrem lesões no DNA por um agente mutagênico genotóxico. As lesões geradas (quebras, oxidação, adutos, etc.), não sendo reparadas, podem levar a mutações. A célula mutada pode permanecer dormente com seu crescimento normal, até que um evento epigenético favoreça sua replicação. A promoção é a fase representada por vários eventos reversíveis e com duração variável que favorecem a replicação celular. Alguns compostos químicos não genotóxicos que atuam como carcinógenos em animais são indutores de proliferação celular. A indução da proliferação celular acelera a expansão clonal de células que tenham sofrido mutações, aumentando o número de células alteradas e, com isso, a probabilidade de que outros eventos dêem seqüência ao processo de carcinogênese. A progressão tumoral envolve ciclos sucessivos de mutação e seleção. Por exemplo, em tumores endócrinos em sua fase inicial, pode haver dependência de estímulos hormonais para o crescimento tumoral, que desaparece com a progressão do tumor. Durante a progressão tumoral, as características fenotípicas se modificam, ocorre a invasão de tecidos adjacentes, expansão da massa tumoral e, posteriormente o aparecimento de metástases (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999).

É sabido que é necessário que exposições repetidas a carcinógenos ocorram para que haja o desenvolvimento de tumores. O desenvolvimento da

carcinogênese é muito complexo, pois suas várias etapas ocorrem muito lentamente (Figura 1).

As perdas da regulação celular que originam a maioria dos cânceres são decorrentes de lesões celulares. Mutações em duas grandes classes de genes estão envolvidas neste processo: os proto-oncogenes e os genes supressores tumorais. Os proto-oncogenes, quando ativados, originam os oncogenes e causam a ativação excessiva da promoção do crescimento. Tanto o aumento da expressão gênica como a síntese de um produto hiperativo favorecerá esse resultado (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999).

Os genes supressores tumorais normalmente limitam o crescimento celular, atuando na regulação desse processo. Vários genes codificam proteínas que auxiliam na regulação do crescimento celular ou na morte celular por apoptose; outros codificam proteínas que participam no reparo do DNA lesado (VOLIN e KOCH, 2000).

Diversos carcinógenos, como exemplo o benzo[a]pireno, são chamados carcinógenos completos, por serem iniciadores e promotores da carcinogênese. Alguns são tidos como carcinógenos incompletos, pois só leva a uma transformação maligna se ocorrer uma promoção. Entretanto, a dose é importante para que um promotor exerça seu efeito. No caso do carbamato de etila (uretano), sua ação em pulmão de fetos de animais é de um carcinógeno completo e em pele de camundongos é de um carcinógeno incompleto (NAIR *et al.*, 2000).

Figura 1 – Etapas da carcinogênese química.

Vários estudos de monitoramento de populações têm sido realizados para avaliar o risco para a saúde humana relacionado à exposição a mutágenos ambientais. Os xenobióticos atravessam as membranas celulares por diferentes mecanismos, dependendo de suas propriedades físico-químicas, e são transportados pelo sangue e pela linfa para os diversos tecidos, fixando-se a vários componentes celulares, conforme sua natureza química. São excretados através da urina, bile, fezes, ar expirado, leite, suor e outras excreções, sob forma inalterada ou biotransformada. Algumas substâncias sofrem degradação não enzimática, enquanto outras são metabolizadas somente na presença e sob ação de enzimas (GUENGERICH, 2000).

Muitos estudos epidemiológicos moleculares são realizados para a elucidação da relação entre a ocorrência de lesões em DNA (quebras, adutos, oxidação, etc.) e o risco de câncer em humanos, que geram hipóteses acerca dos mecanismos básicos que levam ao desenvolvimento de tumores. No que diz respeito à formação de adutos carcinógeno-DNA, ocorrem muitas variações entre os indivíduos, sugerindo que os determinantes genéticos do metabolismo de carcinógenos, reparo do DNA e controle do ciclo celular podem contribuir para as consequências dos danos ao DNA (POIRIER; SANTELLA; WESTON, 2000).

1.1.1 Vias de ativação de xenobióticos

As reações de oxidação, redução e hidrólise fazem parte da primeira fase de biotransformação de xenobióticos (fase I). Os citocromos P-450 (CYP450) e as enzimas que compõem seu sistema estão envolvidos em grande parte nas reações de biotransformação de xenobióticos lipofílicos (GUENGERICH, 2000).

Geralmente esse sistema leva a detoxificação de xenobióticos lipofílicos, uma vez que compostos menos lipofílicos são gerados, facilitando sua excreção. Porém, eventualmente são formados intermediários eletrofílicos reativos que podem interagir com biomoléculas (DNA, RNA, proteínas, lipídeos) e provocar lesões.

CYP450 ativam, por exemplo, os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), presentes na fumaça de cigarro, poluição atmosférica e dieta. As formas de CYP mais importantes para ativação de carcinógenos pertencem às famílias 1–3, e exibem especificidades sobrepostas por diversos substratos e padrões de expressão em tecido específico. Por exemplo, a CYP1A1 é a forma mais importante em pulmão de humanos, CYP1A2, CYP2A6, CYP2E1 e CYP3A4 são expressas principalmente no fígado, e CYP1B1 é expressa em quase todos órgãos com exceção do fígado e pulmão (LUCH, 2005). Os genes de várias enzimas CYP foram clonados e expressos em cepas de bactérias utilizadas em ensaios genotóxicos, facilitando a avaliação direta do potencial mutagênico para o homem acerca de um composto ou mistura ambiental (COOPER e PORTER, 2000).

A biotransformação de fase I introduz ou expõe grupos –OH, –NH₂, –SH ou –COOH nos substratos, os quais acabam se tornando sítios para a biotransformação de fase II, como exemplificado na figura 2. Moléculas polares endógenas como glutatona, ácido glicurônico e sulfato são adicionadas enzimaticamente aos grupos funcionais expostos, por ação de glutatona S-transferases (GSTs), glicuroniltransferases e sulfotransferases (SULTs), respectivamente. O grupo acetil menos polar também é adicionado por O- e N-acetiltransferases (NATs).

Figura 2 – Exemplos de biotransformação de fase I e II.

Nesse processo, intermediários eletrofílicos também podem ser gerados, como ilustrado na figura 3 (LUCH, 2005). Assim, enzimas como SULT, NAT e GST, tidas originalmente como envolvidas na detoxificação nos passos de biotransformação, também podem contribuir para a ativação de pró-carcinógenos (LUCH, 2005). A ativação da aflatoxina B1 (AFB₁) e 2-acetilaminofluoreno (AAF) requer a atividade de CYP450 (CYPs). O CYP3A4 ativa a AFB₁, resultando no óxido exo-8,9 de AFB₁. O AAF é convertido pela CYP1A2 em *N*-hidroxi-AAF que pode ser conjugado ao sulfato pela sulfotransferases, formando o *N*-sulfoxi-AAF.

Figura 3 – Conversão enzimática de alguns pró-carcinógenos humanos para os metabólitos reativos com DNA. As setas vermelhas apontam a posição do ataque nucleofílico (DNA, proteína, GSH). AFB₁ (Aflatoxina B₁), AAF (2-acetilaminofluoreno), GST (glutathione S-transferase), GT DP (glutamil transpeptidase, dipeptidase), CYP3A4 (citocromo P450), SULT (sulfotransferase). Adaptado de LUCH, 2005.

Além da geração de intermediários eletrofilicos que podem se adicionar ao DNA e outras biomoléculas, o processo de biotransformação de xenobióticos também leva à geração de espécies reativas de oxigênio. Aumento de dano oxidativo, avaliado através da análise dos níveis de 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina (8-oxodGuo) em lesões pré-neoplásicas e neoplásicas de ratos expostos a carcinógenos (VAN CAMPEN *et al.*, 2002) foi observado, sugerindo que o estresse oxidativo gerado pela exposição aos carcinógenos esteja relacionado à carcinogênese.

Bases oxidadas e adutos de DNA que escapam dos mecanismos de reparo celular podem resultar em mutações permanentes e iniciar, portanto, o processo de carcinogênese. Vários mecanismos de reparo do DNA atuam de forma sobreposta para remover do DNA grande parte das lesões mutagênicas. Os mais estudados são: reparo por excisão de bases, reparo por excisão de nucleotídeos, reparo por reversão da lesão e reparo recombinacional (WOGAN *et al.*, 2004).

O reparo por excisão de bases (BER) utiliza enzimas glicosilases para remover bases lesadas. Em seguida, AP endonucleases cortam a ligação de açúcar fosfato na posição da base perdida. Poucos nucleotídeos da fita de DNA são retirados por exonucleases, a lacuna é preenchida por ressíntese e o corte remanescente é fechado pela DNA ligase III.

O mesmo processo é utilizado para reparar despurinações espontâneas. O reparo por excisão de nucleotídeos (NER) utiliza diversas proteínas que participam do reconhecimento da lesão (exemplos: proteínas XP como XPC, XPA, XPD e RPA) e da clivagem do sítio contendo a lesão (exemplos: ERCC1-XPF e XPG), com remoção de um fragmento contendo de 24 a 32 nucleotídeos. Em

seguida a DNA polimerase sintetiza o novo fragmento de DNA com o auxílio do molde da fita complementar, finalizando o processo de reparo com a restauração da molécula original através da ação da DNA ligase.

No reparo por reversão da lesão há o reparo direto da base lesada sem a sua substituição. Esse tipo de reparo é também conhecido como reparo direto e é dividido em três tipos: fotorreativação, alquiltransferência e o reparo direto oxidativo. Na fotorreativação, o dano causado por irradiação UV (ex., dímero de pirimidina) é revertido pela utilização da luz visível. Esse tipo de reparo não ocorre em eucariontes, sendo observado apenas em bactérias. A alquiltransferência é uma forma usada para reparo de lesões decorrentes da adição de grupos alquil às bases de DNA. Nesse tipo de reparo uma proteína com atividade de alquiltransferase remove, com o auxílio de resíduos de cisteína, o grupo alquil da base. É um processo específico e custoso, pois a proteína não é regenerada após este processo. Já o reparo direto oxidativo promove a liberação do grupo metila na forma de formaldeído e, desse modo, reverte a lesão.

O reparo por recombinação homóloga é necessário para corrigir quebras de dupla fita de DNA, sendo que ocorre com maior eficiência na fase S do ciclo celular, por ser possível usar a informação da cromátide irmã. Em outras fases do ciclo há a predominância do reparo de quebras de dupla fita por junção de extremidades não homólogas, sendo que nesse caso há maior chance de ocorrência de mutações devido à modificação das extremidades através da deleção ou adição de nucleotídeos (AGNEZ-LIMA *et al.*, 2003).

A incorporação de técnicas de química e biologia molecular permite que sejam construídos modelos de DNA com lesões em sítios específicos para que seja possível a avaliação do potencial mutagênico e do reparo dessas lesões

(MARNETT e PLASTARAS, 2001). A importância das vias de reparo de DNA para a redução da incidência de câncer tem sido demonstrada nos estudos de várias doenças humanas que envolvem deficiência de mecanismos de reparo (por exemplo, *Xeroderma Pigmentosum*, Síndrome de Cockayne) e em modelos de animais transgênicos (BOER e HOEIJMAKERS, 2000).

A perda da regulação do crescimento celular característica dos vários tipos de câncer ocorre quando duas classes importantes de genes são atingidas: os proto-oncogenes e os genes supressores de tumor. Os proto-oncogenes (*c-fos*, *c-myc*, *c-jun*, *K-ras*, etc.) estão usualmente relacionados com o crescimento celular. Eles codificam fatores de transcrição, fatores de crescimento, receptores para esses fatores, proteínas envolvidas na transdução do sinal dos receptores da superfície celular para o núcleo, ou proteínas envolvidas no controle da morte celular. Mutações em proto-oncogenes podem levar a um aumento da proliferação celular e ao desenvolvimento de tumores (VOLIN e KOCH, 2000).

Existem vários pontos de checagem ao longo do ciclo celular pelos quais as células só passam se tiverem cumprido certas exigências, como por exemplo, terem completado a replicação do DNA ou atingido um tamanho mínimo. Esse tipo de controle é essencial para atrasar a mitose até que a replicação do DNA tenha sido completada na fase S ou tenha sido efetuado o reparo de possíveis danos a essa molécula. Os genes envolvidos no bloqueio da divisão celular são chamados genes supressores de tumor. Um gene importante pertencente a essa classe é o p53. A proteína p53 é um fator de transcrição que age no sentido de bloquear a divisão celular. O gene p53 é ativado em resposta a danos ao DNA ou alterações anormais em grupos de nucleosídeos precursores. Seu produto aumenta a transcrição de vários outros genes, incluindo p21 (o qual codifica um

inibidor da ciclina quinase) e *GADD45* (relacionado com a parada de crescimento na presença de danos ao DNA). A expressão do gene p53 é aumentada em células submetidas a estresse causador de danos ao DNA (raios X, raios γ e luz UV, por exemplo) e a replicação do DNA pára até que os danos sejam reparados. O estímulo do gene p53 também pode desencadear apoptose. Se ambos os alelos do gene p53 forem inativados, as células entram no processo de divisão com o DNA danificado. Mutações nos genes p53 são lesões comuns em cânceres humanos, sendo encontradas em mais de 50% dos casos (DIAMANTIS *et al.*, 1994).

Análises utilizando adutos de DNA e metabólitos dos carcinógenos em urina como biomarcadores moleculares sugerem que os indivíduos diferem na suscetibilidade a esses carcinógenos. Polimorfismos das enzimas de ativação metabólica e detoxificação, como também de genes envolvidos no reparo do DNA podem contribuir para essa variabilidade (WOGAN *et al.*, 2004). Exposições variáveis e diferenças em um grande número de genes complicam a estimativa de riscos individuais.

O desenvolvimento de métodos analíticos sensíveis para a detecção de danos em DNA é de fundamental importância para que se possa avaliar a contribuição desses danos para a carcinogênese.

1.2 Fontes exógenas e endógenas de danos em DNA

Como já dissemos anteriormente, é importante ressaltar que, em geral, substâncias eletrofilicas são capazes de reagir com sítios nucleofílicos de macromoléculas biológicas formando adutos. A formação de adutos com o DNA é uma etapa crítica na carcinogênese química, e a detecção dos adutos em níveis

aumentados em fluidos biológicos pode servir como bioindicador de risco de desenvolvimento de câncer e outras doenças (POIRIER, 2004).

No caso do desenvolvimento de tumores há um intervalo de 20 a 40 anos entre a exposição do indivíduo ao carcinógeno e a detecção clínica do tumor. As fontes de dano ao DNA podem ser divididas em: (i) agentes exógenos, como xenobióticos e (ii) agentes endógenos, como as moléculas reativas geradas por processos celulares normais (por exemplo, espécies reativas de oxigênio e nitrogênio). No seu processo de biotransformação, xenobióticos podem ser convertidos em intermediários reativos que ao interagirem covalentemente com o DNA podem levar a mutações e ao câncer. Tais intermediários reativos podem também interagir com proteínas e causar citotoxicidade e imunotoxicidade. Espécies reativas de oxigênio (EROs) podem ser geradas nos processos enzimáticos de biotransformação de xenobióticos ou ainda por transferência de elétrons de intermediários gerados nesse processo para o oxigênio molecular. As EROs podem lesar o DNA e outras biomoléculas, como proteínas e lipídios. No caso de oxidação de ácidos graxos das membranas celulares, é desencadeado o processo de peroxidação lipídica que também gera uma série de intermediários reativos (hidroperóxidos, aldeídos, radicais lipídicos). Todos esses processos contribuem para o aparecimento de mutações e o desenvolvimento de doenças, como o câncer (figura 4). Danos ao DNA provocados por substâncias reativas geradas endogenamente incluem: alquilação, depurinação, desaminação, oxidação, quebras que podem ser aumentadas no caso de ser desencadeada uma situação de estresse oxidativo. Foi calculado que aproximadamente dez mil locais de depurinação são gerados por célula por dia e um número maior resulta de um aumento da geração de espécies reativas de oxigênio (WOGAN *et al.*, 2004).

Figura 4 – Fontes de lesões em biomoléculas. (EROs - Espécies Reativas do Oxigênio).

As lesões desencadeadas por fontes endógenas e/ou exógenas devem ocorrer em frequência acima da capacidade de reparo do DNA para que mutações possam se fixar e levar a alterações nas funções de genes críticos para a manutenção da estabilidade do genoma. Alguns desses genes são os envolvidos

no reparo do DNA, na segregação cromossômica, no gerenciamento de danos ao DNA, na apoptose. Uma vez alterados esses genes, a célula se torna mais susceptível a novas mutações, adquirindo um fenótipo conhecido como “fenótipo mutador”. A partir daí, mutações em proto-oncogenes e genes supressores de tumor podem ocorrer mais facilmente e desencadear o processo de carcinogênese (LOEB; LOEB; ANDERSON, 2003; WOGAN *et al.*, 2004).

Um fenótipo mutador poderia explicar o grande número de mutações encontradas no câncer e provê um mecanismo para a geração de mutações em um número limitado de genes relacionados ao câncer (WOGAN *et al.*, 2004). Alterações múltiplas nos cromossomos foram identificadas na maioria dos tipos de tumores e envolvem translocações, amplificações e aneuploidia. Em alguns tumores há evidência de uma ordem seqüencial para mutações em genes fundamentais para a estabilidade do genoma durante a progressão do tumor (WOGAN *et al.*, 2004).

A contribuição relativa das vias exógenas e endógenas para o aumento das mutações ainda é assunto de debate e estudos quantitativos comparativos incluindo lesões em DNA induzidas diretamente pelo agente e indiretamente por estresse oxidativo precisam ser realizados (DE BONT e VAN LAREBEKE, 2004). As lesões mutagênicas geradas por espécies reativas de oxigênio/nitrogênio e produtos de peroxidação lipídica são de grande interesse por permitirem intervenção farmacológica através da indução de defesas antioxidantes, as quais contribuem para a diminuição dos níveis dessas lesões e são importantes para a prevenção do envelhecimento, câncer e outras condições degenerativas (DE BONT e VAN LAREBEKE, 2004).

