

"ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE A REDAÇÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA POR
GISELLE ZENKER JUSTO E APROVADA PELA COMISSÃO JULGADORA."

Campinas, 12 de março de 1992.

Nelson Durán
Nelson Durán

Dr. Nelson Durán

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE QUÍMICA

"RADICAL 2-FENILETILA: GERAÇÃO E REATIVIDADE
COM O ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLEÍCO"

GISELLE ZENKER JUSTO *nº 985*
PROF. DR. NELSON DURAN *nº 000000*
TESE DE MESTRADO

CAMPINAS

-1992-

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

BC 92.05.808

Aos meus pais com carinho,
pelo amor, incentivo e apoio

Ao meu irmão,
pela amizade

Ao Ramón, pelo apoio nas horas
difíceis e carinho de sempre

AGRADECIMENTOS

Ao Paolo Livotto, pela pronta colaboração na efetuação dos cálculos teóricos e também pelas discussões esclarecedoras.

A Janete Cerutti, pela amizade e pela ajuda nos ensaios com o plasmideo. Agradeço também a todo o pessoal da genética humana e vegetal pela colaboração e amizade.

Ao Jaime e André, que além da amizade, me auxiliaram na parte experimental e nas discussões acadêmicas transcorridas ao longo deste período.

A Elisa Esposito, pela amizade e apoio dispensados em todos os momentos.

Ao Prof. Dr. Francisco Pessine, pela colaboração e interesse no decorrer deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Giuseppe Cilento (IQ-USP), Fernando Galembeck, Paulo Arruda e Ronaldo Pilli, por terem permitido o uso de seus laboratórios e materiais necessários ao desenvolvimento deste trabalho.

Ao pessoal do bloco B-10 superior e B-12 inferior (IQ-USP), pela amizade.

A todo o pessoal do bloco D (departamento de química orgânica IQ-UNICAMP), pelo agradável convívio diário e pela amizade.

Aos amigos de todos os momentos Beth, Marcelo, Adriana, Ana e Márcia, pelo afeto que me acompanhou ao longo destes anos de trabalho.

A Maria Aparecida de Souza, pela pronta colaboração em todas as horas.

Aos funcionários do Instituto de Química, pela colaboração sem a qual não seria possível a realização de parte desta tese.

A FAPESP, CNPq, FINEP, OEA e UNESCO, pelo apoio financeiro.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A Profa. Dra. Adelaide Faljoni-Alário, pelo auxílio e possibilidade de preparar e isolar DNA de plasmídeo, bem como realizar estudos de fluorescência em seu laboratório.

A Profa. Dra. Dhara Augusto, pela co-orientação nos estudos desenvolvidos e pela possibilidade de realizar parte deles em seus laboratórios. Agradeço também à Luciana Cerqueira Leite e Luis Netto pelo auxílio e amizade.

A Profa. Dra. Solange Farah, pela atenção e disposição de seus laboratórios durante os estudos com o DNA de plasmídeo.

A Dra. Maricilda P. De Mello, pela valiosa colaboração e proveitosas discussões no término desta tese.

Ao Prof. Dr. Nelson Durán, pela orientação e dedicação
dispensadas, além da oportunidade de aprender com ele

ABREVIACOES E NOMES USUAIS

DETAFAC	cido dietilenotriaminopentactico
EDTA	cido etilenodiaminotetracético
EPR	ressonância paramagnética eletrônica
Fenelzina	2-feniletildrazina
t-NB	tert-nitrosobutano
POBN	α -(4-piridil-1-xido)N-tert-butilnitrona
TBE	Tris-HCl 90mM, ácido bórico 113mM e EDTA 2,5mM, pH8,0
TEMPOL	4-hidroxi-2,2,6,6-tetrametilpiperidilxido
Tris	tris(hidroximetil)aminometano
DNA	cido desoxirribonuclico
A	adenina
C	citossina
G	guanina
T	timidina
G•	guanina em sua forma radicalar
A•	adenina em sua forma radicalar
C•	citossina em sua forma radicalar
T•	timidina em sua forma radicalar
MG•	9-metilguanina em sua forma radicalar
MA•	9-metiladenina em sua forma radicalar
EF•	radical 2-feniletila
B•	base em sua forma radicalar
R•	radical
X•	nucleófilo em sua forma radicalar

