

RENATO HADDAD

***UTILIZAÇÃO DA TÉCNICA HPLC/APCI-MS/MS
PARA DETERMINAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE
DANOS AO DNA***

Este exemplar corresponde à versão final da Tese de Doutorado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, para obtenção do título de Doutor em Ciências Médicas, Área de Concentração em Ciências Biomédicas do(a) aluno(a) Renato Haddad.

Campinas, 12 de novembro de 2004.


Prof(a). Dr(a). Nelci Fenalti Höehr
Orientador(a)

CAMPINAS

2004

RENATO HADDAD

***UTILIZAÇÃO DA TÉCNICA HPLC/APCI-MS/MS
PARA DETERMINAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE
DANOS AO DNA***

*Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação
da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas para
obtenção do título de Doutor em Ciências
Médicas, área de Patologia Clínica*

ORIENTADORA: PROFA. DRA. NELCI FENALTI HÖEHR

CO-ORIENTADOR: PROF. DR. MARCOS NOGUEIRA EBERLIN

CAMPINAS

2004

UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	7/Unicamp
H177u	
V	EX
TOMBO	62025
DATA	16-P-2005
PREÇO	11,00
DATA	10/02/05
Nº CPD	

Bibid: 341773

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP**

Haddad, Renato

H177u

H177u

Utilização da técnica HPLC/APCI-MS/MS para determinação e identificação de danos ao DNA / .Renato Haddad. Campinas, SP : [s.n.], 2004.

Orientadores : Nelci Fenalti Höehr, Marcos Nogueira Eberlin
Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Alzheimer, Doença de. 2. Espectrometria de massas. 3. Estresse oxidativo. I. Nelci Fenalti Höehr. II. Marcos Nogueira Eberlin. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

SLP

Banca examinadora da tese de Doutorado

Orientador(a): Prof(a). Dr(a).

Nelci Fenalti Höehr

Membros:

1. Prof(a). Dr(a). Nelci Fenalti Höehr

2. Prof. Dr. Cláudio Francisco Tormena

3. Prof. Dr. Eduardo César Meurer

4. Prof. Dr. Leonardo Silva Santos

5. Prof. Dr. Roberto Rittner

200400533

Curso de pós-graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas
da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 12/11/2004

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus Filhos Felipe Haddad e Melissa Haddad, para que ambos sigam um futuro cheio de Felicidades, Alegrias, Vitórias e Prosperidade.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus.

A toda a minha família, principalmente meus pais que tornaram meus estudos viáveis e a minha esposa pela paciência e carinho.

Aos amigos Alessandra, Eduardo, Fabio, Lílian, Regina, Leonardo, Rafael, Rodrigo e Adriana do **Laboratório Thomsom do Instituto de Química da UNICAMP**.

Ao Prof. Dr. Roberto Rittner e seus brilhantes pupilos, em especial ao Dr. Cláudio Francisco Tormena do **Instituto de Química da UNICAMP**.

Ao Prof. Dr. Roger Frigério Castilho, **Departamento de Patologia Clínica, Faculdade de Ciências Médicas – UNICAMP** por ter cedido células para este trabalho.

Ao Instituto de Química da UNICAMP.

À **FAPESP** pelo apoio financeiro.

Agradeço em especial aos meus orientadores Profa. Dra. Nelci Fenalti Höehr e Prof. Dr. Marcos N. Eberlin pela amizade, confiança e principalmente pela ajuda e incentivo.

"Desistir de aprender é egoísmo".

Este é um ditado que eu gosto muito.

Quando acalentamos o desejo de aprender mais,

Nossas vidas estarão repletas

De genuína vitalidade e brilho.

"Jamais permita que os impasses da vida o perturbem. Afinal, ninguém pode escapar dos problemas, nem mesmo santos ou sábios. Sofra o que tiver que sofrer. Desfrute o que existe para ser desfrutado. Considere tanto o sofrimento como a alegria como fatos da vida".

GLOSSÁRIO

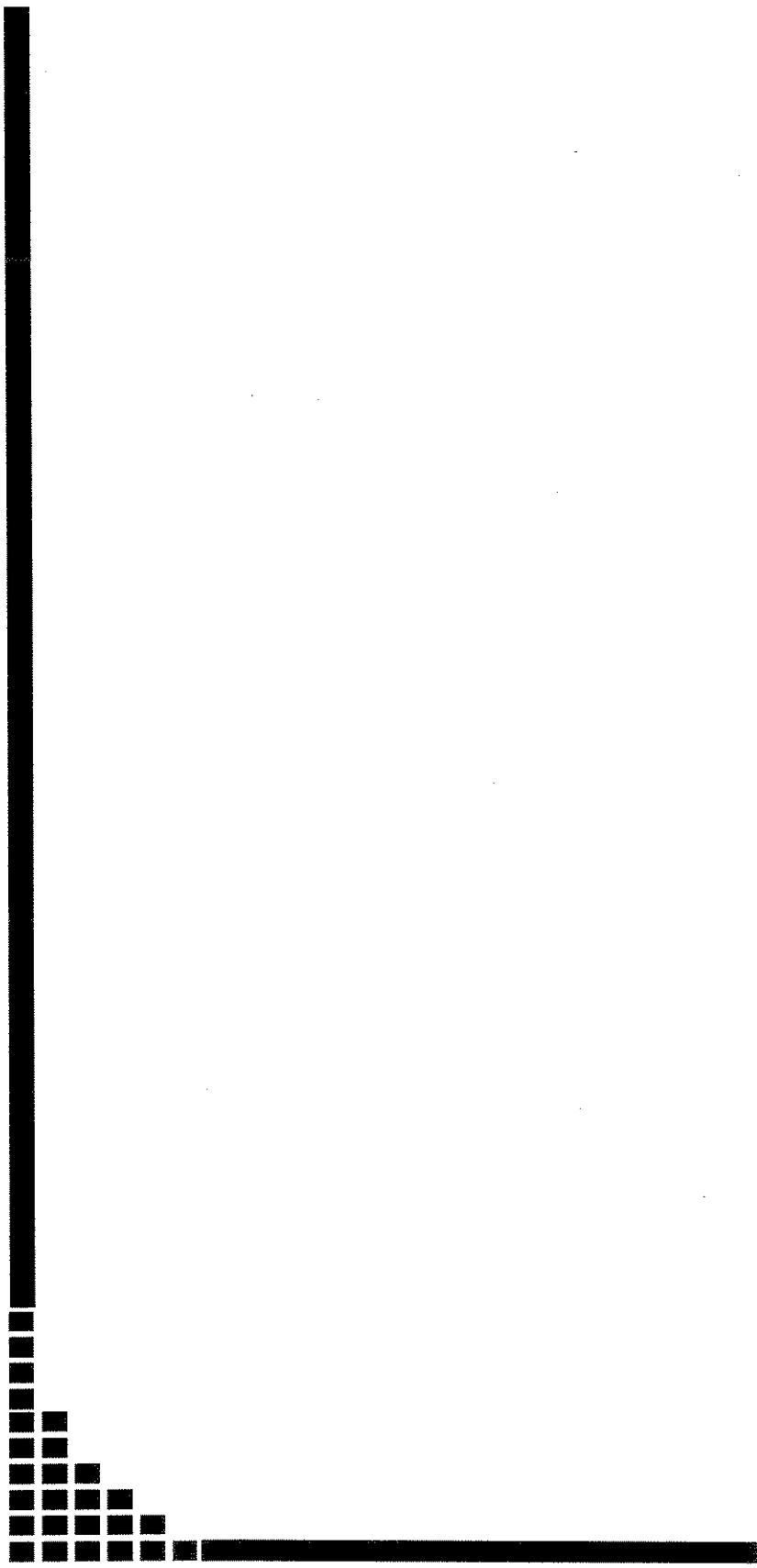
5-OHMe-Uracila	5-Hidroximetiluracila
5-OH-Uracila	5-Hidroxiuracila
8-OHdG	8-Hidroxi-2'-deoxiguanosina
8-OHGua	8-Hidroxiguanina
APCI	Ionização Química a Pressão Atmosférica (“Atmospheric Pressure Chemical Ionization”)
DA	Doença de Alzheimer
ERO's	espécies reativas de oxigênio
Fape-Ade	4,6-Diamino-5-(formamido)-pirimidina
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (“High Performance Liquid Chromatography”)
LC	Cromatografia Líquida
LF	Luz Fluorescente
MRM	Monitoramento de Múltiplas Reações
MS	Espectrometria de Massas
TG	Timina Glicol
CID	Dissociação induzida por colisão (“Collision-Induced Dissociation”)
<i>m/z</i>	razão massa carga
DMEM	“Dulbecco's Modification of Eagle's Medium”

SUMÁRIO

Pág.

RESUMO.....	<i>xi</i>
ABSTRACT.....	<i>xiii</i>
INTRODUÇÃO.....	15
Doenças neurodegenerativas.....	17
Mecanismos de danos oxidativos ao DNA.....	22
Análise dos Danos Oxidativos ao DNA.....	28
Espectrometria de Massas.....	29
Técnica de APCI.....	29
OBJETIVOS.....	32
MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
Equipamentos e Reagentes.....	35
PARTE EXPERIMENTAL.....	36
Preparação das soluções.....	37
Hidrólise Ácida.....	38
Cultura de células.....	38
RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	40

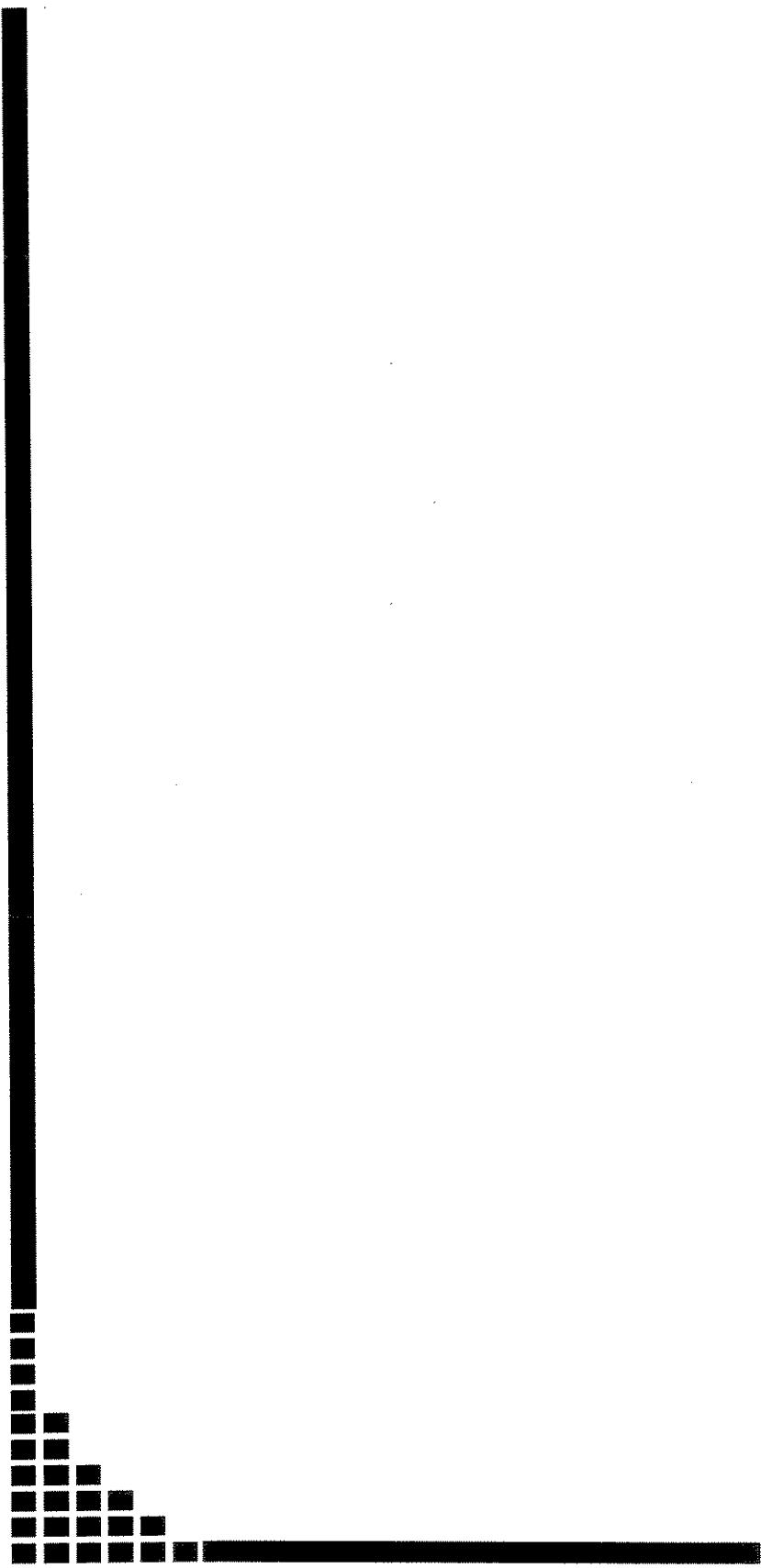
Síntese da Timina Glicol a partir da Timina.....	41
Tempos de retenção.....	48
Linearidade.....	50
Hidrólise Ácida dos Oligonucleotídeos.....	55
Formação das lesões oxidativas nas bases de DNA após exposição à Luz Fluorescente.....	58
CONCLUSÕES.....	61
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63



RESUMO

O acúmulo de danos oxidativos ao DNA vem sendo proposto como um dos responsáveis pelo envelhecimento e por doenças neurodegenerativas como a doença de Alzheimer. Estudos de danos oxidativos vêm sendo realizados com o objetivo de elucidar diversas doenças como a predisposição ao câncer e os processos de envelhecimento, uma vez que a formação de radicais livres dentro das células, causa lesões cuja natureza química ainda é pouco conhecida. Este estudo permitiu o desenvolvimento de uma nova metodologia de análise utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas sequencial com Ionização Química a Pressão Atmosférica (HPLC/APCI-MS/MS) para identificação das lesões oxidativas ao DNA.

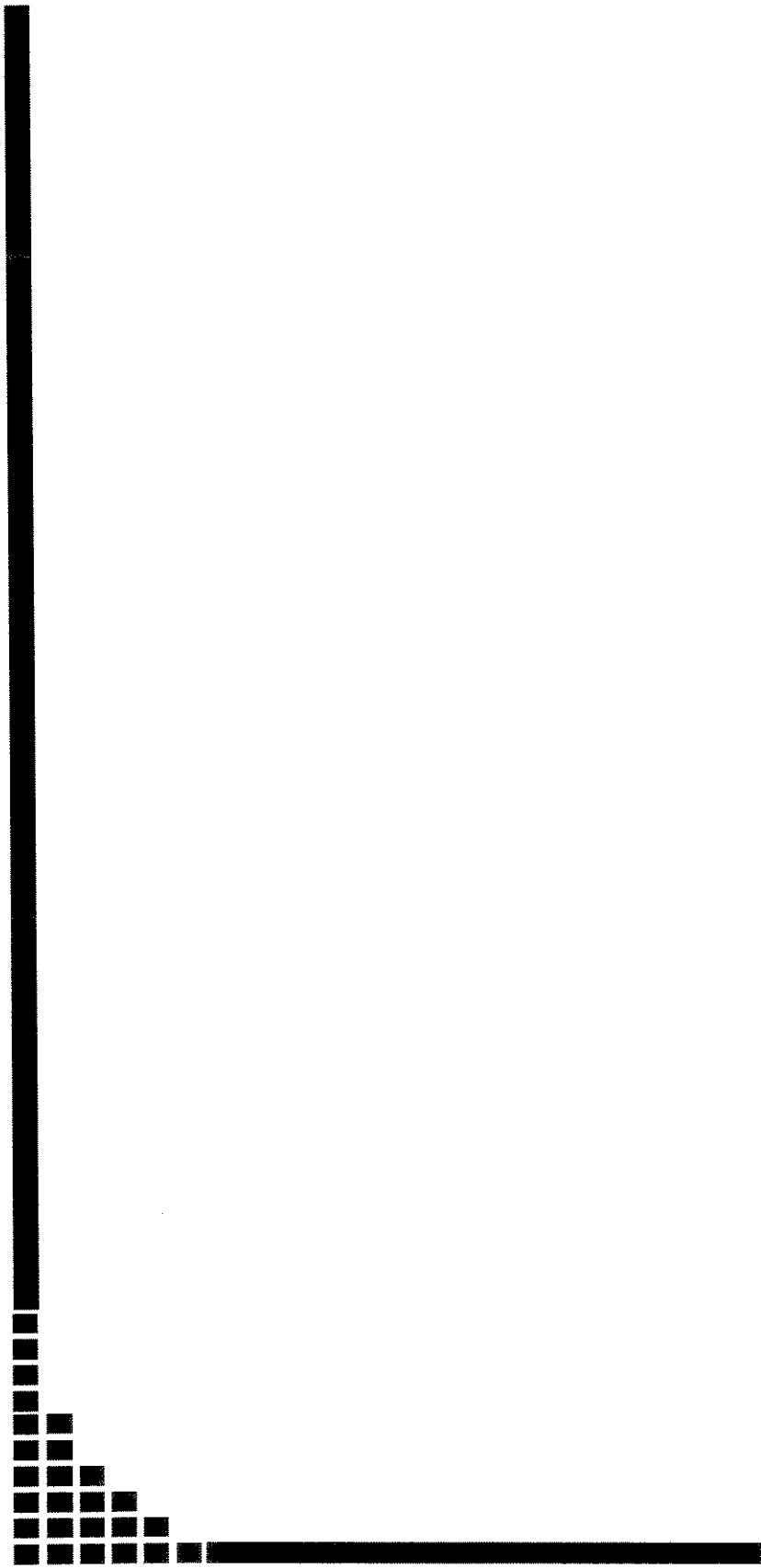
Foram adquiridos espectros de massas (APCI-MS e APCI-MS/MS) das bases oxidadas de DNA para verificar os padrões de fragmentação destas bases. Após a realização dos testes de linearidade, estudos iniciais com sistemas mais simples, oligonucleotídeos comerciais foram realizados para testar a aplicabilidade da técnica de HPLC/APCI-MS/MS. Estudos “*in vivo*” com culturas de células [PC-12, feocromocitoma de rato (fibroblastos)], foram realizados. Estas células foram irradiadas com Luz Fluorescente por 2, 4 e 6 horas e analisadas após exposição. Nós observamos a formação de cinco das seis bases de DNA oxidadas analisadas [8-OHGua, 4,6-Diamino-5-(formamido)-pirimidina (Fape-Ade), 5-Hidroxiuracila (5-OH-Uracila), 5-Hidroximetiluracila (5-OHMe-Uracila), Diidrotimina] mostrando assim que a técnica desenvolvida é apropriada para este tipo de análise, recebendo bons níveis de detecção e sensibilidade.



ABSTRACT

Reactive oxygen species produce oxidized bases, deoxyribose lesions and DNA strand breaks in mammalian cells. Free radicals are produced in cells by cellular metabolism and by exogenous agents. These species react with biomolecules in cells, including DNA. The resulting damage to DNA, which is also called oxidative damage to DNA, is implicated in mutagenesis, carcinogenesis, and aging.

We introduced a new methodology using Atmosphere Pressure Chemical Ionization (APCI) and HPLC/tandem mass spectrometry (HPLC/APCI-MS/MS). This technique for the measurement of modified nucleosides can simultaneously measure numerous products (8-hydroxyguanine, dihydrothymine, 4,6-diamino-5-(formamido)pyrimidine, isobarbituric acid (5-hydroxyuracil), 5-hydroxymethyluracil and thymine glycol), and provide positive identification and accurate quantification for monitoring in MRM mode. The responses for all damage bases and the four normal bases were highly linear with correlation coefficients 0.9950-0.9999 and detection limit in *fmols*. We applied the method for quantification and identification of these bases in cultured PC-12 cells, a rat pheochromocytoma (fibroblasts) cell line irradiated for 2, 4 and 6 hours following FL exposure.