8-Oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina (8-oxodGuo) é uma importante lesão gerada por ataque de radical hidroxila (HO[•]) ou oxigênio singlete (¹O₂) à base guanina do DNA e, por ser de fácil detecção, é considerada um marcador de dano oxidativo ao DNA. Suas propriedades biológicas foram amplamente investigadas, tendo sido verificado que é uma lesão mutagênica em bactérias e em células de mamífero, levando principalmente a transições G → T, as quais são muito encontradas em genes supressores de tumor e proto-oncogenes mutados (estudos revisados por LOUREIRO *et al.*, 2002).

Devido à sua abundância nas células e suscetibilidade à oxidação, os ácidos graxos poliinsaturados são também 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 (LOUREIRO, 2000).

A decomposição dos hidroperóxidos lipídicos (LOOH) é importante porque, além de gerar radicais que propagam a peroxidação lipídica, gera produtos não radiculares (aldeídos, cetonas, epóxidos, entre outros) relativamente estáveis que podem atingir pontos distantes do local em que se formaram (VACA; WILHELM; HARMS-RINGDAH, 1988). A peroxidação lipídica tem sido associada ao desenvolvimento de algumas condições patológicas induzidas por exposição a agentes oxidantes. Alguns exemplos são a injúria devida à isquemia – reperfusão (GRUNE; SIEMS; SCHNEIDER, 1993), a toxicidade hepática devida ao tetracloreto de carbono (MORROW *et al.*, 1992), a carcinogênese (NAIR *et al.*, 2000), a aterogênese (SALOMON *et al.*, 2000) e a formação de pigmentos de lipofucsina associados ao envelhecimento (HIDALGO; ZAMORA, 2000). Considerando que os aldeídos α,β -insaturados (aqueles que apresentam uma dupla ligação C=C

conjugada com o grupo carbonila), variantes estruturais dos mesmos (tais como 4-hidroxiacetaldeídos e epoxiacetaldeídos) e malonaldeído são agentes alquilantes com capacidade de se ligarem covalentemente a grupos nucleofílicos presentes em DNA, peptídeos e proteínas, provocando alterações nas funções dessas moléculas, muitos trabalhos têm sugerido a implicação desses aldeídos em processos degenerativos associados ao estresse oxidativo (MARNETT e PLASTARAS, 2001; LOUREIRO *et al.*, 2002).

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 potenciais ferramentas para o estudo do estresse oxidativo, da etiologia do câncer e para a avaliação da eficácia de agentes quimiopreventivos contra danos em DNA. Tem se estudado muito para que seja possível elucidar as fontes, o significado toxicológico e as consequências genéticas dessas lesões em 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).

1.3 Adutos de DNA como biomarcadores

Vários são os parâmetros biológicos que podem ser alterados como resultado da interação do agente químico com o organismo. Entretanto, esses parâmetros só podem ser utilizados como indicadores biológicos ou biomarcadores se houver correlação com a intensidade da exposição e/ou o efeito biológico da substância.

Desta forma, o biomarcador compreende toda substância ou seu produto de biotransformação, assim como qualquer alteração bioquímica precoce, cuja determinação nos fluidos biológicos, tecidos ou ar exalado avalie a intensidade da exposição e o risco à saúde (WHO, 1993).

Os biomarcadores fornecem uma ligação crítica entre a exposição à substância ou dose interna e o prejuízo à saúde, e eles são valiosos na avaliação de risco. Contudo, existe uma necessidade de identificar e validar para cada sistema orgânico esses parâmetros característicos que são indicativos de indução de disfunção orgânica, alteração clínica e toxicidade, além de estabelecer a especificidade e sensibilidade de cada biomarcador e seu método para determinação (GARCEA *et al.*, 2003).

Para a determinação da relação causal entre a exposição a xenobióticos e o desenvolvimento de doenças, uma poderosa ferramenta nos estudos epidemiológicos tem sido o uso de biomarcadores. A descoberta e validação de biomarcadores que representam meios sensíveis e seletivos para a avaliação da exposição e riscos de danos biológicos têm ocorrido graças aos avanços em métodos analíticos e de biologia molecular. Sensibilidade e seletividade na detecção são desejáveis nos casos de exposição às baixas concentrações de xenobióticos presentes no meio ambiente. O processo de validação desses biomarcadores envolve estudos *in vitro*, em animais experimentais e estudos epidemiológicos em humanos (figura 5). No caso dos carcinógenos genotóxicos, quando conhecidos os mecanismos principais pelos quais eles interagem com o DNA, as lesões geradas *in vitro* (adutos de DNA) podem ser separadas e utilizadas na padronização de métodos analíticos para a sua detecção bastante sensível em modelos animais expostos às substâncias em estudo. Nos modelos animais

podem ser feitas correlações entre a dose de exposição ao carcinógeno e o nível gerado de lesão no DNA do órgão alvo de carcinogênese, nos leucócitos e, após o reparo, na urina. Também se faz correlações entre os dois parâmetros anteriores e o desenvolvimento de tumores. E nos estudos de quimioprevenção, é possível avaliar se a presença do biomarcador se relaciona com a doença.

Quando verificado que o biomarcador (exemplo, aduto de DNA) se relaciona com a exposição ao carcinógeno e com o risco de desenvolvimento da doença nos estudos em animais, iniciam-se os estudos epidemiológicos em humanos, onde esse mesmo biomarcador é utilizado para avaliar a relação entre a exposição humana ao carcinógeno e o desenvolvimento do câncer. Muitos anos de estudo são necessários para que se tenha um biomarcador validado (WOGAN *et al.*, 2004; SANTELLA *et al.*, 2005; MIGLIORE *et al.*, 2006).

Os biomarcadores moleculares de carcinogênese têm algumas características importantes como: devem ser moléculas quantificáveis envolvidas em eventos fisiológicos ou patológicos que ocorrem entre a exposição a carcinógenos exógenos e endógenos e o desenvolvimento do câncer; devem permitir o diagnóstico precoce das alterações esperadas para o desenvolvimento do câncer antes que os tumores apareçam; e também, devem ser detectados em fluídos como sangue e urina, para que não seja necessário fazer a biópsia de tecidos (DE BONT e LAREBEKE, 2000; TURESKY e VOUROS, 2004).

Figura 5 - Processo de validação de biomarcadores em animais experimentais e estudos epidemiológicos em humanos. Adaptado de WOGAN *et al.*, 2004.

Tradicionalmente, os biomarcadores utilizados em epidemiologia molecular, para avaliação da exposição individual a xenobióticos, identificação de alterações clínicas como marcadores iniciais de doença e determinação de susceptibilidade genética, são divididos como:

- Biomarcadores de dose interna: indicam a quantidade da substância absorvida pelo indivíduo. Em questionários, são importantes para eliminar problemas de informação sobre exposição. Quase sempre revelam a exposição recente (depende da meia-vida). São muito sensíveis e específicos para a exposição e junto com biomarcadores de efeito ou de dose biologicamente efetiva, podem servir para a determinação de uma relação dose-resposta;
- Biomarcadores de dose biologicamente efetiva: mostram a quantidade de material reativo que atingiu o tecido em estudo (por exemplo, adutos xenobióticos-biomoléculas);
- Biomarcadores de efeito: servem para medir as alterações fisiológicas ou bioquímicas associadas com doenças (por exemplo, aberrações cromossômicas, mutações em genes alvos, etc.);
- Biomarcadores de susceptibilidade: mostram se um indivíduo tem alguma limitação para lidar com a exposição química (por exemplo, polimorfismo de enzimas envolvidas no metabolismo de carcinógenos).

A epidemiologia tradicional estuda a distribuição das doenças e suas causas em populações humanas, ou seja, estuda os fatores que determinam a frequência e a distribuição das doenças em humanos, enquanto que na epidemiologia molecular são utilizados os biomarcadores definidos acima para

que possa ser melhor compreendida a causa da doença, sendo possível o estabelecimento de relações causais entre exposição e doença. Na figura 6, a caixa preta simboliza as fases não estudadas pela epidemiologia tradicional. (CHEN e HUNTER, 2005).

Figura 6: Epidemiologia molecular promovendo a abertura da “caixa preta” da relação causal entre a exposição a xenobióticos e o desenvolvimento de câncer (adaptado de CHEN e HUNTER, 2005).

Adutos de DNA são bastante utilizados como biomarcadores de exposição, sendo que indicam a dose biologicamente efetiva da substância em estudo. Também são úteis em estudos de quimioprevenção da carcinogênese (KYRTOPOULOS *et al.*, 2001; GARCEA *et al.*, 2003). Um exemplo clássico da

epidemiologia molecular que demonstra a importância do uso de adutos de DNA como biomarcadores é o conjunto de estudos realizados desde a década de 1960 que culminou com a validação da relação causal entre a exposição a aflatoxinas e o risco de carcinoma hepatocelular em humanos (aproximadamente 40 anos após o início dos estudos). Além da determinação dessa relação causal, a utilização de adutos de DNA (aduto aflatoxina B1-guanina) como biomarcadores tem permitido a investigação da ação quimiopreventiva de alguns compostos, como clorofilina e oltipraz, com potencial de serem utilizados pela população exposta a aflatoxinas e por auxiliarem na contribuição para uma redução do risco de desenvolvimento de câncer hepático por essa população. Outra conclusão desses estudos foi à verificação de um efeito sinérgico entre a exposição ao vírus da hepatite B e a exposição a aflatoxinas no desenvolvimento de carcinoma hepatocelular nas populações estudadas. Intervir no processo de lesão desencadeado pelas aflatoxinas contribui significativamente para a redução do risco de câncer hepático mesmo entre os infectados com o vírus da hepatite B (WOGAN *et al.*, 2004).

1.4 Estudos sobre a toxicidade do tetraidrofurano

Tetraidrofurano (THF) é um solvente muito utilizado industrialmente. Alguns exemplos de uso são: meio para reação de Grignard; síntese de butirolactona, ácido succínico e diacetato de 1,4-butanodiol; fabricação de artigos para embalagem, transporte e estoque de alimentos; indústria farmacêutica; solvente para tintas, resinas, adesivos; e intermediário químico no solvente de polimerização utilizado para síntese de borrachas, resinas e plásticos (CHAPMAM *et al.*, 2006). É volátil (ponto de ebulição 67°C, pressão de vapor 17,5 kPa a 20°C)

e, portanto, considerável concentração de vapor pode ser encontrada nos locais de trabalho, havendo um grande potencial de exposição ocupacional entre seres humanos.

O THF é também um contaminante indireto encontrado em alimentos, resultado da sua presença na superfície de contato de artigos utilizados no processamento e estoque desses alimentos. Vapores de THF podem causar irritação em mucosas, sistema respiratório e pele. Danos ao fígado e rim foram observados em ratos expostos a concentrações acima de 3000 ppm (8 h por dia, 20 dias). Aspartato aminotransferase, colinesterase e níveis de açúcar no sangue se mostraram elevados em ratos expostos a 1000 ou 5000 ppm (CHHABRA *et al.*, 1998; ELOVAARA; PFAFFLI; SAVOLAINEN, 1984; HELLWIG; GEMBARDT; JASTI, 2002; NTP, 1998).

O THF é um potente narcótico. A toxicidade aguda pode levar a narcose, hipotonia muscular e perda de reflexos da córnea, seguidos por coma e morte. A provável dose oral letal em humanos é de 50 - 500 mg/kg (NTP, 1998). Ensaio de genotoxicidade realizados *in vitro* e *in vivo* (utilizando *Salmonella typhimurium*, células de ovário de hamster chinês, *Drosophila melanogaster*, células da medula óssea de camundongos e eritrócitos de camundongo) não apontaram o THF como mutagênico ou genotóxico (NTP, 1998). A IARC (1998) não classifica o THF como mutagênico ou carcinogênico. Entretanto, há evidência de atividade carcinogênica em ratos machos após inalação (600 ou 1800 ppm, 6h/dia, 525 dias), nos quais foi observada incidência aumentada de carcinoma ou adenoma epitelial tubular renal. Clara evidência de carcinogênese em camundongos fêmeas (inalação de 1800 ppm, 6h/dia, 525 dias) foi também obtida, com elevada incidência de neoplasia hepatocelular (CHHABRA *et al.*, 1998).

As diferenças entre ratos e camundongos/machos e fêmeas no que se refere aos neoplasmas induzidos por THF podem ser devidas a diferenças no metabolismo e distribuição do THF. Existe limitada informação na literatura a respeito da toxicocinética e toxicidade celular desse solvente amplamente utilizado (NTP, 1998) o que, juntamente com os poucos estudos de genotoxicidade, dificulta o estabelecimento de mecanismos que expliquem os efeitos observados em ratos e camundongos.

Recentemente foi verificado que camundongos (machos e fêmeas) expostos a vapores de THF (5400 mg/m³, 6 h/dia, 5 ou 20 dias) apresentaram indução da atividade do CYP450 e da proliferação celular em fígado de camundongos (fêmeas) e rim de ratos (machos) (GAMER *et al.*, 2002).

Ravenzwaay e colaboradores (2003) investigaram a indução da proliferação celular no fígado de ratos expostos ao THF. No tratamento dos ratos com THF (15.000 mg/m³) ocorreu indução da enzima CYP450 microsomal no fígado. O conteúdo do CYP450 praticamente dobrou (+98%), e as atividades de pentoxiresorufina-O-deetilase (PROD) e etoxiresorufina-O-deetilase (EROD) foram aumentadas em 600% e 160%, respectivamente (GAMER *et al.*, 2002). Os ratos também foram pré-tratados com 1-aminobenzotriazole (ABT), um inibidor não específico de CYP450, sendo verificado que a supressão do metabolismo de THF por ABT causou uma resposta mitogênica adicional na região midzonal. A resposta proliferativa do fígado indica que os efeitos mitogênicos são relacionados com as concentrações de THF no tecido e não com os metabólitos de THF. Essa observação poderia explicar a ausência de uma resposta tumorigênica em ratos machos, uma vez que o metabolismo de THF em ratos machos ocorre a uma taxa mais alta que em ratos fêmeas e os níveis de THF restantes podem não ser

suficientemente altos para causar uma resposta mitogênica em machos (RAVENZWAAY *et al.*, 2003).

No meio ambiente o THF pode ser utilizado no tratamento de águas para evitar contaminação microbiana, que pode surgir em águas represadas. O THF favorece a degradação dos organismos presentes no reservatório de água e é eliminado por evaporação (GROVE e STEIN, 2005).

Em um estudo sobre o transtorno do comportamento sexual em ratos machos realizado por Mani e col. (2005), foi verificado que ratos tratados com THF tiveram seu comportamento sexual alterado, com perda de libido mesmo com a estimulação das fêmeas. Nesse estudo é citado que trabalhadores de indústrias que utilizaram THF durante a execução de seus trabalhos ficaram acometidos por transtornos endócrinos e apresentaram baixa libido e baixa contagem de esperma, abrindo a possibilidade para ação do THF como interferente endócrino.

Cartigny e colaboradores (2001) descreveram um caso de envenenamento por THF utilizado como solvente em uma tinturaria, após analisar o espectro de ^1H RMN dos fluídos biológicos da paciente, onde foi encontrado um sinal característico de 1.90 ppm relacionado aos dois grupos β -metilênicos do THF. Além disso, foi possível detectar a presença de produtos de biotransformação, como gamaidroxibutirato (GHB) no sangue e urina da paciente (figura 7). A detecção de GHB indica a possível biotransformação do THF por uma via oxidativa. A presença do THF e do GHB foi confirmada por GC/MS.

Figura 7 – Possível via de biotransformação oxidativa do THF (CARTIGNY *et al.*, 2001).

Loureiro e colaboradores (2005) caracterizaram estruturalmente três adutos estáveis derivados da reação de THF oxidado com 1,*N*²- ϵ dGuo. O provável produto que dá origem a esses adutos é o 4-hidroxi-butanal resultante da abertura do anel de THF hidroxilado na posição α (THF-OH). Revisando a literatura verificamos que THF-OH é um produto do metabolismo de *N*-nitrosopirrolidina, uma nitrosamina cíclica carcinogênica formada endogenamente e encontrada em

alimentos e fumaça de cigarro. Um dos principais produtos resultantes da reação de α -acetoxi-*N*-nitrosopirrolidina com dGuo é o aduto THF-dGuo (pouco estável) resultante da reação de THF-OH, via abertura do anel, com o grupo amino exocíclico da dGuo (YONG-SCIAME *et al.*, 1995). Essas observações nos permitiram considerar a hipótese de que o THF oxidado *in vivo* poderia reagir com bases do DNA e originar lesões que explicariam a carcinogênese observada experimentalmente em ratos e camundongos, abrindo a possibilidade dessa linha de investigação (LOUREIRO *et al.*, 2005).

A caracterização estrutural de adutos específicos que possam ser correlacionados a uma determinada exposição química constitui uma importante ferramenta para que sejam avaliados os riscos da exposição.

OBJETIVOS

2. Objetivos

1. Investigar a formação de adutos de THF com 2'- desoxiadenosina e 2'- desoxicitidina *in vitro*, determinando suas estruturas.
2. Definir condições cromatográficas para análise dos adutos por HPLC/ESI/MS-MS em DNA.
3. Investigar a ocorrência de dano oxidativo em órgãos de camundongos expostos a THF.

