

1. Introdução

O desenvolvimento do câncer é mediado por alterações na seqüência e na organização do genoma celular que variam de substituição de um nucleotídeo a aberrações cromossômicas. O evento crucial é a alteração genômica que resulta em alteração funcional de proteínas/enzimas (SHILOH, 2003).

O processo pode se iniciar quando substâncias endógenas e exógenas reativas, ou tornadas reativas após biotransformação, se ligam a biomoléculas, como o DNA, formando adutos ou induzindo sua fragmentação ou oxidação. Essas lesões induzem várias respostas celulares, incluindo ativação do reparo do DNA, alteração do ciclo celular e apoptose (morte celular programada) (KASTAN & BARTEK, 2004), mas pode também dar origem a gerações de células mutadas.

Os eventos bioquímicos que conduzem ao dano incluem formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS) e metabólitos reativos (DE BONT E VAN LAREBEKE, 2004). A carcinogênese está diretamente relacionada a alterações genéticas resultantes de mutações após lesões em DNA. Essas lesões, quando não reparadas e ocorrendo em genes importantes, como os relacionados ao controle do ciclo celular, perturbam a homeostase, podendo levar a um crescimento celular desordenado, o câncer (LOWE *et al.*, 2004).

As alterações no DNA podem resultar de fatores endógenos, como defeitos nos mecanismos de reparo ou replicação e geração de ROS e RNS, ou exógenos, como radiação ionizante, mutágenos químicos (ex.: hidrocarbonetos policíclicos aromáticos - HPAs) e biológicos (ex.: vírus da hepatite-HBV) (FETT-CONTE *et al.*, 2000).

1.1 Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos

Os HPAs são poluentes ambientais pertencentes a uma classe de compostos orgânicos caracterizados por dois ou mais anéis aromáticos fundidos e

constituídos unicamente de átomos de carbono e hidrogênio (**figura 1.1**) (WHO, 2003).

Essas substâncias são amplamente emitidas à atmosfera por atividades naturais (ex.: vulcões) e antropogênicas (produtos da queima incompleta de matéria orgânica em incineradores, na combustão dos derivados de petróleo, em chaminés de fábricas, em processos petrolíferos e em queimadas) (RIBEIRO e ASSUNÇÃO, 2002; GIODA e NETO, 2003). A composição e a complexidade das misturas geradas dependem da fonte emissora, pois estão relacionadas com as condições de reação, temperatura e quantidade de ar envolvido (SAMANTA *et al.*, 2002; WEY *et al.*, 2006).

Uma fonte relevante e rica em mistura de HPAs é a fumaça do cigarro e tem sido uma grande preocupação de saúde pública, pois os impactos negativos envolvem tanto os fumantes ativos, como os passivos (GOODSEL *et al.*, 2004). Em ambientes fechados é o principal contribuinte para o aumento dos níveis ambientais dessas substâncias (GIODA e NETO, 2003).

Estudos recentes mostraram a presença de HPAs de origem pirogênica (queima de matéria orgânica) e petrogênica (derivados de petróleo) em concentrações variando de 8 a 4163 µg/Kg de sedimento (peso seco) na Baía de Todos os Santos em Salvador, Bahia (VENTURINI *et al.*, 2004) e nas concentrações de 0,02 a 4,2 µg/L em chorume proveniente de aterro controlado, como o do Morro do Céu, em Niterói, Rio de Janeiro (NETTO *et al.*, 2002). O mais preocupante é que os destinos destes líquidos são rios, lagos e mares. Além disso, alguns dos HPAs descritos como carcinogênicos pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA), como exemplo o indeno[1,2,3-*cd*]pireno (InP), benzo[*a*]pireno (B[*a*]P) e antraceno, foram quantificados em plantas como *Cucumis sativus* (pepino japonês) e *Cucurbita pepo* ssp (pepino caipira, abobrinha), cultivadas em solo contaminado (PARRISH *et al.*, 2006), mostrando que os HPAs podem tornar-se biodisponíveis e ser transferidos ao longo da cadeia alimentar.