E. coli	Escherichia coli
GSH	glutathiona reduzida
HRP	horseradish peroxidase
U.V.	ultra violeta
10_2^*	oxigênio singlete
RNA	ácido ribonucléico
Tb(III)	cátion térbio trivalente
HPLC	cromatografia líquida de alta pressão
ácido hidrocínâmico	ácido 3-fenilpropiónico
DAPI	4',6'-diamidino-2-fenilindol
meio LB	10g triptona, 5g levedura, 10g NaCl/l pH 7,4
meio LB-A	contém 50 μ g/mL de ampicilina
boiling	8% sacarose, 0,5% Triton-100 em 50mM EDTA, 10mM Tris-HCl pH 8,0
TE	TRIS-HCl 10mM, EDTA 1,0mM, ph 7,4
Q	densidade eletrônica (análise populacional)
$f_R(R)$	índice de fronteira para a base em sua forma radicalar
$f_R(N)$	índice de fronteira para a base em sua forma neutra
$f_R(E)$	índice de fronteira para a base como eletrófilo
G/A	razão guanina/adenina
ΔH_f	entalpia de formação
ΔH^0	entalpia de reação
MNDO	modified neglect differential overlap
HIND III	enzima de restrição

fago λ	DNA de fago digerido com HIND III fornecendo fragmentos visíveis de pesos moleculares 23; 10; 7,4; 2,2 e 2,0 Kb
UHF	unrestricted Hartree-Fock
MOPAC	molecular package
OD	densidade ótica
λ_{exc}	comprimento de onda de excitação
λ_{irr}	comprimento de onda de irradiação
$\lambda_{máx}$	comprimento de onda máximo de absorção
$\Delta A(260)$	variação da absorbância a 260nm
a^N	constante de desdobramento hiperfino do nitrogênio
a^H	constante de desdobramento hiperfino do hidrogênio

INDICE

CAPITULO I- INTRODUÇÃO

I.I. ACIDOS NUCLEICOS	1
I.I.1 Unidades Nucleotídicas	1
I.I.2 Estrutura do DNA	4
I.II. METABOLISMO DE XENOBIOTICOS	10
I.III. DERIVADOS DE HIDRAZINA:FENELZINA	13
I.IV. RADICAIS LIVRES	17
I.V. FOTOQUIMICA DE ACIDOS CARBOXILICOS	19
I.VI. MODIFICAÇÃO NO DNA INDUZIDA POR AGENTES ALQUILANTES	21
OBJETIVOS	24

CAPITULO II- DESENVOLVIMENTO EXPERIMENTAL

REAGENTES E PROCEDENCIA	26
II.a. Tampões	27
II.b. Horseradish Peroxidase	27
II.c. Acido Desoxirribonuclêico	27
II.d. Filtro para Irradiação	27
II.e. Preparação do DNA para Complexação com térbio-III	28
II.f. Cloreto de Térbio Hexahidratado	29
II.g. Citrato de Sódio/Cloreto de Sódio	29
II.h. Malonaldeído Sódico	29
II.i. Hidrólise Ácida de DNA	29
II.j. Reação de DNA com Formaldeído	30
II.k. Reação de DNA com 4',6'-diamidino-2-fenilindol	30
II.l. Reação de DNA com Acido Hidrocinâmico	31
II.m. Reação de DNA com Fenelzina	31
II.n. Estudos de Ressonância Paramagnética Eletrônica do Acido Hidrocinâmico	32
II.o. Síntese do Peróxido de Dihidrocinamoila	32
II.p. Estudos de Ressonância Paramagnética Eletrônica do Peróxido de Dihidrocinamoila	33
II.q. Obtenção de DNA de Plasmídeo	34
II.q.1. Transferência de bactérias com DNA de plasmídeo carregando marcadores genéticos de resistência à antibióticos	34
II.q.2. Preparação de DNA de plasmídeo	35
II.q.3. Verificação da eficiência da transferência previamente à aplicação em gradiente de CsCl	36
II.q.4. Centrifugação com cloreto de cézio	36
II.r. Eletroforese de DNA de Plasmídeo em Gel de Agarose	37
II.s. Cálculos Teóricos	40