INTRODUÇÃO

“Viver em um ambiente carregado de oxigênio requer a evolução e estratégias celulares eficazes de detectar e desintoxicar o organismo dos metabólitos do oxigênio molecular, que são conhecidos como espécies reativas de oxigênio. (...), e a habilidade do organismo de responder ao estresse oxidativo, está conectada à extensão do envelhecimento e da vida.”

Esta frase foi extraída de um artigo publicado na conceituada revista *Nature* (FINKEL e HOLBROOK, 2000) mostrando o grande interesse da ciência na formação e atuação de radicais livres no organismo. O metabolismo normal é estabelecido como uma fonte endógena de espécies reativas de oxigênio (ERO's), e são estes processos celulares (normalmente não patogênicos) que elucidam os níveis dos danos oxidativos encontrados nos tecidos normais. Os radicais livres são produzidos nas células através do metabolismo celular e de agentes exógenos (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2000). Cadeias de transporte de elétrons de todos os processos liberam elétrons do oxigênio resultando na formação de superóxidos (EVANS et al., 1997). As atividades de certas enzimas geram superóxidos e, via uma “explosão”, ERO's são liberadas de células fagocitárias destinadas a destruir células infectadas como vírus ou bactérias, ainda que o tecido circunvizinho possa também ser afetado. Os peroxissomas são cápsulas do metabolismo oxidativo que transportam estes produtos reativos, que de outra forma seriam prejudiciais às células normais, embora sob determinadas circunstâncias estes produtos também pudessem ser liberados. As ERO's também podem ser formadas através da radiação ionizante ou ultravioleta. Um fator importante para o aumento de radicais livres é a radiação UVB, onde recentemente foi demonstrado, que a exposição subcutânea ao UVB aumenta substancialmente o nível de H₂O₂, ERO's e da 8-Hidroxi-2'-deoxiguanosina (8-OHdG) na epiderme de ratos. A exposição crônica em baixas doses de UVB aumenta substancialmente os níveis de 8-OHdG não somente na epiderme, mas também em órgãos internos como cérebro e fígado com exceção do rim (WEI et al., 2002). A 8-OHdG é uma das bases mais estudadas até o momento, sendo considerada um marcador biológico para o estresse oxidativo. Os mecanismos de formação de danos oxidativos ao DNA envolvem reações de abstração e adição de radicais livres na cadeia carbônica do açúcar que são causados por radicais hidroxídos ([•]OH) e adutos de hidrogênio nas bases heterocíclicas do DNA (DIZDAROGLU ET AL., 1995; BREEN e MURPHY, 1995). Além disso, certos

compostos químicos exógenos podem sofrer um processo redox seguido de metabolismo celular, com subsequente produção de elétrons que podem ser transferidos para o oxigênio molecular produzindo superóxido (O_2^-). Apesar de sua origem, ERO's podem interagir com biomoléculas celulares, como o DNA, levando a modificações que podem ser potencialmente danosas para as células.

Estão presentes no organismo um conjunto de mecanismos de defesa antioxidante os quais protegem o organismo do ataque destes radicais livres, entretanto, quando ocorre um aumento exacerbado na formação de radicais livres estes reagem com as biomoléculas e o DNA, formando os chamados danos oxidativos. Estes danos podem levar a mutagênese, carcinogênese e envelhecimento precoce. Atualmente, estudos buscam relações mais íntimas entre a formação de radicais livres e doenças cada vez mais comuns (OLINSKI ET AL., 2002), demonstrando uma grande necessidade do desenvolvimento de técnicas novas e modernas de análise das bases que sofrem modificações. Neste estudo utilizamos a linhagem celular adrenal feocromocitoma de rato PC-12, uma linhagem clonada inicialmente de células tumorais de rato (WARREN e CHUTE, 1972), que podem ser mantidas por muitos anos sem que ocorra alteração de suas características.

DOENÇAS NEURODEGENERATIVAS

A doença de Alzheimer (DA), descrita inicialmente por Alois Alzheimer em 1907, caracteriza-se por alterações neurodegenerativas progressivas, perda de memória e de outras funções cognitivas. Estima-se que a DA afete de 1,5 a 2 milhões de americanos e que, pelo menos, 100.000 deles morrem a cada ano (PERRY e MARKOWITZ, 1992). No Brasil estima-se que haja em torno de 1 milhão de doentes (CORRÊA, 1996). Por volta dos 65 anos a DA acomete de 5 a 10 % das pessoas; aos 80 anos, em torno de 20% e aos 85 anos, em torno de 47%. A DA parece ser mais comum em mulheres e arianos, enquanto que a demência vascular em homens negros americanos e japoneses (GOMES, 1995). Dado o envelhecimento vertiginoso da população mundial, notadamente nos países desenvolvidos, a DA tem sido chamada de a "epidemia silenciosa", "a doença número 1 do ano 2.000" e "a Peste Negra do século XXI" (Institut, 1987).

A DA caracteriza-se patologicamente pela atrofia cortical, perda neuronal (DAVIES et al., 1987), proliferação da glia, formação acentuada de um emaranhado de neurofibrila (PEARSON et al., 1985) e deposição da proteína β -amilóide nas placas neuríticas (HARDY e ALLSOP, 1991). Inúmeras são as hipóteses que acercam da DA (PERRY et al., 2000), mas nenhuma delas responde sozinha pela causa da doença. A seguir estão citadas as principais hipóteses atualmente em destaque: genética; neuroquímica; viral; imunológica; microtubular; filotérmica; vascular e metabólica; papel tóxico do alumínio e radicais livres; entre outras hipóteses (SINET, 1987). Os mecanismos responsáveis pela perda neuronal na doença de Alzheimer ainda permanecem desconhecidos e uma das hipóteses é de que certas alterações celulares envolvidas no estresse oxidativo podem levar a neurodegeneração (MARTINS et al., 1986; GSELL et al., 1995). Sugere-se que espécies reativas de oxigênio podem estar envolvidas na produção, agregação e na toxicidade da β -amilóide (FRIEDLICH e BUTCHER, 1993) a qual seria atribuída o dano neuronal na doença de Alzheimer (NIXON e CATALDO, 1994).

Uma outra teoria sobre a etiologia do envelhecimento normal e da doença de Alzheimer se refere ao envolvimento do acúmulo de danos ao DNA (.GAUBATZ e TAN, 1994) Os danos oxidativos ao DNA ocorrem como uma consequência da geração de espécies oxidantes tais como ânions superóxido (PETERSEN et al., 2000), peróxido de hidrogênio, radicais hidroxila, bem como subprodutos do metabolismo celular normal (AMES e SHIGENAGA,¹⁹⁹²).

Em sistemas biológicos, os oxidantes de maior importância são os intermediários de redução do oxigênio molecular, formados em etapas de transferências monoeletrolétricas, de acordo com o Esquema abaixo:



Os radicais ânion superóxido (O_2^\cdot), hidroxila (HO^\cdot), e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) são conhecidos como ERO's, em função de sua alta reatividade em relação ao oxigênio em seu estado fundamental (.GREEN e HILL, 1984).

Diversas alterações que aparecem nos tecidos na doença de Alzheimer, tais como cromatina condensada (LEWIS et al., 1981), e também anormalidades nas membranas (ZUBENKO¹⁹⁸⁶) são condizentes aos efeitos esperados em presença dessas ERO's. Para a manutenção da integridade do genoma, as células possuem mecanismos de defesa antioxidantes e um sistema eficiente de reparo de DNA (SATOH e LINDAHL, 1994). Existem hipóteses de que algumas doenças neurodegenerativas podem estar relacionadas aos níveis elevados de danos oxidativos no DNA, devido a um defeito no reparo do DNA ou uma diminuição na sua capacidade antioxidante.

A doença *Xeroderma Pigmentosum* (XPA) é um exemplo típico onde ocorrem alterações nos mecanismos de reparo e que podem levar a processos neurodegenerativos (LINK et al., 1995). Existem especulações de que a deficiência de reparo nos adutos de DNA produzidos nos neurônios não divididos, bem como a persistência de tais lesões nestes pacientes, induz a uma viabilidade celular reduzida devido à inabilidade destas células de transcrever gens essenciais. No entanto, não está claro se estes mesmos fatores possuem um papel importante nos processos neurodegenerativos associados aos processos de envelhecimento normal ou em outras doenças neurodegenerativas.

Foram realizados experimentos com células de pacientes com a doença de Alzheimer, com a finalidade de determinar se existe um defeito no processamento de reparo de DNA das mesmas (SCUDIERO, 1986). Alguns estudos realizados com a doença de Alzheimer demonstraram uma diminuição na capacidade de reparo do DNA (ANSON et al., 1998). A ocorrência deste defeito no processo de reparo pode ter um papel importante na neurodegeneração, uma característica comum observada nestes pacientes. Nestes experimentos foram medidas as velocidades do reparo de DNA em gens específicos em células de pacientes com doença de Alzheimer, não se observando diferenças tanto na velocidade de remoção dos dímeros de pirimidina induzidos por radiação UV, nem nos danos induzidos por agentes alquilantes, quando comparadas com células de indivíduos normais (ANSON et al., 1998). No entanto, células de pacientes com doença de Alzheimer possuem uma resposta anormal frente à radiação ionizante, bem como com agentes alquilantes simples. É possível que as lesões introduzidas por estes agentes tais como, as

lesões oxidativas não são eficientemente reparadas nas células de Alzheimer (BRADLEY, 1987). O reparo no genoma total nas células de Alzheimer vem sendo medido frente a uma resposta à ação de agentes alquilantes simples e pela radiação ionizante, com resultados bastante conflitantes dependendo do tipo de agente utilizado e do método de análise da atividade de reparo do DNA (JONES et al., 1989; PARSHAD et al., 1996).

Foi observado que a luz fluorescente (LF) induziu quebra de cromatina em células de pacientes com doença de Alzheimer enquanto que em células de pacientes normais não foram observadas alterações em resposta a esta irradiação (SATOH et al., 1993). Embora a sensibilidade das células frente à radiação fluorescente tenha sido bem documentada (LIPINSKI et al., 1999), e também que estas irradiações tem comprovado seu uso para análise detalhada de diversas doenças, a presença de danos ao DNA foi apresentada, mostrando algumas das lesões produzidas pela exposição à luz fluorescente. No entanto, os efeitos da exposição à luz fluorescente são inibidos pela adição de seqüestradores de radicais livres, e que danos oxidativos provocados por estes radicais são responsáveis pelo aumento da quebra de cromatina nas células de Alzheimer. Embora tenha sido realizada uma medida direta no processo de reparo do DNA, foi demonstrada a possibilidade de deficiência no reparo das lesões oxidativas induzidas pela luz fluorescente nas células de pacientes com doença de Alzheimer (SATOH et al., 1993). Muitas das bases lesadas produzidas através de agentes oxidantes estão identificadas e suas estruturas podem ser observadas na Figura 1 (LIPINSKI et al., 1999).

Estudos preliminares realizados pela exposição das células de “Alzheimer” à radiação fluorescente indicaram que diversas lesões oxidativas se formaram no DNA, tais como: 5-Hidroximetiluracila, 5-Hidroxi-5-metilidantoína, 5-Hidroxiuracila, 5-Hidroxicitosina, 8-Hidroxiadenina, 8-Hidroxiguanina (8-OHGuA) entre outras, podem estar presentes após exposição das células à luz fluorescente.

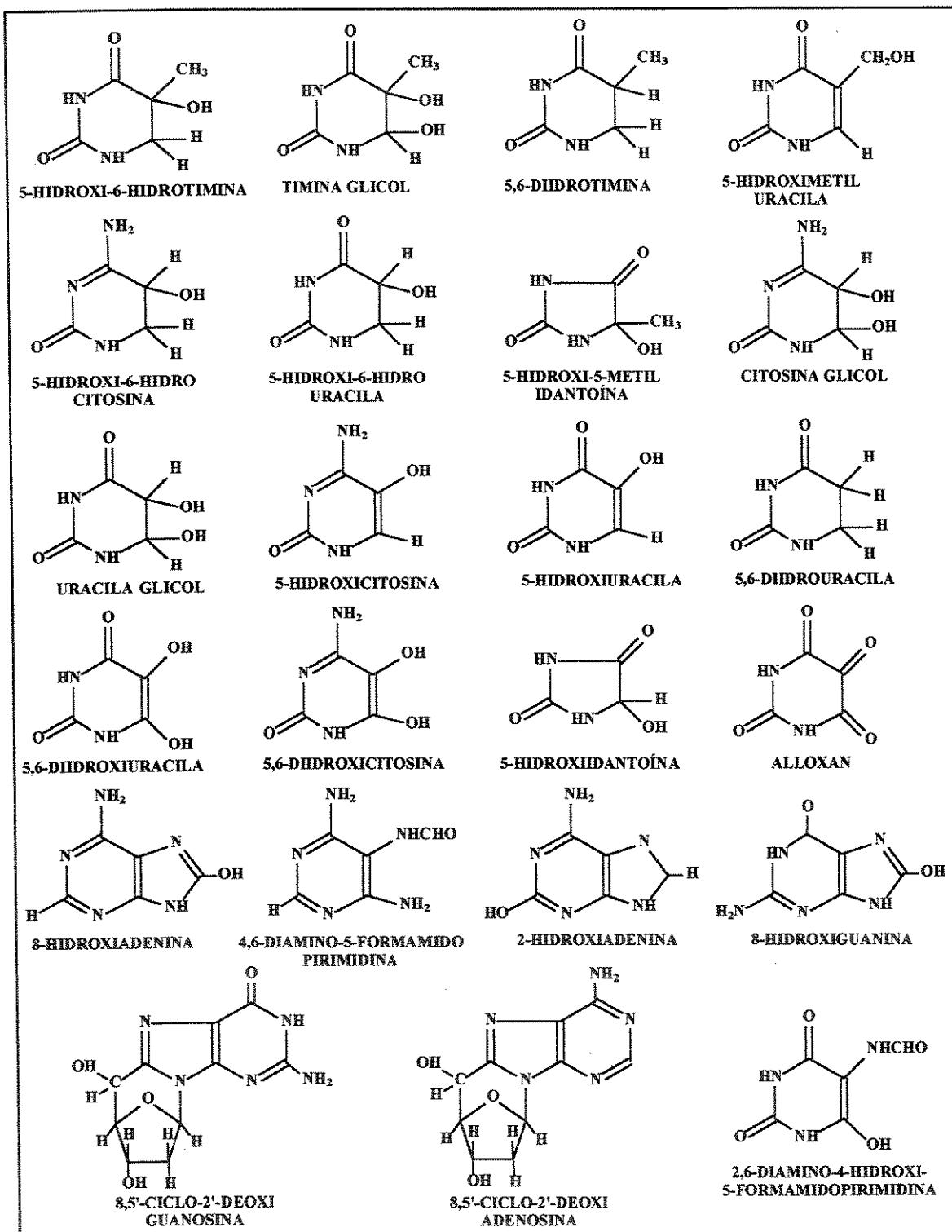


Figura 1 - Estruturas das bases lesadas por agentes oxidantes descritas na literatura.

MECANISMOS DE DANOS OXIDATIVOS AO DNA

Alguns mecanismos, que levam a formação de danos oxidativos às bases de DNA purínicas e pirimidínicas, podem ser observados nas Figuras 2-5.

Das espécies reativas de oxigênio, o mais reativo é o radical hidroxila ($\cdot\text{OH}$) que reage com o DNA pela adição na dupla ligação das bases do DNA e pela abstração de um átomo de H do grupo metila da Timina e em cada uma das ligações de C-H da 2'-deoxiribose (Figura 2) (SONNTAG, 1987). A adição na dupla ligação na posição C5-C6 das pirimidinas conduzem aos radicais adutos C5-OH e C6-OH, e a abstração do átomo de H da Timina, resultando em um radical alílico. Adutos radicalares diferem em suas propriedades redox, com adutos radicalares do C5-OH sendo reduzidos, e adutos radicalares do C6-OH sendo oxidados (STEEENKEN, 1987).

Os radicais pirimidínicos fornecem inúmeros produtos por uma grande variedade de mecanismos. Radicais são oxidados ou reduzidos dependendo das suas propriedades, ambientes redox e associações reativas (STEEENKEN, 1987). Os tipos e rendimentos dos produtos dependem da ausência ou da presença do oxigênio entre outras condições. Na ausência de oxigênio, a oxidação de um aduto radicalar C5-OH é seguida pela adição de OH^- (ou adição de água seguida de desprotonação, Figura 2 e 3), levando a formação de Timina Glicol ou Citosina glicol (TEOULE, 1987; DIZDAROGLU, 1992; BREEN e MURPHY, 1995). O radical alílico fornece a 5-OHMe-Uracila (Figura 2). O radical C5-OH-6 peroxila é formado pela adição de oxigênio ao aduto radicalar C5-OH. Este radical, C5-OH-6 peroxila (no caso da Timina), elimina O_2^- , seguida de reação com água (adição de OH^-) que fornece Timina e de maneira semelhante a Citosina glicol. Reações de oxigênio com radicais alílicos conduzem a formação de 5-OHMe-Uracila e 5-formiluracila. Radicais peroxila da Timina são reduzidos, seguidos de protonação formando hidroperóxidos, os quais se decompõe e fornecem Timina Glicol, 5-OHMe-Uracila, 5-formiluracila e 5-hidroxi-5-metilidantoína (Figura 2) (WAGNER et al., 1994).

Produtos da Citosina podem ser desaminados ou desidratados. Citosina glicol desaminadas formam uracila glicol e 5-Hidroxiuracila (Figura 3) (DIZDAROGLU et al., 1986; DIZDAROGLU et al., 1993; WAGNER, 1994). Entretanto, Citosina glicol, uracila

glicol, 5-hidroxicitosina e 5-Hidroxiuracila foram detectadas em Citosina γ -irradiada, indicando que todas estes compostos podem estar simultaneamente presentes em danos ao DNA. Na ausência de oxigênio, adutos radicalares C5-OH podem ser reduzidos, seguidos pela protonação formando 5-hidroxi-6-hidropirimidina. A 5-hidroxi-6-hidrocitosina é prontamente desaminada em 5,6-diidroxiuracila. Similarmente, adutos radicalares C6-OH das pirimidinas podem formar a 6-hidroxi-5-hidropirimidina. Estes produtos são tipicamente formados em condições anóxicas porque o oxigênio inibe sua formação pela reatividade com o aduto OH radicalar. No entanto, pirimidina glicol e 5-OHMe-Uracila são formados sobre ambas as condições, na presença e ausência de oxigênio. Reações adicionais dos radicais C5-OH-6-peroxila e C6-OH-5-peroxila da Citosina resultam na formação da 4-amino-5-hidroxi-2,6(1H,5H)-pirimidinadiona e 4-amino-6-hidroxi-2,5(1H,6H)-pirimidinadiona, respectivamente. A detecção da 4-amino-6-hidroxi-2,5(1H,6H)-pirimidinadiona e ácido isodialúrico no DNA sugerem que ambos os compostos podem estar presentes ao mesmo tempo no DNA. O oxigênio pode ainda oxidar o ácido dialúrico formando alloxan (DIZDAROGLU, 1993b; DIZDAROGLU et al., 2000).

Radicais hidroxilas adicionados nas posições do C2, C4 e C8 das purinas geram adutos OH radicalares. No caso da Adenina, dois adutos OH são formados: C3-OH e C8-OH radicalares (VIEIRA e STEENKEN, 1990). Aduitos C2-OH e C4-OH radicalares das purinas desidratam-se e são convertidos por oxidação a um radical purina, o qual pode ser reduzido ou protonado para reconstituir a purina (Figura 4) (O'NEILL e CHAPMAN, 1985). O aduto C2-OH radicalar possui propriedades oxidativas, visto que os adutos C4-OH e C8-OH radicalares são primeiramente reduzidos. Por outro lado, diferentes estruturas mesoméricas destes radicais podem ser oxidadas ou reduzidas, um fenômeno chamado de “redox ambivalente”.