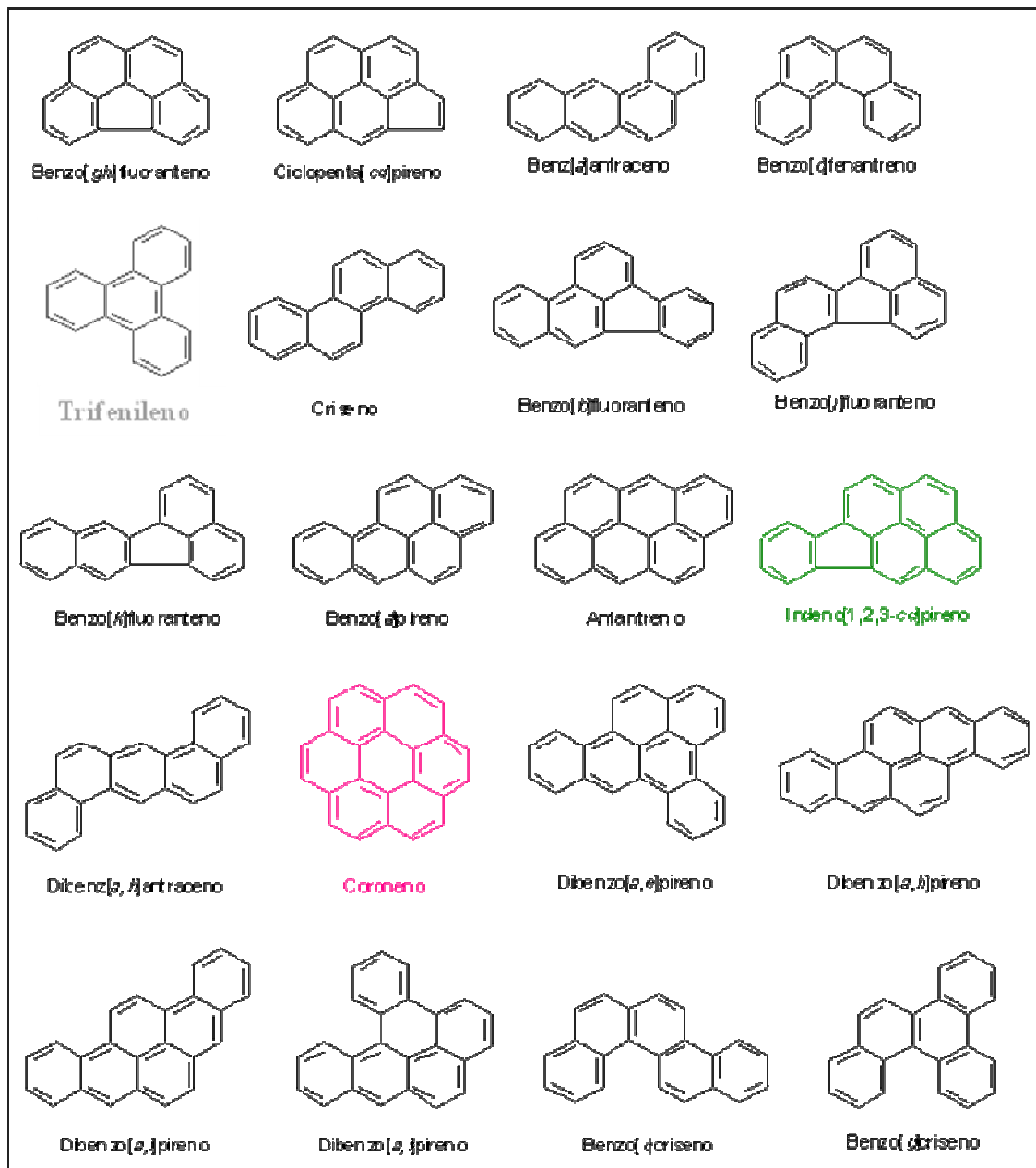


Figura 1.1. Estruturas químicas de alguns HPAs.

A contaminação de alimentos por essas substâncias também pode ser decorrente do uso de água contaminada e da sedimentação sobre grãos e, em maior escala, de alguns processos de industrialização tais como defumação, secagem, torrefação, cozimento a altas temperaturas e migração de embalagem (CAMARGO *et al.*, 2006).

A meia vida ambiental dos HPAs de maior peso molecular (constituídos por 5 ou mais anéis aromáticos) é relativamente elevada, o que indica que sua degradação é lenta. Os HPAs com menor número de anéis aromáticos, ao serem sedimentados, tendem a interagir com o solo, o que pode contribuir para sua degradação no decorrer do tempo (JOHNSEN *et al.*, 2006). São estáveis à hidrólise (WHO, 2003; KRIVOBOK *et al.*, 2003), mas podem ser lentamente biotransformados por fungos e bactérias, gerando compostos mais mutagênicos, com maior solubilidade em água (UMBUZEIRO *et al.*, 2004). Normalmente a intensidade do impacto ao ecossistema e o tempo de recuperação tendem a ser diretamente proporcionais às quantidades desses compostos no meio ambiente.

A solubilidade dos HPAs em água diminui com o aumento do peso molecular, com exceção do naftaleno que é relativamente solúvel (32 mg/L). Seus coeficientes de partição óleo/água (K_{ow}) são elevados e diferem de acordo com a massa molecular. Como resultado, em sistemas aquosos, tendem a concentrar-se de forma inalterada em sedimentos, geralmente adsorvidos ao material sólido em suspensão ou dispersos na fase coloidal (COUTWAY *et al.*, 2003; HYLLAND, 2006).

Em virtude de suas propriedades físico-químicas e da grande distribuição ambiental, o risco de contaminação humana por essas substâncias é significativo. Apresentam característica lipofílica e podem ser facilmente absorvidos pela pele, por ingestão ou por inalação, sendo rapidamente distribuídos pelo organismo (BRAUN *et al.*, 2004). Quando veiculado pelos alimentos, os HPAs atravessam a membrana intestinal e através de circulação entero-hepática atingem os hepatócitos ainda em grande concentração.

Para viabilizar a excreção corpórea, essas substâncias precisam ser biotransformadas enzimaticamente, o que pode levar a formação de produtos eletrofílicos com capacidade de lesar biomoléculas, como o DNA. O processo de biotransformação também gera espécies reativas de oxigênio, as quais também danificam o DNA, como será descrito adiante. Além disso, alguns HPAs apresentam estruturas moleculares caracterizadas pela fusão de benzenos orto-fundidos, denominadas de região de baía ou fjord (ver **figura 1.2.**), as quais são frequentemente relacionadas com ação carcinogênica dessas substâncias. Esses mecanismos podem ter um efeito sinérgico na presença de outros poluentes

ambientais, tais como os metais, potencializando sua genotoxicidade (SQUADRITO *et al.*, 2001; MIELZYNSKA *et al.*, 2006).

Misturas de HPAs são mutagênicas em bactérias, como *Salmonella typhimurium* (DU FOUR *et al.*, 2005) e em células humanas (PANDEY *et al.*, 2006), carcinogênicas em animais experimentais (MOORTHY *et al.*, 2003) e, portanto, suspeitas de terem um papel importante na etiologia de muitas doenças humanas, dentre elas, o câncer (BIGGER *et al.*, 2000). Comprometimentos cardiovasculares também têm sido vastamente associados à poluição (CLANCY *et al.*, 2002; ZANOBETTI *et al.*, 2003; MOORTHY *et al.*, 2003).

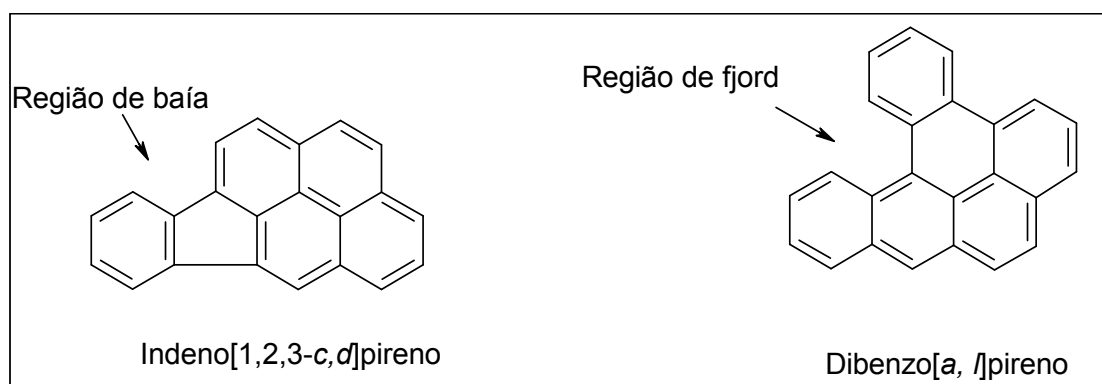


Figura 1.2. Presença de região de baía e fjord em HPAs

Os HPAs de menor massa molecular (até 4 anéis aromáticos) apresentam maior toxicidade aguda, levando a efeitos sobre o sistema imunológico, alterações na regulação endócrina e no desenvolvimento fetal (DIETERT e PIEPEMBRINK, 2006). Os HPAs de maior massa molecular são mais genotóxicos tanto para humanos como para animais (RICE *et al.*, 2000). Risco aumentado de dano (adutos HPA-DNA) foi observado em populações ocupacionalmente expostas aos HPAs gerados por fontes industriais (como fábrica de alumínio) e urbanas (ex.: tráfego de veículos automotores) (SRAM e BINKOVA, 2000; DE BUCK *et al.*, 2005).