MATERIAL E MÉTODOS

3. Material e Métodos

3.1 – Reagentes

Descrição dos reagentes utilizados no projeto:

Ácido fórmico, ácido clorídrico, hidróxido de sódio, cloreto de magnésio hexaidratado, fosfato de potássio monobásico, sacarose, MgCl_2 , acetato de sódio, isopropanol, etanol foram adquiridos da Merck (Darmstadt, Alemanha). Tetraidrofurano, acetonitrila, metanol foram adquiridos da EM Science (Gibbstown, NJ). Sulfato de Ferro (II) foi adquirido da Aldrich (Milwaukee, WI). Clorofórmio foi obtido da Cinética Química (São Paulo, Brasil). A água foi purificada em um aparelho Milli-Q da Millipore (Bedford, MA). Tris-HCl, Fosfatase alcalina, Fosfodiesterase 1, DNase I, EDTA, desferroxamina, desoxiadenosina, desoxicitidina adquiridos da Sigma (St. Louis, MO). Todos os outros reagentes foram adquiridos da Sigma (St. Louis, MO).

3.2 Equipamentos

Os espectros de absorbância foram adquiridos em um espectrofotômetro Hitachi U3000 (Tokyo, Japão).

Os espectros de ^1H e ^{13}C RMN em uma e duas dimensões foram adquiridos a 27°C em espectrômetros DPX-300 e DRX-500 MHz (Bruker, Rheinstatten, Alemanha).

Os espectros de massas com ionização por electrospray (ESI) foram obtidos em um espectrômetro com triplo quadrupolo (Quattro II - Micromass,

Manchester, U.K.) no modo positivo. As separações cromatográficas no sistema de HPLC/ESI/MS foram feitas utilizando-se um equipamento de HPLC da Shimadzu (Kyoto, Japão) incluindo duas bombas LC-10 AD, um injetor Rheodyne (Cotati, CA), um injetor automático, modelo SIL-10 AD/VP, uma válvula de troca automatizada (FCV-12AH) e um detector de absorbância, modelo SPD-10 AV/VP UV, controlados por um módulo de comunicação SCL-10A/VP-CBM 10A e os softwares Class-VP ou MassLynx (Micromass).

Para as centrifugações foram utilizadas centrífugas refrigeradas modelos 5702R e 5804R da Eppendorf (Hamburg, Alemanha) e centrífugas sem refrigeração nos modelos Mini-Spin Plus, 5415D da Eppendorf (Hamburg, Alemanha) e modelo AP56 da Phoenix (São Paulo, Brasil).

As incubações que necessitavam de agitação foram feitas em um Thermomixer 5436 da Eppendorf (Hamburg, Alemanha).

Foram utilizados agitador magnético modelo 78HW-1 Constant Temperature Magnetic Stirrer – Biomixer e balança analítica da Bioprecisa (Eletronic Balance) modelo FA 2104N.

As medidas de pH foram feitas em um potenciômetro da Denver Instrument Basic modelo C031603098 (Sigma).

Liofilizador, micromódulo E-C para secagem a baixas temperaturas acoplado à bomba de vácuo Savant, modelo VLP200 (Hollbrook, EUA) e um concentrador modelo 5301 da Eppendorf (Hamburg, Alemanha) foram utilizados para liofilização de amostras.

Nas análises por HPLC/PDA foi utilizado um sistema de HPLC da Shimadzu (Kyoto, Japão) constituído por duas bombas LC-10 AD ou LC-10Ad/VP, um injetor Rheodyne (Cotati, CA), um detector de arranjo de diodos, modelo SPD-

M10AV, controlados por um módulo de comunicação e pelo software Class LC-10AWS (Class-VP). As separações no HPLC foram feitas utilizando uma coluna analítica (Luna C18(2) (250 mm x 10 mm i.d., 10 µm) da Phenomenex (Torrance, CA). A eluição ocorria através do sistema 1 utilizando água e acetonitrila. Sistema 1: 0-5 min, 5% de acetonitrila; de 5 a 30 min, 5 a 20% de acetonitrila; de 30 a 50 min, 20 a 40% de acetonitrila; e de 50 a 55 min, 40 a 100% de acetonitrila.

3.3 Determinação da concentração de peróxidos no THF

A concentração de peróxidos no THF foi determinada utilizando-se o ensaio do Fe^{2+} / alaranjado de xilenol (JIANG; WOOLLARD; WOLFF, 1991). Este método consiste na rápida oxidação de Fe^{2+} , mediada por hidroperóxidos, em condições ácidas ($\text{Fe}^{2+} + \text{ROOH} \longrightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{RO}^\cdot + \text{OH}$). Fe^{3+} forma um cromóforo com o alaranjado de xilenol que absorve em 560nm.

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 que não ocorresse autooxidação e a solução mãe de BHT foi preparada em 90% de metanol). Foi utilizado um volume de 100 µL de diferentes soluções com várias concentrações de THF em água e 900 µL da solução de Fe^{2+} / alaranjado de xilenol. A concentração de peróxidos no THF foi determinada pela medida de absorbância a 560 nm ($\epsilon = 4,3 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) multiplicada pela diluição.

3.4 Preparação e purificação dos adutos dAdo-THF e dCyd-THF

O THF oxidado (180 μ L contendo 11 mM de peróxidos e 305 mM de THF-OH) foi acrescentado a soluções de dAdo e de dCyd (5 mg) preparadas em 300 μ L de tampão acetato 0,2 M (pH 4.0) ou tampão fosfato 0,2 M (pH 7.4). Após 24 h de incubação a 37°C em um agitador, foram realizadas duas extrações com igual volume de clorofórmio. A fase aquosa foi injetada no HPLC usando o sistema 1 (descrito no item 3.2) para purificação inicial dos adutos. As frações foram eluídas de 12 a 16 min (dCyd-THF) e de 20 a 30 min (dAdo-THF) e foram coletadas, liofilizadas, e reduzidas com NaBH₄. Para redução, os adutos isolados foram dissolvidos em 1mL de tampão fosfato (0.2 M, pH 7.4) e foram adicionados 50 μ L de uma solução aquosa de NaBH₄ (90 mg/mL). Após uma noite de incubação a temperatura ambiente, os adutos reduzidos foram purificados por HPLC usando o sistema 1 (descrito no item 3.2).

3.5 Caracterização dos adutos

Os adutos foram caracterizados por análises de espectros de UV, ESI/MS, ¹H RMN, ¹H-¹H COSY e ¹H-¹³C HMQC / HMBC. O espectro de ESI/MS do aduto dAdo-THF mostrou quatro sinais importantes em: m/z 322 ([M + H]⁺, 95% intensidade relativa), m/z 251 ([M + H]⁺ - THF, 15% intensidade relativa), m/z 206 ([M + H]⁺ - 2-D-eritropentose, 100% intensidade relativa), e m/z 135 ([M + H]⁺ - 2-D-eritro-pentose - THF, 35% intensidade relativa). O espectro de ESI/MS do

aduto dCyd-THF apresenta três sinais importantes em: m/z 298 ($[M + H]^+$, 30% intensidade relativa), m/z 182 ($[M + H]^+ - 2\text{-D-eritropentose}$, 100% intensidade relativa), e m/z 111 ($[M + H]^+ - 2\text{-D-eritropentose} - \text{THF}$, 35% intensidade relativa) (figura 11).

3.5.1 – Condição de HPLC para obtenção dos espectros de massas por HPLC/ESI/MS

Análises de HPLC/ESI/MS em modo positivo foram feitas em um espectrômetro com triplo quadrupolo - Quattro II da Micromass (Manchester). O sistema de HPLC da Shimadzu descrito no item 3.2 foi utilizado para injeção das amostras. A temperatura da fonte do espectrômetro de massas foi mantida em 100°C, e os fluxos do gás de secagem e nebulização (nitrogênio) foram mantidos a 350 e 10 L/h, respectivamente. Os dados foram processados pelo software MassLynx (Micromass). A condição utilizada no HPLC para eluição dos adutos foi (sistema 2): uma coluna Luna C18(2) (150 mm, 2 mm i.d., 3 μm , Phenomenex, Torrance) eluída com um gradiente de ácido fórmico (0.1% em água) e acetonitrila (de 0 a 5 min, 5% acetonitrila; de 5 a 30 min, 5-20% acetonitrila; de 30 a 50 min, 20-40% acetonitrila; de 50 a 55 min, 40-100% acetonitrila; e de 55 a 65 min, 100-5% acetonitrila) a um fluxo de 0.12 mL/min. As amostras pré-purificadas foram dissolvidas em água e injetadas no sistema. Os espectros em MS_1 foram adquiridos no intervalo de 100-700 Da em diferentes voltagens de cone.

3.5.2 Condição de HPLC para detecção dos adutos por HPLC/ESI/MS-MS

Análises de HPLC/ESI/MS-MS em modo positivo foram feitas em um espectrômetro com triplo quadrupolo - Quattro II da Micromass (Manchester). Os adutos dAdo-THF e dCyd-THF foram analisados por monitoramento de reação múltipla (MRM). O sistema de HPLC da Shimadzu foi utilizado para injeção das amostras e limpeza da coluna analítica (Luna C18 (2) 250 mm x 4,6 mm i.d., 5 µm, Phenomenex, Torrance, CA). Os adutos foram eluídos através dessa primeira coluna com duas diferentes condições e fase móvel (ácido fórmico 0.1% em água/acetonitrila). O sistema 3 foi usado para eluição do aduto dAdo-THF, e o sistema 4 para eluição do aduto dCyd-THF. Sistema 3: de 0 a 30 min, 8-15% acetonitrila; de 30 a 31 min, 15-80% acetonitrila; de 31 a 39 min, 80% acetonitrila; de 39 a 40 min, 80-8% acetonitrila. De 0 a 8 min, 0.6 mL /min; de 8 a 9 min, 0.6-0.15 mL/min; de 9 a 30 min, 0.15 - 0.12 mL/min; de 30 a 31 min, 0.12-0.6 mL/min. Sistema 4: de 0 a 40 min, 2-8% acetonitrila; de 40 a 44 min, 8-80% acetonitrila; de 44 a 50 min, 80% acetonitrila; de 50 a 51 min, 80-2% acetonitrila. De 0 a 7 min, 0.3-0.1 mL/min; de 7 a 25 min, 0.1-0.25 mL/min; de 25 a 25.5 min, 0.25-0.1 mL/min; de 25.5 a 43 min, 0.1 mL/min; de 43 a 44 min, 0.1-0.6 mL/min; de 44 a 51 min, 0.6-0.3 mL/min. Uma terceira bomba do HPLC (LC-10AD, Shimadzu) foi usada simultaneamente para eluir uma segunda coluna (Luna C18(2) 150 mm, 2 mm i.d., 3 µm, Phenomenex) com um fluxo isocrático (0.1 mL/min) de uma solução de ácido fórmico 0.1% em água/acetonitrila (70:30), mantendo um fluxo constante da fase móvel para o espectrômetro de massas durante a análise. A posição da válvula foi trocada duas vezes para a

análise de dAdo-THF (aos 20 e aos 30 min), e para a análise de dCyd-THF (aos 36 e aos 43 min). Isto permitiu que os adutos eluídos da primeira coluna entrassem na segunda coluna para análise no MS-MS e permitiu que a primeira coluna fosse lavada enquanto os adutos estavam sendo eluídos através da segunda coluna para o espectrômetro de massas.

O DNA hidrolisado enzimaticamente foi injetado nos sistemas descritos acima. Foram monitoradas as transições m/z 324 $\Rightarrow$ 208 (dAdo-THF reduzido), e 300 $\Rightarrow$ 184 (dCyd - THF reduzido). A voltagem do cone foi mantida em 15V. A energia na câmara de colisão foi fixada em 10 eV. A pressão do gás de colisão (argônio) na célula de colisão foi ajustada para 1×10^{-3} mbar. A temperatura da fonte do espectrômetro de massas foi mantida em 100°C, e os fluxos do gás de secagem e nebulização (nitrogênio) foram mantidos a 350 e 10 L/h, respectivamente. O capilar e o eletrodo HV tiveram seus potenciais fixados em 3.10 e 0.30 kV, respectivamente.

Foram ajustados todos os outros parâmetros do espectrômetro de massas para aquisição da melhor transição $[M + H]^+ / [M + H]^+ - 2$ -D-eritropentose. Os dados foram processados usando o software MassLynx (Micromass).

3.6 Reação de THF oxidado com DNA de timo de bezerro e hidrólise enzimática

DNA de timo de bezerro (1 mg) foi dissolvido em 500 μ L de tampão acetato 0.2 M (pH 4.0) ou tampão fosfato 0.2 M (pH 7.4), onde uma alíquota de 270 μ L de THF oxidado (contendo 11 mM de peróxidos e 305 mM de THF-OH) foi adicionada. A solução resultante foi agitada a 37°C por 24 h. Após uma extração

com clorofórmio para remoção do THF, o DNA foi precipitado pela adição de 50 µL de tampão acetato de sódio 3 M (pH 5) e 1 mL de 2-propanol. A suspensão foi congelada a -20 °C e depois centrifugada a 5000g por 10 min a 4°C. O *pellet* resultante foi lavado com 2-propanol 60% (5000g, 10 min), seguido por lavagem com etanol 70% (5000g, 10 min), e dissolvido em 500 µL de água. A concentração de DNA foi determinada pela leitura da absorbância a 260 nm. Uma alíquota da solução contendo 300 µg de DNA foi acrescentada a 6 µL de tampão acetato de sódio 1 M (pH 5), seguido por digestão com 3 unidades de nuclease P1 a 37°C por 30 min. Seis microlitros de tampão Tris-HCl 1 M (pH 7.4), 6 µL de tampão da fosfatase (Tris-acetato 100 mM, acetato de magnésio 100 mM, pH 7.0) e 9 unidades de fosfatase alcalina foram adicionados, sendo as amostras incubadas por 1h a 37°C. O volume final da solução foi ajustado para 100 µL com água. As enzimas foram precipitadas pela adição de clorofórmio, e as amostras aquosas resultantes foram reduzidas com NaBH₄ (100 µL de NaBH₄ de uma solução aquosa 90 mg/mL) e depois foram injetadas no sistema de HPLC/ESI/MS-MS para as análises como descrito no item 3.5.2. O mesmo procedimento foi adotado para incubação de DNA na ausência de THF (DNA controle).

3.7 Exposição de camundongos a vapor de THF

Seis camundongos fêmeas da linhagem C57Bl/6J foram expostos ao vapor de THF, sendo que 2 mL de THF foi adicionado a cada duas horas num período diário de 6 h, durante cinco dias. A concentração do vapor de THF na caixa onde os camundongos ficaram expostos era de aproximadamente 465 ppm a cada 2h (cálculos feitos considerando-se o volume de THF adicionado ao erlenmeyer para

evaporação). Seis camundongos fêmeas controles não foram submetidos a qualquer exposição (figura 8). No quinto dia os camundongos foram sacrificados por decapitação e os fígados e rins foram removidos, lavados com NaCl 0,9% e congelados a -80°C .

Figura 08 – Esquema da exposição dos camundongos ao vapor de THF.

3.8 Extração do DNA dos órgãos dos camundongos

Os órgãos dos camundongos foram homogeneizados com 5 mL de tampão A (320 mM sacarose; 5mM MgCl_2 ; 10 mM Tris-HCl; 0,1 mM desferroxamina; Triton X100 (1%), pH 7,5) e centrifugados a 1500g por 10 minutos. Os sobrenadantes foram descartados e os precipitados foram ressuspensos em 5 mL de tampão A e centrifugados a 1500g por 10 minutos. A seguir adicionou-se em cada tubo 6 mL de tampão B (10 mM Tris-HCl; 5mM EDTA-Na_2 ; 0,15 mM desferroxamina, pH8), 350 μL de SDS (10%) e agitou-se, acrescentando-se em seguida 30 μL de RNase A (10 mg/mL em tampão C [10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA; 2,5 mM desferroxamina, pH7,4]) e 4 μL de RNase T1 (20U/ μL em tampão C) (Wang *et al.*, 1994). As amostras foram incubadas por 1 hora a 37°C . Após a incubação foram

adicionados 300 µL de proteinase K (20 mg/mL) e as amostras foram incubadas por mais 1 hora a 37°C. Após a segunda incubação as amostras foram centrifugadas a 5000g por 15 minutos. Coletou-se o sobrenadante e aos tubos foram adicionados 4 mL de solução NaI (7,6 M NaI; 40 mM Tris-HCl; 20 mM EDTA-Na₂, pH 8) e 8 mL de isopropanol. Após leve agitação para precipitação do DNA, as amostras foram guardadas no freezer por 1 dia. Em seguida as amostras foram centrifugadas a 5000g por 15 minutos, os sobrenadantes foram descartados e aos tubos foram adicionados 10 mL de isopropanol (60% em água). As amostras foram centrifugadas novamente a 5000g por 15 minutos. O DNA foi lavado com 10 mL de etanol (70% em água) e centrifugado a 5000g por 15 minutos. Adicionou-se então 300 µL de solução de desferroxamina (0,1 mM em água) e agitou-se para dissolver o DNA. A concentração do DNA foi determinada por leitura da absorbância a 260 nm.

3.9 Hidrólise enzimática do DNA para análise de 8-oxodGuo

A hidrólise enzimática do DNA para subsequente análise por HPLC/detecção eletroquímica foi feita seguindo o procedimento descrito abaixo:

Tampão Tris-HCl 0,2 M (10 µL, pH 7,4) e MgCl₂ 2 M (10 µL) foram adicionados a uma alíquota de solução contendo 100 µg de DNA. Em seguida, foi adicionada DNase 1 (1,25 unidade) e a amostra foi incubada a 37°C por 1,5h. Então foram adicionados 10 µL de tampão glicina-acetato 0,2 M (pH 10) e 0,031 unidade de fosfodiesterase 1 (PDE1) e feita nova incubação a 37°C por 1,5h. Finalmente foram adicionados 25 µL de tampão Tris-HCl- MgCl₂ 0,2 M (pH 7,4) e

3 unidades de fosfatase alcalina. A amostra foi incubada a 37°C por 1 hora. O volume final da solução foi ajustado para 200 µL com água.