O cátion radicalar Guanina ($G^{\bullet+}$) é formado pela eliminação de OH⁻ do aduto radicalar C4-OH da Guanina e pode ser desprotonado, dependendo do pH. O cátion radicalar desidratado pode levar a formação de um aduto C8-OH radicalar e então a 8-Hidroxiguanina (8-Oxoguanina, 8-OHGuA) por oxidação (Figura 5); entretanto, este pode reagir com a 2'-deoxiribose no DNA pela abstração de H causando a quebra da fita do DNA (MELVIN, 1996).

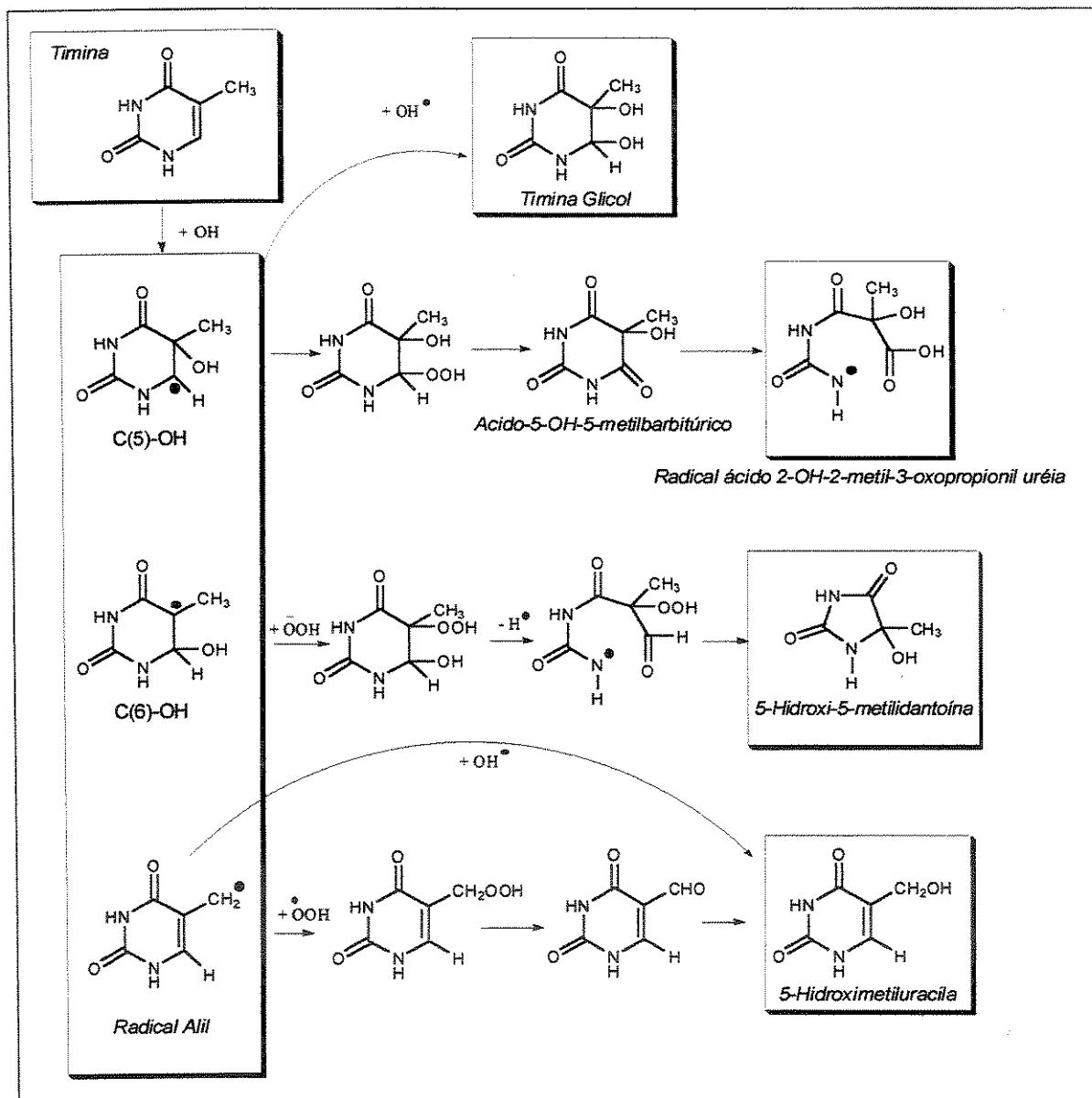


Figura 2 - Mecanismos propostos para formação de danos oxidativos da base Timina.

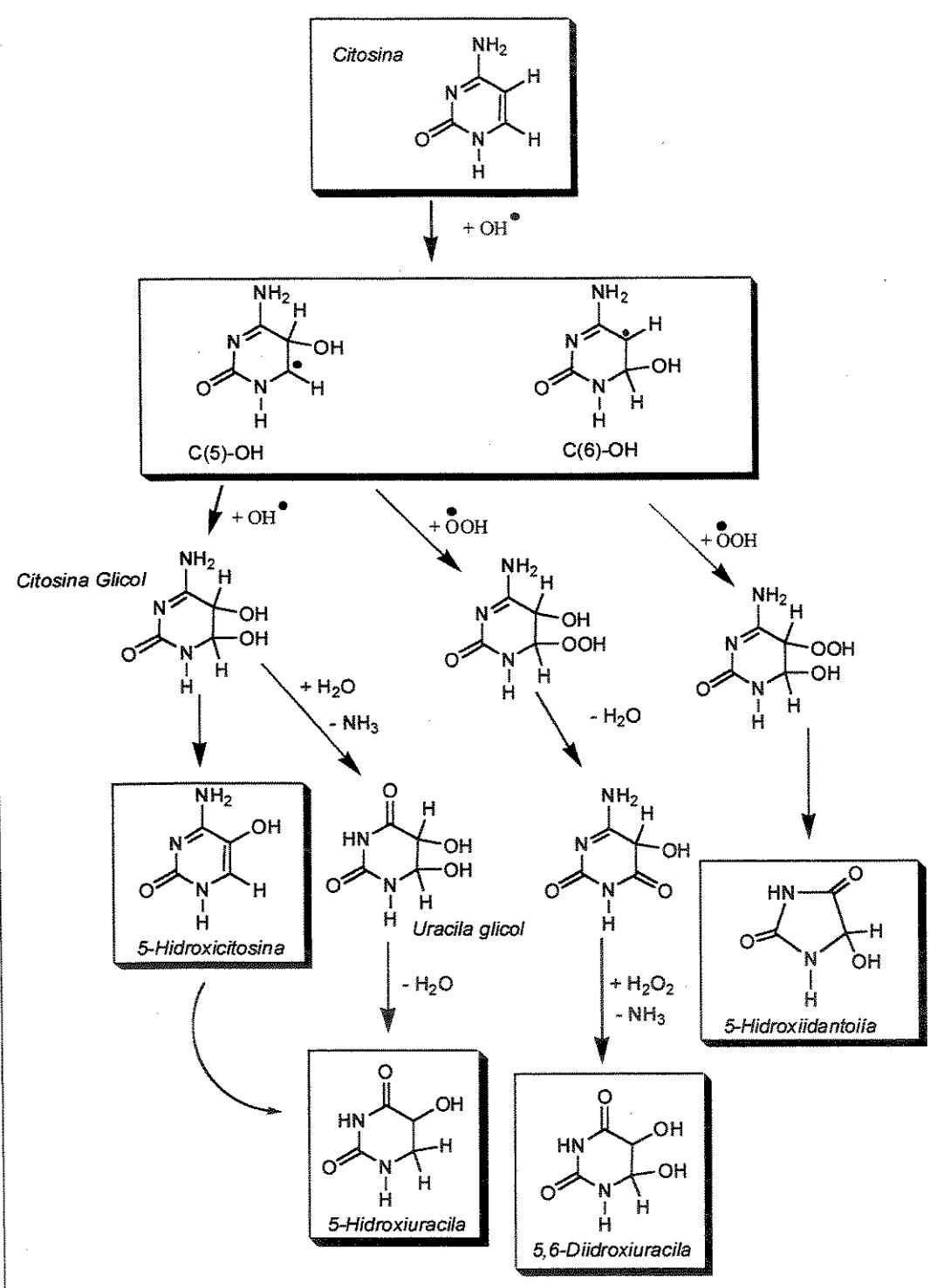


Figura 3 - Mecanismos propostos para formação de danos oxidativos da base Citosina.

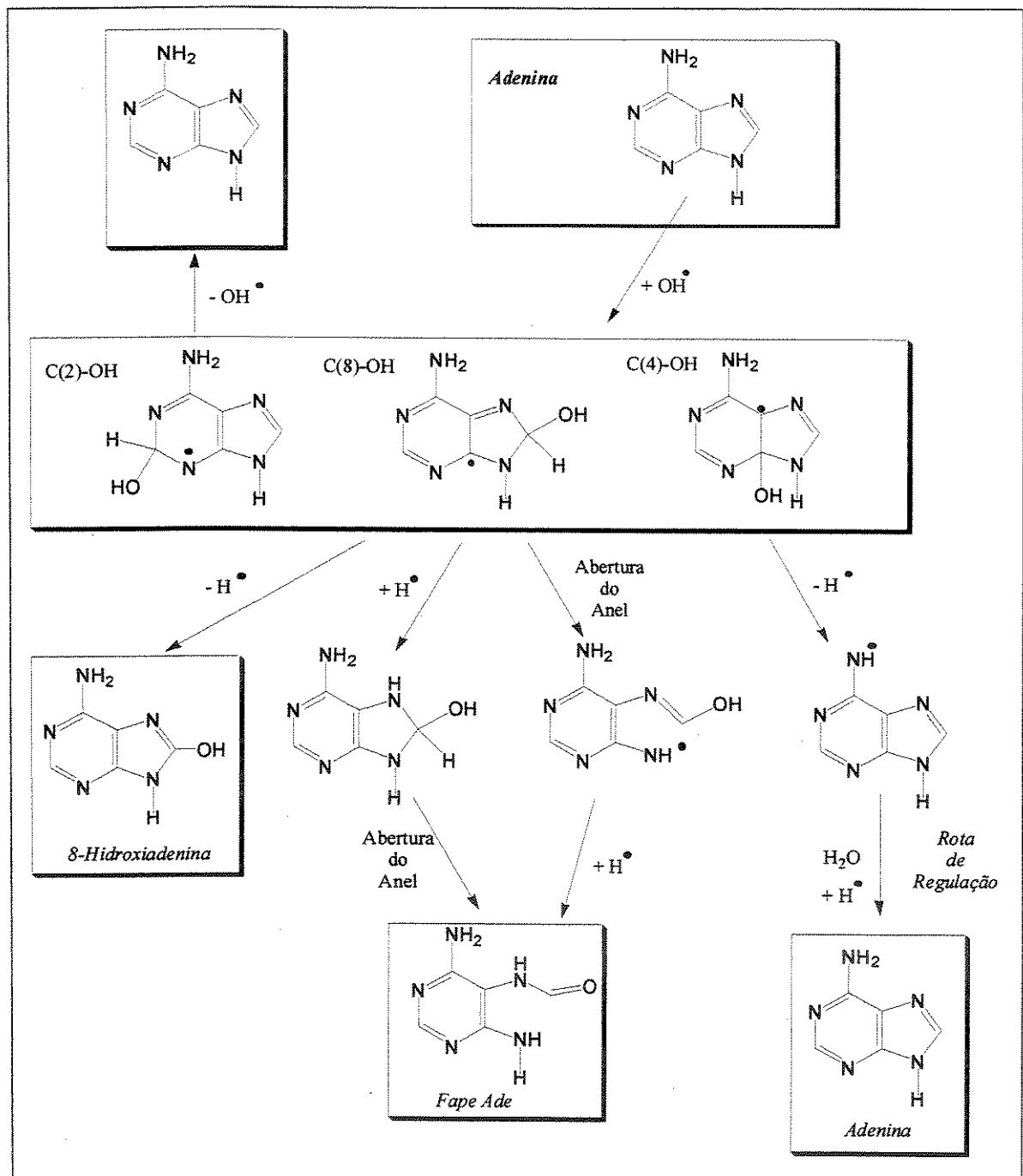


Figura 4 - Mecanismos propostos de formação de danos oxidativos da base Adenina.

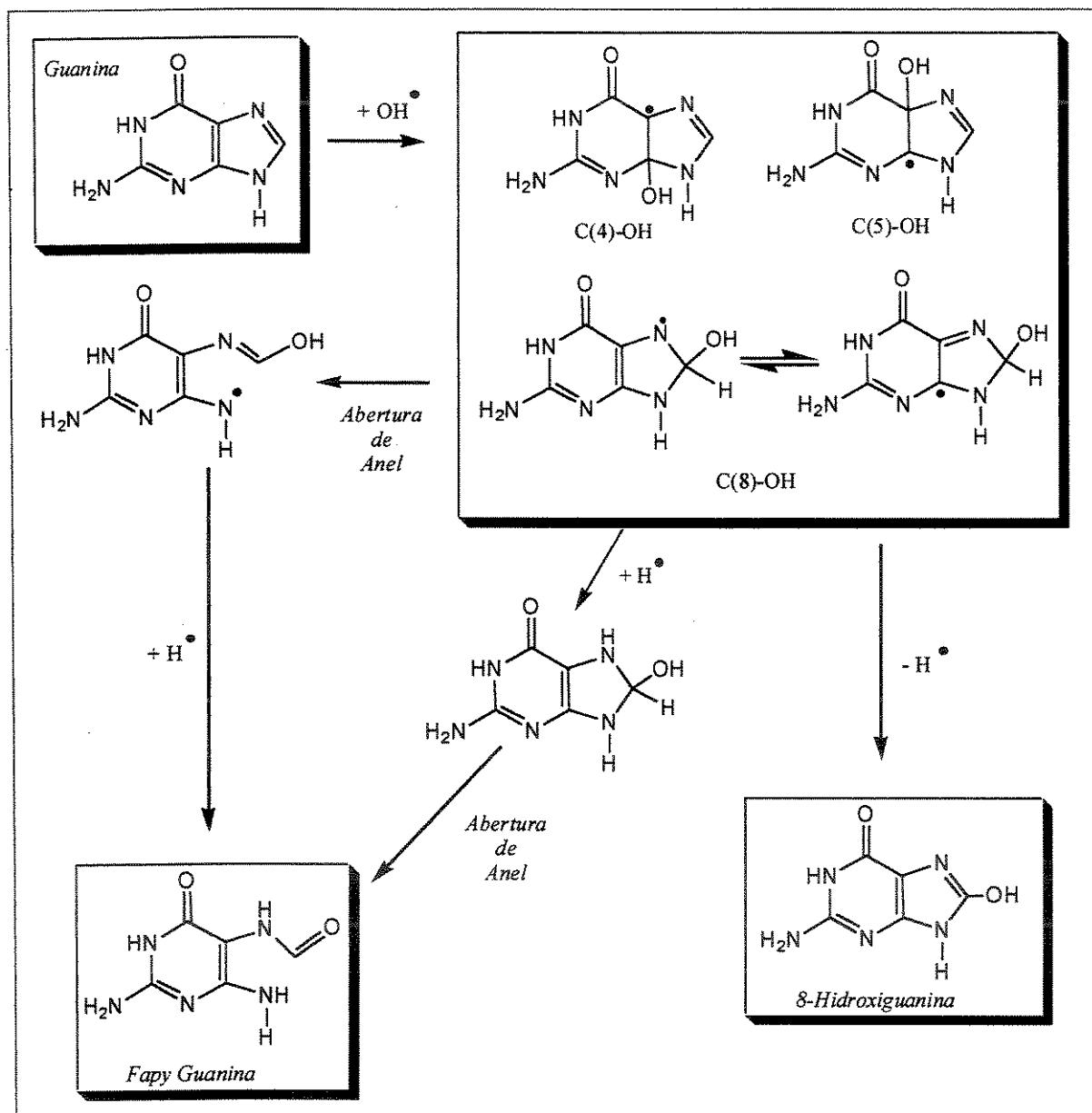


Figura 5 - Mecanismos propostos para formação de danos oxidativos da base Guanina.

ANÁLISE DOS DANOS OXIDATIVOS AO DNA

Uma técnica muito utilizada na identificação e quantificação de danos ao DNA é a de cromatografia gasosa por diluição isotópica acoplada a espectrometria de massas (GC/IDMS) (DIZDAROGLU, 1994). Outros métodos utilizados para a análise de bases modificadas estão descritos na literatura, onde emprega técnicas de LC-MS que são métodos extremamente trabalhosos. A quantificação das bases de DNA oxidadas por GC/IDMS, por exemplo, é de difícil manipulação uma vez que utiliza alíquotas de uma base com marcação isotópica (2'-deoxiguanosina-¹⁵N₅). A 2'-deoxiguanosina-¹⁵N₅ é análoga das bases do DNA, sendo adicionada nas amostras analisadas e utilizada como padrão interno. As amostras de DNA são previamente hidrolisadas, liofilizadas e posteriormente derivatizadas para a identificação das bases, tornando este procedimento bastante trabalhoso e de alto custo (SERRANO et al., 1996). Em resumo, os métodos que vem sendo utilizados até o momento são muito trabalhosos, de custo elevado, ou não conduzem a resultados altamente confiáveis, devido à formação de artefatos.

Recentes avanços em instrumentação e o desenvolvimento de técnicas novas e revolucionárias revitalizaram acentuadamente a Espectrometria de Massas (MS), que hoje se constitui em uma das mais abrangentes técnicas instrumentais na ciência, com amplas aplicações em diversos campos da química, biologia, ciências médicas e tecnológicas. Com seus novos horizontes e amplas perspectivas de desenvolvimento, a MS vem se consolidando como uma ferramenta extremamente versátil e essencial na ciência. A espectrometria de massas tem exercido papel de grande destaque, desde pesquisas aplicadas até as mais fundamentais, com crescente aplicação.

Recentemente, a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas seqüencial (LC/MS/MS) e a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas (LC/MS) emergiram como técnicas novas para a medida de bases modificadas no DNA. O método de LC/MS/MS foi usado primeiramente para a medida de 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina (8-OH-dGua), que posteriormente foi aplicado para diversos outras bases modificados (SERRANO et al., 1996; RAVANAT et al., 1998; HUA et al., 2000; FRELON et al., 2000; PODMORE et al., 2000; WEIMANN et al., 2001). Neste projeto de pesquisa, estamos

utilizando a técnica de HPLC/APCI-MS/MS para análise dos produtos de oxidação do DNA: 8-OHGuia, Diidrotimina, Fape-Ade, ácido isobarbitúrico (5-OH-Uracila), 5-Hidroximetiluracila (5-OHMe-Uracila) e Timina Glicol, mostrados na Figura 6.

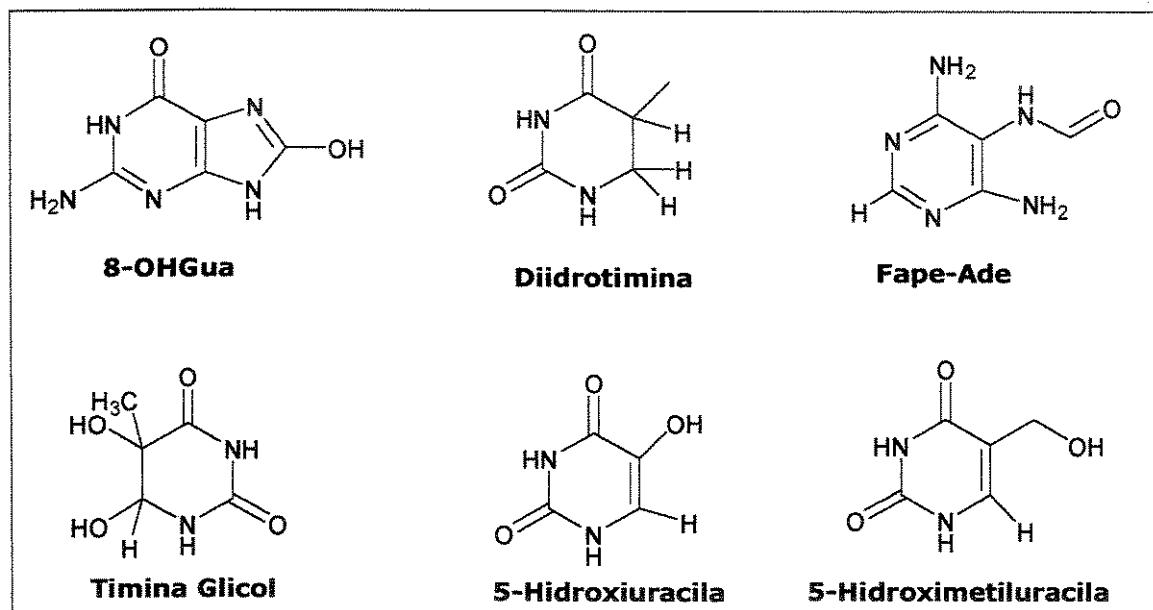


Figura 6 - Bases oxidadas de DNA utilizadas para o desenvolvimento do método.