CAPITULO III- RESULTADOS

III.I. Formação de Radicais Livres na Fotoirradiação do Acido Hidrocinâmico e Peróxido de Dihidrocinamoila em Anaerobiose	41
III.II. Estudos com o DNA	44
III.II.1. Reação com formaldeído	44

III.II.2. Complexação e fluorescência do complexo DNA- térbio (III)	49
III.II.3. Complexação e fluorescência do complexo DNA- DAPI	57
III.II.4. Interação do radical 2-feniletila com DNA de plasmídeo	59
III.II.5. Cálculos teóricos efetuados pelo método MNDO	63
III.II.6. Estudos de cromatografia líquida de alta pressão	68

CAPITULO IV- DISCUSSAO

CONCLUSAO E PERSPECTIVAS	86
SUMARIO	88
SUMMARY	90
BIBLIOGRAFIA	92
APENDICE I	98
APENDICE II- O Método do Captador de Spin	100

CAPITULO I

INTRODUÇÃO

I.I. ACIDOS NUCLEICOS

Primeiro para orientação examinemos rapidamente a natureza, a função e a localização intracelular dos ácidos nucléicos. Os DNAs são moléculas extremamente longas, consistindo de muitos milhares de desoxirribonucleotídeos de quatro espécies diferentes, ligados numa sequência característica para cada organismo. (Kilgour, 1981). Eles tem a função de estoque e utilização da hereditariedade genética da célula. Servem também como porção substancial de toda virose, que tem a capacidade de forçar a célula hospedeira a rearranjar seu metabolismo para reproduzir constituintes virais. (Costa, 1987).

Uma célula humana contém, em média, de 2 a 5% de seu peso seco como ácidos nucléicos e nucleotídeos, unidades fundamentais de tais polímeros biológicos. (Kilgour, 1981).

I.I.1 Unidades Nucleotídicas

Os nucleotídeos contém três componentes característicos: (1) uma base nitrogenada, (2) uma pentose e (3) ácido fosfórico, ligados de forma que a base seja covalentemente unida numa ligação N-glicosídica ao átomo de C-1 da pentose e o ácido fosfórico esterificado no C-5', como mostrado na figura 1. (Lehninger, 1982).

As unidades desoxirribonucleotídicas do DNA contém a 2'-desoxi-D-ribose e as unidades ribonucleotídicas do RNA contém a D-ribose. Ambas as pentoses ocorrem nos nucleotídeos nas formas

β -furanosídicas. (Lehninger, 1982).

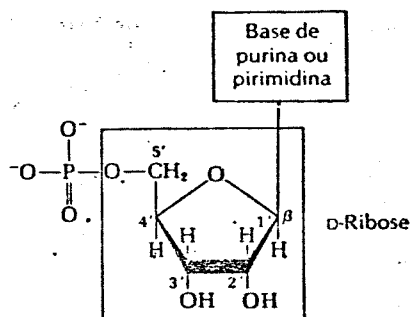


FIGURA 1: Estrutura geral dos nucleotídeos. A estrutura mostrada é a de um ribonucleotídeo. Nos desoxirribonucleotídeos o grupo -OH da posição 2' é substituído por -H

As bases púricas e pirimidicas são moléculas com estrutura aproximadamente planares, relativamente insolúveis na água. (Lehninger, 1982).