3.10 Análise de 8-oxodGuo em DNA extraído de fígado e rim dos camundongos

As amostras de DNA extraídas dos órgãos dos camundongos foram hidrolisadas enzimaticamente e analisadas por um sistema de HPLC/detecção eletroquímica constituído por uma bomba (LC-10AD, Shimadzu), um injetor Rheodyne (modelo 9125i, Cotati, CA), um detector de absorbância (SPD-10A, Shimadzu), e um detector eletroquímico Coulochem II (ESA, Chemsford, MA) controlados por um módulo de comunicação (CBM 10A, Shimadzu) e o software Class LC10AWS (Shimadzu). A eluição foi realizada através de uma coluna Luna C18(2) (250 mm x 4,6 mm i.d., 5 µm, Phenomenex) com a fase móvel constituída por 8% de metanol em tampão fosfato de potássio 25 mM (pH 5,5) a um fluxo de 0,8 mL/min. Nessas condições o tempo de retenção de 8-oxodGuo foi de aproximadamente 28 min. Os potenciais dos eletrodos 1 e 2 do detector eletroquímico foram fixados em +130 mV e +280 mV para detecção de 8-oxodGuo e a absorbância foi monitorada em 254nm.

Curvas de calibração de 8-oxodGuo e dGuo foram obtidas nos intervalos das quantidades esperadas nas amostras de DNA para a quantificação, e depois determinou-se a fração molar de 8-oxodGuo/dGuo presente em cada amostra. A análise estatística foi feita utilizando-se o teste *t*-student, comparando-se duas populações (controle e tratado, N=6).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4. Resultados e Discussão

4.1 Reação de dCyd e dAdo com THF oxidado – Caracterização dos adutos formados

Em trabalho anterior do grupo foi verificado que produtos de oxidação do THF reagem com 1,*N*²- ϵ dGuo, o qual é um aduto bem conhecido de dGuo com aldeídos α,β -insaturados. Três adutos 1,*N*²- ϵ dGuo-THF foram isolados e caracterizados (LOUREIRO *et al.*, 2005). No presente trabalho investigamos a reação de THF diretamente com as bases do DNA e verificamos que o THF oxidado pode reagir com os grupos amino dos desoxirribonucleosídeos dCyd e dAdo (figura 9).

As incubações foram feitas em pH 4.0 e pH 7.4, como descrito no item 3.4, e observamos rendimentos melhores dos adutos de dAdo e de dCyd no pH 7.4. Os adutos dAdo-THF e dCyd-THF foram purificados através do sistema 1 do HPLC (descrito no item 3.2). Após a primeira coleta, foi feita repurificação através do mesmo sistema. Foram obtidos espectros de absorbância (UV) dos adutos em um detector de arranjo de diodos e foram comparados com os espectros de UV dos desoxirribonucleosídeos originais (figura 10).

Figura 9 – Cromatogramas dos produtos das incubações de (A) dAdo e (B) dCyd com THF obtidos por HPLC (sistema 1 conforme descrito no item 3.2).

Figura 10 – Espectros de absorbância dos adutos de dCyd-THF e dAdo-THF antes e após a redução com NaBH_4 . Os espectros foram obtidos por HPLC/PDA. Os espectros de absorbância dos desoxirribonucleosídeos normais estão apresentados para comparação.

Os espectros de ESI/MS indicam um aumento de 70 Da na massa molecular dos desoxirribonucleosídeos, sendo consistentes com a formação de adutos dAdo/THF (1:1) e dCyd/THF (1:1), havendo a perda de dois átomos de hidrogênio (figura 11). Observamos que os adutos dAdo-THF e dCyd-THF eram em parte convertidos de volta para os desoxirribonucleosídeos originais na fase de repurificação quando suas soluções eram deixadas à temperatura ambiente.

Figura 11 – Espectros de massas dos adutos dAdo-THF e dCyd-THF (dR = desoxirribose).

Tal observação nos levou a procurar um derivado estável para estes adutos para confirmação das estruturas por análises de ^1H RMN, ^1H - ^1H COSY e ^1H - ^{13}C HMQC/HMBC.

A incubação dos adutos com NaBH_4 após a primeira purificação teve como resultado a formação de derivados reduzidos estáveis. Os adutos reduzidos foram injetados no sistema de HPLC/ESI/MS e os espectros de massas mostram a adição de dois átomos de hidrogênio às estruturas (figura 12).

Figura 12 - Espectros de massas dos adutos dCyd-THF e dAdo-THF após reação com NaBH_4 (dR = desoxirribose).

Os espectros de ^1H RMN dos adutos dAdo-THF e dCyd-THF reduzidos (Tabelas 1 e 2) mostram uma cadeia hidroxi-butil ligada aos desoxinucleosídeos. Além dos prótons do açúcar, o aduto dAdo-THF apresenta singletes em 8.31 ppm (H-8), 8.18 ppm (H-2) e 7.82 ppm (bs, $N^6\text{-H}$); um triplete em 3.37-3.41 ppm (2H-13, $J = 6.45$ Hz); e multipletes em 1.55-1.62 ppm (2H-11) e 1.41-1.47 ppm (2H-12). O sinal correspondente a 2H-10 foi encoberto pelo sinal da água em 3.30 ppm (figura 13). O espectro de ^1H - ^1H COSY mostra que o sinal em 1.44 ppm (2H-12) correlaciona com aqueles em 1.58 ppm (2H-11) e 3.39 ppm (2H-13).

Tabela 1: Deslocamentos Químicos nos Espectros de ^1H NMR do Aduto dAdo-THF (reduzido) em $\text{DMSO-}d_6^{a, b}$

	δ (ppm)		Tipo
dAdo-THF reduzido			
H-1'	6.31-6.34	m	$\text{N}-\underline{\text{CH}}-\text{O}$
H-2'	2.68-2.74	m	$\text{CH}_2-\underline{\text{C}}$
H-2''	2.22-2.26	m	$\text{CH}_2-\underline{\text{C}}$
H-3'	4.38-4.41	m	$\text{HO}-\underline{\text{CH}}$
H-4'	3.86-3.88	m	$\text{O}-\underline{\text{CH}}$
H-5'	3.59-3.62	m	$\text{HO}-\underline{\text{CH}}_2$
H-5''	3.49-3.52	m	$\text{HO}-\underline{\text{CH}}_2$
H-8	8.31	s	$\text{N}=\underline{\text{CH}}-\text{N}$
H-2	8.18	s	$\text{N}=\underline{\text{CH}}-\text{N}$
$N^6\text{-H}$	7.82	s (largo)	$\underline{\text{H}}\text{N}-\text{C}=\text{N}$
2H-10	3.30		$\text{HN}-\underline{\text{CH}}_2-\text{CH}_2$
2H-11	1.55-1.62	m	$\text{CH}_2-\underline{\text{CH}}_2-\text{CH}_2$
2H-12	1.41-1.47	m	$\text{CH}_2-\underline{\text{CH}}_2-\text{CH}_2$
2H-13	3.37-3.41	t	$\text{HO}-\underline{\text{CH}}_2-\text{CH}_2$

^a m, multiplete; t, triplete; d, dublete; s, singlete.

^b espectros adquiridos em um espectrômetro de RMN DRX 500.

O espectro de ^{13}C RMN mostra 14 sinais como esperado para a estrutura do aduto: C-2 (153 ppm), C-4 (148 ppm), C-5 (120 ppm), C-6 (155 ppm), C-8 (139 ppm), C-10 (69 ppm), C-11 (30 ppm), C-12 (26 ppm), C-13 (61 ppm), C-1' (84 ppm), C-2' (encoberto pelo sinal do DMSO a 40 ppm), C-3' (71 ppm), C-4' (88 ppm) e C-5' (62 ppm).

Figura 13 - Espectros de ^1H RMN de dAdo-THF reduzido

No caso do aduto dCyd-THF reduzido, observamos os prótons do açúcar, os dubletes em 7.69-7.71 ppm (H-6, $J = 7.5$ Hz) e 5.70-5.72 ppm (H-5, $J = 7.5$ Hz), os tripletes a 7.64-7.66 ppm (N⁴-H, $J = 5.4$ Hz) e 3.37-3.40 ppm (2H-10, $J = 6.45$ Hz) e multipletes em 3.19-3.24 ppm (2H-7), 1.47-1.52 ppm (2H - 8) e 1.40-1.46 ppm (2H-9). Neste caso, N⁴-H (7.65 ppm) acoplou com 2H-7 (3.21 ppm), confirmando o sítio da reação (figura 14). O espectro de ¹H-¹H COSY também mostra que o sinal em 1.43 ppm (2H -9) correlaciona com aqueles em 1.49 ppm (2H-8) e 3.38 ppm (2H -10), o sinal em 1.49 ppm (2H-8) correlaciona adicionalmente com aquele em 3.21 ppm (2H-7), e o sinal em 7.70 ppm (H-6) correlaciona com aquele em 5.71 ppm (H-5).

Desta forma, caracterizamos um produto principal da reação de dCyd com THF, 1-(4-hidroxi-5-hidroximetil-oxolan-2-il)-4-(oxolan-2-ilamino)-1*H*-pirimidina-2-um (dCyd-THF), e um produto principal da reação de dAdo com THF, 2-hidroximetil-5-[6-(oxolan-2-ilamino)-purina-9-il]-oxolan-3-ol (dAdo-THF).

O fato dos adutos serem reduzidos por NaBH₄ para derivados estáveis nos levou a concluir que as estruturas intermediárias na formação de dCyd-THF e dAdo-THF eram bases de *Schiff* (figura 15).

O mecanismo proposto envolve um ataque eletrofílico da carbonila do 4-hidroxi-butanal (gerado pela abertura do anel do α-hidroxi-THF) aos grupos amino exocíclicos das bases.

Tabela 2: Deslocamentos Químicos nos Espectros de ^1H NMR do Aduto dCyd-THF (reduzido) em $\text{DMSO}-d_6^{a, b}$

	δ (ppm)		Tipo
	dCyd-THF reduzido		
H-1'	6.12-6.15	m	N-CH-O
H-2''	2.05-2.09	m	CH ₂ -C
H-2'	1.88-1.93	m	CH ₂ -C
H-3'	4.16-4.19	m	HO-CH
H-4'	3.72-3.75	m	O-CH
H-5'	3.52-3.56	m	HO-CH ₂
H-5''	3.49-3.52	m	HO-CH ₂
H-6	7.69-7.71	d	HC=CH-N
H-5	5.70-5.72	d	HC=CH-C=N
N ⁴ -H	7.64-7.66	t	HN-C=N
2H-7	3.19-3.24	m	HN-CH ₂ -CH ₂
2H-8	1.47-1.52	m	CH ₂ -CH ₂ -CH ₂
2H-9	1.40-1.46	m	CH ₂ -CH ₂ -CH ₂
2H-10	3.37-3.40	t	HO-CH ₂ -CH ₂

^a m, multiplete; t, triplete; d, dublete; s, singlete.

^b espectros adquiridos em um espectrômetro de RMN DRX 500.

Figura 14 - Espectros de ^1H RMN de dCyd-THF reduzido

Figura 15 – Estruturas e mecanismo para formação e redução de dCyd-THF e dAdo-THF.

4.2 Formação dos adutos após reação *in vitro* de DNA com THF oxidado

Os derivados estáveis obtidos por redução dos adutos dCyd-THF e dAdo-THF com NaBH₄ foram utilizados como padrões para otimização das condições cromatográficas para investigarmos a formação dos adutos em DNA incubado com THF. As condições de HPLC/ESI/MS-MS que estabelecemos estão descritas no item 3.5.2. Após hidrólise enzimática do DNA, os possíveis adutos formados foram estabilizados por reação com NaBH₄ (item 3.6) e os cromatogramas resultantes da análise por HPLC/ESI/MS-MS estão apresentados na figura 16.

Adutos dCyd-THF e dAdo-THF foram também encontrados em níveis mais baixos no DNA não incubado com THF (DNA controle), como pode ser observado na figura 16.

A formação endógena desses adutos, como também a estabilidade deles na molécula de DNA, ainda precisa ser investigada. Deve ser ressaltado, porém, que a nitrosamina cíclica carcinogênica *N*-nitrosopirrolidina é gerada endogenamente, está presente na dieta e fumaça de cigarro, e pode levar à formação de adutos de desoxirribonucleosídeos-THF através de um derivado α -hidroxil que decompõe para um intermediário THF-OH (YOUNG-SCIAME *et al.*, 1995).

Wang e colaboradores (2007a) fizeram incubações de α -acetoxyNPYR com desoxinucleosídeos e com DNA de timo de bezerro. As amostras de DNA foram hidrolisadas enzimaticamente e reduzidas com NaBH₃CN o que permitiu que identificassem os adutos formados através da reação de α -acetoxi-*N*-nitrosopirrolidina com DNA *in vitro*. Ficou evidenciado que a nitrosamina cíclica NPYR reage com as bases do DNA, através da caracterização espectroscópica dos adutos de dAdo, dCyd, dThd e dGuo. Correlacionaram os dados obtidos com os

apresentados em nosso trabalho (HERMIDA *et al.*, 2006) e chegaram aos adutos que tínhamos identificado e caracterizado.

Wang e colaboradores (2007b) ao tratarem ratos com NPYR verificaram a formação dos adutos dAdo-THF e dCyd-THF, além de adutos de THF com dGuo e dThd em DNA de fígado destes ratos. Os níveis encontrados de dAdo-THF foram 2 – 4 adutos / 10^8 dGuo. Os autores não quantificaram o aduto dCyd-THF devido à presença de picos interferentes. A detecção de adutos em DNA (níveis aumentados em fluidos biológicos, por exemplo), pode ser utilizada como bioindicador de risco ao desenvolvimento de câncer e outras doenças (MARNETT e PLASTARAS, 2001; POIRIER, 2004).

Figura 16 – Cromatogramas obtidos por HPLC/ESI/MS-MS (MRM), mostrando a formação dos adutos dCyd-THF e dAdo-THF em DNA incubado com THF oxidado *in vitro*. O DNA foi hidrolisado enzimaticamente e reduzido com NaBH_4 antes da injeção no sistema.

Com relação à estabilidade dos adutos, um estudo recente mostrou que o aduto 6-hidroxietano, um intermediário na formação de 1,*N*²- ϵ dGuo, tem uma meia-vida de 1 a 2 dias em oligonucleotídeos solubilizados em tampão fosfato de potássio (50 mM, pH 7.0). Embora com baixa estabilidade, os autores verificaram que o aduto hidroxietano tem tempo de vida e propriedades de pareamento errado suficientes para contribuir para o espectro de mutações de compostos como haletos de vinila e aldeídos α,β insaturados, fontes de 1,*N*²- ϵ dGuo (GOODENOUGH *et al.*, 2005).

4.3 Indução de dano oxidativo em fígado e rim de camundongos expostos a vapor de THF

Camundongos fêmeas da linhagem C57Bl/6J foram expostos a vapor de THF como descrito no item 3.7. O DNA foi extraído do fígado e rim desses animais (item 3.8), hidrolisado enzimaticamente (item 3.9) e analisado por HPLC/detecção eletroquímica (item 3.10) para verificarmos o nível de dano oxidativo (8-oxodGuo). Os dados apresentados na figura 17 mostram que a exposição dos camundongos ao vapor de THF leva à formação de 8-oxodGuo, conforme metodologia de detecção de 8-oxodGuo descrito no item 3.10, também utilizamos o programa Origin para calcular as médias e para obtermos os valores do desvio padrão, e com esses dados foi possível realizar a análise estatística: teste *t-student*. Fígado e rim são órgãos alvos de carcinogênese induzida por THF. O grande aumento de dano oxidativo pode ser um fator que propicia o desenvolvimento de tumores. O metabolismo microssomal do THF pode favorecer a geração de espécies reativas de oxigênio que levam ao dano observado.

Figura 17 – Níveis de 8-oxodGuo em fígado e rim de camundongos tratados com THF e controles (N = 6; $P < 0,0005$). Cada amostra foi injetada uma vez no sistema de HPLC/detecção eletroquímica. A análise estatística foi feita utilizando-se o teste *t*-student para comparação entre população tratada e controle.

Em um estudo anterior foi verificado que o THF leva à indução de CYP450 e aumento das atividades pentoxiresorufina-*O*-deetilase (PROD) e etoxiresorufina-*O*-deetilase (EROD) em fígado de camundongos fêmeas B6C3F₁

expostos a 1800 ppm de THF. Esse efeito foi acompanhado pelo aumento da proliferação celular no fígado (GAMER *et al.*, 2002).

Para elucidar o papel do metabolismo do THF na proliferação celular, ratos foram pré-tratados com 1-aminobenzotriazol (ABT), um inibidor não específico de CYP450, e em seguida expostos ao THF. Apesar de os autores concluírem que a supressão do metabolismo de THF por ABT causou uma resposta mitogênica adicional na região midzonal, eles não excluíram a possibilidade de ocorrência de uma outra via de metabolismo do THF, com formação de metabólitos que poderiam levar ao efeito mitogênico (RAVENZWAAY *et al.*, 2003).

Uma vez que não há dados na literatura sobre genotoxicidade induzida por THF, os autores concluem que na ausência de um potencial genotóxico biologicamente relevante para o THF, à exposição a concentrações que não induzam a proliferação celular nos órgãos alvos de carcinogênese não oferece risco de desenvolvimento de câncer em humanos (GAMER *et al.*, 2002; RAVENZWAAY *et al.*, 2003). Entretanto, os resultados que obtivemos no presente trabalho mostram um potencial genotóxico para o THF e, neste caso, a possível ocorrência das lesões em humanos seguida pela indução de proliferação celular (possivelmente relacionada com a alteração da expressão de vários genes) são fatores que propiciam a carcinogênese. Outros estudos são necessários para verificar a relevância desse mecanismo *in vivo*.