ESPECTROMETRIA DE MASSAS

Técnica de APCI

APCI (Ionização Química a Pressão Atmosférica) (SADOUN et al., 1993) é um método de ionização a pressão atmosférica que utiliza uma descarga corona. As moléculas do solvente são inicialmente ionizadas, e uma reação íon-molécula entre os íons do solvente e as moléculas da amostra levam a produção das moléculas protonadas/desprotonadas. O Esquema geral de uma fonte de ionização química a pressão atmosférica pode ser observado na Figura 7.

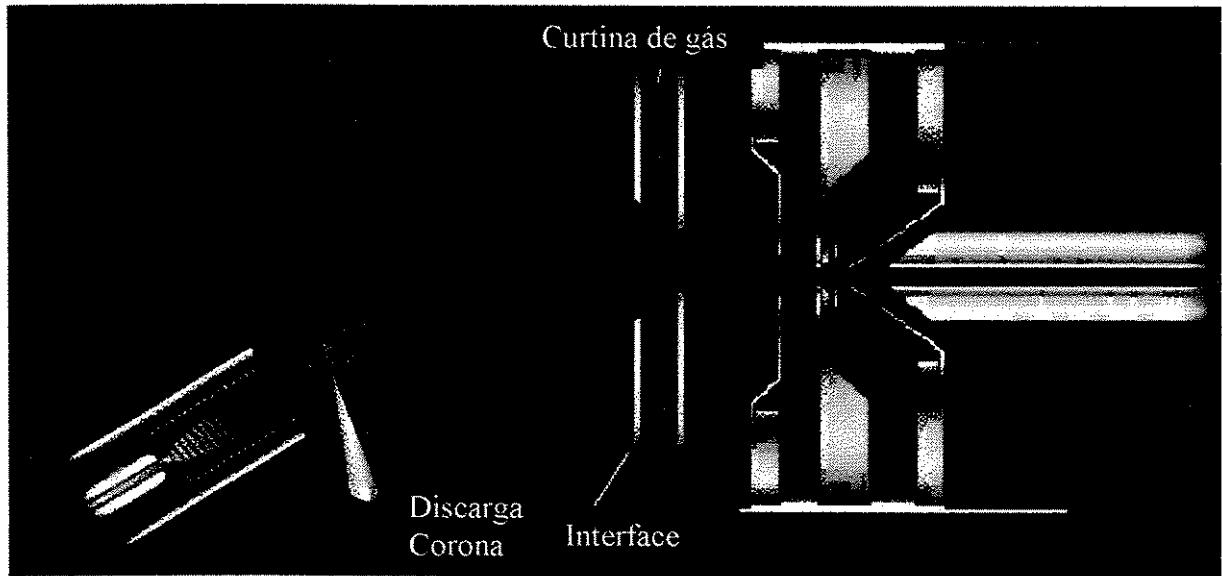


Figura 7 - Esquema da fonte de APCI (Ionização Química a Pressão Atmosférica).

Inicialmente uma solução contendo a amostra de interesse (**M**) e um solvente (**S**) é introduzida dentro de um vaporizador, constituído por um tubo capilar de aço inoxidável. Na saída deste tubo, o líquido é nebulizado dentro de uma câmara, onde recebe uma descarga corona, que gera os íons no solvente e induz a uma variedade de reações entre os íons do solvente e as moléculas da amostra. As gotas do líquido nebulizado apresentam uma razão área superficial/raio muito grande, o que favorece a evaporação do solvente, e em consequência disto aumenta a densidade de carga. No entanto, a repulsão eletrostática entre as cargas também aumenta, atingindo a tensão superficial, e os íons começam a se ejetar das gotas. Isto pode ocorrer com o íon isolado ou associado a uma molécula de solvente, formando um *cluster* (Figura 8).3

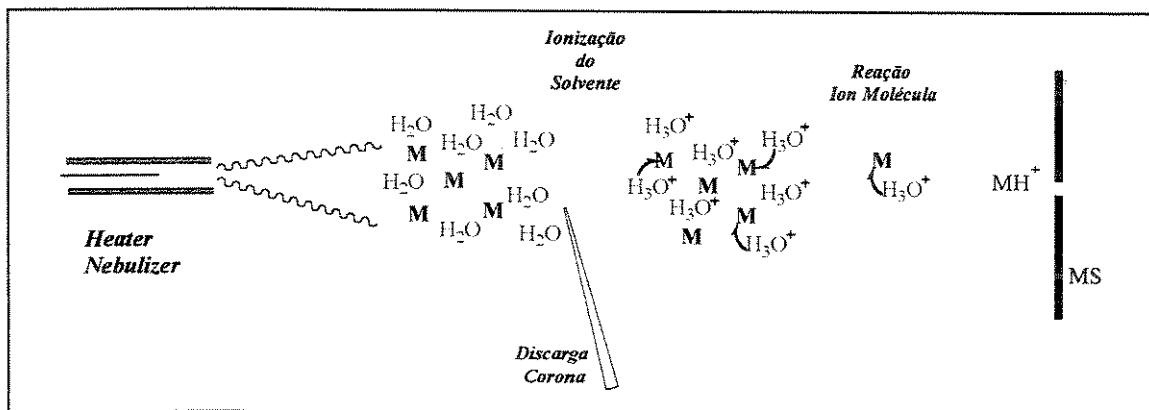


Figura 8 - Nebulização da amostra e vaporização do solvente.

Para favorecer este processo de evaporação do solvente, os íons atravessam um fluxo de gás secante, geralmente o nitrogênio (Figura 9), que em seguida são introduzidos dentro do espectrômetro de massas por meio de uma região de pressão intermediária entre dois eletrodos cônicos com orifícios muito estreitos (NIWA, 1995).

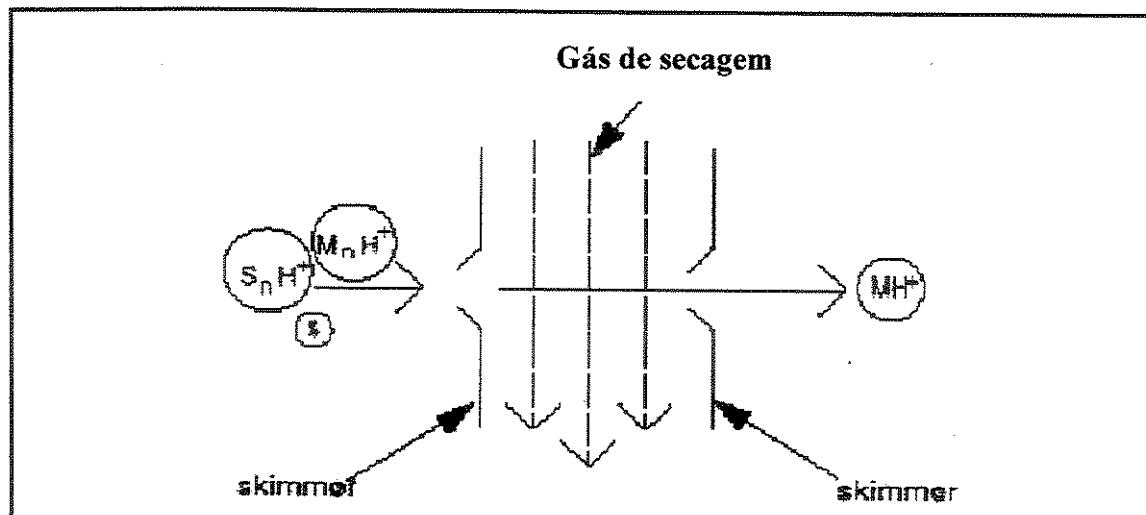
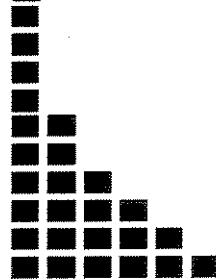


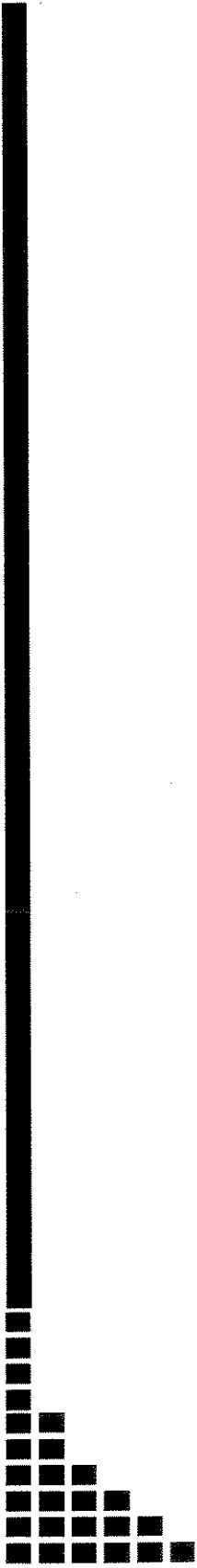
Figura 9 - Passagem dos íons formados pelo fluxo de gás secante.

Os espectros de massa produzidos através de APCI por injeção direta, em geral, apresentam pouca fragmentação se comparados aos espectros obtidos com as outras técnicas de ionização, mas tem a vantagem de apresentar um abundante sinal da molécula protonada MH^+ .



OBJETIVOS

Desenvolver uma nova metodologia baseada na espectrometria de massas com ionização por APCI acoplada a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC/APCI-MS e HPLC/APCI-MS/MS) para a identificação e caracterização de bases purínicas e pirimidínicas, tanto intactas bem como para as lesadas presentes no DNA, através do padrão de fragmentação de cada uma delas, com posterior montagem de uma biblioteca de espectros de massas de DNA intactos e lesados. Obtendo-se estes dados preliminares através da técnica desenvolvida poderemos analisar outros danos ao DNA tanto na avaliação de células não tratadas bem como de células tratadas com diferentes agentes oxidantes.

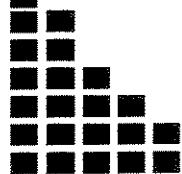


MATERIAIS E MÉTODOS

EQUIPAMENTOS E REAGENTES

Espectrômetro de massas Q-trap® (Applied Biosystems), utilizando-se a técnica de APCI (Ionização Química a Pressão Atmosférica). Ultra-som T14 (THORNTON), Liofilizador, speedvac, HPLC - Alliance modelo 2695 (Waters®). Coluna 4.6X250 mm XTerra RP₁₈ (5 µm) e pré-coluna 4.6X15 mm (5 µm) adquirida da Waters®. 8-OHGuo (Cayman Chem.), Diidrotimina, 4,6-Diamino-5-(formamido)-pirimidina (Fape-Ade), ácido isobarbitúrico (5-Hidroxiuracila, 5-OH-Uracila), 5-Hidroximetiluracila (5-OHMe-Uracila) (Acros), acetonitrila (CH₃CN), Guanina, Adenina, Timina, Citosina, hidróxido de amônia 25% e acetato de amônio (Merk). Timina Glicol (*sintetizada*).

Oligonucleotídeos, 5'-CAT TTC CAA TCA ACT AAT GCT-3', - 50.2 nmols - massa molecular, 6656.2 g/mol (oligo01) e 5'-CTG CAT TCT GAC TTT CAG TAA-3', - 54.6 nmols - massa molecular, 6711.2g/mol (oligo02) (invitrogen). Todos os compostos e solventes são de alto grau de pureza.



PARTE EXPERIMENTAL

PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES

Fase Móvel: H₂O:CH₃CN (90:10, v/v): Em um frasco de 1000 mL adicionou-se 900 mL de água deionizada com 2,5 mM de acetato de amônio (NH₄OAc) e 100 mL de acetonitrila. Posteriormente adicionou-se a este frasco contendo a mistura de acetonitrila : H₂O (2,5 mM NH₄OAc), hidróxido de amônio 25% para ajuste do pH (8.0). Após a homogeneização, a solução foi então desgaseificada com ultra-som durante 1 hora sob agitação. Esta fase móvel previamente tratada foi utilizada para a separação das bases e de seus derivados.

Solução das bases: As bases comerciais foram preparadas pesando-se 0.001 g (Guanina, Citosina, Timina e Adenina 8-OHGuia, Diidrotimina, Fape-Ade, 5-OH-Uracila, 5-OHMe-Uracila) de cada base e dissolvidas em 5 mL de água deionizada e desgaseificada.

Solução equimolar das bases: as amostras das bases comerciais livres foram preparadas na concentração equimolar de 0,09 mM em fase móvel H₂O:CH₃CN (90:10, v/v; pH 8.0).

Oligonucleotídeos: os oligonucleotídeos foram preparados nas seguintes concentrações:

- *Oligo 01* - 50.2 nmols - 1 mL de água deionizada foi adicionada para resuspender os oligonucleotídeos. Posteriormente, alíquotas de 100 µL foram colocadas em frascos de 1,5 mL. Estas alíquotas foram secas em speedvac e armazenadas a temperatura de – 20 °C até sua utilização.
- *Oligo 02* - 54.6 nmols - 1 mL de água deionizada foi adicionada para resuspender os oligonucleotídeos. Posteriormente, alíquotas de 100 µL foram colocadas em frascos de 1,5 mL. Estas alíquotas foram secas em speedvac e armazenadas a temperatura de – 20 °C até sua utilização.

Preparação do Ácido Fórmico 60 %: Para a preparação do ácido fórmico a 60%, 50 mL de água deionizada foi sonicada por 1 hora sob agitação. Posteriormente esta quantidade de água deionizada foi transferida para um balão e selado com um septo de

borracha. Nitrogênio gasoso foi purgado por 1 hora e posteriormente congelado em nitrogênio líquido sob agitação e alto vácuo para que todo o oxigênio fosse extraído. Nesta etapa todos os procedimentos foram realizados em triplicata para que ocorresse a desgaseificação completa da H₂O deionizada. Após este procedimento de desgaseificação, 4 mL da água desgaseificada foi transferida para um frasco selado com septo de borracha onde foi adicionado 6 mL de ácido fórmico o qual recebeu o mesmo procedimento de desgaseificação.

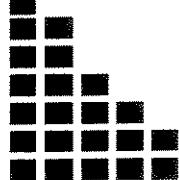
HIDRÓLISE ÁCIDA

Aliquotas das amostras de oligonucleotídeo (oligo 01; 100 µL; 5.02 nmol ou oligo 02; 100 µL; 5.46 nmol) foram hidrolisadas com 0,5 mL do ácido fórmico a 60%, em um tubo à vácuo. Após a adição do reagente o tubo foi selado e mantido a uma temperatura de 140 °C durante 30 minutos. O produto hidrolisado foi transferido para frascos (eppendorf) de 1,5 mL previamente esterilizados, acondicionados em nitrogênio líquido e liofilizados por um período de 18 horas. Esta hidrólise ácida total cliva as ligações peptídicas entre a base e o açúcar, liberando somente as bases de DNA livres intactas bem como modificadas. A hidrólise realizada com ácido fórmico 60% (v/v) é uma reação bastante branda evitando o aumento das lesões ao DNA (artefatos de técnica).

CULTURA DE CÉLULAS

Células PC-12 cresceram em DMEM suplementado com 5% de soro fetal bovino, 10% de soro de cavalo inativado, 100 unidades/mL de penicilina, e 100 µg/mL de estreptomicina em uma densidade média de 3.3×10^4 cels/cm² a 37 °C em atmosfera modificada contendo 5% CO₂. Os experimentos foram realizados de 48-96 horas após as células serem semeadas. As células foram transferidas para discos de cultura e incubadas a 37°C em atmosfera modificada contendo 5% CO₂ em DMEM livre de soro, contendo L-glutamina e antibióticos, por 2, 4 e 6 horas com exposição à luz fluorescente com uma intensidade de 10 W/m². As células foram expostas à luz fluorescente em discos de cultura

de tecido, o qual protege eficazmente o meio dos raios UVA e UVB. Células utilizadas como controle foram incubadas em meio livre de soro durante o tempo total de tratamento (6 h) na ausência dos raios UVA e UVB. As células foram coletadas por centrifugação a 300 g. O DNA foi extraído através da técnica de extração de tampão salino modificada como previamente descrito (SCUDIERO et al., 1986). A viabilidade das células após 2, 4 e 6 h de exposição à luz fluorescente foi determinada pela exclusão do azul de tripan. Os estudos de viabilidade celular, tanto das células expostas a luz fluorescente bem como as não expostas apresentaram um valor maior que 75%.



RESULTADOS E DISCUSSÕES

SÍNTESE DA TIMINA GLICOL A PARTIR DA TIMINA

Timina Glicol foi sintetizada a partir da oxidação da Timina com KMnO₄ de acordo com o método de Hayatsu (IIDA e HAYATSU, 1970) (Figura 10). 8,0 mmols de Timina foram completamente dissolvidos em 300 mL de água aquecida entre 50-60°C. A solução foi então resfriada em água gelada entre 5 a 10 °C, e o pH foi ajustado para 8,6 usando solução aquosa de NH₃ (5% ~ 1mL). Adicionou-se a seguir 150 mL de KMnO₄ (0,07M) a solução de Timina (pH final 9,3). Após 5 minutos, H₂SO₃ (ácido sulfuroso) saturado foi adicionado, gotejando-se lentamente até que o MnO₂ fosse totalmente precipitado e a cor púrpura desaparecesse (pH 2,3). Após esta etapa a solução foi imediatamente alcalinizada com solução aquosa de NH₃ (5%, ~ 12 mL) até atingir pH 8,6.

Esta solução, após filtrada, foi evaporada em um rotaevaporador (40-50 °C) até um volume de aproximadamente 5,0 mL. Adicionou-se 500 mL de acetonitrila à mistura produzindo sob agitação um precipitado branco. O precipitado foi filtrado e concentrado entre 5 e 10 mL utilizando novamente o evaporador rotatório (40-50°C). O volume restante foi resfriado em banho de gelo, e o produto final recristalizado. Obteve-se um rendimento de 63% de acordo com o método de IIDA e HAYATSU (1970).

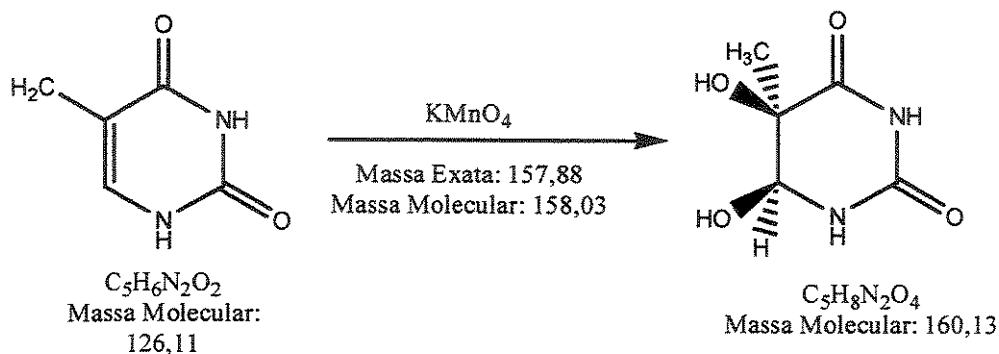


Figura 10 - Esquema da reação de síntese da *cis*-Timina Glicol a partir da Timina.