A exposição a estas substâncias tem sido apontada como uma das principais causas do desenvolvimento de vários tipos de leucemia em crianças, tanto

em regiões urbanas, onde há uma prevalência de atividade industrial e tráfego de veículos como fontes emissoras (KWAN *et al.*, 2005), como em regiões rurais, onde a única fonte emissora constatada é a atividade petrolífera, cujos rejeitos contaminam solo (óleo misturado com água) e ar (gases liberados durante a extração do óleo) (HURTIG *et al.*, 2004). Tal exposição foi também apontada como contribuinte para o aumento de aberrações cromossômicas em sangue de cordão umbilical de crianças sob exposição ambiental pré-natal aos HPAs (BOCSKAY *et al.*, 2005) e para mutações somáticas em recém-nascidos (PERERA *et al.*, 2005). Estas alterações estão relacionadas à embriotoxicidade sinérgica dos HPAs, por via epigenética, como mostrado por WASSENBERG E GIULIO, 2004.

O monitoramento biológico da exposição ambiental, ocupacional e social a esses poluentes é de fundamental importância para a prevenção de um desequilíbrio gerador de danos. Foi observado um aumento na mutagenicidade urinária (teste com bactéria *Salmonella typhimurium* YG 1024) após ativação metabólica com S9 (fração hepática que contém enzimas de biotransformação de fase I e II), de trabalhadores ocupacionalmente expostos aos HPAs durante processamento industrial da matéria prima do refrigerante (SIMIOLI *et al.*, 2004), o que pode estar relacionado com o efeito genotóxico e conseqüentemente com a incidência de câncer de bexiga nesses profissionais (SIWINSKA *et al.*, 2006).

Dentre os HPAs, o benzo[a]pireno é o mais estudado. O 1-hidroxipireno detectado na urina é o produto de biotransformação do pireno, sendo muito utilizado como biomarcador de exposição humana (JONGENELEN, 2001) e animal a essas substâncias (OKONA-MENSAH *et al.*, 2005; MIELZYNSKA *et al.*, 2006). No entanto, outros HPAs têm sido mensurados em diversas matrizes ambientais (água, solo, ar e plantas). Isso aguça um questionamento sobre a eficácia da utilização desse indicador biológico quando ocorre exposição a concentrações significativas de outros HPAs, tais como indeno[1,2,3-*cd*]pireno, coroneno e trifenileno. Além disso, esses compostos são estruturalmente diferentes e a contribuição individual dos HPAs para a carcinogênese e outras doenças ainda é pouco esclarecida.

O indeno[1,2,3-*cd*]pireno, coroneno e trifenileno são HPAs encontrados em concentrações elevadas nas partículas aerotransportadas emitidas pelo tráfego de veículos automotores (CIGANEK *et al.*, 2004; LI *et al.*, 2005; LIU *et al.*, 2006) e apresentam importantes diferenças estruturais entre si (**figura 1.3.**).

O indeno[1,2,3-*cd*]pireno foi apontado pela Agência Internacional para Pesquisa do Câncer (IARC) como carcinogênico. Sua massa molecular é de 276,34 Da e apresenta uma região de baía. É composto de 5 anéis aromáticos. Foi identificado em vários tipos de resíduos sólidos industriais (SISINNO *et al.*, 2003) e na atmosfera por fontes urbanas (ex.: combustão de diesel e gasolina) e rurais (ex.: queima de carvão) (MOON *et al.*, 2006).

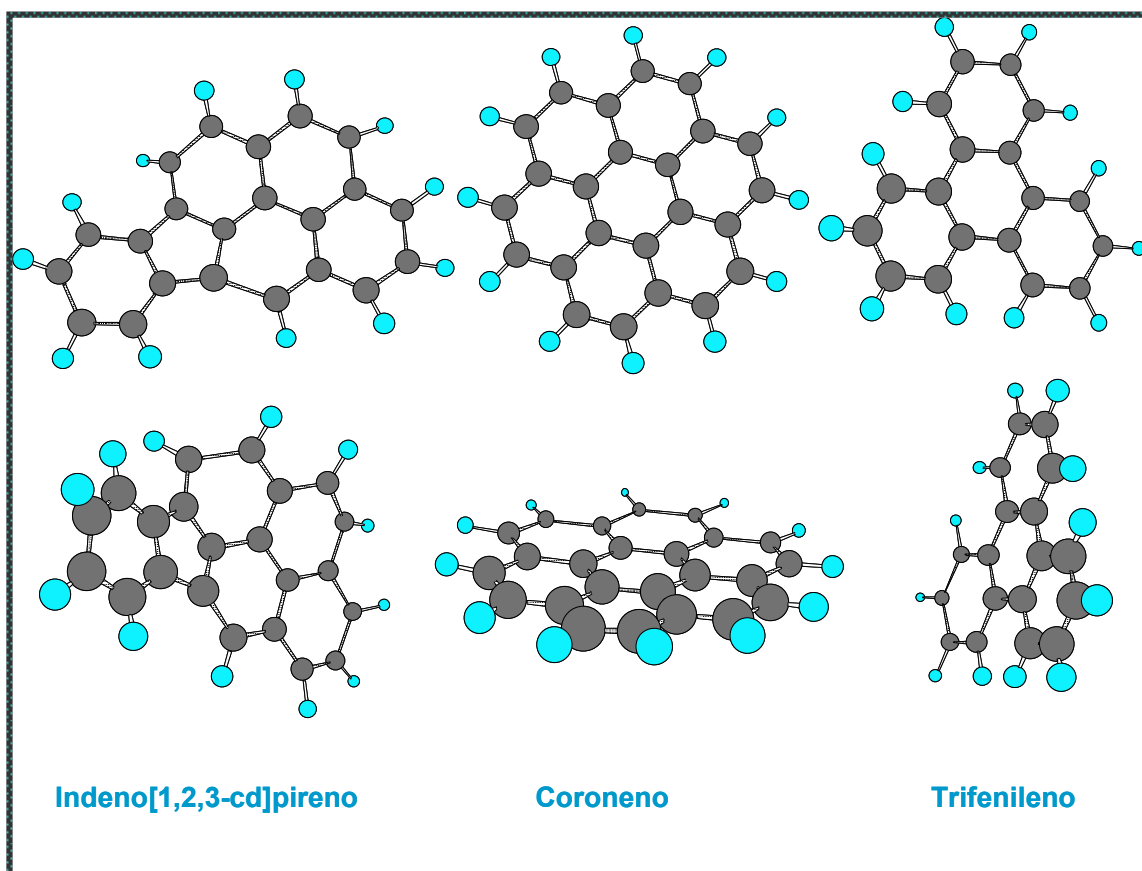


Figura 1.3. Estruturas químicas, em três dimensões (3D), dos HPAs indeno[1,2,3-*cd*]pireno, coroneno e trifênileno nas posições anterior e perfil.