Os níveis de adutos em DNA são um reflexo das velocidades de formação e remoção dos mesmos, o que depende da ativação do carcinógeno, da eficiência do reparo das lesões, da estabilidade do aduto e da velocidade de renovação do tecido. Os danos em DNA induzidos por substâncias carcinogênicas refletem a

exposição e podem ser relacionados com o processo de formação de tumor (POIRIER *et al.*, 2000; LOUREIRO, 2000; SINGH e FARMER, 2006).

Vários estudos relatam a influência de carcinógenos na formação de adutos no DNA, pois alguns carcinógenos podem reagir diretamente com o DNA, mas a maioria requer ativação metabólica para formar espécies reativas eletrofílicas que se ligarão covalentemente nas bases do DNA. A presença de adutos de DNA não significa que ocorrerão mutações porque as células podem ser reparadas durante a divisão celular. Porém, quando o reparo não ocorre corretamente, as mutações são fixadas e surgem consequências advindas da exposição aos carcinógenos no ambiente de trabalho, bem como da exposição aos compostos presentes na dieta, no meio ambiente, entre outros (IMBENOTTE *et al.*, 2003; COGLIANO, 2004; SINGH e FARMER, 2006).

O desenvolvimento de um processo mutagênico e o aparecimento do câncer é também influenciado por suscetibilidade individual, etnia, idade, estado de saúde, nutrição e polimorfismo genético, como bem sabemos. E em geral, a determinação de metabólitos excretados, por exemplo, através da urina (indicadores de dose interna), não fornecem dados exatos sobre o risco carcinogênico. Os adutos de DNA, por participarem da fase de iniciação da carcinogênese química, correlacionam melhor o desenvolvimento da doença. Já se sabe que muitas substâncias consideradas carcinogênicas para o homem formam adutos com o DNA. Mesmo que estes sejam eliminados por processos de reparação, alguns podem persistir e causar mutações permanentes, resultando em crescimento celular aberrante e câncer (NETTO *et al.*, 2000).

A exposição a agentes exógenos é condição necessária para o desenvolvimento de 75-80% dos casos de câncer, conforme descrito em estudos

epidemiológicos (WOGAN *et al.*, 2004). Compostos gerados endogenamente em concentrações acima da normalidade podem provocar aumento dos níveis de danos endógenos e também contribuir para que processos de mutagênese e carcinogênese ocorram, além dos danos biológicos provocados pelos próprios xenobióticos. Em ambos os casos, as lesões geradas devem ocorrer em frequência além da capacidade de reparo do DNA para que as mutações possam fixar-se e induzir as alterações nas funções de genes específicos para a manutenção da estabilidade do genoma (LOEB; LOEB; ANDERSON, 2003).

A ativação de xenobióticos ocorrida por mecanismos intracelulares leva também à geração de espécies reativas de oxigênio, ocorrendo uma combinação de fatores resultando em aumento de lesões no DNA e mutações.

CONCLUSÕES

5. Conclusões

A partir dos experimentos realizados verificamos que o THF oxidado reage com desoxiadenosina (dAdo) e desoxicitidina (dCyd) *in vitro* levando à formação de adutos de dAdo-THF e dCyd-THF. Através de análises espectroscópicas, as estruturas dos adutos foram elucidadas e confirmadas.

Obtivemos padrões estáveis dos adutos por redução com NaBH₄ e padronizamos um método sensível e seletivo (HPLC/ESI/MS-MS) para detecção dos adutos de dAdo-THF e dCyd-THF em DNA.

Detectamos os adutos dAdo-THF e dCyd-THF em DNA incubado com THF oxidado *in vitro* e por último verificamos que a exposição de camundongos a vapor de THF induz a formação de 8-oxodGuo em fígado e rim.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6. Referências Bibliográficas¹

AGNEZ-LIMA, L.F.; MEDEIROS, S.R.B.; MARQUES, R.C.P.; PINHEIRO, M.M.; MENCK, C.F.M. Processos de reparo de DNA: garantindo a estabilidade do material genético. In: RIBEIRO, L.R.; SALVADORI, D.M.F.; MARQUES, E.K. **Mutagênese Ambiental**. Canoas, Ed. Ulbra, cap. 3, 49-79, 2003.

BOER, J.; HOELJMARKERS, J.H.J. Nucleotide excision repair and human syndromes. **Carcinogenesis**, vol. 21, 3, 453-460, 2000.

CARTIGNY, B.; AZAROUAL, N.; IMBENHOTTE, M.; SADEG, N.; TESTART, F.; RICHECOEUR, J.; VERMEERSCH, A; LHERMITTE, M. H NMR Spectroscopic Investigation of Serum and Urine in a Case of Acute Tetrahydrofuran Poisoning. **Journal of Analytical Toxicology**, vol.25, 270-274, 2001.

CHHABRA, R.S.; HERBERT, R.A.; ROYCROFT, J.H.; CHOU, B., MILLER, R.A.; RENNE, R.A. Carcinogenesis studies of tetrahydrofuran vapors in rats and mice. **Toxicol. Sci.** 41, 183-188, 1998.

CHAPMAN, P.D.; TAN, X.; LIVINGSTON A.G.; LI, K., OLIVEIRA, T. Dehydration of tetrahydrofuran by pervaporation using a composite membrane. **Journal of Membrane Science**: 268, 13-19, 2006.

¹ As referências bibliográficas estão de acordo com a norma NBR6023/2002 preconizada pela associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).

CHEN,YEN-CHING.; HUNTER, D.J. Molecular Epidemiology of Cancer. **Cancer J Clin**, 55, 45-54, 2005.

COGLIANO, V. J. Current criteria to establish human carcinogens. **Seminars in Cancer Biology** 14: 407–412, 2004.

COUPIER, I.; PUJOL, P. Hereditary predispositions to gynaecological cancers. **Gynécologie Obstétrique & Fertilité**, 33, 851-6, 2005.

COOPER, M.T; PORTER, T.D. Mutagenicity of nitrosamines in methyltransferase-deficient strains of *Salmonella typhimurium* coexpressing human cytochrome P450 2E1 and reductase. **Mutat Res**. Nov 6; 454(1-2): 45-52, 2000.

DE BONT, R.; VAN LAREEKE, N. Endogenous DNA damage in humans: a review of quantitative data. **Mutagenesis** vol. 19 no. 3 pp. 169-185, 2004.

DIAMANTIS, I.D.; MCGANDY, C.; CHEN, T.J.; LIAW, Y.F.; GUDAT, F.; BIANCHI, L. A new mutational hot-spot in the p53 gene in human hepatocellular carcinoma. **J Hepatol**. Apr; 20(4):553-6, 1994.

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.

FETT-CONTE. A. C.; VENDRAME-GOLONI. C. B.; HOMSI. C. M.; LEILA N.B., BORIM.,; ZOLA, P. A.; RICCI. O. Estudo cromossômico no sangue periférico de pacientes com diferentes tipos de leucemia do Hospital de Base, São José do Rio Preto – SP., **Rev.Bras. Hematol. Hemoter.**, 22(3): 374-386, 2000.

GAMER, A.O.; JAECKH, R.; LEIBOLD, E.; KAUFMANN, W.; GEMBARDT, C.; BAHNEMANN, R.; VAN RAVENZWAAY, B. Investigations on cell proliferation and enzyme induction in male rat kidney and female mouse liver caused by tetrahydrofuran. **Toxicol Sci.** 70, 140-149, 2002.

GARCEA, G., SHARMA, R.A., DENNISON, A., STEWARD, W.P., GESCHER, A., BERRY, D.P. Molecular biomarkers of colorectal carcinogenesis and their role in surveillance and early intervention. **European Journal of Cancer** 39: 1041–1052, 2003.

GOODENOUGH, A.K.; KOZEKOV, I.D.; ZANG, H.; CHOI, J.Y; GUENGERICH, F.P.; HARRIS, T. M.; RIZZO, C. J. Site specific synthesis and polymerase bypass of oligonucleotides containing a 6-hydroxy-3,5,6,7-tetrahydro-9*H*-imidazo[1,2- α]purin-9-one base, an intermediate in the formation of 1,*N*²-etheno-2'-deoxyguanosine. **Chem. Res. Toxicol.** 18, 1701-1714, 2005.

GROVE, J.K.; STEIN, O.R. Polar organic solvent removal in microcosm constructed wetlands. **Water Research**, 39, 4040-4050, 2005.

GRUNE, T.; SIEMS, W.G.; SCHNEIDER, W. Accumulation of aldehydic lipid peroxidation products during postanoxic reoxygenation of isolated rat hepatocytes. **Free Radic. Biol. Med.** 15, 125-132, 1993.

GUENGERICH, F.P. Metabolism and chemical carcinogens. **Carcinogenesis**, vol.21, 3, pag. 345-351, 2000.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Free Radicals in Biology and Medicine. Third Edition, Oxford University Press, UK, 1999.

HELLWIG, J.; GEMBARDT, C.; JASTI, S. Tetrahydrofuran: two-generation reproduction toxicity in Wistar rats by continuous administration in the drinking water. **Food Chem Toxicol.** 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 reaction of Tetrahydrofuran with DNA bases. **Chem. Res. Toxicol.**, 19, 927-936, 2006.

HIDALGO, F.J.; ZAMORA, R. Modification of bovine serum albumin structure following reaction with 4,5(E)-epoxy-2(E)-heptenal. **Chem. Res. Toxicol.** 13, 501-508, 2000.

IARC – International Agency for Research on Cancer. Report of an Ad-Hoc Iarc Monographs Advisory Group on Priorities for Future Evaluations. Internal Report No. 98/004, Lyon, France, 1998.

IMBENOTTE, M.; AZAROUAL, M. N.; CARTIGNY, B.; VERMEERSCH, G.; LHERMITTE M. Identification and quantitation of xenobiotics by ^1H NMR spectroscopy in poisoning cases. **Forensic Science International** 133: 132–135, 2003.

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.

KYRTOPOULOS, S.A.; GEORGIARDIS, P.; AUTRUP, H.; DEMOPOULOS, N.; FARMER, P.; HAUGEN, A.; KATSOUYANNI, K.; LAMBERT, B.; OVREBO, S.; SRAM, R.; STEFANOUS, G.; TOPINKA, J. Biomarkers of genotoxicity of urban air pollution: overview and descriptive data from a molecular epidemiology study on populations exposed to moderate-to-low levels of polycyclic aromatic hydrocarbons: the AULIS project. **Mutation Research**, v.496, p.207-228, 2001.

LOEB, L.A., LOEB, K.R., ANDERSON, J.P. Multiple mutations and cancer. **PNAS**, February 4, vol. 100, 3, 776–781, 2003.

LOUREIRO, A.P.M. Caracterização e detecção de adutos entre 2'-desoxiguanosina e trans,trans-2,4-decadienal. Tese de Doutorado apresentada ao

Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo, Brasil, 2000.

LOUREIRO, A.P.M.; DI MASCIO, P.; MEDEIROS, M.H.G. Formação de adutos exocíclicos com bases de DNA: Implicações em mutagênese e carcinogênese. **Quim. Nova** 25, 777-793, 2002.

LOUREIRO, A.P.M.; ARRUDA, I.P.; 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.

LUCH, A. Nature and Nurture – Lessons from chemical carcinogenesis. **Nature Reviews Cancer**, 5, 113-125, 2005.

MANI, S.K; REYNA, A.M.; ALEJANDRO, M.A; CROWLEY, J.; MARKAVERICH, B.M. Disruption of male sexual behavior in rats by tetrahydrofurandiols (THF-diols). **Steroids**, Oct; 70(11): 750-4, 2005.

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

MIGLIORE, R.; COLOGNATO, R.; NACCARATI, A.; BERGAMASCHI, E. Relationship between genotoxicity biomarker in somatic and germ cells: findings

from a biomonitoring study. **Mutagenesis**, Mutagenesis Advance Access p.1-4. Published, March 27, 2006.

MORROW, J.D.; AWAD, J.A.; KATO, T.; TAKAHASHI, K.; BADR, K.F.; ROBERTS, L.J.; BURK, R.F. Formation of novel non-cyclooxygenase-derived prostanoids (F2- isoprostanes) in carbon tetrachloride hepatotoxicity. An animal model of lipid peroxidation. **J. Clin. Invest.** 90, 2502-2507, 1992.

NAIR, J.; FURSTENBERGER, G.; BURGER, F.; MARKS, F.; BARTSCH, H. Promutagenic etheno-DNA adducts in multistage mouse skin carcinogenesis: correlation with lipoxygenase-catalyzed arachidonic acid metabolism. **Chem. Res. Toxicol.** 13, 703-709, 2000.

NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM (NTP) Toxicology and carcinogenesis studies of tetrahydrofuran (CAS No. 109-99-9) 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 of Health**, Research Triangle Park, NC, 1998.

NETTO, A.D.P.; MOREIRA, J.; DIAS, A.E.X.O.; ARBILLA, G.; FERREIRA, L.F.V.; OLIVEIRA, A.S.; BAREK, J. Avaliação da contaminação humana por Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAS) e seus derivados Nitrados (NHPAS): Uma revisão metodológica. **Química Nova**, 23(6), 2000.

POIRIER, M.C.; SANTELLA, R.M.; WESTON, A. Carcinogen macromolecular adducts and their measurement. **Carcinogenesis**, vol 21, 353-359, 2000.

POIRIER, M.C. Chemical-Induced DNA damage and human cancer risk. **Nature Reviews**, vol 4, 630-637, 2004.

RAVENZWAAY, B. VAN.; GAMER, A.O.; LEIBOLD, E; KAUFMANN, W. Effect of cytochrome P-450 inhibition on tetrahydrofuran-induced hepatocellular proliferation in female mice. **Arch Toxicol** 77: 459-464, 2003.

SALOMON, R.G.; KAUR, K.; PODREZ, E.; HOFF, H.F.; KRUSHINSKY, A.V.; SAYRE, L.M. HNE-derived 2-pentylpyrroles are generated during oxidation of LDL, are more prevalent in blood plasma from patients with renal disease or atherosclerosis, and are present in atherosclerotic plaques. **Chem. Res. Toxicol.** 13, 557-564, 2000.

SANTELLA, R.M.; GAMMON, M.; TERRY, M.B.; SENIE, R.; SHEN, J.; KENNEDY, D.; AGRAWAL, M.; FARAGLIA, B.; ZHANG, F.F. DNA adducts, DNA repair genotype/phenotype and cancer risk. **Mutation Research**, v.592, p.1-2, 2005.

SINGH, R.; FARMER, P.B. Liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry: the future of DNA adduct detection. **Carcinogenesis** vol.27 no.2 178-196, 2006.

TURESKY, R.T.; VOUIROS, P. Formation and analysis of heterocyclic aromatic amine–DNA adducts in vitro and *in vivo*. **Journal of Chromatography B**, 802, 155–166, 2004.

VACA, C.E.; WILHELM, J.; HARMS-RINGDAH, M. Interaction of lipid peroxidation products with DNA. A review. **Mutat. Res.** 195, 137-149, 1988.

VAN CAMPEN, L.E.; MURPHY, W.J.; FRANKS, J.R.; MATHIAS, P.I.; TORAASON, M.A. Oxidative DNA damage is associated with intense noise exposure in the rat. **Hear Res.**, Feb;164(1-2):29-38, 2002.

VOLIN M.V.; KOCH, A.E. Cell Cycle Implications In The pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. **Frontiers in Bioscience** 5, 594-601, June 1, 2000.

WANG, L.; HIRAYASU, K.; ISHIZAWA, M.; KOBAYASHI, Y. Purification of genomic DNA from human whole blood by isopropanol-fractionation with concentrated NaI and SDS. **Nucleic Acids Research**, vol 22(9), 1994.

WANG, M.; LAO, Y.; CHENG, G.; SHI, Y.; VILLALTA, P. W.; NISHIKAWA, A.; HECHT, S. S. Analysis of adducts in hepatic DNA of rats treated with *N*-Nitrosopyrrolidine. **Chem. Res. Toxicol.**, 20, 634-640, 2007a.

WANG, M.; LAO, Y.; CHENG, G.; SHI, Y.; VILLALTA, P. W.; HECHT, S. S. Identification of adducts formed in the reaction of α -Acetoxy-*N*-nitrosopyrrolidine with deoxyribonucleosides and DNA. **Chem. Res. Toxicol.**, 20, 625-633, 2007b.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) International Programme on Chemical Safety (IPCS) – **Environmental Health Criteria** 155: Biomarkers and risk assessment: concepts and principles. Geneva, 1993.

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

YOUNG-SCIAME, R.; WANG, M.; CHUNG, F. L.; HECHT, S.S. Reactions of alpha-acetoxy-*N*-nitrosopyrrolidine and alpha-acetoxy-*N*-nitrosopiperidine with deoxyguanosine: formation of *N*²-tetrahydrofuranyl and *N*²-tetrahydropyranyl adducts. **Chem. Res. Toxicol.** 8, 607-616, 1995.

CURRÍCULO

Nome Silvia Araújo da Silva Hermida

silviaws@terra.com.br

Email:

silviahermida@usp.br

2005 - 2007 Mestrado em Toxicologia.
Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo,
FCF-USP, São Paulo, Brasil, Ano de obtenção: 2007

1998 - 2002 Graduação em Biologia.
Unifio - Centro Universitário Fieo - Osasco, UNIFIEO, Brasil

2006 - 2006 Aperfeiçoamento em Atualização Biologia Molecular Aplicada Diagnóstico.
Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil, Ano de obtenção: 2006
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
Curso de Curta Duração em Auditoria Ambiental.

2007 - 2007 18º. Encontro de Biólogos do CRBio-01, Cuiabá, Brasil, Ano de obtenção: 2007
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
Prêmio "Young Investigator" por estar entre os 20 melhores
apresentados no congresso. IV MEETING OF THE SOUTH
AMERICAN GROUP OF THE SOCIETY FOR FREE RADICAL
BIOLOGY AND MEDICINE

Produção bibliográfica

Artigo completo publicado em periódicos

★ 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.