Derivadas das Pirimidinas (I). (Figura 2)

(Barker, 1971; Hurst, 1979; White, 1968)

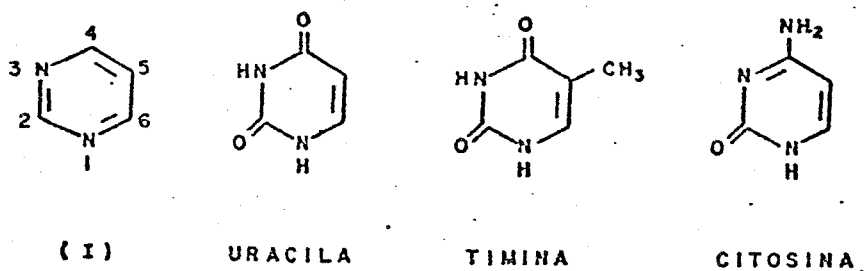


FIGURA 2: Bases pirimidicas

Os átomos de nitrogênio na posição meta produzem uma distribuição eletrônica fortemente deficiente nas posições 2, 4 e 6, sendo suscetível ao ataque nucleofílico. A posição 5, por outro

lado, é relativamente rica em elétrons, estando sujeita a uma substituição eletrofilica principalmente quando grupos elétrondoadores estão presentes em outras posições do anel. (Figura 3). É comum o tautomerismo lactama-lactima nas pirimidinas sendo que a forma lactama prevalece em pH's neutro e ácido. (Figura 4).

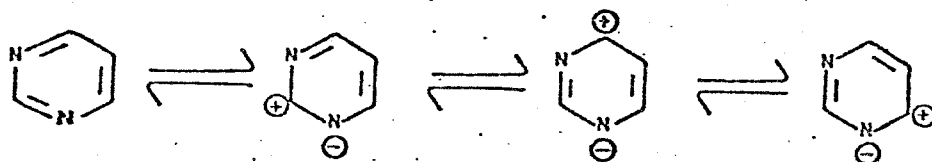


FIGURA 3: Estruturas de ressonância do anel pirimidina

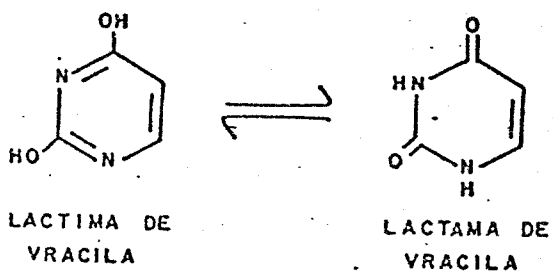


FIGURA 4: Tautômeros de uracila

Derivadas das Purinas (II). (Figura 5)

(Barker, 1971; Hurst, 1979; White, 1968)

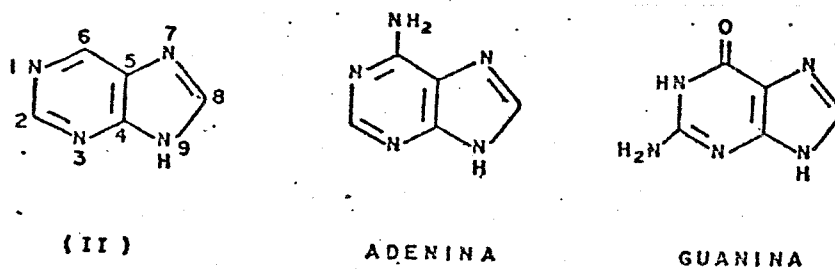


FIGURA 5: Bases purinicas

Os átomos de nitrogênio do anel purínico são elétrôn-retiradores, produzindo uma deficiência de elétrons nas posições 2 e 6 do anel pirimidínico e mais fracamente na posição 8 da porção imidazólica como mostra a figura 6.