Para confirmação do produto formado e obtenção do espectro de massas de APCI-MS e APCI-MS/MS, foi preparada uma solução de 0,09 mM de Timina Glicol e injetada no equipamento com auxílio de uma bomba de seringa. O espectro de APCI-MS/MS pode ser observado na Figura 11, o qual mostra o íon de m/z 161 da Timina Glicol protonada e seus fragmentos principais através de experimentos de CID (Dissociação Induzida por Colisão) de m/z 72 e 101, 115 e 143, característico da Timina Glicol, o fragmento escolhido para o monitoramento em MRM foi o de m/z 72. O gás de colisão utilizado para a realização dos testes de APCI-MS/MS foi o nitrogênio.

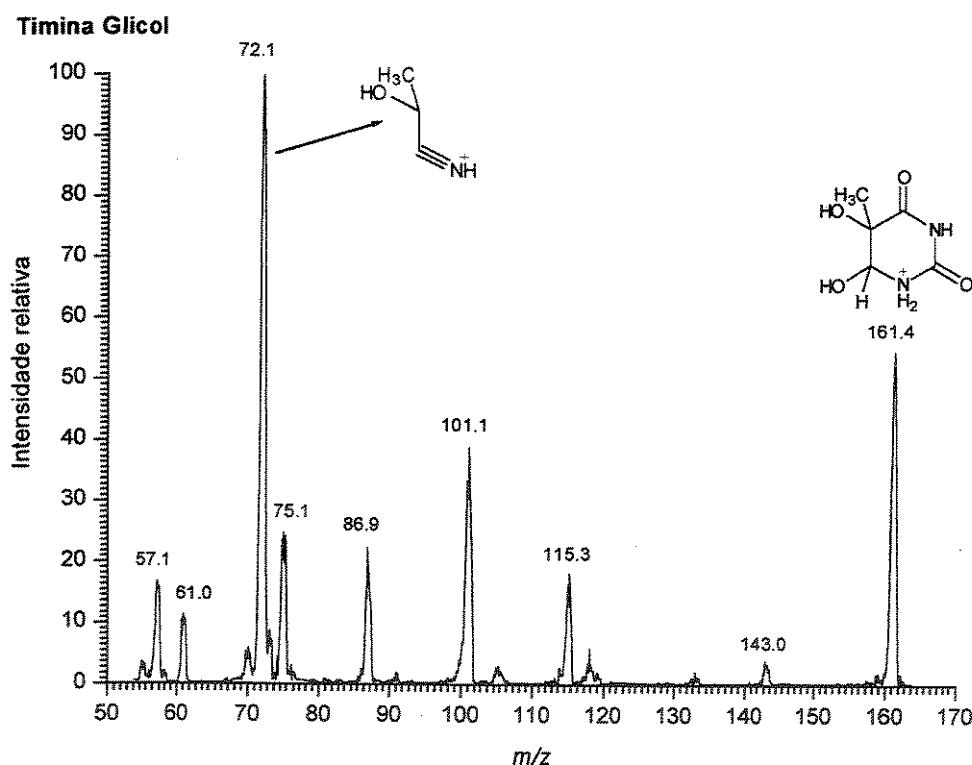


Figura 11 - Espectro de APCI-MS/MS da solução de Timina Glicol (0,09 mM).

Foram realizados testes com as bases de DNA intactas e lesadas na concentração 0,09 mM através da técnica de APCI/MS, onde foram observados os íons das moléculas protonadas característicos para cada base intacta e lesada, sendo que dois deles (Diidrotimina e 5-OH-Uracila) possuíam massas nominais iguais (m/z 129). Testes

utilizando-se APCI-MS/MS foram realizados para que se pudessem diferenciar as diversas bases intactas e lesadas através de seus fragmentos característicos. O gás de colisão utilizado para a realização dos testes de APCI-MS/MS foi o nitrogênio. Foram observados os fragmentos característicos de cada base testada - **intactas**: Guanina, Citosina, Timina e Adenina - **lesadas**: 8-OHGuo, Diidrotimina, Fape-Ade, 5-OH-Uracila (ácido isobarbitúrico), 5-OHMe-Uracila. Na Figura 12 podemos observar um íon de relação massas carga (m/z) de 152, apresentando fragmentos de CID em m/z 135 e 110 característico da Guanina; na Figura 13 podemos observar um íon de m/z 112 e o fragmento mais intenso de CID em m/z 95 característico da Citosina; na Figura 14 observa-se o íon molecular de m/z 127 e fragmentos em CID de 110 m/z característico da Timina e na Figura 15 a molécula protonada de m/z 136 e fragmento principal em CID de m/z 119, característico da Adenina.

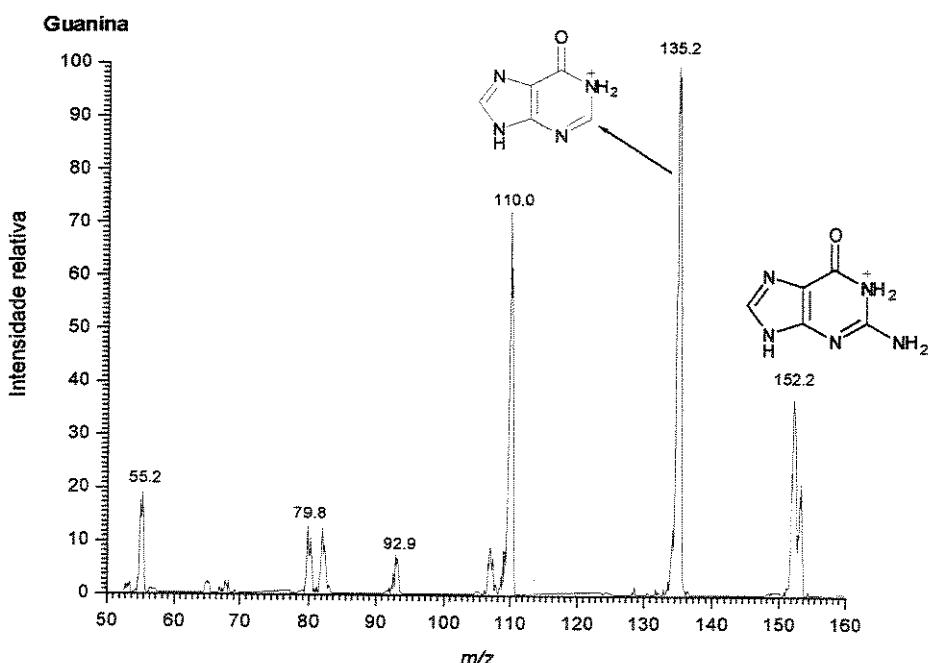


Figura 12 - Espectro de massas em APCI-MS/MS da Guanina protonada de m/z 152 e seus fragmentos característicos.

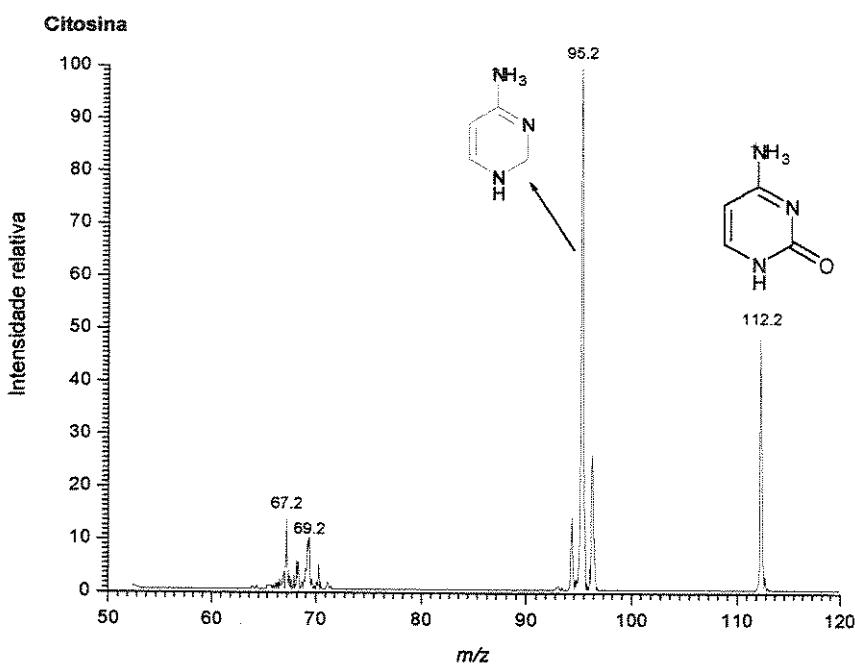


Figura 13 - Espectro de massas em APCI-MS/MS da Citosina protonada de m/z 112 e seus fragmentos característicos.

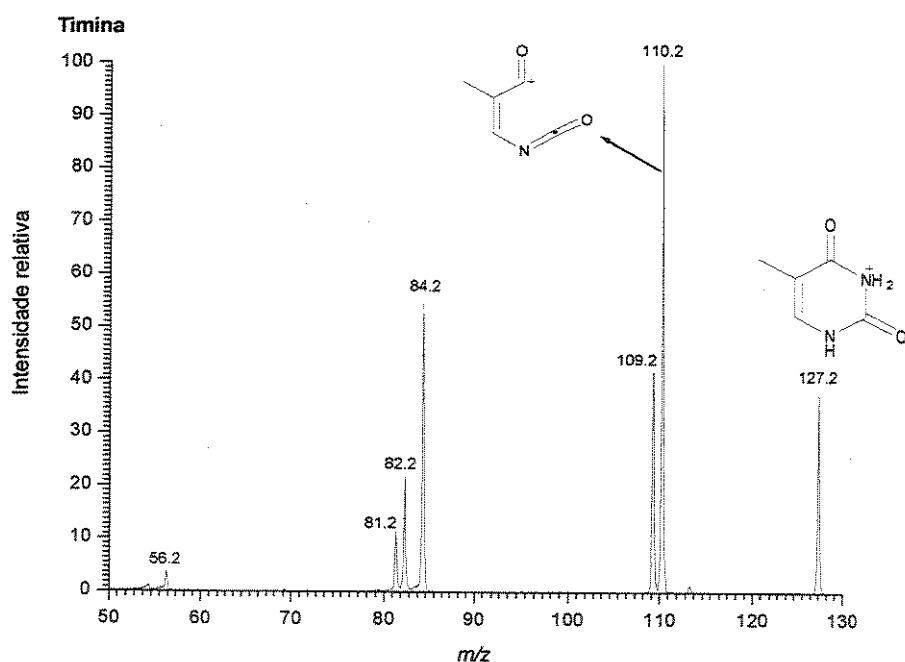


Figura 14 - Espectro de massas em APCI-MS/MS da Timina protonada de m/z 127 e seus fragmentos característicos.

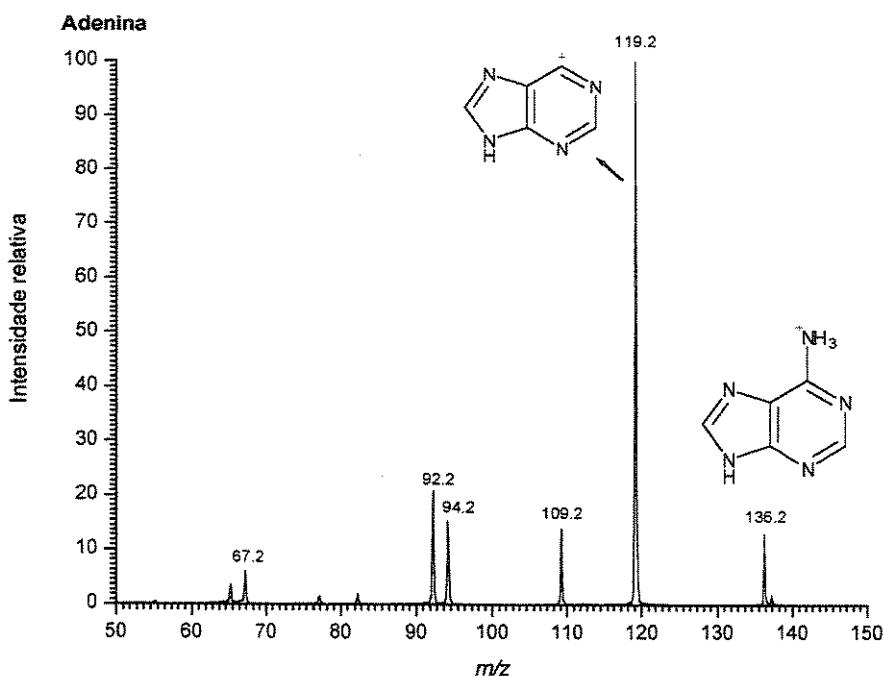


Figura 15 - Espectro de massas em APCI-MS/MS da Adenina protonada de m/z 136 e seus fragmentos característicos.

As bases lesadas adquiridas comercialmente foram testadas por experimentos de APCI/MS e APCI-MS/MS mostrando íons característicos como podem ser observados a seguir.

A 8-OHGuia apresenta o íon da molécula protonada em m/z 168, e fragmento característico principal de CID de m/z 140 entre outros (Figura 16). A Diidrotimina apresentou íon característico em m/z 129 e seu fragmento mais intenso de CID em m/z 86 (Figura 17); na Figura 18 observa-se o íon de m/z 143 e seus fragmentos de CID, sendo seu fragmento principal o íon de m/z 125 característico da 5-OHMe-Uracila, a 5-OH-Uracila apresentou seu íon da molécula protonada de m/z 129 observado na Figura 19 e seus fragmentos característicos de CID, sendo o principal fragmento o íon de m/z 56; a Fape-Ade apresentada na Figura 20, com o íon da molécula protonada de m/z 154 e seus fragmentos característicos, sendo o íon principal o de m/z 126.

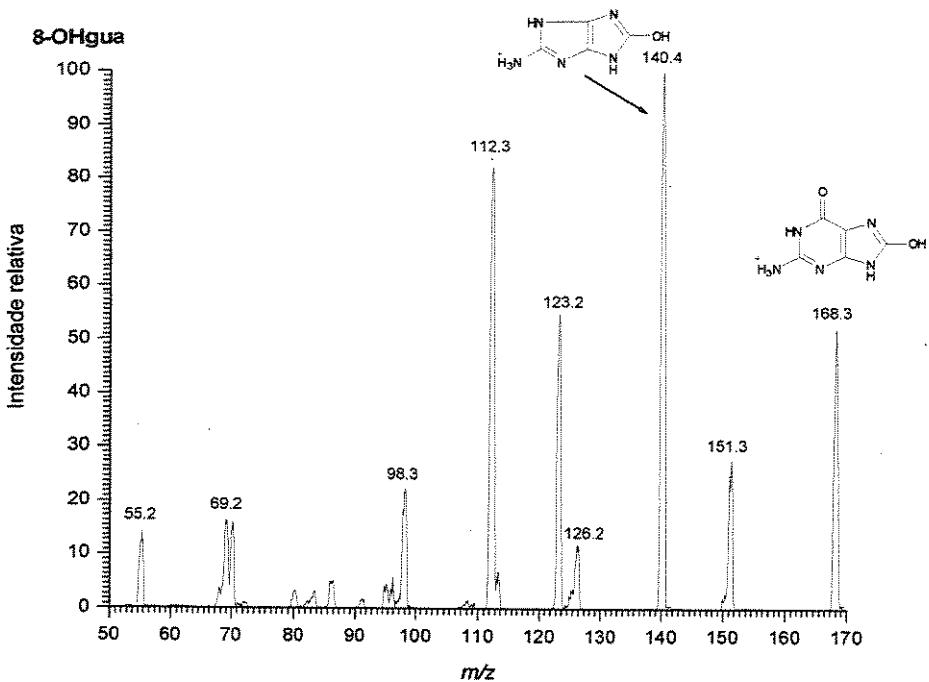


Figura 16 - Espectro de massas em APCI-MS/MS da 8-OHGuia protonada de m/z 168 e seus fragmentos característicos.

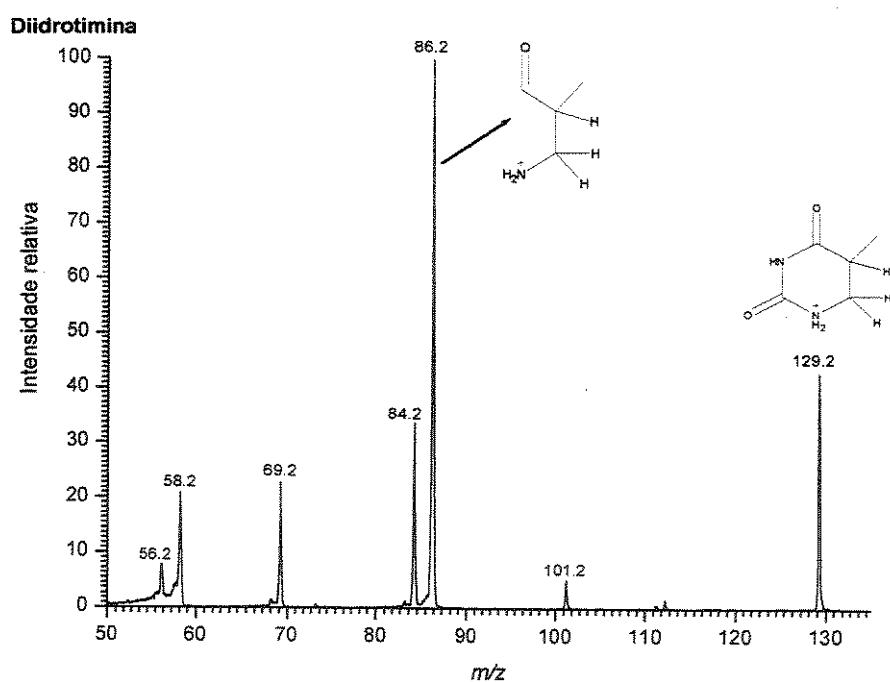


Figura 17 - Espectro de massas em APCI-MS/MS da Diidrotimina protonada de m/z 129 e seus fragmentos característicos

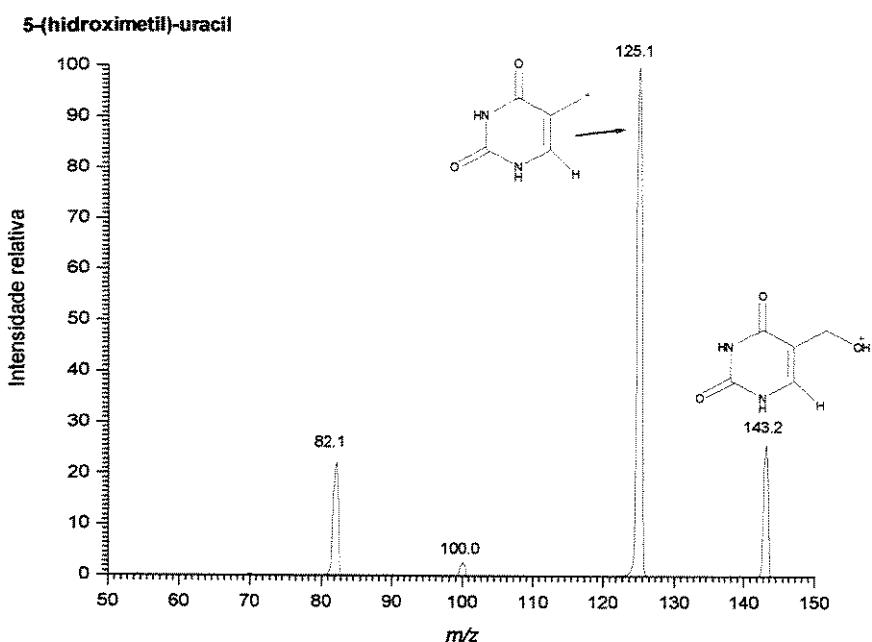


Figura 18 - Espectro de massas em APCI-MS/MS da 5-OHMe-Uracila de m/z 143 e seus fragmentos característicos.