1. **2'-Deoxyguanosine, 2'-deoxycytidine and 2'-deoxyadenosine adducts resulting from the reaction of tetrahydrofuran with DNA bases.** Chemical Research in Toxicology (Washington). , v.19, p.927 - 936, 2006.

Comunicações e Resumos Publicados em Anais de Congressos ou Periódicos (resumo)

- HERMIDA, S. A. S., Campos, I P A, Di Mascio, P, Medeiros, M H G, Loureiro, A.P.M.
- Ação do Tetrahidrofurano na formação de adutos de 2'-desoxiadenosina e 2'-desoxicitidina**
1. In: XV Congresso Brasileiro de Toxicologia, 2007, Búzios - RJ.
Revista Brasileira de Toxicologia. São Paulo: Sociedade Brasileira de Toxicologia, 2007.
v.20. p.116 - 116
HERMIDA, S. A. S., Campos, I P A, Di Mascio, P, Medeiros, M H G, Loureiro, A.P.M.
ADUTOS DE 2'-DESOXIADENOSINA E 2'-DESOXICITIDINA INDUZIDOS POR
TETRAHIDROFURANO In: XXI Seminário de Pós-Graduação - XI Semana Farmacêutica de
Ciência e Tecnologia, 2006, São Paulo.
**ADUTOS DE 2'-DESOXIADENOSINA E 2'-DESOXICITIDINA INDUZIDOS POR
TETRAHIDROFURANO.** São Paulo: Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas,
2006. v.42. p.83 - 83
HERMIDA, S. A. S., Loureiro, A.P.M., Souza, D.B., Possari, E.P.M., Campos, I P A,
Medeiros, M H G, Gomes, O F, Di Mascio, P
 3. **DNA and Protein Adducts Induced by Tetrahydrofuran** In: XL SUPFAB na X SEMANA
FARMACÊUTICA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA, 2005, São Paulo.
REVISTA BRASILEIRA DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS. SÃO PAULO:

2005. v.41. p.98 - 98

HERMIDA, S. A. S., Loureiro, A.P.M., Souza, D.B., Possari, E.P.M., Campos, I P A, Medeiros, M H G, Gomes, O F, Di Mascio, P, Terada, R

4. **DNA and protein adducts induced by tetrahydrofuran** In: IV MEETING OF THE SOUTH AMERICAN GROUP OF THE SOCIETY FOR FREE RADICAL BIOLOGY AND MEDICINE, 2005, ÁGUAS DE LINDOIA.
IV MEETING OF THE SOUTH AMERICAN GROUP OF THE SOCIETY FOR FREE RADICAL BIOLOGY AND MEDICINE. 2005. p.27 - 27
HERMIDA, S. A. S., Loureiro, A.P.M., Souza, D.B., Possari, E.P.M., Campos, I P A, Medeiros, M H G, Gomes, O F, Di Mascio, P, Terada, R
5. **DNA AND PROTEINS ADDUCTS INDUCED BY TETRAHYDROFURAN** In: XXXIV REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR - SBBq, 2005, p.42 – 42, ÁGUAS DE LINDOIA.

Para acessar todos os dados do currículo entrar em:

<http://lattes.cnpq.br/index.htm>

ANEXO

Chemical Research in Toxicology[®]

JULY 2006

Published by the American Chemical Society

VOLUME 19, NUMBER 7

DNA-Tetrahydrofuran Adducts

2'-Deoxyguanosine, 2'-Deoxycytidine, and 2'-Deoxyadenosine Adducts Resulting from the Reaction of Tetrahydrofuran with DNA Bases

Silvia A. S. Hermida,[†] Ediliz P. M. Possari,[†] Denise B. Souza,[†] Ivan P. de Arruda Campos,[‡] Osmar F. Gomes,[§] Paolo Di Mascio,[§] Marisa H. G. Medeiros,[§] and Ana Paula M. Loureiro^{*,†}

Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Avenida Prof. Lineu Prestes 580, Bloco 13 B, CEP 05508-900, São Paulo, Brazil, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Produção, Instituto de Ciências Exatas e Tecnologia, Universidade Paulista, Rua Dr. Bacelar 1212, CEP 04026-002, São Paulo, Brazil, and Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, Avenida Prof. Lineu Prestes 748, CEP 05508-900, São Paulo, Brazil

Received February 15, 2006

A recent study showed that tetrahydrofuran (THF), a widely used solvent, is carcinogenic in experimental animals. Despite its carcinogenic activity, there is a paucity of information regarding cellular toxicity, biomolecular damage, and genotoxicity induced by THF. We describe here the structural characterization of adducts produced by the reaction of oxidized THF with 2'-deoxyguanosine (dGuo-THF 1 and dGuo-THF 2), 2'-deoxyadenosine (dAdo-THF), and 2'-deoxycytidine (dCyd-THF). Adducts were isolated from *in vitro* reactions by reverse-phase HPLC and fully characterized on the basis of spectroscopic measurements. The stable derivatives obtained by the reduction of adducts with NaBH₄ (the case of dGuo-THF 1, dCyd-THF, and dAdo-THF) and the stable adduct dGuo-THF 2 were used as standards for optimization of chromatographic separations for adduct detection in DNA through HPLC/ESI/MS-MS. Using this methodology, we successfully detected the four adducts in calf thymus DNA reacted with oxidized THF. The present study also provides evidence that rat liver microsomal monooxygenases oxidize THF to the reactive electrophilic compounds that are able to damage the DNA molecule, as indicated by a significant increase in adduct dGuo-THF 1 level when NADPH was added to the THF/microsomes/dGuo incubation mixtures. Our data point to DNA-THF adducts as possible contributing factors to the toxicological effects of THF exposure.

Introduction

Tetrahydrofuran (THF)¹ is a solvent used widely in industry and research (1, 2). Because of its low boiling point, high vapor concentrations may develop in the workplace, representing a strong potential for occupational exposure in humans. In addition, THF is highly soluble in water and degrades slowly, allowing it to be characterized as an environmental pollutant (3, 4). Various studies have shown that THF is toxic to living systems, causing irritation of the upper respiratory tract, skin, and mucous membranes, and affecting the eyes, central nervous system, liver, and kidneys. Once in contact with air, THF may form peroxides, which enhance its irritating effect (2, 5, 6).

Human exposure to THF is beginning to cause concern, since clear evidence has been found of carcinogenic activity in female

mice, based on the increased incidence of hepatocellular neoplasm after 2 years of exposure to 1800 ppm THF (99% pure) by inhalation (6 h/day, 5 days/week) (6, 7). The nonobservable-adverse-effect level (NOAEL) for nonneoplastic lesions from THF is 600 ppm in mice after 14 weeks of exposure (6h/day, 5 days/week). However, in the 2-year study, even the incidence of hepatocellular neoplasm in female mice exposed to 200 ppm was elevated (48%) in relation to the controls (34%) (6, 7). Considering that the current threshold limit value-time-weighted average (TLV-TWA) for THF is 200 ppm (590 mg/m³) and the short-term exposure limit (TLV-STEL) is 250 ppm (737 mg/m³) (8), the results obtained in the National Toxicology Program study (6) may have some implications for the current limit of occupational exposure.

Our previous studies on DNA adducts from the reaction of 2'-deoxyguanosine (dGuo) with *trans,trans*-2,4-decadienal (DDE) revealed the formation of three adducts that could be observed only in the reactions occurring in the presence of oxidized THF (9–11). We have recently shown that these adducts are produced by the reaction of THF oxidation products with 1,*N*²-etheno-2'-deoxyguanosine (1,*N*²- ϵ dGuo), a well-known adduct of dGuo with oxidized α,β -unsaturated aldehydes and vinyl halides (11). Here, we describe the structural characterization of adducts produced by the reaction of THF oxidation products with dGuo, 2'-deoxyadenosine (dAdo), and 2'-deoxycytidine (dCyd). Information about adduct detection in DNA reacted with oxidized THF and about adduct formation through microsomal oxidation

* Corresponding author. Phone: ++ (55) 11 30911192. Fax: ++ (55) 38156593. E-mail: apmlou@usp.br.

[†] Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Universidade de São Paulo.

[‡] Universidade Paulista.

[§] Departamento de Bioquímica, Universidade de São Paulo.

¹ Abbreviations: THF, tetrahydrofuran; TWA, time-weighted average; NOAEL, nonobservable-adverse-effect level; TLV-TWA, threshold limit value-time-weighted average; TLV-STEL, short-term exposure limit; dGuo, 2'-deoxyguanosine; dAdo, 2'-deoxyadenosine; dCyd, 2'-deoxycytidine; 1,*N*²- ϵ dGuo, 1,*N*²-etheno-2'-deoxyguanosine; 8-oxodGuo, 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine; HPLC, high-performance liquid chromatography; ESI/MS, electrospray ionization mass spectrometry; SIR, selected ion recording; COSY, ¹H-¹H two-dimensional correlation spectroscopy; HMQC, ¹H-¹³C two-dimensional heteronuclear multiple-quantum correlation; HMBC, ¹H-¹³C two-dimensional heteronuclear multiple-bond correlation.

Figure 1. HPLC elution profile of the reaction mixtures of (A) dGuo, (B) dAdo, and (C) dCyd with oxidized THF. The chromatograms were obtained with HPLC system 1. Conditions as described in Experimental Procedures.

of THF is also provided. The occurrence of an interaction leading to DNA-THF adducts may be a contributing factor to the observed toxicological effects associated with THF exposure.

Experimental Procedures

Chemicals. All the chemicals employed here were of the highest purity grade commercially available. Formic acid, dGuo, sodium hydroxide, ethanol, hydrochloric acid, magnesium chloride, sucrose, and potassium phosphate were acquired from Merck (Darmstadt, Germany). Chromatography grade acetonitrile, methanol, and THF were obtained from EM Science (Gibbstown, NJ). Chloroform was supplied by Cinética Química (São Paulo, Brazil). Oxidized THF was obtained from THF solvent unprotected from light. The concentration of hydroperoxides in the THF batches was measured by the Fe^{2+} /xylenol orange assay (12). 2-Hydroxy-THF was estimated by GC/FID (HP5890). All the other chemicals used came from Sigma (St. Louis, MO). The water was purified in a Milli-Q system (Millipore, Bedford, MA).

Spectroscopy. One-dimensional (1D) and two-dimensional (2D) ^1H and ^{13}C NMR spectra were acquired at 27 °C using a DPX-300 or a DRX-500 MHz NMR spectrometer (Bruker, Rheinstatten, Germany). The samples were dissolved in $\text{DMSO}-d_6$ or in a mixture of $\text{D}_2\text{O}/\text{DMSO}-d_6$, and the solvent peak was used as the reference.

HPLC Separations. HPLC analyses were made using a Shimadzu HPLC system (Shimadzu, Kyoto, Japan). This included two

Figure 2. UV absorption spectra obtained through HPLC/PDA of adducts before and after reduction with NaBH_4 : (A) dCyd-THF, (B) dAdo-THF, and (C) dGuo-THF 1 and dGuo-THF 2. UV spectra of the normal deoxynucleosides are shown for comparison. Conditions as described in Experimental Procedures.

LC-10AD (or LC-10AD/VP) pumps, a Rheodyne injector (Cotati, CA), an SPD-10AV absorbance device, and a SPD-M10AV (or SPD-M10A/VP) photodiode array detector, controlled by a CBM-10A (or SCL-10A/VP) communication bus module and CLASS LC-10AWS (or CLASS-VP) software. HPLC separations were conducted in a Luna 10 C18 (2) (250 mm $\times$ 10 mm i.d., 10 μm) semipreparative column (Phenomenex, Torrance, CA) eluted with the system 1 gradient of water and acetonitrile. System 1: from 0 to 5 min, 5% acetonitrile; from 5 to 30 min, 5–20% acetonitrile; from 30 to 50 min, 20–40% acetonitrile; from 50 to 55 min, 40–100% acetonitrile; and from 55 to 65 min, 100–5% acetonitrile.

HPLC/ESI/MS Analyses. On-line HPLC/ESI/MS analyses in the positive mode were carried out using a Quattro II mass spectrometer (Micromass, Manchester, U.K.). A Shimadzu HPLC system (Shimadzu, Kyoto, Japan), consisting of an auto sampler (SIL-10AD/VP), a Rheodyne injector (Cotati, CA), an automated switching valve (FCV-12AH), two pumps (Class LC 10AD), and

Figure 3. ESI/MS spectra of (A) nonreduced adducts dCyd-THF, dAdo-THF, dGuo-THF 1, and dGuo-THF 2 and (B) reduced adducts dCyd-THF, dAdo-THF, and dGuo-THF 1. Cone voltage: 30 V. Conditions as described in Experimental Procedures.

an SPD-10AV/VP UV detector controlled by a communication bus module (SCL-10A/VP-CBM 10A) and Class-VP software, was used for sample injection and cleanup of the analytical column. The source temperature of the mass spectrometer was kept at 100 °C, and flow rates of drying and nebulizing gas (nitrogen) were optimized at 350 and 10 L/h, respectively. The data were processed using MassLynx software (Micromass). System 2 HPLC condition was used to elute the adducts. System 2: a Luna C18(2) column (150 mm $\times$ 2 mm i.d., 3 μ m, Phenomenex, Torrance, CA) eluted with a gradient of formic acid (0.1% in water) and acetonitrile (from 0 to 5 min, 5% acetonitrile; from 5 to 30 min, 5–20% acetonitrile; from 30 to 50 min, 20–40% acetonitrile; from 50 to 55 min, 40–100% acetonitrile; and from 55 to 65 min, 100–5% acetonitrile) at a flow rate of 0.12 mL/min. The prepurified samples were dissolved in aqueous solutions and injected into the mobile phase through the Rheodyne injector with a 20 μ L Rheodyne loop. Full scan data in MS₁ were acquired over a mass range of 100–700 Da with different cone voltages.

HPLC/ESI/MS–MS Analyses of Adducts in DNA and in Samples of Microsomal Oxidation of THF Containing 2'-Deoxyguanosine. On-line HPLC/ESI/MS–MS analyses in the positive mode were carried out using a Quattro II mass spectrometer (Micromass, Manchester, U.K.). dGuo-THF, dAdo-THF, and dCyd-THF adducts in DNA samples, and microsomal incubations were detected by multiple-reaction monitoring (MRM). The Shimadzu HPLC system described above was used for sample injection and cleanup of the analytical column (Luna C18(2) 250 mm $\times$ 4.6 mm i.d., 5 μ m, Phenomenex, Torrance, CA). Adducts were eluted

from this first column with three different HPLC mobile phase conditions (formic acid 0.1% in water/acetonitrile). System 3 was used for elution of dGuo-THF adducts, System 4 was used for elution of dAdo-THF adduct, and System 5 was used for elution of dCyd-THF adduct. System 3: from 0 to 30 min, 8–40% acetonitrile; from 30 to 40 min, 40–35% acetonitrile; from 40 to 46 min, 35–80% acetonitrile; from 46 to 50 min, 80–8% acetonitrile. From 0 to 10 min, 0.6 mL/min; from 10 to 11 min, 0.6–0.15 mL/min; from 11 to 40 min, 0.15–0.1 mL/min; from 40 to 41 min, 0.1–0.6 mL/min; from 41 to 50 min, 0.6 mL/min. System 4: from 0 to 30 min, 8–15% acetonitrile; from 30 to 31 min, 15–80% acetonitrile; from 31 to 39 min, 80% acetonitrile; from 39 to 40 min, 80–8% acetonitrile. From 0 to 8 min, 0.6 mL/min; from 8 to 9 min, 0.6–0.15 mL/min; from 9 to 30 min, 0.15–0.12 mL/min; from 30 to 31 min, 0.12–0.6 mL/min. System 5: from 0 to 40 min, 2–8% acetonitrile; from 40 to 44 min, 8–80% acetonitrile; from 44 to 50 min, 80% acetonitrile; from 50 to 51 min, 80–2% acetonitrile. From 0 to 7 min, 0.3–0.1 mL/min; from 7 to 25 min, 0.1–0.25 mL/min; from 25 to 25.5 min, 0.25–0.1 mL/min; from 25.5 to 43 min, 0.1 mL/min; from 43 to 44 min, 0.1–0.6 mL/min; from 44 to 51 min, 0.6–0.3 mL/min. A third HPLC pump (LC-10AD, Shimadzu) was used to simultaneously load a second column (Luna C18(2) 150 mm $\times$ 2 mm i.d., 3 μ m, Phenomenex) with an isocratic flow (0.1 mL/min) of a (70:30) solution of formic acid 0.1% in water/acetonitrile, maintaining a constant flow of the mobile phase to the mass spectrometer during the analysis. The position of the switching valve was changed twice for dGuo-THF analyses (at 11 and at 39.5 min), dAdo-THF

analyses (at 20 and at 30 min), and dCyd–THF analyses (at 36 and at 43 min). This allowed the first column eluant to enter the second column for MS–MS detection and permitted the first column to be washed while the adducts were eluted through the second column to the mass spectrometer.

The DNA hydrolysates and products from the microsomal incubations were injected into the above-described systems. The m/z 340 $\rightarrow$ 224 (dGuo–THF 1 reduced), 338 $\rightarrow$ 152 (dGuo–THF 2), 324 $\rightarrow$ 208 (dAdo–THF reduced), and 300 $\rightarrow$ 184 (dCyd–THF reduced) transitions were monitored with a dwell time of 1 s. The cone voltage was kept at 15 V. The collision energy was set at 10 eV. The pressure of the collision gas (argon) in the gas cell was adjusted to 1×10^{-3} mbar. The source temperature was held at 100 °C, and the drying and nebulizing gas (nitrogen) flow rates were optimized at 350 and 10 L/h, respectively. The capillary and HV electrode potentials were set at 3.10 and 0.30 kV, respectively. All the other parameters of the mass spectrometer were adjusted for acquisition of the best $[M + H]^+ / [M + H]^+ - 2\text{-D-erythro-pentose transition}$. The data were processed using MassLynx software 3.2 (Micromass).