Coroneno é uma molécula orgânica simétrica cuja estrutura se assemelha a um fragmento de grafita (CHI *et al.*, 2004). Sua massa molecular é de 300,26 Da e é composto por 7 anéis aromáticos. Não possui região de baía ou fjord, porém apresenta atividade mutagênica em teste de Ames na presença de fração S9, ou

seja, gera metabólitos mutagênicos (CIGANECK *et al.*, 2004; ASADA *et al.*, 2005). É largamente distribuído no meio ambiente (DE MARTINIS *et al.*, 2002; OMAR *et al.*, 2002; ORLINSKI, 2002; AMARANENI., 2006).

O trifenileno é um hidrocarboneto tetracíclico simétrico, com três regiões de baía idênticas, possui 4 anéis aromáticos e massa molecular 228,29 Da, mas sem dados adequados com relação à sua ação carcinogênica (IARC, 1983), apesar de alguns estudos terem evidenciado ação genotóxica desse composto após ativação metabólica (MERSCH-SUNDERMANN *et al.*, 1993).

1.2. Biotransformação e toxicidade dos HPAs

Diariamente somos expostos a toxicantes ambientais, também conhecidos como xenobióticos, em geral quimicamente inertes, e ao serem biotransformados pelo nosso organismo por enzimas de fase I e fase II podem originar compostos eletrofílicos que reagem com biomoléculas. Os HPAs são tóxicos e têm sido apontados como carcinogênicos ao homem (AWADA e DEDON, 2001). Sua atividade mutagênica é fortemente relacionada à estrutura molecular (OKONA-MENSAH *et al.*, 2005).

A biotransformação envolve uma série de enzimas que catalisam reações de oxidação, redução e hidrólise (fase I), como oxidases de função mista e NADPH-citocromoP450-redutase, bem como as que catalisam reações de conjugação (fase II), como as sulfotransferases, glutatona-S-transferases (GST) e UDP-glicuroniltransferases, que estão distribuídas em todos os tecidos, especialmente no fígado (SCHOKET *et al.*, 2001; PLATT *et al.*, 2005; DE BUCK *et al.*, 2005; CARRILHO *et al.*, 2005).

O sistema citocromo P450 (CYP450) constitui uma superfamília de proteínas heme localizadas no retículo endoplasmático e catalisam a oxidação de xenobióticos e endobióticos. Grande parte dessa oxidação ocorre no retículo endoplasmático, podendo ocorrer também nas mitocôndrias e no envoltório nuclear. Após homogeneização de tecidos e centrifugação do homogenato celular, o retículo endoplasmático pode ser isolado na forma de microvesículas chamadas

microsossomos. A fração microsossomal de fígados de ratos é largamente utilizada em ensaios *in vitro* para verificação do efeito de metabólitos de muitas substâncias (PLATT *et al.*, 2005; INAMI e MOCHIZUK, 2002).

Há vários mecanismos propostos para ativação enzimática dos HPAs. Dentre eles, podem ser citados a formação de um cátion radical, catalisada por CYP450 ou peroxidases (CAVALIERE *et al.*, 1995), a formação de derivados metilados (XUE e WARSHAWSKY, 2005), de *o*-quinonas (MCCOULL *et al.*, 1999; XUE e WARSHAWSKY, 2005) e de metabólitos de anel aberto (YAN *et al.*, 2003) (**figura 1.4**).

Um importante mecanismo de ativação dos HPAs envolve a epoxidação de duplas ligações por CYP450 1A1 e 1B1. As enzimas atuam principalmente sobre as regiões de elevada densidade eletrônica ou na região angular da molécula do HPA, formando os óxidos de areno (epóxidos) que podem espontaneamente formar fenóis ou, por ação da enzima epóxido hidrolase, produzir diidrodióis vicinais. Alguns fenóis são oxidados a quinonas e outros podem sofrer nova epoxidação, levando à formação de epóxidos secundários (diidrodiolépóxidos) (NETO *et al.*, 2000; MOREIRA *et al.*, 2001). A oxidação de trans-diidrodióis de HPAs através de enzimas aldo-cetoreduases (AKRs) levando à formação de *o*-quinonas é outro caminho bastante estudado (PARK *et al.*, 2005). O carbono do epóxido de diidrodiol-epóxidos é capaz de reagir covalentemente com as bases nucleofílicas do DNA, notadamente a guanina e a adenina, formando adutos, que quando não reparados dão origem a mutações (MCCOULL, 1999) (ver **figura 1.4**).

A oxidação de HPAs por radiação ultravioleta (UV) leva também à ativação desse compostos, havendo preocupação com a fototoxicidade dos mesmos. Na presença de metais, como o dióxido de titânio, a oxidação é acelerada (XAVIER *et al.*, 2005). Estudos com organismos aquáticos indicam que a exposição à radiação UV ou aos raios solares pode potencializar o efeito tóxico dos HPAs (HYLLAND, 2006). Outro estudo mostrou que produtos gerados pela fotodegradação dos HPAs induzem peroxidação lipídica (HERRENO-SAENZ *et al.*, 2006; XIA *et al.*, 2006) o que pode estar relacionado às mutações induzidas em bactérias (*Salmonella typhimurium*) expostas a produtos de fotodegradação de HPAs (YAN *et al.*, 2003).