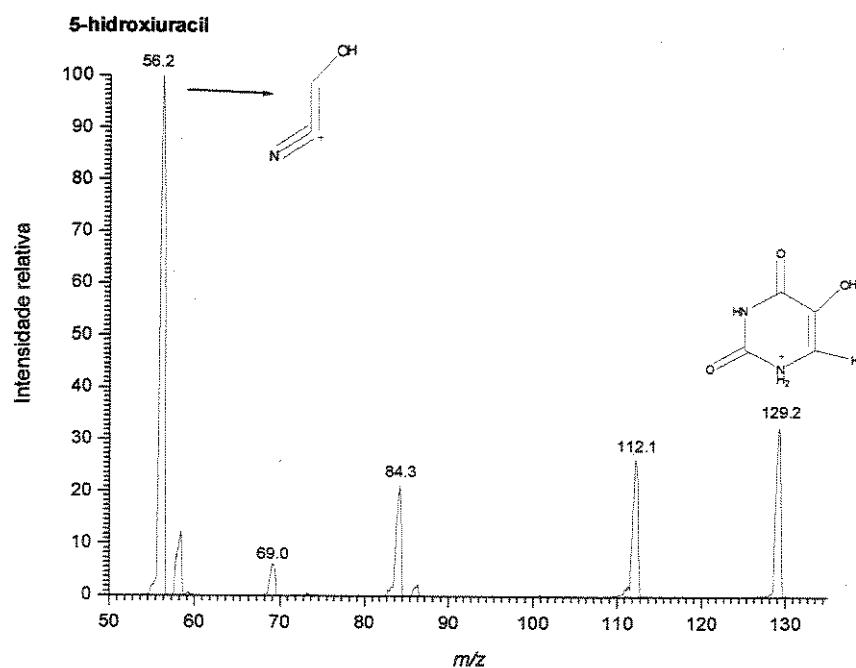


Figura 19 - Espectro de massas em APCI-MS/MS da 5-OH-Uracila protonada de m/z 129 e seus fragmentos característicos.

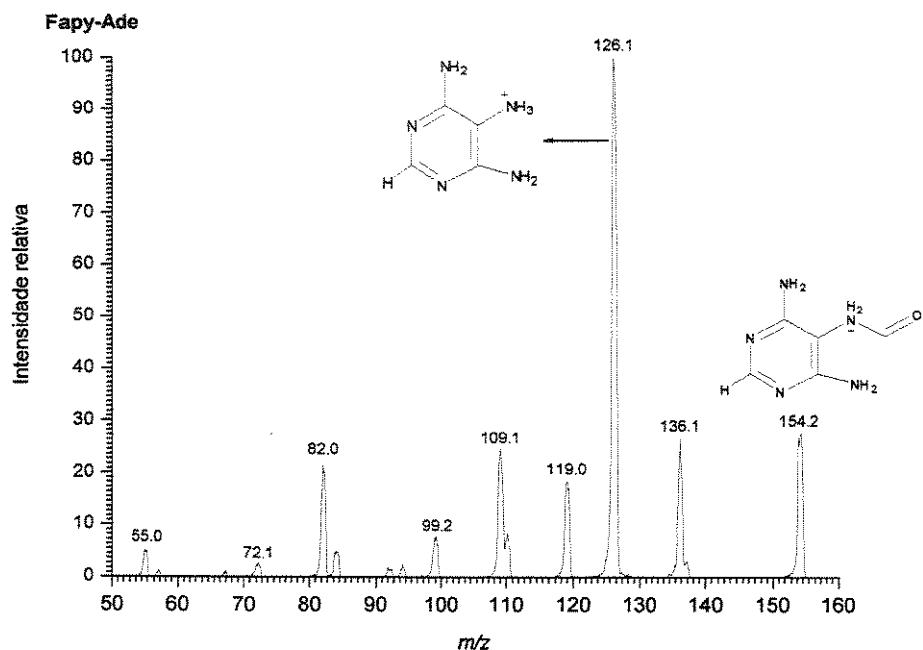


Figura 20 - Espectro de massas em APCI-MS/MS da Fape-Ade protonada de m/z 154 e seus fragmentos característicos.

TEMPOS DE RETENÇÃO

Inicialmente foram realizados testes para a identificação do tempo de retenção (TR) de cada base separadamente, utilizando-se para isso soluções na concentração de 0,09 mM de cada base. Utilizou-se para os testes de HPLC/APCI-MS/MS uma coluna 4.6X250 mm (XTerra RP₁₈ 5 μ m) acoplado a uma pré-coluna. A fase móvel isocrática consiste de CH₃CN:H₂O (10:90 – v/v), 2,5 mM acetato de amônio e pH 8,0 ajustado com hidróxido de amônio 25%, com fluxo de 0,250 mL/min e injeção de 10 μ L de cada base, utilizando-se o modo de MRM (Multiple Reaction Monitoring) para a aquisição dos dados.

Após realizados estes testes, uma solução equimolar (0,09 mM) de cada base foi preparada e injetada sem qualquer alteração no método. Este teste foi realizado para que se pudesse observar os tempos de retenções dos compostos analisados, bem como a comparação destes dados com os obtidos anteriormente nas injeções realizadas separadamente. Podemos observar na Figura 21 o perfil do cromatograma das 10 bases (intactas e lesadas) injetadas ao mesmo tempo.

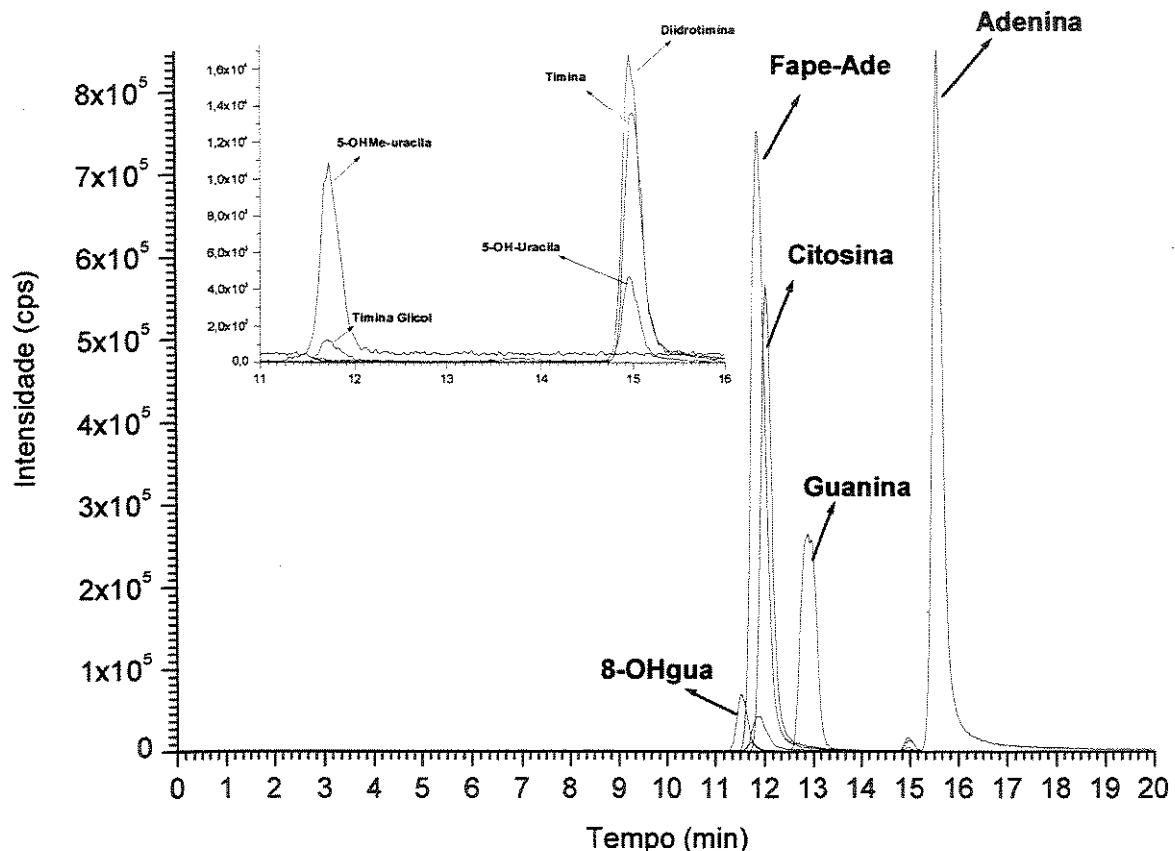


Figura 21 - Cromatograma das bases intactas e lesadas analisadas; Adenina (15.5 min), Timina (14.9 min) Citosina (12.0 min), Guanina (12.8 min), Diidrotimina (14.9 min), Fape-Ade (11.8 min), 8-OHGua (11.5 min), 5-Hidroximetiluracila (11.7 min), Timina Glicol (11.7 min) e 5-OH-Uracila (14.9 min).

Na Tabela 1 podemos observar os íons das moléculas protonadas (Q1) e seus fragmentos observados (Q3) das bases analisadas, seus tempos de retenção e as áreas calculadas.

Tabela 1 - Tempos de retenção dos compostos de acordo com o íon da molécula protonada selecionado em Q1, seus fragmentos característicos selecionados em Q3 e área encontradas utilizando Coluna 4.6X250 mm XTerra RP₁₈ (5µm) e pré-coluna 4.6X15 mm (5µm), fase móvel CH₃CN:H₂O (10:90-v/v pH 8.0), fluxo de 0.250 mL/min (solução equimolar das Bases - 0.09 mM).

Composto	Q1	Q3	TR (min.)	Área (counts)
Adenina	136	119	15.5	1.4x10 ⁷
Timina	127	110	14.9	2.1x10 ⁵
Citosina	112	95	12.0	9.1x10 ⁶
Guanina	152	135	12.8	5.9x10 ⁶
Diodrotimina	129	86	14.9	2.3x10 ⁵
Fape-Ade	154	126	11.8	1.5x10 ⁷
8-OHGuá	168	140	11.5	1.1x10 ⁶
5-OHMe-Uracila	143	125	11.7	1.5x10 ⁵
5-OH-Uracila	129	56	14.9	6.4x10 ⁴
Timina Glicol	161	72	11.7	2.3x10 ⁴

Após a obtenção destes dados, optou-se por realizar as análises pela área calculada obtida de cada base, sendo construído posteriormente curvas analíticas para observar se o método proposto era realmente factível de ser utilizado para a análise simultânea das bases de DNA. Estes dados estão mostrados a seguir.

LINEARIDADE

Após a escolha do método de análise (HPLC/APCI-MS/MS), e da escolha do fragmento característico para a análise das bases lesadas e intactas (Tabela 2), foi iniciada a etapa de construção de curvas analíticas. Este teste foi realizado para se verificar a linearidade do método proposto. Para a obtenção das curvas de calibração preparou-se

soluções equimolares das bases de acordo com a Tabela 2. As amostras formam injetadas uma a uma, com um intervalo de injeção de 10 minutos, para que ocorresse uma limpeza do sistema.

Tabela 2 - Concentrações molares dos padrões injetados para a construção da curva analítica

	<i>Std 01</i>	<i>Std 02</i>	<i>Std 03</i>	<i>Std 04</i>	<i>Std 05</i>	<i>Std 06</i>	<i>Std 07</i>	<i>Std 08</i>
Concentração. (molar)	225 nM	450 nM	900 nM	4,5 μ M	9 μ M	22,5 μ M	45 μ M	0,09 mM

* *Std* = Standard (padrão)

Correlacionando os dados obtidos pelo método desenvolvido em nosso laboratório das várias diluições preparadas com as áreas obtidas em “counts” foram construídas curvas analíticas que nos mostram um coeficiente de correlação obtido entre $r^2 = 0,9987$ a $r^2 = 0,9999$. Pode-se observar que o sistema de escolha para a análise mostrou um resultado bastante linear, levando-se em consideração a complexidade da amostra analisada, bem como o monitoramento de 10 compostos simultaneamente. As Figuras de 22 a 27 mostram as curvas analíticas obtidas das 6 bases lesadas analisadas simultaneamente.

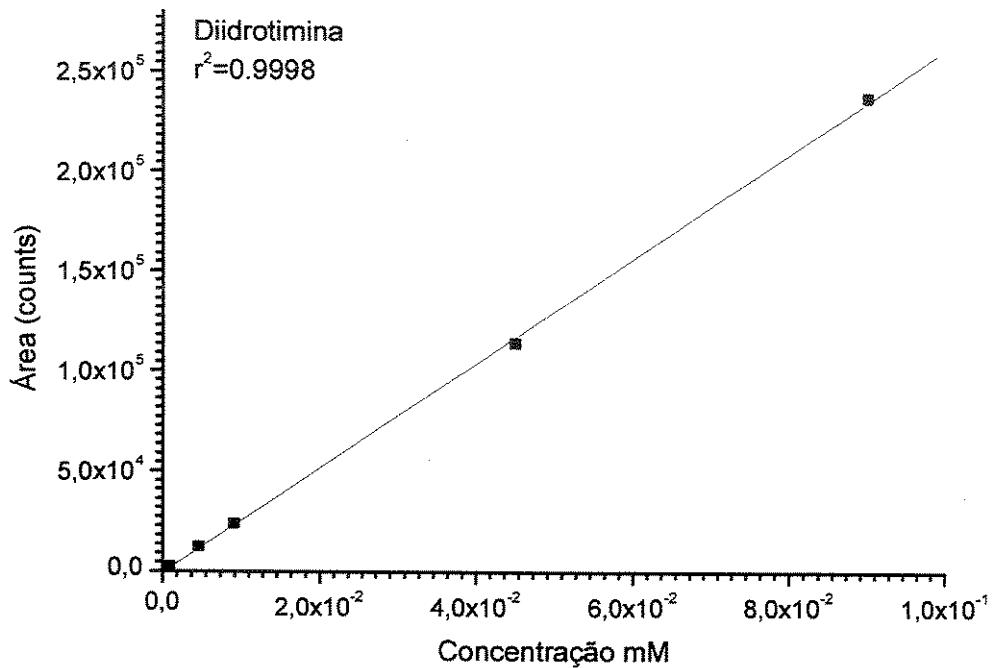


Figura 22 - Curva analítica obtida através das diluições preparadas X área obtida da Diidrotimina (m/z 129 \rightarrow m/z 86).

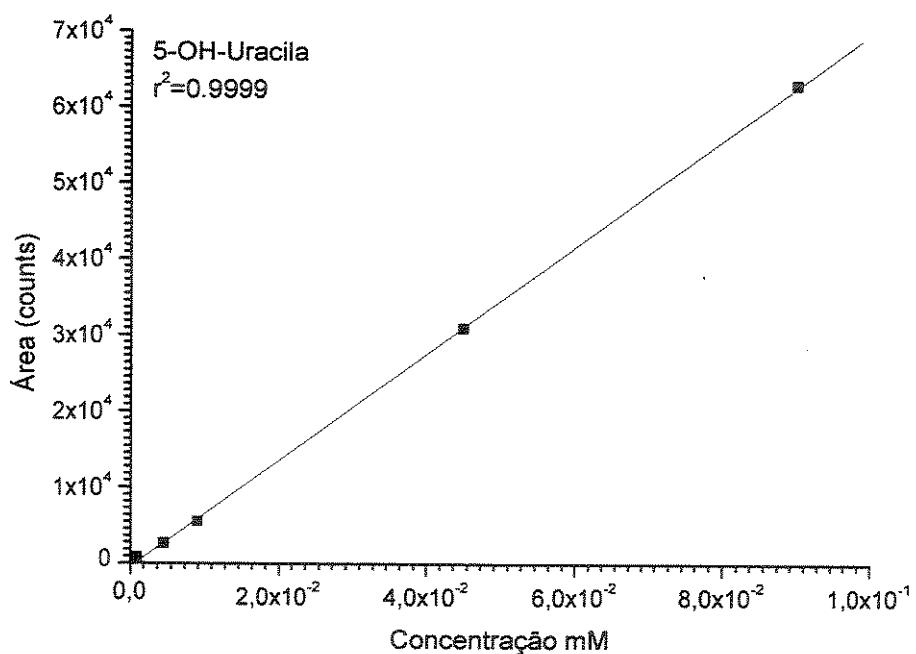


Figura 23 - Curva analítica obtida através das diluições preparadas X área obtida da 5-OH-Uracila (m/z 129 \rightarrow m/z 56).

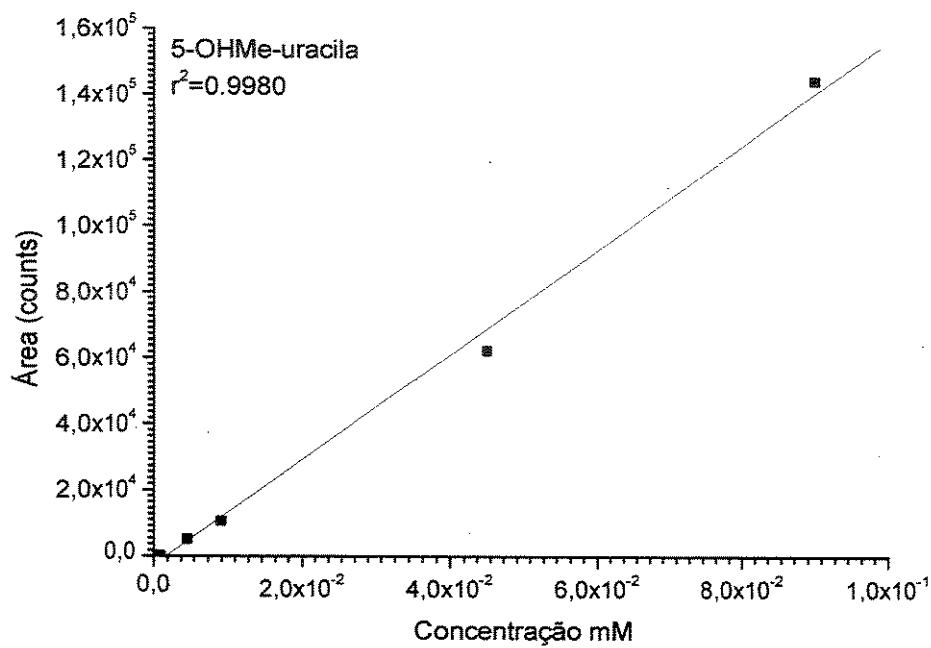


Figura 24 - Curva analítica obtida através das diluições preparadas X área obtida da 5OHMe-Uracila (m/z 143 \rightarrow m/z 125).

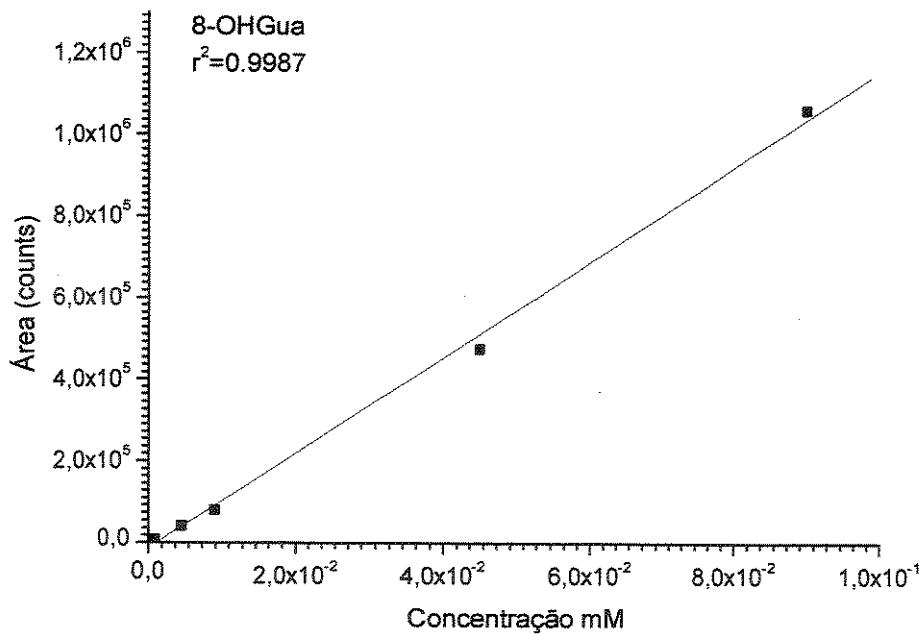


Figura 25 - Curva analítica obtida através das diluições preparadas X área obtida da 8-OHGuo (m/z 168 \rightarrow m/z 140).