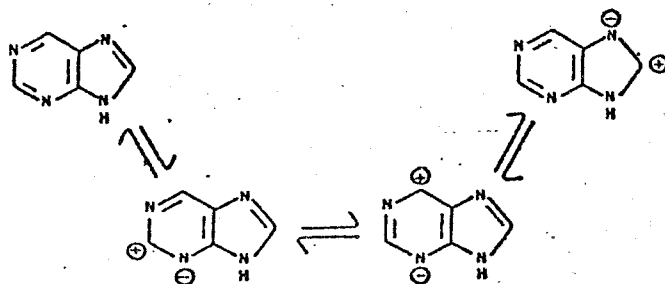


FIGURA 6: Estruturas de ressonância do anel purínico

Como as pirimidinas, as purinas também exibem tautomerismo semelhante. (Figura 7).

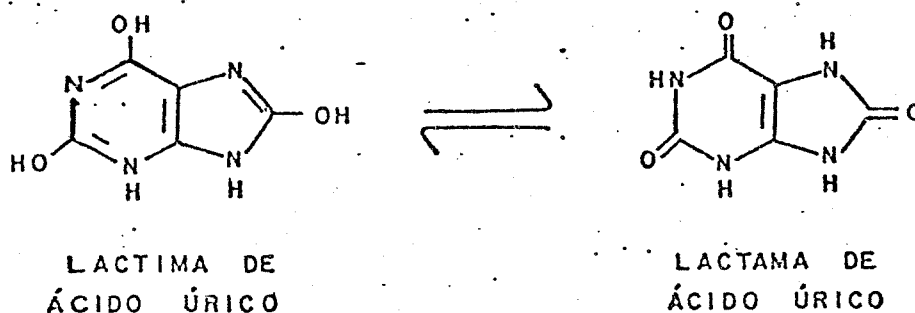


FIGURA 7: Tautômeros de ácido úrico

I.I.2 Estrutura do DNA

(Wang, 1976; White, 1968; Watson e Crick, 1953; Lehninger, 1982; Mahler e Cordes 1971; Chargaff, 1950)

As longas sequências específicas das bases adenina, timina, guanina e citosina no DNA codificam a informação genética e

compreendem a estrutura primária. Elas estão unidas entre si por ligações fosfodiéster que ocorrem no núcleo com a participação da DNA-polimerase. Observa-se na figura 8 um seguimento da cadeia do DNA, representado por dois nucleotídeos.

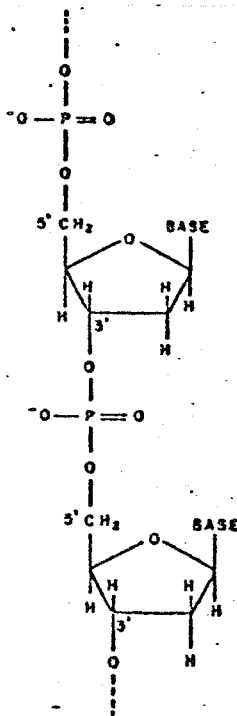


FIGURA 8: Segmento de uma fita simples de DNA, formado por dois nucleotídeos

Em adição aos nucleotídeos contendo as quatro bases principais o DNA também contém algumas bases secundárias, usualmente formas metiladas, hidroximetiladas ou glicosiladas das bases principais.

Tais bases alteradas são, em muitos casos, sinais específicos que desempenham papéis importantes na programação ou, na proteção da informação genética.

Uma vez aceito o fato de que os elementos herdáveis eram compostos de DNA, poder-se-ia esperar que grandes esforços seriam desenvolvidos para esclarecer melhor a estrutura do DNA e o seu papel como molécula informacional. Do ponto de vista científico, este é um exemplo marcante da importância do trabalho cooperativo e de interação entre áreas afins.