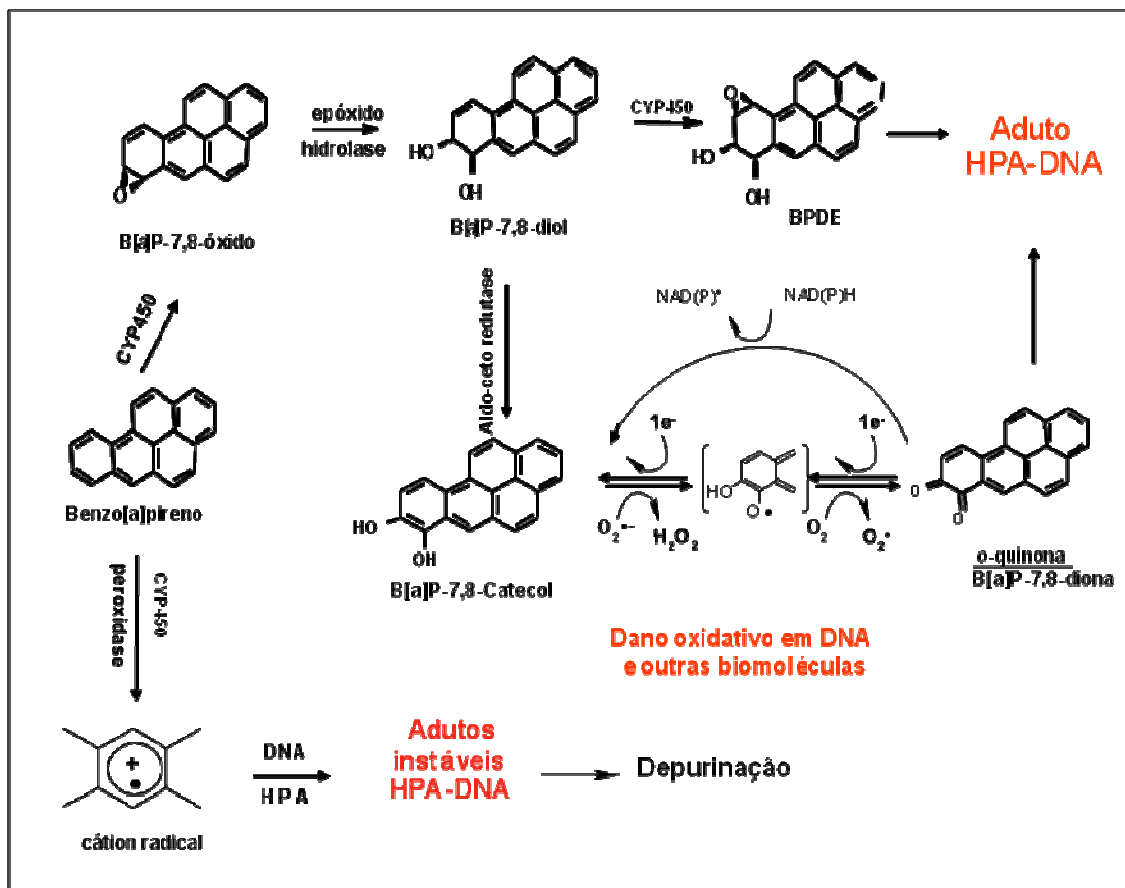


Figura 1.4: Vias de ativação metabólica dos HPA. Benzo[*a*]pireno (BaP), benzo[*a*]pireno diol epóxido (BPDE), hidrocarboneto policíclico aromático (HPA), orto-quinona (*o*-quinona).

Além disso, enzimas de ambas as fases da biotransformação são induzidas por HPA e outros xenobióticos. Algumas substâncias podem levar a um aumento da síntese de uma ou mais isoformas de CYP450, como a indução de CYP2B1 e CYP2B2 por fenobarbital, CYP2E1 pelo etanol (NAVASUMRIT *et al.*, 2001) e , CYP1A1, CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1 pelo aroclor (EASTERBROOK *et al.*, 2001). As CYP1A1 e CYP1B1 são induzidas por HPA, como 3-metilcolantreno e benzo[*a*]pireno e por compostos clorados, como bifenilas policloradas e dioxinas, os quais atuam como potentes agonistas do receptor de hidrocarbonetos aromáticos (AhR), atuando pela via epigenética (DENISON e NAGY, 2003; ROBOTOM-FERREIRA *et al.*, 2003; YUAN *et al.*, 2003; HU *et al.*, 2006).

1.3. Via Epigenética dos HPAs

O receptor de hidrocarbonetos aromáticos (AhR) é uma proteína que tem como uma das funções, modular as respostas a diversos compostos ambientais, incluindo HPAs, regulando a biotransformação desses xenobióticos pela indução de diferentes isoformas de CYP450 (BEISCHLAG *et al.*, 2002). Esse receptor é um membro do complexo heterodímero nuclear, um fator de transcrição. Ele fica situado no citoplasma associado a proteínas de choque térmico (hsp90) e outras proteínas. Quando ativado pela ligação de um xenobiótico, migra para o núcleo e complexa com o transportador nuclear de AhR (Arnt), ativando a expressão de genes (como exemplo, isoformas de CYP450 e GST) que são ligados a elementos responsivos a xenobióticos (XREs) (BEISCHLAG *et al.*, 2002; FALLONE *et al.*, 2005). Um aumento significativo da expressão do gene da CYP1B1 foi observado em trabalhadores que atuam na incineração de lixo, com exposição freqüente à fumaça contendo essas substâncias (HU *et al.*, 2006).

A detoxificação por isoformas de CYP450 é de fundamental importância para proteção de efeitos danosos dos poluentes. Paradoxalmente, com a indução enzimática há aumento da capacidade oxidativa da fração microsomal e geração de metabólitos eletrofílicos dos HPAs, o que potencializa seus efeitos tóxicos e os de outras substâncias bioativadas pelas enzimas mais expressas (NEBERT *et al.*, 2006). Os genes estruturais e reguladores que determinam a estabilidade, a atividade e controlam a indução das enzimas são sujeitos a polimorfismos em humanos e animais (HUKKANEN *et al.*, 2003).

Polimorfismos genéticos das enzimas de biotransformação conferem grande variabilidade interindividual à capacidade de ativar e inativar o potencial genotóxico e carcinogênico de várias substâncias (SCHOKET *et al.*, 2001). Algumas combinações de genótipos, como CYP2C9*1 e CYP2E1*2 são significativamente elevadas em indivíduos com histórico de carcinoma, o que indica maior risco de câncer nos indivíduos portadores desses polimorfismos (MARTINEZ *et al.*, 2001). Polimorfismo de GSTT1 é associado à susceptibilidade de câncer de próstata, especialmente entre fumantes (KOMYA *et al.*, 2005), sendo utilizado como biomarcador de susceptibilidade (GARCEA *et al.*, 2003).

Ainda que pouco esclarecido, o envolvimento dessa via não genotóxica na deficiência cardiovascular, levando a deformidade em embriões de peixes também foi relacionado à exposição à HPAs petrogênicos (INCARDONA *et al.*, 2005).

1.4. Genotoxicidade via estresse oxidativo

Espécies reativas de oxigênio, radicalares ou não, tais como ânion radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), radical hidroxila (HO^{\bullet}), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ácido hipocloroso (HOCl) e oxigênio singlete (1O_2), são gerados normalmente no nosso organismo como resultado de processos bioquímicos fundamentais para a sobrevivência, como a respiração celular e a inflamação. No caso da exposição a xenobióticos, como os HPAs, mecanismos intracelulares que levam à sua detoxificação, como as vias enzimáticas citadas anteriormente, levam também a geração de espécies reativas de oxigênio, havendo uma combinação de fatores que resulta em aumento de lesões no DNA e mutações (HERMES-LIMA, 2004; AUGUSTO, 2006).

A oxidação de trans-dihidrodióis de HPAs por aldo-cetoreduases, levando à formação de catecóis é uma das vias que propicia a indução de dano oxidativo por estes compostos. Catecóis podem ser oxidados para *o*-semiquinonas, que transferem elétrons para o oxigênio molecular e dão origem a *o*-quinonas, como descrevemos anteriormente. Os catecóis, *o*-semiquinonas e *o*-quinonas participam do ciclo redox, levando à geração de grande quantidade de espécies reativas de oxigênio que podem oxidar o DNA e outras biomoléculas (BOLTON *et al.*, 2000). Na presença de cobre (Cu II) e redutor celular equivalente, como NADPH, pequenas concentrações (nanomolar) de *o*-quinonas de HPAs produzem quantidades suficiente de ROS para aumentar os níveis de 8-Oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina (8-oxodGuo) (PARK *et al.*, 2005).