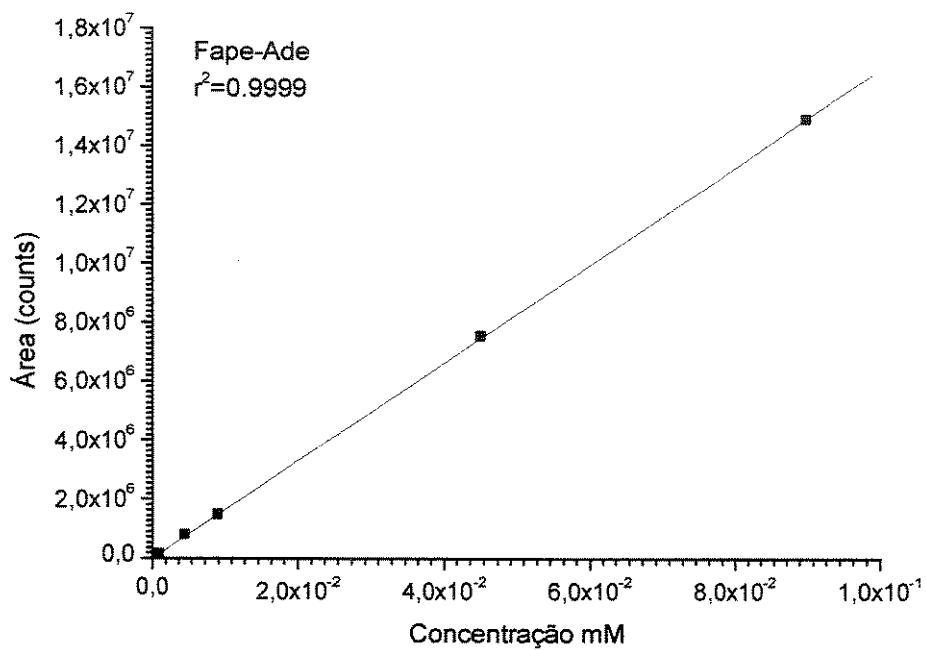


Figura 26 - Curva analítica obtida através das diluições preparadas X área obtida da Fape-Ade (m/z 154→ m/z 126).

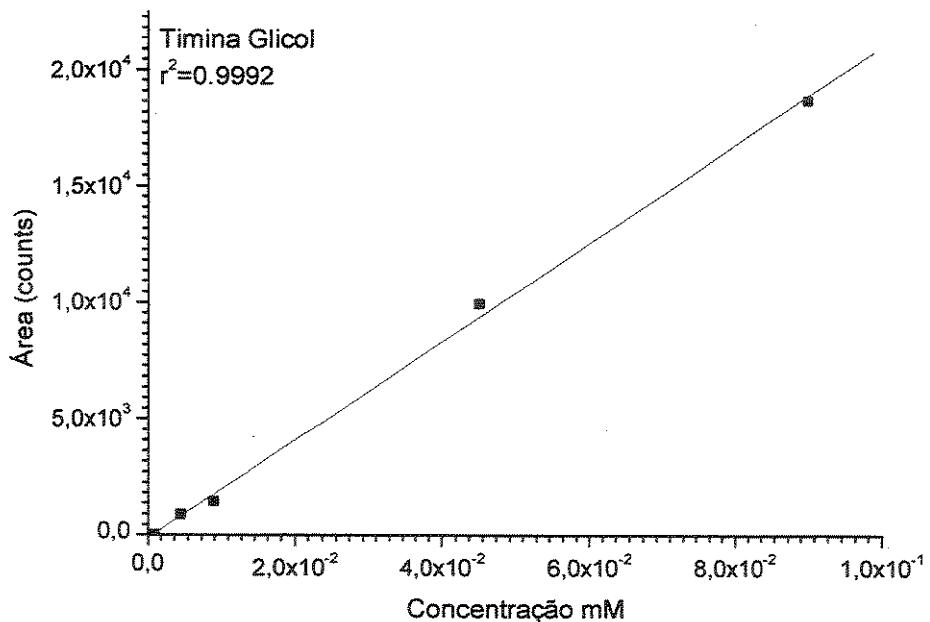


Figura 27 - Curva analítica obtida através das diluições preparadas X área obtida da Timina Glicol (m/z 161→ m/z 72).

Todas as 10 bases testadas obtiveram ótimos limites de detecção, realizando injeções de padrões equimolares cada vez mais baixas até que seus sinais monitorados não pudessem mais ser detectadas: ~50 fmol para Diidrotimina, Fape-Ade e 8-OHGu; e ~4.5 nmol para 5-OHMe-Uracila, Timina Glicol e 5-OH-Uracila, que são de maior interesse.

HIDRÓLISE ÁCIDA DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS

Com a finalidade de testar o método desenvolvido, e se a hidrólise ácida utilizada seria eficiente para a análise das bases de DNA intactas e lesadas, foram preparadas amostras em triplicata dos oligos 01 e 02 (oligo 01 - 5'-CAT TTC CAA TCA ACT AAT GCT-3', oligo 02 5'-CTG CAT TCT GAC TTT CAG TAA-3') com a hidrólise ácida conforme descrito anteriormente. Após o procedimento de hidrólise ácida os produtos foram ressuspendidos em 100 μ L de fase móvel e injetadas (10 μ L) no equipamento Q-trap® (Applied Biosystems), utilizando-se a técnica de HPLC/APCI-MS/MS desenvolvida.

Os sinais obtidos revelaram que a hidrólise ácida foi eficiente, uma vez que as bases intactas foram liberadas, com pouca formação de artefatos. As bases lesadas encontradas foram: 5-OHMe-Uracila (m/z 143 \rightarrow m/z 125) e Fape-Ade (m/z 154 \rightarrow m/z 126), como podemos observar na Tabela 4. Este dado pode ser melhor visualizado no Gráfico 1 para o Oligo 01. Pequenas alterações nas concentrações de algumas das bases foram observadas, este fato pode ser racionalizado devido à presença de resíduo de ácido fórmico ainda presente na amostra mesmo após 18 horas de liofilização. Testes de adição de padrão também foram realizados e estão mostrados na Tabela 5 e podem ser melhor visualizados no Gráfico 2, demonstrando que todos os compostos podem ser analizados após a hidrólise ácida.

Tabela 4 - Concentrações encontradas das bases intactas e lesadas de DNA do oligo 01 e 02 testado.

	<i>m/z</i>										
	Adenina	Timina	Citosina	Guanina	Diidrotimina	Fape-Ade	8-OHGuA	5-OHMe-Uracila	5-OH-Uracila	TG	
	136/119	127/110	112/95	152/135	129/86	154/126	168/140	143/125	129/56	161/72	
Oligo	Concentração (mM)										
01_1	0.478	0.0323	0.119	0.0627	0	0.000416	0	0.000599	0	0	
01_2	0.520	0.0516	0.163	0.0772	0	0.000350	0	0.000782	0	0	
01_3	0.554	0.0456	0.153	0.0380	0	0.000326	0	0.000475	0	0	
Oligo											
02_1	0.438	0.0767	0.161	0.0385	0	0	0	0.000499	0	0	
02_2	0.421	0.0873	0.190	0.0393	0	0	0	0.000423	0	0	
02_3	0.477	0.0261	0.0831	0.0104	0	0	0	0.000439	0	0	

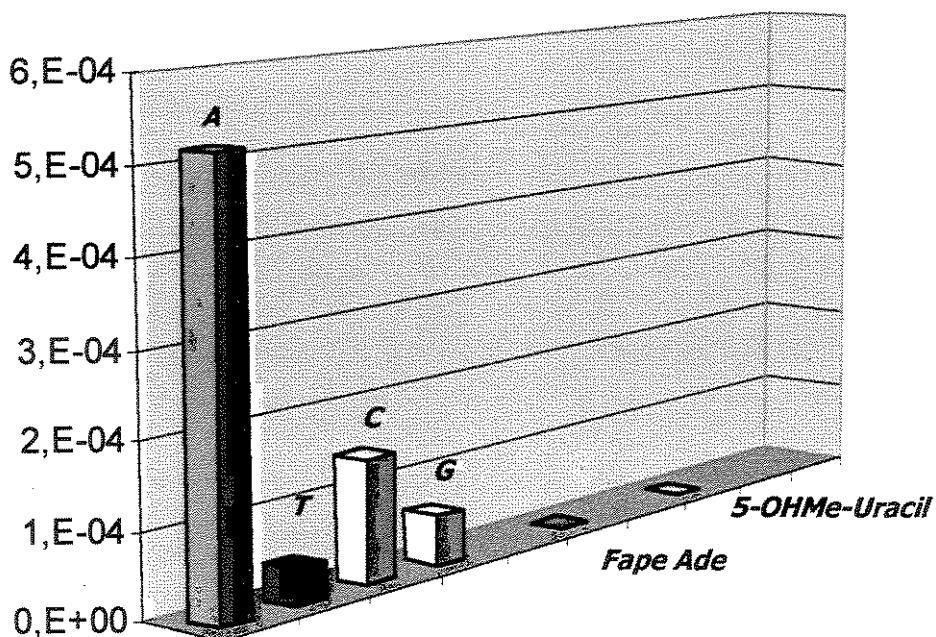


Gráfico 1 - Gráfico de colunas das bases intactas e lesadas de DNA do oligo 01 encontradas após a hidrólise ácida.

Tabela 5 - Concentrações encontradas das bases intactas e lesadas de DNA do oligo 01 testado com adição de padrão em concentração de 45 μM - *std 07* (Tabela 2).

	<i>m/z</i>										
	Adenina	Timina	Citosina	Guanina	Düdrotimina	Fape-Ade	8-OHGuA	5-OHMe-Uracila	5-OH-Uracila	TG	
	136/119	127/110	112/95	152/135	129/86	154/126	168/140	143/125	129/56	161/72	
Concentração (mM)											
Oligo01-1p	0.767	0.179	0.265	0.197	0.113	0.107	0.00196	0.0339	0.103	0.0127	
Oligo01-2p	0.561	0.124	0.230	0.160	0.0997	0.0977	0.00337	0.0315	0.0991	0.0180	
Oligo01-3p	0.843	0.195	0.297	0.214	0.129	0.118	0.00254	0.0349	0.130	0.0109	

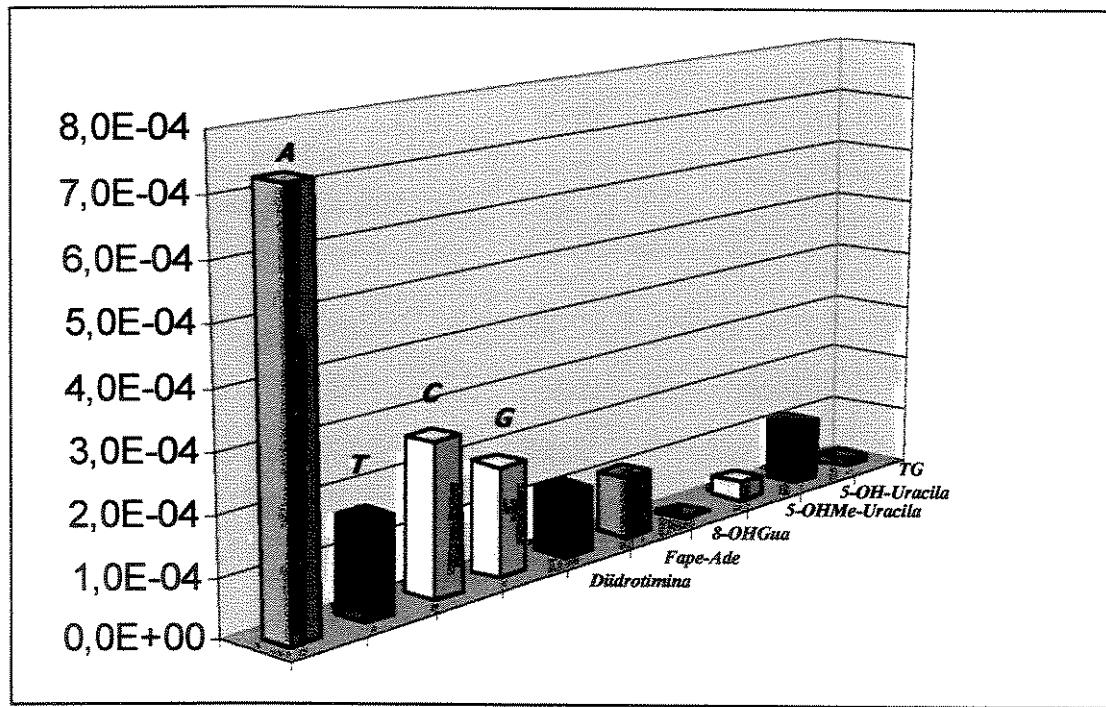


Gráfico 2 - Gráfico de colunas das bases intactas e lesadas de DNA do oligo 01 encontradas após a hidrólise ácida e adição de padrão.

FORMAÇÃO DAS LESÕES OXIDATIVAS NAS BASES DE DNA APÓS EXPOSIÇÃO À LUZ FLUORESCENTE

As células PC-12 foram expostas a luz fluorescente (LF) a 10 W/m² por 2, 4 e 6 h em meio livre de soro (n=3). Indução das lesões oxidativas nas bases de DNA em células PC-12 foram medidas e analisadas pelo método de HPLC/APCI-MS/MS desenvolvido. Os níveis endógenos da 8-OHGua, Fape-Ade, 5-OH-Uracila, 5-OHMe-Uracila, Diidrotimina e Timina Glicol foram analisados após a exposição LF. Células utilizadas como controle foram incubadas em meio livre de soro durante o tempo total de tratamento (6 h) na ausência dos raios UVA e UVB. Destas seis lesões oxidativas 8-OHGua, Fape-Ade, 5-OH-Uracila, 5-OHMe-Uracila, e Timina Glicol foram induzidas pela exposição à luz fluorescente, como mostrado nas Figuras de 28A-E, mas detalhes da quantificação podem ser observados e analisados na Tabela 6. Todos os dados foram realizados em triplicata (n=3), extraídos suas médias e desvios padrões. Os níveis de 5-OH-Uracila e Timina Glicol, apresentaram um aumento de aproximadamente 3 vezes nas 2 primeiras horas da exposição à luz fluorescente, enquanto os níveis de Fape-Ade exibiram um aumento de aproximadamente 2 vezes após 4 h de exposição comparados com o controle. Podemos observar que um importante marcador para lesões oxidativas, a 8-OHGua apresentou um aumento significativo de aproximadamente 3 vezes nas primeiras 2 h, e 7 vezes maior nas 6 h seguintes. A 5-OHMe-Uracila, somente pôde ser analisada após 6hs mostrando um aumento de aproximadamente 3 vezes após a exposição. A formação de Diidrotimina não foi detectada nas amostras controle e após 2, 4 e 6 h.

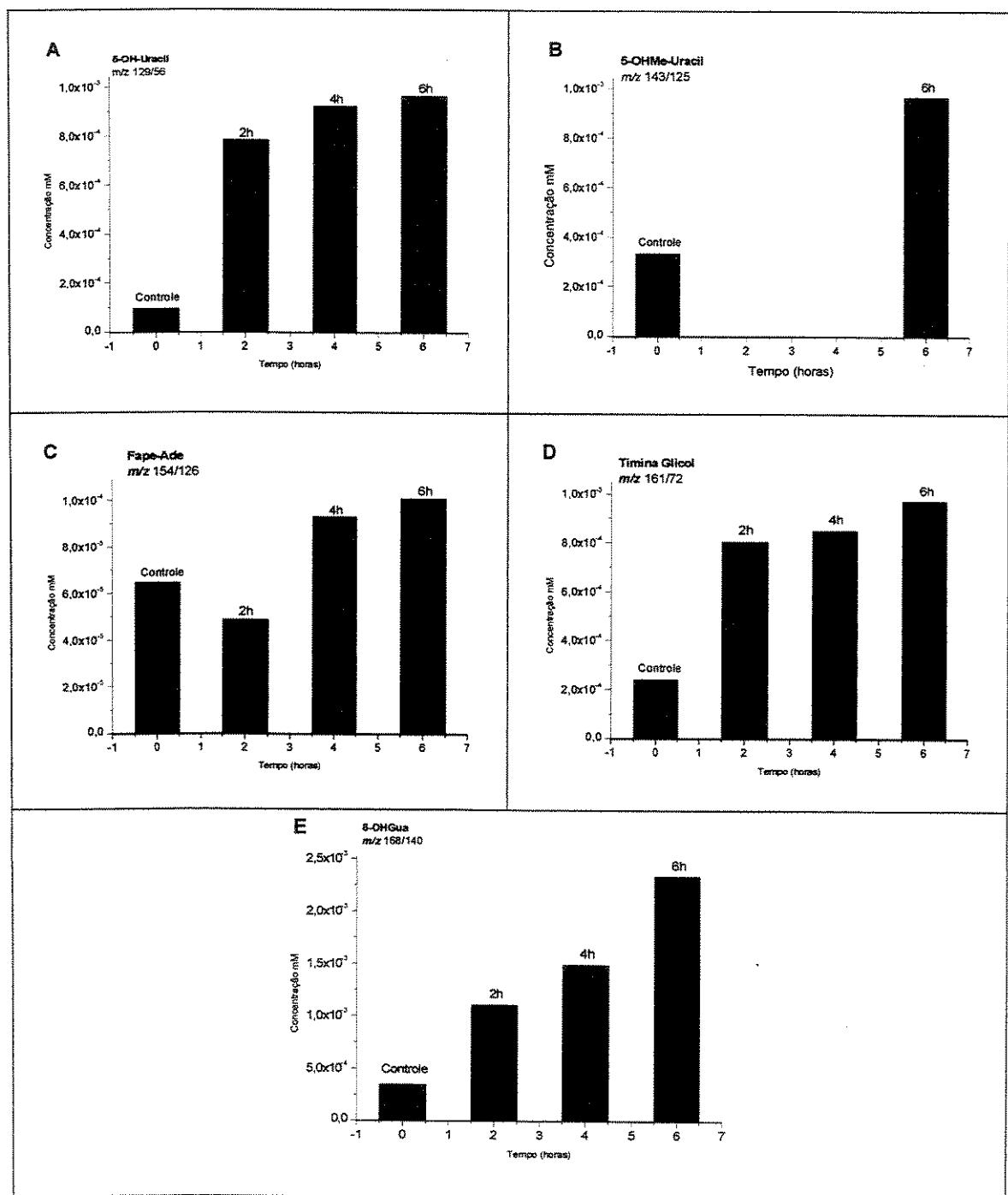


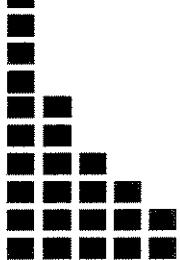
Figure 28 - Formação das lesões oxidativas no DNA em células após 2, 4 e 6h de exposição à LF. Os dados representam a média de triplicatas (expostas e controle).

Tabela 6 - Freqüência das lesões oxidativas encontradas em células PC-12 (n=3) quantificadas pelo método de HPLC/APCI-MS/MS desenvolvido.