Para elucidar a estrutura tridimensional do DNA, foram de fundamental importância as descobertas de Chargaff e colaboradores (1950), Wyatt e de Mirsky (1950). Analisando cuidadosamente a composição química do DNA de diversos organismos, concluíram que a soma das purinas é igual à soma das pirimidinas, ou seja, a soma das amino bases adenina e citosina é igual à soma das ceto bases guanina e timidina. As duas cadeias são de polaridades opostas no sentido de que as ligações internucleotídicas em uma fita seguem a ordem C-3' → C-5', enquanto que na outra fita elas seguem a ordem oposta.

De posse de todos os dados físico-químicos e de uma excelente capacidade de dedução, Watson e Crick em 1953 elucidaram a estrutura tridimensional da molécula de DNA, a qual consiste de uma fita dupla arranjada na forma de uma hélice cilíndrica em sentido dextrógiro, com as duas cadeias polinucleotídicas em torno do mesmo eixo e mantidas unidas por ligações hidrogênio entre elas. (Figura 9).

Por razões estéricas e frente à necessidade de formação de pontes de hidrogênio o único arranjo possível seria:

A ↔ T; C ↔ G, o que é compatível com os dados de Chargaff para as proporções de bases encontradas no DNA. (Figura 10).

Uma vez sendo a molécula de DNA solúvel em água e os grupos fosfato-pentose apresentando características hidrofílicas, inclusive pela carga residual negativa em pH fisiológico, dever-se-ia supor que o esqueleto açúcar-fosfato estivesse na região exterior da molécula, em contato com a água. Consequentemente as bases nitrogenadas, de natureza hidrofóbica, ficariam voltadas para o interior da molécula, perpendiculares ao eixo, criando oportunidade para se estabelecerem pontes de hidrogênio entre as bases de uma fita e outra.

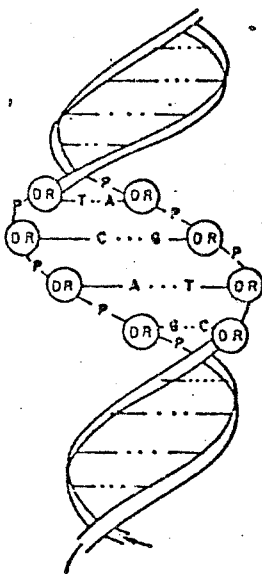


FIGURA 9: Estrutura secundária do DNA proposta por Watson e Crick em 1953

A idéia original de que as ligações hidrogênio eram as únicas responsáveis pela estabilidade da hélice, tem cedido lugar ao argumento de que a grande estabilidade da hélice do DNA é mantida por forças resultantes do empilhamento das bases, ou seja, ligações apolares entre elas, enquanto que as ligações

hidrogênio confeririam especificidade no mecanismo de pareamento das mesmas. Embora esta grande estabilidade da molécula de DNA lhe confira o papel de portador da informação genética, está claro que a dupla hélice não é uma estrutura fixa e rígida, ao contrário é dinâmica, podendo sofrer deformações internas de uma maneira contínua. Em razão disso formas distintas da molécula são conhecidas, diferindo em essência na disposição e inclinação dos pares de base, em relação ao eixo da dupla hélice, no número de pares de base por volta (período) e no diâmetro ao longo da molécula global.