Mecanismos de defesa antioxidante, tanto enzimáticos (superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase, glutathione reductase, etc) quanto não enzimático (vitaminas C e E, β -caroteno, licopeno, etc) existem nos organismos aeróbicos para garantir que os níveis de espécies reativas permaneçam dentro de

limites fisiológicos considerados normais. Além disso, uma dieta balanceada, incluindo ingestão de frutas e verduras, são importante na redução da ação oxidativa promovidas por essas espécies (ZOOPI *et al.*, 2003; RAIMONDI *et al.*, 2007). Ao haver excesso na produção dessas espécies reativas e/ou prejuízo da sua detoxificação pelos sistemas antioxidantes, seus níveis intra/extracelulares aumentam, o que provoca conseqüentemente aumento de dano em biomoléculas alvo, como DNA, RNA, lipídios, carboidratos e proteínas (ver revisão CAMPOS e YOSHIDA, 2004; SLUPPHAUG *et al.*, 2003).

Danos basais que ocorrem no DNA sob condições normais e que podem ter sua freqüência aumentada como resultado de exposição a xenobióticos incluem depurinação, desaminação, oxidação e formação de adutos com produtos gerados endogenamente (ex. aldeídos resultantes do processo de peroxidação lipídica) (PARK *et al.*, 2006).

Dentre as bases de DNA oxidadas, a 8-oxodGuo é a mais estudada e, por ser de fácil detecção, é considerada um importante marcador de dano oxidativo. Ela é uma lesão resultante do ataque do radical hidroxila (HO[•]) ou oxigênio singlete ao carbono 8 da base guanina no DNA (**figura 1.5**). As conseqüências desses danos incluem um aumento na taxa de mutação, alteração na sinalização do ciclo celular, acionando mecanismos de reparo, ou quando em níveis elevados esses danos podem levar à morte da célula por necrose ou apoptose (MARNETT, 2003). Suas propriedades biológicas têm chamado a atenção por ser uma lesão pró-mutagênica, especialmente induzindo transversões de G → T (WONG *et al.*, 2006).

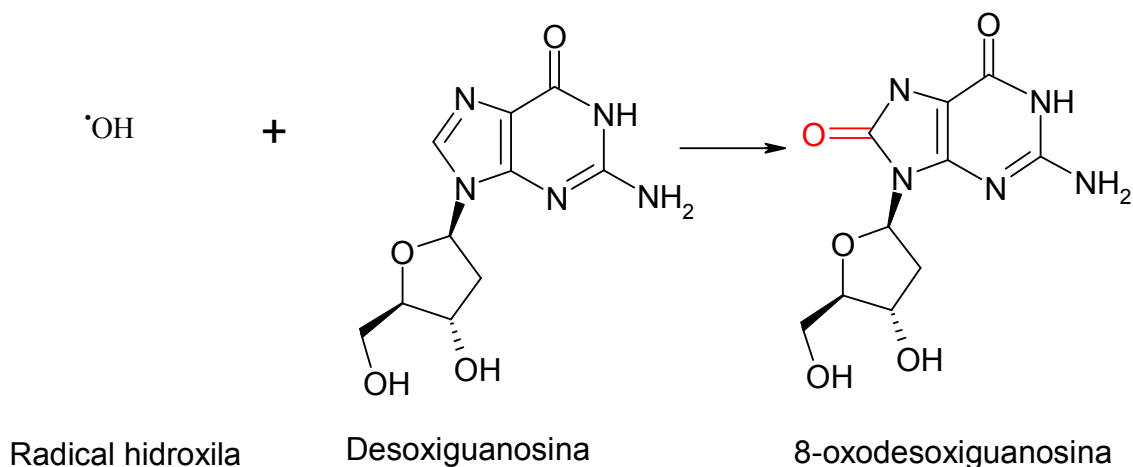


Figura 1.5. Estrutura do produto de oxidação da desoxiguanina, 8-oxodesoxiguanosina

Freqüentemente, as espécies reativas inicialmente geradas convertem componentes celulares em intermediários reativos de segunda geração, capazes de produzir danos com efeitos aditivos. 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 na prevenção do envelhecimento precoce, câncer e outras condições degenerativas (DE BONT E VAN LAREMBEKE, 2004).

A peroxidação lipídica, é um mecanismo ativado quando há estresse oxidativo. É iniciada pelo ataque à bicamada lipídica por espécies reativas capazes de remover o hidrogênio bis-aliílico do ácido graxo poliinsaturado (LH), produzindo um radical lipídico (L^{\bullet}) centrado no carbono, que por rearranjo molecular adquire uma estrutura de dieno conjugado. Este reage com oxigênio molecular formando um radical peroxil (LOO^{\bullet}), o qual remove um hidrogênio de outros lipídios, formando um hidroperóxido de lipídio (LOOH) e outros L^{\bullet} que reagem com o oxigênio, desencadeando uma cascata autocatalítica de oxidação, contribuindo para a propagação da peroxidação lipídica (LOUREIRO, 2000).

Uma das vias alternativas dos radicais LOO^{\bullet} é a formação de peróxidos cíclicos pelo ataque a uma dupla ligação na mesma cadeia, podendo também propagar a peroxidação lipídica (LOUREIRO, 2000).

Quando um radical combina com outro radical e forma um não radical, o hidroperóxido de lipídios pode sofrer outras reações gerando vários produtos eletrofílicos reativos tais como aldeídos (principal exemplo, o malonaldeído (MDA)), cetonas e epóxidos (**figura 1.6**). Os mecanismos pelos quais esses produtos secundários são gerados envolvem cisão- β por clivagem homolítica entre o carbono do radical alcoxil (LO^*) e uma ligação C-C adjacente, originando um aldeído e um radical de hidrocarboneto, ou um ataque do radical alcoxil a uma dupla ligação adjacente podendo formar epóxidos (LOUREIRO, 2000).