Preparation and Purification of the Adducts. Oxidized THF (180 μL containing 11 mM of peroxides and 305 mM of THF–OH) was added to dGuo, dAdo, or dCyd solutions (5 mg) prepared in 300 μL of 0.2 M acetate buffer (pH 4.0) or 0.2 M phosphate buffer (pH 7.4). After 24 h of incubation at 37 °C with stirring, the reaction mixtures were extracted twice, with 1 vol of chloroform. The aqueous phase was injected into the HPLC system 1 for initial adduct purification (Figure 1). The fractions eluted from 12 to 16 min (adduct dCyd–THF) and from 20 to 30 min (adducts dGuo–THF and dAdo–THF) were collected, lyophilized, and reduced with NaBH_4 . For reduction, the isolated adducts were dissolved in 1 mL of phosphate buffer (0.2 M, pH 7.4) and 50 μL of an aqueous solution of NaBH_4 (90 mg/mL), followed by overnight incubation at room temperature. The reduced adducts were further purified by HPLC system 1.

Characterization of the Adducts. The adducts were characterized by UV, ESI/MS, ^1H NMR, and ^1H – ^1H COSY or ^1H – ^{13}C HMQC/HMBC NMR spectra analyses. The UV spectra of original and reduced adducts are illustrated in Figure 2. The positive mode ESI/MS analyses of the original and reduced adducts (Figure 3) show the addition of two hydrogen atoms to the molecules after reaction with NaBH_4 . Three important signals at m/z 338 ($[M + H]^+$, 15% relative intensity), m/z 222 ($[M + H]^+ - 2\text{-D-erythro-pentose}$, 90% relative intensity), and m/z 152 ($[M + H]^+ - 2\text{-D-erythro-pentose} - \text{THF}$, 100% relative intensity) are observed for dGuo–THF 1, and two important signals at m/z 338 ($[M + H]^+$, 15% relative intensity) and m/z 152 ($[M + H]^+ - 2\text{-D-erythro-pentose} - \text{THF}$, 100% relative intensity) are observed for dGuo–THF 2. The ESI/MS spectrum of dAdo–THF shows four important signals at m/z 322 ($[M + H]^+$, 95% relative intensity), m/z 251 ($[M + H]^+ - \text{THF}$, 15% relative intensity), m/z 206 ($[M + H]^+ - 2\text{-D-erythro-pentose}$, 100% relative intensity), and m/z 135 ($[M + H]^+ - 2\text{-D-erythro-pentose} - \text{THF}$, 35% relative intensity). The ESI/MS spectrum of dCyd–THF shows three important signals at m/z 298 ($[M + H]^+$, 30% relative intensity), m/z 182 ($[M + H]^+ - 2\text{-D-erythro-pentose}$, 100% relative intensity), and m/z 111 ($[M + H]^+ - 2\text{-D-erythro-pentose} - \text{THF}$, 35% relative intensity). Table 1 summarizes the ^1H NMR data of the adducts.

Reaction of Oxidized THF with Calf Thymus DNA. Calf thymus DNA (1 mg) was dissolved in 500 μL of 0.2 M acetate buffer (pH 4.0) or 0.2 M phosphate buffer (pH 7.4), to which an aliquot (270 μL) of oxidized THF containing 11 mM of peroxides and 305 mM of THF–OH was added. The resulting solution was stirred at 37 °C for 24 h. The unreacted THF was removed by two extractions with chloroform, and DNA precipitation was carried out by the addition of 50 μL of 3 M sodium acetate buffer (pH 5) and 1 mL of 2-propanol. The suspension was cooled to -20 °C and centrifuged at 5000g for 10 min at 4 °C. The resulting pellet was washed with 2-propanol 60% (5000g, 10 min), followed by ethanol 70% (5000g, 10 min), and dissolved in 500 μL of water. DNA concentration was measured spectrophotometrically at 260

Table 1. ^1H NMR Chemical Shifts of Adducts dGuo–THF 1 (reduced), dGuo–THF 2, dAdo–THF (reduced), and dCyd–THF (reduced) in $\text{DMSO}-d_6^{a,b}$

(A) Adducts dGuo–THF 1 (reduced) and dGuo–THF 2				
	δ (ppm) dGuo–THF 1 reduced	δ (ppm) dGuo–THF 2		type
H-1'	6.10–6.13	6.07–6.11	m	N-CH-O
H-2'	2.64–2.69	2.49–2.53	m	$\text{CH}_2\text{-}\overline{\text{C}}$
H-2''	2.12–2.15	2.17–2.23	m	$\text{CH}_2\text{-}\overline{\text{C}}$
H-3'	4.35–4.36	4.28	m	HO-CH
H-4'	3.79–3.82	3.87–3.90	m	O-CH
H-5'	3.54–3.57	3.68–3.71 and 3.58–3.61 (two isomers)	m	HO-CH_2
H-5''	3.46–3.49	3.49–3.52 and 3.42–3.45 (two isomers)	m	HO-CH_2
OH-5'	4.43		s (broad)	HO-CH_2
OH-3'	5.24	5.31	s (broad)	HO-CH
H-8	8.51	7.84 and 7.81 (two isomers)	s	N=CH-N
N ² -H	7.72		s (broad)	HN-C=N
N ² -H ₂		6.47	s (broad)	$\text{H}_2\text{N-C=N}$
2H-10	3.20–3.23		t	$\text{HN-CH}_2\text{-CH}_2$
H-10		5.07–5.09	t	N-CH-O
2H-11	1.48–1.54	1.81–1.88	m	$\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$
2H-12	1.42–1.47	1.72–1.78	m	$\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$
2H-13	3.38–3.41 ¹	3.68–3.76 ²	¹ / ₂ m	$(\text{H})\text{O-CH}_2\text{-CH}_2$
(B) Adduct dAdo–THF (reduced)				
	δ (ppm) dAdo–THF reduced			type
H-1'	6.31–6.34	m		N-CH-O
H-2'	2.68–2.74	m		$\text{CH}_2\text{-}\overline{\text{C}}$
H-2''	2.22–2.26	m		$\text{CH}_2\text{-}\overline{\text{C}}$
H-3'	4.38–4.41	m		HO-CH
H-4'	3.86–3.88	m		O-CH
H-5'	3.59–3.62	m		HO-CH_2
H-5''	3.49–3.52	m		HO-CH_2
H-8	8.31	s		N=CH-N
H-2	8.18	s		N=CH-N
N ⁶ -H	7.82	s (broad)		HN-C=N
2H-10	3.30			$\text{HN-CH}_2\text{-CH}_2$
2H-11	1.55–1.62	m		$\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$
2H-12	1.41–1.47	m		$\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$
2H-13	3.37–3.41	t		$\text{HO-CH}_2\text{-CH}_2$
(C) Adduct dCyd–THF (reduced)				
	δ (ppm) dCyd–THF reduced			type
H-1'	6.12–6.15	m		N-CH-O
H-2''	2.05–2.09	m		$\text{CH}_2\text{-}\overline{\text{C}}$
H-2'	1.88–1.93	m		$\text{CH}_2\text{-}\overline{\text{C}}$
H-3'	4.16–4.19	m		HO-CH
H-4'	3.72–3.75	m		O-CH
H-5'	3.52–3.56	m		HO-CH_2
H-5''	3.49–3.52	m		HO-CH_2
H-6	7.69–7.71	d		HC=CH-N
H-5	5.70–5.72	d		HC=CH-C=N
N4-H	7.64–7.66	t		HN-C=N
2H-7	3.19–3.24	m		$\text{HN-CH}_2\text{-CH}_2$
2H-8	1.47–1.52	m		$\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$
2H-9	1.40–1.46	m		$\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$
2H-10	3.37–3.40	t		$\text{HO-CH}_2\text{-CH}_2$

^a m, multiplet; t, triplet; d, doublet; s, singlet. ^b Spectra acquired in a DRX 500 NMR spectrometer.

nm. An aliquot of the solution containing 300 μg of DNA was added to 6 μL of 1 M sodium acetate buffer (pH 5), followed by digestion with 3 units of nuclease P1 at 37 °C for 30 min. Six microliters of 1 M Tris–HCl buffer (pH 7.4), 6 μL of phosphatase buffer (Tris–acetate 100 mM, magnesium acetate 100 mM, potassium acetate 500 mM, pH 7.0), and 9 units of alkaline phosphatase were then added for an additional 1 h incubation at 37 °C. The final volume of the solution was adjusted to 200 μL with water. The enzymes were precipitated by the addition of chloroform, and the resulting aqueous samples were reduced with NaBH_4 (100 μL of a 90 mg/mL aqueous solution) and subjected to HPLC/ESI/MS–

Scheme 1. Structures and Proposed Mechanism for the Formation of Adducts dCyd–THF, dAdo–THF, and dGuo–THF 1

MS analyses as described above. This assay permitted the complete hydrolysis of 60–70% of the initial DNA samples. The same procedure was adopted for DNA incubated in the absence of THF (control DNA).

Preparation of Rat Liver Microsomes. A male Sprague–Dawley rat (460 g body weight) was obtained from the colony of the University of São Paulo Faculty of Pharmaceutical Sciences

(São Paulo, Brazil) and was maintained under standard environmental conditions with free access to industrialized food (Purina Nutrientes Ltda, Campinas, SP, Brazil). After an acclimation period of 3 days, the animal was treated with phenobarbital by intraperitoneal injection for 3 consecutive days (32 mg/day). On the fourth day, the rat was killed by decapitation and the liver removed immediately, washed with NaCl 0.9%, and stored at –80

Scheme 2. Structure and Proposed Mechanism for the Formation of Adduct dGuo-THF 2

°C. The microsomal fraction was obtained by liver homogenization in 0.1 M potassium phosphate buffer/5 mM EDTA (pH 7.4). The homogenate was centrifuged at 16 900g for 15 min at 4 °C, and the resulting supernatant was centrifuged at 105 000g for 95 min. The pellet was then recovered and resuspended in 0.1 M potassium phosphate buffer/5 mM EDTA (pH 7.4). After a new centrifugation at 105 000g for 90 min, the pellet containing the microsomes was resuspended in 0.1 M potassium phosphate buffer/5 mM EDTA (pH 7.4), separated in aliquots, and stored at -80 °C until use. The microsomal protein concentration was determined by the Bradford's method (13).

Assessment of Adduct Formation through Microsomal Oxidation of THF in the Presence of 2'-Deoxyguanosine. The deoxyribonucleoside dGuo (1.6 mg) was incubated with rat liver microsomes (2 mg of microsomal protein) in the presence or absence of THF free of peroxides (780 mM). The microsomal monooxygenases were activated by the addition of 5 μ mol of NADPH. Incubations consisting of (i) NADPH/microsomes/dGuo, (ii) THF/microsomes/dGuo, (iii) microsomes/dGuo, and (iv) NADPH/THF/microsomes/dGuo were done in triplicate. After 2 h of incubation under shaking at 37 °C, the microsomal proteins were extracted 3 times with an equal volume of chloroform (3 min, 320g). The resulting aqueous suspensions were filtered through a 2 μ m membrane, and aliquots of the obtained solutions were reacted with NaBH₄ (50 μ L of a 100 mg/mL aqueous solution, overnight) for reduction and stabilization of the adducts. The samples were then analyzed by HPLC/ESI/MS-MS, as described above (HPLC system 3).

Measurement of 8-OxodGuo Levels in Samples of 2'-Deoxyguanosine Incubated with Microsomes and THF. The filtered aqueous suspensions resulted from the above microsomal incubations were also injected into an HPLC/EC system consisting of a Shimadzu LC-10AD pump (Shimadzu, Kyoto, Japan) connected to a Luna C18 (Phenomenex, Torrance, CA) reversed phase column (250 mm $\times$ 4.6 mm i.d., 5 μ m) for determination of 8-oxodGuo levels. The isocratic eluant consisted of a mixture of 25 mM potassium phosphate buffer, pH 5.5, with 8% methanol at a flow rate of 1 mL/min. Coulometric detection was provided by a Coulochem II detector (ESA, Chemsford, MA). The potentials of the two electrodes were set at 120 and 280 mV. The molar ratio of 8-oxodGuo to dGuo in each sample was determined based on coulometric detection at 280 mV for 8-oxodGuo and absorbance at 254 nm for dGuo in each injection.

Results

Reaction of dGuo, dAdo, and dCyd with Oxidized THF.

We have already shown that the reaction of THF oxidation products with 1,N²- ϵ dGuo, a well-known adduct of dGuo with oxidized α,β -unsaturated aldehydes, leads to the formation of three novel 1,N²- ϵ dGuo-THF adducts (11). Further work on investigation of THF reactivity with DNA bases in vitro revealed that THF oxidation products also form adducts with dGuo, dAdo, and dCyd, as shown in Figure 1. Incubations were performed at pH 4.0 and pH 7.4, as stated in Experimental Procedures, and we observed better yields of the dGuo adducts at pH 4.0, while the dAdo and dCyd adducts were formed in

higher yields at pH 7.4. Adducts dGuo-THF 1, dGuo-THF 2, dAdo-THF, and dCyd-THF were purified by eluting the aqueous phase of the reaction mixture through the HPLC system 1. The collected fractions were concentrated under vacuum and repurified through the same HPLC system. The adducts' UV spectra obtained through the photodiode array detector coupled to the HPLC system 1 show a bathochromic shift when compared to the UV spectra of the original deoxynucleosides (Figure 2). The ESI/MS spectra indicate an increase in the molecular mass of the adducts by 70 Da with respect to the original deoxynucleosides, being consistent with adducts dGuo/THF (1:1), dAdo/THF (1:1), and dCyd/THF (1:1) with the loss of two hydrogen atoms (Figure 3A). We observed that the dGuo-THF 1, dAdo-THF, and dCyd-THF adducts were converted back to the original deoxynucleosides in the repurification step if the aqueous solutions were kept at room temperature (data not shown). This finding prompted us to look for stable derivatives of these adducts for structure confirmation through ¹H NMR and ¹H-¹H COSY or ¹H-¹³C HMQC/HMBC NMR analyses. Adduct incubation with NaBH₄ after the first purification step resulted in the formation of stable reduced derivatives. The ESI/MS of the reduced adducts are depicted in Figure 3B, which shows the addition of two hydrogen atoms to the original molecules. In contrast, adduct dGuo-THF 2 was stable in the purification conditions and was not reduced after incubation with NaBH₄. The ¹H NMR data obtained for the three reduced adducts and for dGuo-THF 2 are summarized in Table 1. Another minor adduct obtained in the dGuo/THF reactions (dGuo-THF 3 shown in Figure 1) was not fully characterized because of the small yields obtained. The mass spectrum of this adduct shows a protonated molecular ion at *m/z* 338, also indicating the addition of a THF molecule to the deoxynucleoside (data not shown). The site of the reaction must yet be clarified.

The ¹H NMR spectrum of the reduced adduct dGuo-THF 1 shows, in addition to the sugar protons, a singlet at 8.51 ppm (H-8), triplets at 3.38–3.41 ppm (2H-13, *J* = 6.29 Hz) and 3.20–3.23 ppm (2H-10, *J* = 6.86 Hz), multiplets at 1.48–1.54 ppm (2H-11) and 1.42–1.47 ppm (2H-12), and a broad singlet at 7.72 ppm (N²-H). The chemical shifts and coupling constants of the side chain protons are in agreement with those described by Young-Sciame and co-workers (14), who characterized the same base structure resulting from the reaction of α -acetoxy-*N*-nitrosopyrrolidine with dGuo, followed by NaBH₄ reduction and acid hydrolysis of the modified deoxynucleoside to obtain the adducted base. The H-8 signal we observed for the reduced adduct dGuo-THF 1 is deshielded when compared to the most common H-8 dGuo chemical shifts reported in the literature (9–11, 14). In general, N²-substituted guanine and N²-substituted deoxyguanosine have H-8 chemical shifts of about 7.6 and 7.8–7.9 ppm, respectively. The ¹H NMR spectrum we have obtained for the nonreduced dGuo-THF 1 shows, in fact, the H-8 dGuo chemical shift at 7.82 ppm, which correlates well with the C-8

Figure 4. HPLC elution profile with ESI/MS–MS (MRM) detection of the ions $[M + H]^+$ m/z 300 $\rightarrow$ 184 (dCyd–THF reduced), 324 $\rightarrow$ 208 (dAdo–THF reduced), 340 $\rightarrow$ 224 (dGuo–THF 1 reduced), and 338 $\rightarrow$ 152 (dGuo–THF 2) present in DNA reacted with oxidized THF and control. The chromatograms were obtained with HPLC systems 3 (dGuo–THF adducts), 4 (dAdo–THF adduct), and 5 (dCyd–THF adduct). Conditions as described in Experimental Procedures.

signal at 137 ppm in the HMQC spectrum and does not correlate with any other signal in the COSY spectrum (data not shown). When considering the tautomerism of dGuo, one observes that the enol tautomeric form has an electronic distribution in the purine ring similar to that observed for dAdo, which presents H-8 chemical shifts of 8.27–8.89 ppm, depending on the N^6 substituent. The process of dGuo–THF 1 reduction may lead to stabilization of the enol tautomeric form of dGuo, shifting H-8 to 8.5 ppm.