	<i>m/z</i>	Diidrotimina	Fape-Ade	8-OHGuA	5-OHMe-Uracila	5-OH-Uracila	TG
		129/86	154/126	168/140	143/125	129/56	161/72
Concentração mM							
Controle	média	0	$6,48 \times 10^{-5}$	$3,47 \times 10^{-4}$	$3,34 \times 10^{-4}$	$9,57 \times 10^{-5}$	$2,39 \times 10^{-4}$
	DP	0	$1,56 \times 10^{-5}$	$1,48 \times 10^{-4}$	$1,56 \times 10^{-4}$	$8,44 \times 10^{-5}$	$1,75 \times 10^{-4}$
2 h	média	0	$4,89 \times 10^{-5}$	$1,11 \times 10^{-3}$	0	$7,84 \times 10^{-4}$	$8,06 \times 10^{-4}$
	DP	0	$8,50 \times 10^{-7}$	$1,15 \times 10^{-5}$	0	$8,58 \times 10^{-5}$	$7,25 \times 10^{-5}$
4 h	média	0	$9,31 \times 10^{-5}$	$1,49 \times 10^{-3}$	0	$9,23 \times 10^{-4}$	$8,49 \times 10^{-4}$
	DP	0	$6,45 \times 10^{-5}$	$3,56 \times 10^{-4}$	0	$1,33 \times 10^{-4}$	$6,62 \times 10^{-5}$
6 h	média	0	$1,01 \times 10^{-4}$	$2,34 \times 10^{-3}$	$1,60 \times 10^{-3}$	$9,65 \times 10^{-4}$	$9,72 \times 10^{-4}$
	DP	0	$5,77 \times 10^{-7}$	$1,91 \times 10^{-4}$	$1,04 \times 10^{-4}$	$1,67 \times 10^{-4}$	$2,86 \times 10^{-4}$

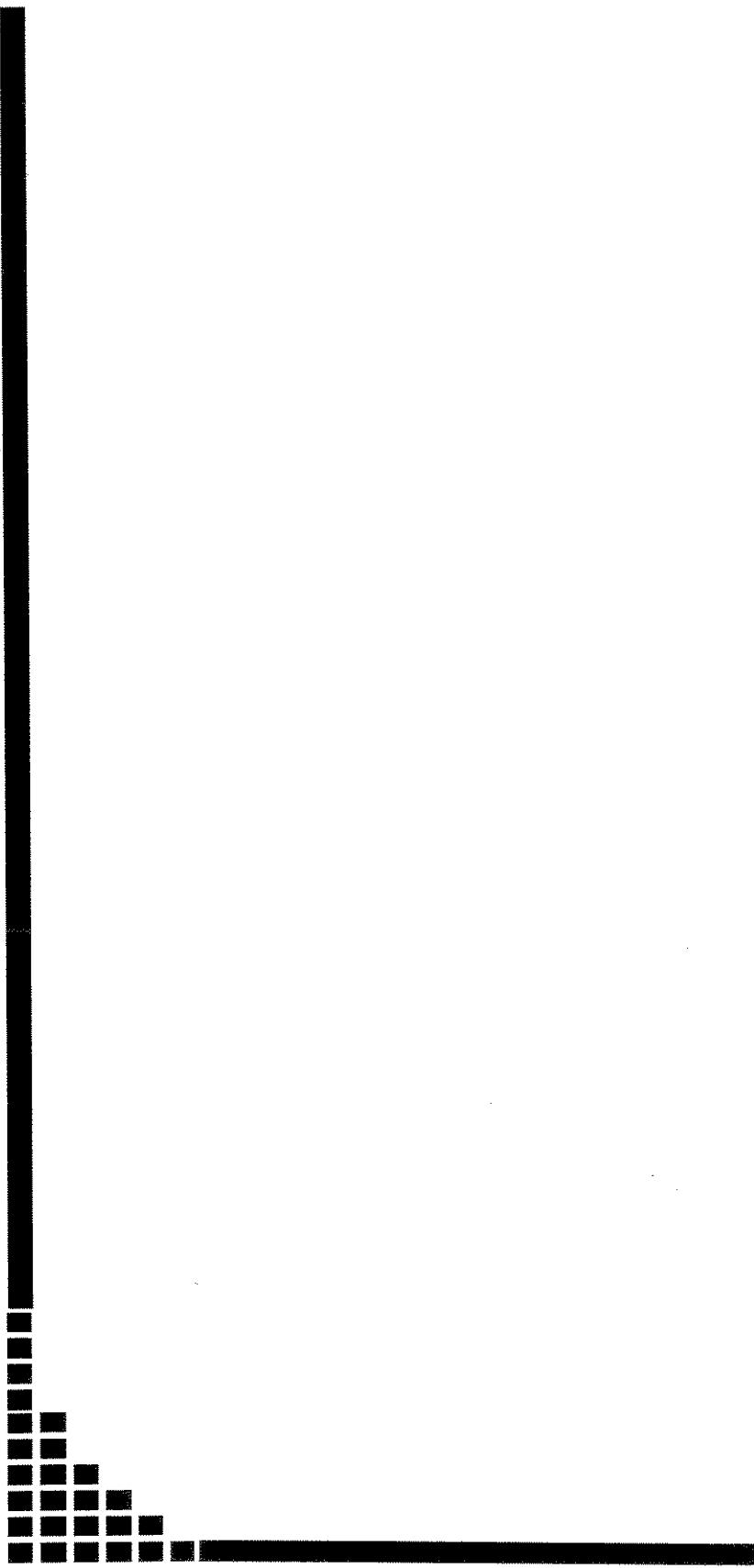
DP = desvio padrão

TG = Timina Glicol



CONCLUSÕES

Nós desenvolvemos um novo método para quantificação de bases de DNA e para produtos de sua interação com o oxigênio reativo, espécies radicalares e a exposição à Luz Fluorescente (LF). Para isso utilizamos a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a Espectrometria de Massas Seqüencial (HPLC/APCI-MS/MS) através do modo de monitoramento de MRM. As células utilizadas nestes experimentos foram células PC-12, feocromocitoma adrenal de rato (fibroblastos) irradiadas por 2, 4 e 6 horas com LF. As lesões oxidativas encontradas no DNA destas células foram: Fape-Ade, 8-OHGuA, 5-OHMe-Uracila, 5-OH-Uracila e Timina Glicol. O método descrito é sensível, rápido e não necessita de derivatização das bases a serem analisadas, evitando assim a formação de artefatos de técnica (CADET et al., 1997). Este método se mostrou viável para estudos da indução de lesões ao DNA nas células estudadas, bem como podem ser realizados em outras linhagens celulares. Outros tipos de lesões oxidativas também poderão ser analisados por este método. As mutações (WEI et al., 2002) e os sítios sensíveis a endonucleases têm sido amplamente estudados e detectados após exposição à luz visível (PFLAUM et al., 1994). Os efeitos prejudiciais da luz visível em culturas de células são conhecidos há muitos anos (FINKEL e HOLBROOK, 2000), sugerindo que esta radiação pode promover modificações no DNA (EVANS et al., 1997). Entretanto, este é o primeiro trabalho que estuda as lesões oxidativas formadas em células da linhagem PC-12 expostas a LF. O método desenvolvido apresentou boa linearidade ($r^2 = 0.9987-0.9999$) e limites de quantificação entre ~50 fmol e ~4.5 nmol, podendo ser aplicado também para o monitoramento de outras lesões oxidativas nas bases de DNA.



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMES, B. N.; SHIGENAGA, M. K. Oxidants are a major contributor to aging. *Ann NY Acad Sci*, 663: 85-96, 1992.

ANSON, R. M.; CROTEAU,D .L.; STIERUM, R. H.; FILBURN, C.; PARSELL, R.; BOHR,V .A. Homogenous repair of singlet oxygen-induced DNA damage in differentially transcribed regions and strands of human mitochondrial DNA. *Nucleic Acids Res*, 26, 662-8, 1998.

BRADLEY .G.; ROBINSON S.H.; TANDEM R. Deficient repair of alkylation damage of DNA in Alzheimer's disease and amyotrophic lateral sclerosis cells. *Exp Med Biol*, 209, 3-6, 1987.

BREEN, A. P.; MURPHY, J. A. Reactions of oxyl radicals with DNA. *Free Radic Biol Med*, 18: 1033-77, 1995.

CADET J.; DOUKI T.; RAVANAT J.-L.; Artifacts associated with the measurement of oxidative DNA bases. *Environ Health Perspect*, 105: 1034-9, 1997.

CORRÊA, A.C.O. - A doença de Alzheimer. Envelhecimento, Depressão e Doença de Alzheimer. Belo Horizonte, Ed Health, 1996.

DAVIES C. A.; MANN D. M. A.; SUMPTER P. Q.; YATES P. J. A quantitative morphometric analysis of the neuronal and synaptic contend of the frontal and temporal cortex in patients with AD. *J Neurol Sci*, 78: 151-64, 1987. / De Kosky S. T.; Scheff S. W. Synapse loss in frontal cortex biopsies in AD: correlation with cognitive severity. *Ann Neurol*, 27: 457-64, 1990.

DIZDAROGLU M.; JARUGA P.; BIRINCIOGLU M.; RODRIGUEZ H., Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement. *Free Radical Biology and Medicine*, 32(11): 1102-15, 2002.

DIZDAROGLU, M. Oxidative damage to DNA in mammalian chromatin. *Mutat Res*, 275: 331-42, 1992.

DIZDAROGLU, M. Quantitative determination of oxidative base damage in DNA by stable isotope-dilution mass spectrometry. *FEBS Lett*, 315(1): 1-6, 1993b.

DIZDAROGLU, M., Chemical determination of oxidative DNA damage by gas chromatography-mass spectrometry. **Methods Enzymol**, 234: 3-16, 1994.

DIZDAROGLU, M.; BAUCHE, C.; RODRIGUEZ, H.; LAVAL, J. Novel substrates of Escherichia coli nth protein and its kinetics for excision of modified bases from DNA damaged by free radicals. **Biochemistry**, 39: 5586-92, 2000.

DIZDAROGLU, M.; HOLWITT, E.; HAGAN, M. P.; BLAKELY, W. F. Formation of cytosine glycol and 5,6-dihydroxycytosine in deoxyribonucleic acid on treatment with osmium tetroxide. **Biochem J**, 235: 531-6, 1986.

DIZDAROGLU, M.; LAVAL, J.; BOITEUX, S. Substrate specificity of the Escherichia coli endonuclease III: excision of thymine- and cytosine-derived lesions in DNA produced by radiation-generated free radicals. **Biochemistry**, 32: 12105-11, 1993.

EVANS, M. D.; GRIFFITHS, H. R.; LUNEC, J. **Reactive oxygen species and their cytotoxic mechanisms**. Chipman, J. K. eds. Mechanisms of Cell Toxicity 20, 25-73 JAI Press Inc. London. 1997.

FINKEL T.; HOLBROOK N. J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing, **Nature**, 408: 239-47, 2000.

FRELON, S.; DOUKI, T.; RAVANAT, J. L.; POUGET, J. P.; TORNABENE, C.; CADET, J. High-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry measurement of radiation-induced base damage to isolated and cellular DNA. **Chem Res Toxicol**, 13: 1002-10, 2000.

FRIEDLICH A. L., BUTCHER L.L. Involvement of free oxygen radicals in b-amyloidosis: a hypothesis. **Neurobiol Aging**, 15: 443-5, 1993.

GAUBATZ J. W.; TAN B. H. Aging affects the levels of DNA damage in postmitotic cells. **Ann NY Acad Sci**, 719: 97-107, 1994.

GOMES, M. M. Epidemiologia das desordens demenciais. **J Bras Psiq**, 44: 351-5, 1995.

GREEN M. J.; HILL H. A. O. Chemistry of dioxygen. **Meth. Enzimol**, 105:, 3-22, 1984.

GSELL W.; CONRAD R.; HICKETHIER M.; SOFIC E.; FRÖLIC L.; WICHART I.; JELLINGER K.; MOLL G.; RANSMAYR G.; BECKMANN H.; RIEDERER P.; Decreased catalase activity but unchanged superoxyde dismutase activity in brains of patients with dementia of Alzheimer type. *J Neurochem*, 64: 1216-23, 1995.

HALLIWELL B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future, *Ann N Y Acad Sci*, 899: 136-47, 2000.

HARDY J.; ALLSOP D. Amyloid deposition as the central event in the aetiology of AD. *Trends Neurosci*, 12: 383-5, 1991.

HUA, Y.; WAINHAUS, S. B.; YANG, T.; SHEN, N.; YIONG, Y.; XU, X.; ZHANG, Z.; BOLTON, J. L.; van BREEMEN, R. B. Comparison of negative and positive ion electrospray tandem mass spectrometry for the liquid chromatography tandem mass spectrometry analysis of oxidized deoxynucleosides. *J Am Soc Mass Spectrom*, 12: 80-7, 2000.

IIDA, S.; AND HAYATSU, H. The permanganate oxidation of thymine. *Biochim Biophys Acta*, 213: 1-13, 1970.

Institut de Produits de Synthese Et D'extraction Naturelle - Ipsen - **Maladie d'Alzheimer**. 2eme Edition, Paris, Générale Graphique Editeur, 1987.

JONES S.K.; NEE L. E.; SWEET R. J.; POLINSKY R. J.; BARTLETT J. D.; BRADLEY W. G.; ROBINSON S. H. Decreased DNA repair in familial Alzheimer's disease. *Mutation Res*, 219: 247-55, 1989.

LEWIS P. N.; LUKIW W. J.; De BONI U. CRAPPER McLACHLAN D. R. Changes in chromatin structure associated with Alzheimer's disease. *J Nerochem*, 37: 1193-202, 1981.

LINK C. J. JR; ROBBINS J. H.; BOHR V. A. Gene specific DNA repair of damage induced in familial Alzheimer disease cells by ultraviolet irradiation or by nitrogen mustard. *Mutat Res*, 336: 115-21, 1995.

LIPINSKI L. J.; HÖEHR N. F.; MAZUR S.J.,DIANOV G. L.; SENTÜRKER S.; DIZDAROGLU M.; BOHR V. A. Repair of oxidative DNA base lesions induced by fluorescent light is defective in xeroderma pigmentosum group A cells. *Nucleic Acids Research*, 27: (15), 3153-8, 1999.

MARTINS R. N.; HARPER C. G.; STOKES G. B. MASTERS C. L. Increased cerebral glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in Alzheimer's disease may reflect oxidative stress. *J Neurochem*, 46: 1042-45, 1986.

MELVIN, T.; BOTCHWAY, S.; PARKER, A. W.; O'NEILL, P. Induction of strand breaks in single-stranded polyribonucleotides and DNA by photosensitization: one electron oxidized nucleobase radicals as precursors. *J Am Chem Soc*, 118: 10031-36, 1996.

NIWA, T. Clinical Mass Spectrometry. *Clinica Chimica Acta*, 241-2: 1-414, 1995.

NIXON R. A.; CATALDO A. M., Free radicals, proteolysis and degeneration of neurons in Alzheimer disease: how essential is the b-amyloid link? *Neurobiol Aging*, 15: 463-9, 1994.

O'NEILL, P.; CHAPMAN, P. W. Potential repair of free radical adducts of dGMP and dG by a series of reductants. A pulse radiolytic study. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med*, 47:71-80, 1985.

OLINSKI R.; GACKOWSK D.; FOKSINSKI M.; ROZALSKI R.; ROSZKOWSKI K.; JARUGA P. Oxidative DNA damage: assessment of the role in carcinogenesis, atherosclerosis, and acquired immunodeficiency syndrome. *Free Radical Biology and Medicine*. 33(2): 192-200, 2002.

PARSHAD R.; SANFORD K. K.; PRICE F. M.; MELNICK L. K.; NEE L. E.; SCHAPIRO, M. B.; TARONE R.E., ROBBINS J.H., Fluorescent light-induced chromatid breaks distinguish Alzheimer disease cells from normal cells in tissue culture. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93: 5146-50, 1996.

PEARSON R. C. A.; ESIRI M. M.; HIORNS R. W.; WILCOK G. K.; POWELL T. P. S. Anatomical correlates of the distribution of the pathological changes in the neocortex in AD. *Proc Natl Acad Sci USA*, 82: 1-4, 1985.

PERRY G.; RAINA A. K.; NUNOMURA A.; WATAYA T.; SAYRE L. M.; SMITH M. A. How important is oxidative damage? Lessons from Alzheimer's disease. *Free Radical Biology and Medicine*, 28: 831-4, 2000.

PERRY, S.W. & MARKOWITZ, J. - Transtornos Mentais Orgânicos. In: Talbott, J., Hales, R. & Yudofsky, S. - *Tratado de Psiquiatria*. Porto Alegre, Artes Médicas, 1992.

PETERSEN A. B.; GNIADECKI R.; VICANOVA J.; THORN T.; WULF H. C. Hydrogen peroxide is responsible for UVA-induced DNA damage measured by alkaline comet assay in HaCaT keratinocytes. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, 59: 123-231, 2000.

PFLAUM, M., BOITEUX, S., EPE, B. Visible light generates oxidative DNA base modifications in high excess of strand breaks in mammalian cells. **Carcinogenesis**, 15: 297-300, 1994.

PODMORE, I. D.; COOPER, D.; EVANS, M. D.; WOOD, M.; LUNEC, J. Simultaneous measurement of 8-oxo-2'-deoxyguanosine and 8-oxo-2'-deoxyadenosine by HPLC-MS/MS. **Biochem Biophys Res Commun**, 277: 764-70, 2000.

RAVANAT, J.L.; DURETZ, B.; GUILLER, A.; DOUKI, T.; CADET, J. Isotope dilution high-performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry assay for the measurement of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine in biological samples. **J Chromatogr B Biomed Sci Appl**, 715: 349-56, 1998.

SADOUN, F.; VIRELIZIER, H.; ARPINO P. Packed-column supercritical fluid chromatography coupled with electrospray ionization mass spectrometry. **J Chromatogr A**, 647: 351-9, 1993.

SATOH M.S.; JONES C. J.; WOOD R. D.; LINDAHL T. DNA excision-repair defect of xeroderma pigmentosum prevents removal of a class of oxygen free radical-induced base lesions. **Proc Natl Acad Sci USA**, 90: 6335-9, 1993.

SATOH M.S.; LINDAHL T. Enzymatic repair of oxidative DNA damage. **Cancer Res**, 54: 1899-901, 1994.

SCUDIERO D. A; POLINSKY R. J.; BRUMBACK R. A; TARONE R. E.; NEE L. E.; ROBBINS J. H.; Alzheimer disease fibroblasts are hypersensitive to the lethal effects of a DNA-damaging chemical. **Mutat Res**, 159: 125-31, 1986.

SERRANO, J.; PALMEIRA, C. M.; WALLACE K. B.; KUEHL, D. W. Determination of 8-hydroxydeoxyguanosine in biological tissue by liquid chromatography/electrospray ionization-mass spectrometry/mass spectrometry. **Rapid Commun Mass Spectrom**, 10: 1789-91, 1996.

SINET, P.M. Yatil des anomalies génétiques explorables in vivo dans la maladie d'Alzheimer? In: Guez, D. et al. - **Investigations Cliniques et Paracliniques dans le Vieillissement Cérébral**. Paris, Doin Éditeurs, 1987.

SONNTAG, V. **The Chemical Basis of Radiation Biology**. Taylor and Francis London, New York. 1987.

STEENKEN, S. Addition-elimination paths in electron-transfer reactions between radicals and molecules. **J Chem Soc Faraday Trans I**, 83,113-24, 1987.

TEOULE, R. Radiation-induced DNA damage and its repair. **Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med**, 51: 573-89, 1987.

VIEIRA, A. J. S. C.; STEENKEN, S. Pattern of OH radical reaction with adenine and its nucleosides and nucleotides. Characterisation of two types of isomeric OH adduct and their unimolecular transformation reactions. **J Am Chem Soc**, 112: 6986-94, 1990.

WAGNER, J. R. Analysis of oxidative cytosine products in DNA exposed to ionizing radiation. **J Chim Phys**, 91: 1280-6, 1994.

WAGNER, J. R.; VAN LIER, J. E.; BERGER, M.; CADET, J. Thymidine hydroperoxides: structural assignments, conformational features and thermal decomposition in water. **J Am Chem Soc**, 116: 2235-42, 1994.

WARREN S.; CHUTE R.N. Pheochromocytoma, **Cancer**, 29: 327-31. 1972.

WEI H.; ZHANG X.; WANG Y.; LEBWOH M. Inhibition of ultraviolet light-induced oxidative events in the skin and internal organs of hairless mice by isoflavone genistein, **Cancer Letters**, 185(1);, 21-9, 2002.

WEIMANN, A.; BELLING, D.; POULSEN, H. E. Measurement of 8-oxo-2'-deoxyguanosine and 8-oxo-2'-deoxyadenosine in DNA and human urine by high performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. **Free Radic Biol Med**, 30: 757-64, 2001.

ZUBENKO G.S., Hippocampal membrane alteration in Alzheimer's disease. **Brain Res**, 385: 115-21, 1986.