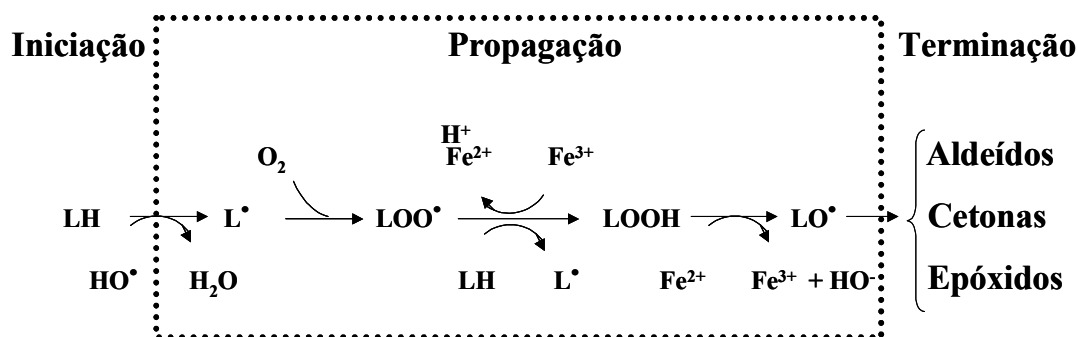


Figura 1.6: Representação do processo de peroxidação lipídica: iniciação, propagação e terminação (LOUREIRO, 2000).

Os produtos eletrofílicos gerados pela peroxidação lipídica têm sido associados ao desenvolvimento de várias doenças induzidas por exposição a oxidantes. Como exemplo, doenças como aterosclerose, isquemia, inflamação e também ao envelhecimento precoce (SAYRE *et al.*, 2001).

O MDA faz parte do grupo de agentes alquilantes com capacidade de se ligarem covalentemente a grupos nucleofílicos presentes no DNA e outras biomoléculas, alterando suas funções orgânicas (AUGUSTO, 2006). O aumento na produção de MDA e conseqüentemente, sua reação com bases do DNA formando o aduto cíclico pirimidopurinona (M1dG) (**figura 1.7.**), prevê uma associação direta

com o risco de desenvolvimento de câncer, quando pessoas são expostas à poluentes ambientais (SIGHT *et al.*, 2007).

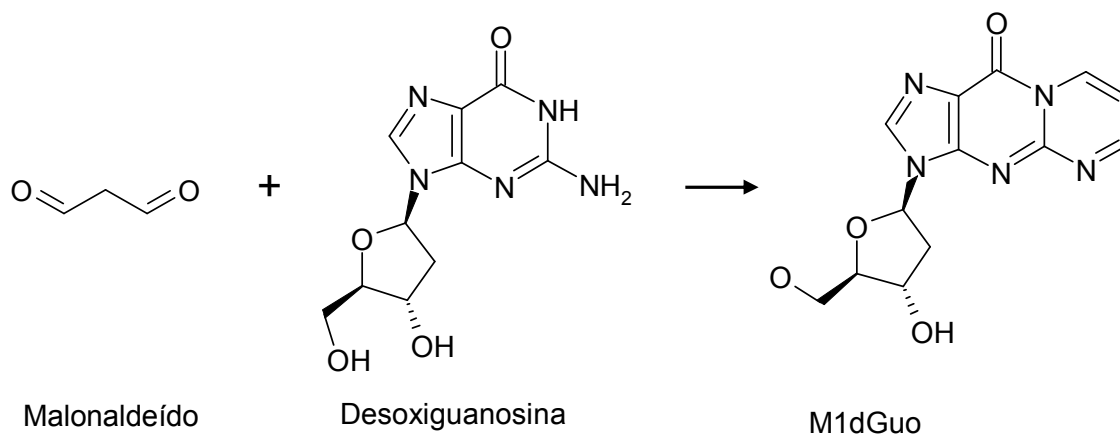


Figura 1.7: Aduto M1dGuo resultante da reação de malonaldeído com desoxiguanosina.

As três classes de metabólitos reativos dos HPAs (cátion radical, diol epóxidos e *o*-quinonas) levam à formação de adutos de DNA. Alguns produtos de biotransformação favorecem a geração de ROS, como apresentado na **figura 1.8**.

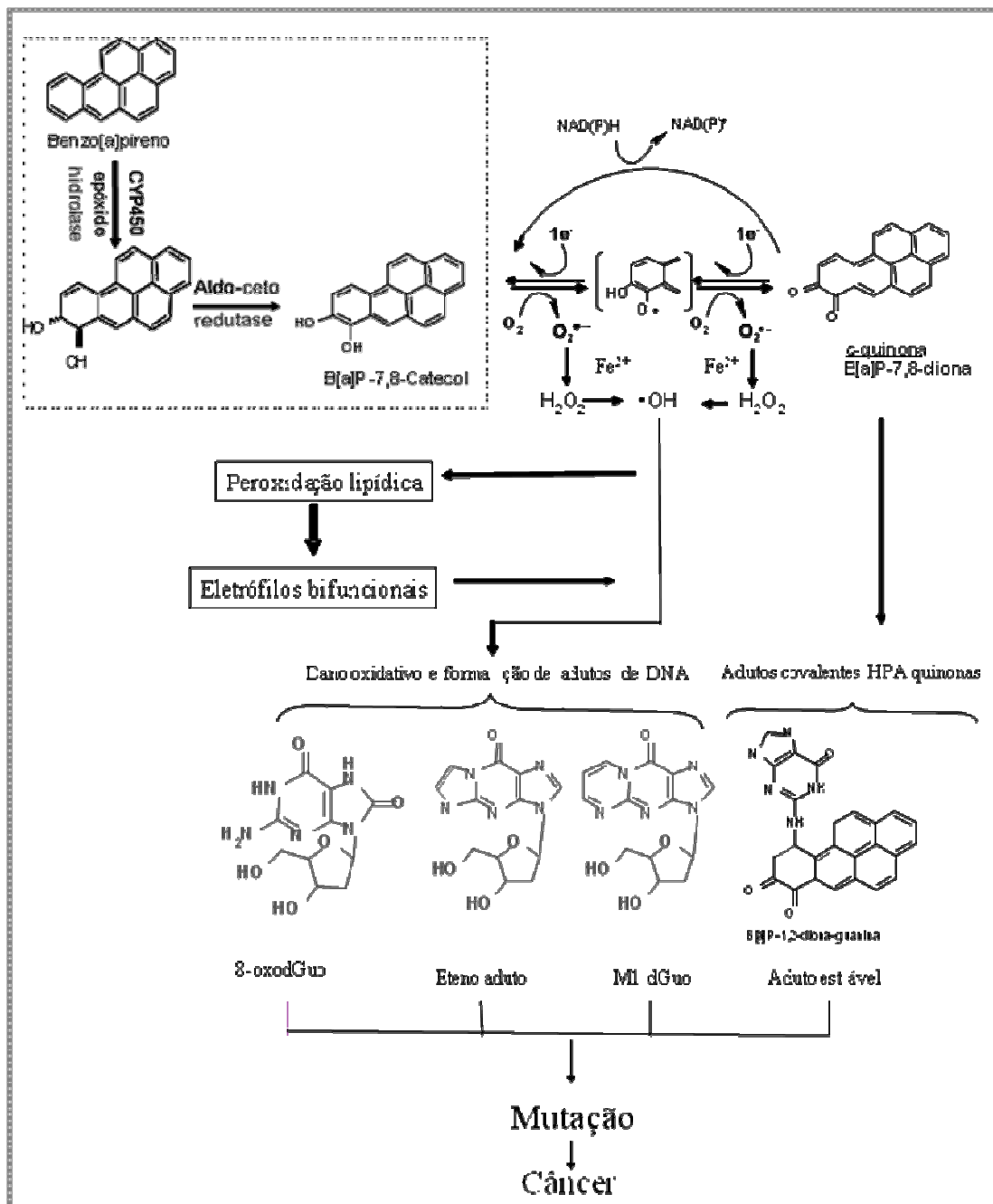


Figura 1.8.: Mecanismo carcinogênico dos HPAs, via geração de espécies reativa de oxigênio e formação de *o*-quinonas, gerando adutos de DNA (8-oxodGuo, eteno aduto, M1dGuo e adutos estáveis) (Modificado de PARK *et al.*, 2006; SINGH *et al.*, 2007).