The ^1H NMR chemical shifts of adduct dGuo–THF 2 indicate the presence of a THF ring in the structure, as the signals at 5.07–5.09 ppm (H-10, triplet, $J = 4.16$ Hz), 3.68–3.76 ppm (2H-13, multiplet), 1.81–1.88 ppm (2H-11), and 1.72–1.78 ppm (2H-12) are congruent with those described for the THF molecule (11, 14, NMR tables in the literature). These ^1H NMR assignments were confirmed by ^1H – ^1H COSY, HMQC, and/or HMBC experiments. Correlations between the signals at 1.75 ppm (2H-12) and 3.72 ppm (2H-13), and between those at 1.84

Figure 5. HPLC elution profile with ESI/MS-MS (MRM) detection of the ion $[M + H]^+ m/z 340 \rightarrow 224$ (dGuo-THF 1 reduced) in dGuo incubations with rat liver microsomes in the presence or absence of THF free of peroxides and NADPH. The chromatograms were obtained with HPLC system 3. Conditions as described in Experimental Procedures.

ppm (2H-11) and 5.08 ppm (H-10), were observed in the COSY spectrum. Duplicated signals of H-5', H-5'', and H-8 were observed in the ^1H NMR spectrum (Table 1A), indicating that the sample under analysis was, in fact, a mixture of diastereomers. From the HMBC spectrum, we were able to verify the correlations of H-8 with the quaternary carbons C-4 (150 ppm) and C-5 (116 ppm); of H-10 with C-11 (33 ppm), C-12 (23 ppm), and C-13 (67 ppm); of 2H-11 with C-12 (23 ppm); and of 2H-12 with C-11 (33 ppm). However, it was not possible to observe the signals of C-2 and C-6, whose correlations with H-10 would help to assign the site of dGuo substitution. Integration of the broad singlet that appears at 6.47 ppm ($N^2\text{-H}_2$) shows the presence of two protons that do not couple with any other proton in the ^1H - ^1H COSY spectrum, nor correlate with any carbon atom in the HMQC or HMBC spectrum, excluding the dGuo- N^2 substitution. Another site for the reaction of 4-hydroxybutanal with dGuo might be the O^6 position, but the UV spectrum obtained for the dGuo-THF 2 adduct (Figure 2) does not show the characteristic separate absorption bands of O^6 substitution, with λ_{max} at about 250 and 280 nm. In addition, a fragment corresponding to the loss of only the 2'-deoxyribose moiety should be observed in the ESI/MS spectrum of the dGuo-THF 2 adduct on considering an O^6 substitution (as is observed for other substitutions in deoxynucleosides exocyclic groups). This was also not observed (Figure 3A). As adduct dGuo-THF 2 is unaffected by NaBH_4 treatment, the intermediate structure in adduct formation could not be a Schiff base (as occurs in the formation of adduct dGuo-THF 1, Scheme 1). The above spectral data led us to conclude that the THF ring was added to the N-1 position of dGuo (Scheme 2).

The ^1H NMR spectra of the reduced adducts dAdo-THF and dCyd-THF also show a hydroxy-butyl side chain linked to the deoxynucleosides. In addition to the sugar protons, the reduced dAdo-THF shows singlets at 8.31 ppm (H-8), 8.18 ppm (H-2), and 7.82 ppm (bs, $N^6\text{-H}$); a triplet at 3.37–3.41 ppm (2H-13, $J = 6.45$ Hz); and multiplets at 1.55–1.62 ppm (2H-11) and 1.41–1.47 ppm (2H-12). The signal corresponding to 2H-10 was hidden by the signal of water at 3.30 ppm. The ^1H - ^1H

COSY shows that the signal at 1.44 ppm (2H-12) correlates to those at 1.58 ppm (2H-11) and 3.39 ppm (2H-13). The ^{13}C NMR spectrum shows 14 signals as expected for the adduct structure: C-2 (153 ppm), C-4 (148 ppm), C-5 (120 ppm), C-6 (155 ppm), C-8 (139 ppm), C-10 (69 ppm), C-11 (30 ppm), C-12 (26 ppm), C-13 (61 ppm), C-1' (84 ppm), C-2' (hidden by the DMSO signal at 40 ppm), C-3' (71 ppm), C-4' (88 ppm), and C-5' (62 ppm). In the reduced dCyd-THF, we observe the sugar protons, doublets at 7.69–7.71 ppm (H-6, $J = 7.5$ Hz) and 5.70–5.72 ppm (H-5, $J = 7.5$ Hz), triplets at 7.64–7.66 ppm ($N^4\text{-H}$, $J = 5.4$ Hz) and 3.37–3.40 ppm (2H-10, $J = 6.45$ Hz), and multiplets at 3.19–3.24 ppm (2H-7), 1.47–1.52 ppm (2H-8), and 1.40–1.46 ppm (2H-9). In this case, $N^4\text{-H}$ (7.65 ppm) couples to 2H-7 (3.21 ppm), confirming the site of the reaction. The ^1H - ^1H COSY shows also that the signal at 1.43 ppm (2H-9) correlates to those at 1.49 ppm (2H-8) and 3.38 ppm (2H-10), the signal at 1.49 ppm (2H-8) correlates additionally to that at 3.21 ppm (2H-7), and the signal at 7.70 ppm (H-6) correlates to that at 5.71 ppm (H-5).

Adduct Formation through Reaction of DNA with Oxidized THF. Calf thymus DNA was allowed to react with oxidized THF at pH 4.0 and pH 7.4. After enzymatic hydrolysis, the released adducts were reduced by overnight incubation with NaBH_4 and analyzed by HPLC/ESI/MS-MS, as described in Experimental Procedures (HPLC systems 3–5). Figure 4 shows the chromatographic behavior of the resulting products in the HPLC/ESI/MS-MS systems. MRM selection was used to monitor the formation of dGuo-THF 1 (reduced, $m/z 340 \rightarrow 224$), dGuo-THF 2 ($m/z 338 \rightarrow 152$), dAdo-THF (reduced, $m/z 324 \rightarrow 208$), and dCyd-THF (reduced, $m/z 300 \rightarrow 184$).

Adduct Formation through Microsomal Oxidation of THF. To ascertain whether liver monooxygenases are able to oxidize THF to electrophilic products that could react with DNA and give rise to one of the above-characterized adducts, we used liver microsomes from a phenobarbital-treated Sprague-Dawley rat. Incubations were done as described in Experimental Procedures, and formation of the adduct dGuo-THF 1 was analyzed by HPLC/ESI/MS-MS (MRM). We observed that the

addition of NADPH to the incubation mixtures led to a significant increase (~ 50 times) in the level of the reduced adduct dGuo-THF 1 when compared to the levels detected in the presence of THF and absence of NADPH. Examples of the chromatograms obtained (HPLC/ESI/MS-MS, HPLC system 3, MRM monitoring) are shown in Figure 5. Figure 6 shows

Figure 6. Relative areas of the reduced adduct dGuo-THF 1 and 8-oxodGuo levels in the incubation mixtures (i) dGuo/microsomes/NADPH, (ii) dGuo/microsomes/THF, (iii) dGuo/microsomes, and (iv) dGuo/microsomes/NADPH/THF. Conditions as described in Experimental Procedures. The statistical comparisons were carried out using independent two-population Student's *t*-test: ^{*a} *p* = 0.06 when compared to the control samples; ^{*b} *p* = 0.002 when compared to the control samples.

the relative areas (adduct peak area/dGuo peak area) of the reduced dGuo-THF 1 in the incubation mixtures. Concomitant to this event, we observed a decrease in the level of 8-oxodGuo when THF was added to the system containing dGuo, microsomes, and NADPH, suggesting that dGuo and THF compete for the active site of the microsomal enzymes (Figure 6).

Discussion

Our results show that oxidized THF is able to react with amino groups of the deoxyribonucleosides dGuo, dCyd, and dAdo, giving rise to adducts with these DNA bases. Through spectroscopic measurements, we characterized two products of the dGuo reaction, named 9-(4-hydroxy-5-hydroxymethyl-oxolan-2-yl)-2-(oxolan-2-ylamino)-1,9-dihydro-purin-6-one (dGuo-THF 1) and 2-amino-9-(4-hydroxy-5-hydroxymethyl-oxolan-2-yl)-1-(oxolan-2-yl)-1,9-dihydro-purin-6-one (dGuo-THF 2), one major product of the dCyd reaction, 1-(4-hydroxy-5-hydroxy-

methyl-oxolan-2-yl)-4-(oxolan-2-ylamino)-1*H*-pyrimidin-2-one (dCyd-THF), and one major product of the dAdo reaction, 2-hydroxymethyl-5-[6-(oxolan-2-ylamino)-purin-9-yl]-oxolan-3-ol (dAdo-THF). Three of the adducts obtained were successfully reduced by NaBH₄ treatment (dGuo-THF 1, dCyd-THF, and dAdo-THF), while adduct dGuo-THF 2 was not. This finding led us to conclude that the intermediate structures in adducts dGuo-THF 1, dCyd-THF and dAdo-THF formation were Schiff bases (Scheme 1). Instead, dGuo-THF 2 was formed through a non-Schiff base intermediate (Scheme 2). Previously, we proposed a reaction mechanism leading to the formation of 1,*N*²- ϵ dGuo-THF adducts (11). Here, too, we have an electrophilic attack on the amino groups of the bases by the 4-hydroxy-butanal carbonyl generated via ring opening of the α -hydroxy-THF (Schemes 1 and 2).

The stable derivatives obtained by adduct reduction with NaBH₄ (the case of dGuo-THF 1, dCyd-THF, and dAdo-THF) and the stable adduct dGuo-THF 2 were used as standards for optimization of chromatographic separations for adduct detection in DNA through HPLC/ESI/MS-MS. Using this methodology, we were able to detect the four adducts in calf thymus DNA reacted with oxidized THF. A reduction step was included after DNA hydrolysis to stabilize the detectable species (Figure 4). Adducts dCyd-THF and dAdo-THF were also detected in minor concentrations in the DNA that was not reacted with THF (control DNA). The endogenous formation of these adducts, as well as their stability inside the DNA molecule, still need to be investigated. It must be noted, however, that the cyclic nitrosamine *N*-nitrosopyrrolidine is generated endogenously, is present in the diet, and can give rise to nucleosides-THF adducts through an α -hydroxyl derivative that decomposes to a THF-OH intermediate (14). With respect to the stability of the adducts, a recent study has shown that the 6-hydroxyethano adduct, an intermediate in the formation of 1,*N*²- ϵ dGuo, has a half-life of 1 to 2 days in oligonucleotides in potassium phosphate buffer (50 mM, pH 7.0). Although it has low stability, the authors verified that the hydroxyethano adduct has sufficient lifetime and miscoding properties to contribute to the mutagenic spectrum of compounds such as vinyl halides and α,β -unsaturated aldehydes sources of 1,*N*²- ϵ dGuo (15).

The present study also provides evidence that rat liver microsomal monooxygenases oxidize THF to the reactive electrophilic compounds that are able to damage the DNA molecule, as shown by the significant increase in adduct dGuo-THF 1 level when NADPH was added to the THF/microsomes/dGuo incubation mixtures (Figure 6). In a previous study, it was clearly evidenced that THF leads to increased cytochrome P450 content and increased ethoxyresorufin-*O*-deethylase (EROD) and pentoxyresorufin-*O*-deethylase (PROD) activities in the liver of female B6C3F₁ mice exposed to 1800 ppm THF (16). This effect was accompanied by increased liver cell proliferation and mitotic index (16). An attempt to elucidate the role of THF metabolism in liver cell proliferation was made using a nonspecific suicide inhibitor of cytochrome P450, 1-aminobenzotriazole (17). Although the authors concluded that the suppression of THF metabolism by 1-aminobenzotriazole caused an additional mitogenic response of the liver midzonal region, they could not exclude the possibility that another THF metabolic pathway occurred, with formation of metabolites that could lead to the mitogenic effect (17). The 1800 ppm exposure dose led to significantly high incidences of hepatocellular neoplasms in female B6C3F₁ mice in the 2-year study of the National Toxicology Program (6, 7). Since there is a paucity

of information about cellular toxicity, biomolecular damage, and genotoxicity induced by THF, the above-described effects have been attributed only to a nongenotoxic mode of action of THF (16, 17). The results presented here point to another possible mechanism involving a genotoxic pathway. Further studies are required to verify the relevance of this mechanism in vivo.

Acknowledgment. This work was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP (Brazil), the Conselho Nacional para o Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq (Brazil), the Conselho Nacional para o Desenvolvimento Científico e Tecnológico—Instituto do Milênio: Redoxoma (Brazil), Pró-Reitoria de Pesquisa da Universidade de São Paulo (Brazil), and Programa de Apoio aos Núcleos de Excelência, PRONEX/FINEP (Brazil). E.P.M.P. and D.B.S. held a FAPESP fellowship. S.A.S.H. and O.F.G. hold CNPq fellowships. P.D.M. is the recipient of a fellowship from the Guggenheim Foundation. We thank Miriam Uemi and Fernanda Manso Prado (IQ-USP, São Paulo, Brazil) for their assistance in the NMR and MS analyses, respectively.

References

- (1) Ong, C. N., Chia, S. E., Phoon, W. H., and Tan, K. T. (1991) Biological monitoring of occupational exposure to tetrahydrofuran. *Br. J. Ind. Med.* 48, 616–621.
- (2) Hazardous Substances Data Bank (HSDB) (2003) Database maintained by the National Library of Medicine, available through the MEDLARS system. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD.
- (3) Daye, K. J., Groff, J. C., Kirpekar, A. C., and Mazumder, R. (2003) High efficiency degradation of tetrahydrofuran (THF) using a membrane bioreactor: identification of THF-degrading cultures of *Pseudonocardia* sp. strain M1 and *Rhodococcus ruber* isolate M2. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 30, 705–714.
- (4) SenGupta, S., Upadhyaya, H. P., Kumar, A., Naik, P. D., and Bajaj, P. (2005) Detection of OH radical in laser induced photo dissociation of tetrahydrofuran at 193 nm. *J. Chem. Phys.* 122, 124309.
- (5) Cartigny, B., Azaroual, N., Imbenotte, M., Sadeg, N., Testart, F., Richecoeur, J., Vermeersch, G., and Lhermitte, M. (2001) ^1H NMR spectroscopic investigation of serum and urine in a case of acute tetrahydrofuran poisoning. *J. Anal. Toxicol.* 25, 270–274.
- (6) National Toxicology Program (NTP) (1998) Toxicology and carcinogenesis studies of tetrahydrofuran (CAS No. 109-99-9) 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 of Health, Research Triangle Park, NC.
- (7) Chhabra, R. S., Herbert, R. A., Roycroft, J. H., Chou, B., Miller, R. A., and Renne, R. A. (1998) Carcinogenesis studies of tetrahydrofuran vapors in rats and mice. *Toxicol. Sci.* 41, 183–188.
- (8) American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH) (2002). *TLVs and BEIs: Threshold Limit Values for Chemical Substances and Physical Agents and Biological Exposure Indices for 2002*. Cincinnati, OH.
- (9) Loureiro, A. P. M., Di Mascio, P., Gomes, O. F., and Medeiros, M. H. G. (2000) *trans,trans*-2,4-Decadienal-induced 1,*N*²-etheno-2'-deoxyguanosine adduct formation. *Chem. Res. Toxicol.* 13, 601–609.
- (10) Loureiro, A. P. M., Campos, I. P. d. A., Gomes, O. F., Di Mascio, P., and Medeiros, M. H. G. (2004) Structural characterization of diastereoisomeric ethano adducts derived from the reaction of 2'-deoxyguanosine with *trans,trans*-2,4-decadienal. *Chem. Res. Toxicol.* 17, 641–649.
- (11) Loureiro, A. P. M., Campos, I. P. d. A., Gomes, O. F., Possari, E. P. M., Di Mascio, P., and Medeiros, M. H. G. (2005) Structural characterization of an etheno-2'-deoxyguanosine adduct modified by tetrahydrofuran. *Chem. Res. Toxicol.* 18, 290–299.
- (12) Jiang, Z.-Y., Woollard, A. C. S., and Wolff, S. P. (1991) Lipid hydroperoxide measured by oxidation of Fe^{2+} in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and an iodometric method. *Lipids* 26, 853–856.
- (13) Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- (14) Young-Sciame, R., Wang, M., Chung, F. L., and Hecht, S. S. (1995) Reactions of α -acetoxy-*N*-nitrosopyrrolidine and α -acetoxy-*N*-nitrosopiperidine with deoxyguanosine: formation of *N*²-tetrahydrofuran-yl and *N*²-tetrahydropyranyl adducts. *Chem. Res. Toxicol.* 8, 607–616.
- (15) Goodenough, A. K., Kozekov, I. D., Zang, H., Choi, J.-Y., Guengerich, F. P., Harris, T. M., and Rizzo, C. J. (2005) Site specific synthesis and polymerase bypass of oligonucleotides containing a 6-hydroxy-3,5,6,7-tetrahydro-9*H*-imidazo[1,2- α]purin-9-one base, an intermediate in the formation of 1,*N*²-etheno-2'-deoxyguanosine. *Chem. Res. Toxicol.* 18, 1701–1714.
- (16) Gamer, A. O., Jaekch, R., Leibold, E., Kaufmann, W., Gembardt, C., Bahnmann, R., and van Ravenzwaay, B. (2002) Investigations on cell proliferation and enzyme induction in male rat kidney and female mouse liver caused by tetrahydrofuran. *Toxicol. Sci.* 70, 140–149.
- (17) van Ravenzwaay, B., Gamer, A. O., Leibold, E., and Kaufmann, W. (2003) Effect of cytochrome P-450 inhibition on tetrahydrofuran-induced hepatocellular proliferation in female mice. *Arch. Toxicol.* 77, 459–464.

TX060033D

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**Faculdade de Ciências Farmacêuticas**

Comissão de Ética em Experimentação Animal

O/CEEA nº 17/2004

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto "Desenvolvimento de novos marcadores moleculares para avaliação de danos causados por exposição a hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e tetrahydrofurano" (Protocolo nº41), sob a responsabilidade da pesquisadora Profa. Ana Paula de Melo Loureiro, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) desta Faculdade, em 05/04/2004.

São Paulo, 06 de abril de 2004.

Prof. Assoc. Elfriede Marianne Bacchi
Coordenadora da CEEA