Existe um sistema elaborado de reparo em *Escherichia coli* para reduzir a mutagênese devida a 8-oxodGuo. Este sistema inclui uma glicosilase para remover a 8-oxoguanina do DNA (glicosilase FAPY/produtos do gene *multM*) e uma hidrolase que remove adenina no pareamento errado 8-oxodGuo:dA (produto do gene *multY*) para eliminar 8-oxoGTP da reserva de nucleotídeos (LUNEC *et al.*, 2002;). Linhagens de *E. coli* com mutações em qualquer um desses genes apresentam não só aumento dos níveis basais de 8-oxodGuo, como também aumento da frequência de mutações espontâneas, principalmente transversões G→ T (GLASSNER *et al.*, 1998).

Existem também glicosilases de remoção de outras bases oxidadas do DNA, sendo que as endonucleases III e VII de *E. coli* participam da remoção de diversas pirimidinas oxidadas, tais como timina glicol, 6-hidroxi-5,6-dihidrocitosina e uracila glicol (HAZRA *et al.*, 1998; COOKE *et al.*, 2000). Homólogos dessas enzimas de reparo estão presentes em organismos eucariontes (MITRA *et al.*, 1997).

Células com danos no DNA freqüentemente não sobrevivem, pois mecanismos de reparo são ativados, reduzindo desse modo a probabilidade de progredirem para a malignidade. No entanto, mutações em vias de apoptose ou necrose podem permitir a sua sobrevivência ou seja, continuar um crescimento celular com anormalidades genômicas, contribuindo para a instalação do câncer (KARTAN e BARKER, 2004).

1.5. Métodos para detecção de lesões em DNA

O diagnóstico precoce de lesões em DNA pode servir para prevenir exposição continuada a altas doses de carcinógenos e mutágenos, impedindo a progressão do processo de carcinogênese. Em estudos epidemiológicos moleculares humanos é importante ter métodos disponíveis para avaliar a formação de adutos de DNA em níveis extremamente baixos, levando em consideração a intensidade da exposição (dose) e o efeito biológico da substância (danos causados).

Com a evolução tecnológica foram desenvolvidos métodos analíticos bastante sensíveis para detecção de adutos de DNA, tais como GC-MS (cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas), LC-ESI/MS (cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas com ionização por *electrospray*), HPLC/radioimunoensaio (cromatografia líquida de alta eficiência/radioimunoensaio), imunoafinidade/³²P-*postlabeling*, HPLC/fluorescência e HPLC-ECD (cromatografia líquida de alta eficiência com detecção eletroquímica).

Dentre eles, o ³²P-*postlabeling* é provavelmente o mais utilizado (SCHOKET *et al.*, 2001). É um método altamente sensível que permite detectar 1 aduto/10¹⁰ nucleotídeos em 12 µg de DNA. O DNA é digerido em nucleotídeos que são marcados por ³²P e, na seqüência, os adutos são detectados por HPLC/detector de radioatividade ou TLC/auto-radiografia. Esta técnica é bastante utilizada para detecção de adutos de DNA, no entanto não permite fazer a caracterização estrutural do aduto, impossibilitando a determinação do agente causador da lesão (SINGH e FARNER, 2006).

Imunoensaio é o método que envolve a ação antígeno anticorpo para reconhecimento do aduto de DNA. Este teste permite respostas rápidas utilizando pequenos volumes de amostra, viabilizando o processo de triagem em estudos epidemiológicos possibilitando a detecção de aduto em células e tecidos. Apresenta simplicidade operacional e realização de múltiplas análises simultâneas. No entanto, requer a utilização de anticorpos específicos para o aduto de DNA e é limitado pela possibilidade de reação cruzada entre o anticorpo e os produtos similares ao aduto, presentes na amostra (POIRIER, *et al.*, 2004).

A espectrometria de massas é um recurso altamente sofisticado, que viabilizou a identificação de adutos de DNA específicos utilizando pequenas quantidades de amostra (10-100 µg de DNA). Seu uso na pesquisa tem grande impacto, viabilizando detecção de moléculas em investigações biológicas, principalmente por proporcionar tecnologia de ionização como *electrospray* e analisador do tipo quadropolo. A alta seletividade e sensibilidade do método são aumentadas pelo uso do modo de detecção de *electrospray*/massa/massa (ESI/MS/MS). O desenvolvimento de métodos ultra-sensíveis baseados nesse modo de detecção permitiu a identificação e quantificação dos adutos de DNA (< 20 fmol) formados na presença de trans-trans-2,4-decadienal *in vitro* e em células de

mamífero expostas (LOUREIRO, 2000) e adutos de benzo[a]pireno diolepóxidos-desoxiguanosina (BPDE-dGuo) detectados em DNA de pulmão humano exposto à fumaça do cigarro, baseado num limite de detecção de $0,3/10^8$ nucleotídeos. (BELLAND *et al.*, 2005). A desvantagem apresentada é o alto custo do equipamento.

Outro recurso bastante seletivo e sensível é o HPLC-eletróquímico (ECD). Muito utilizado para determinar e quantificar 8-oxodGuo, um biomarcador, de dano oxidativo. O método requer hidrólise do DNA e cuidados especiais na manipulação da amostra durante a análise, no intuito de impedir a formação de artefatos. Muitos laboratórios investiram em estudos visando otimizar a detecção de 8-oxodGuo (HELBOCK *et al.*, 1998; LUNEC *et al.*, 2002)

Identificar os produtos de reações de biomoléculas com HPAs individuais *in vitro* é o primeiro passo para o desenvolvimento de métodos que permitam detectar e quantificar tais produtos em células, animais e humanos, onde estarão presentes em baixíssimas concentrações. É importante também entender os mecanismos moleculares envolvidos na indução de lesões em DNA, sejam elas por ligação covalente xenobiótico-DNA ou por indução de estresse oxidativo.