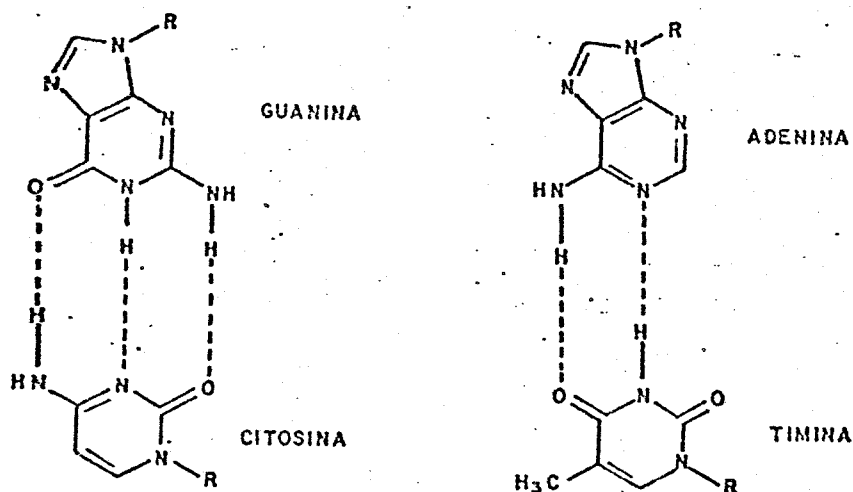


FIGURA 10: Pareamento das bases no DNA, através de pontes de hidrogênio

As mais importantes são as formas A, B e Z. Vê-se que há distorções em relação ao modelo convencional de Watson e Crick. A forma B corresponde ao modelo de Watson e Crick para o DNA cromossomal. A hélice é rodada para a direita com 10 resíduos de pares de base por volta, sendo o plano das bases perpendicular ao eixo principal. A forma A difere em 11 pares de bases por período

e o plano das bases é levemente deslocado 20° da perpendicular ao eixo. É comum em híbridos de DNA-RNA e em RNA dupla-fita. Já na forma Z a hélice é rodada para a esquerda com 12 pares de base por período. Encontra-se em regiões específicas do DNA e tem um possível papel na regulação da expressão gênica.

Em razão do seu grande tamanho e às deformações provocadas pelo seu manuseio o DNA de muitas fontes não pode ser isolado tal como se encontra. Entretanto estudos com DNAs de alguns vírus, do mitocôndria e dos cloroplastos mostraram que a estrutura secundária pode ser compactada em alguns casos, dando origem à estruturas terciárias de diferentes tipos.

DNAs de fita simples lineares ou circulares, podem ser obtidos de vírus ou da denaturação de DNAs de fita dupla. Outros vírus ou DNAs cíclicos de fita dupla, abertas durante o isolamento, dão origem a DNAs lineares de fita dupla, enquanto que os DNAs cíclicos de fita dupla são obtidos de mitocôndrias, de cloroplastos, de plasmídeos e também de certos vírus.

A figura 11 ilustra algumas estruturas terciárias.

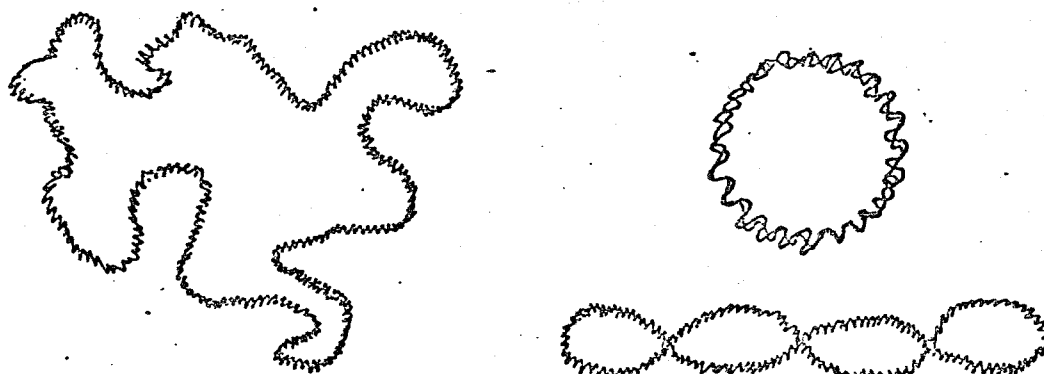


FIGURA 11: Estruturas terciárias de DNA

Assim, introduziu-se o conceito de enovelamento onde o DNA pode interagir com proteínas formando estruturas nucleoprotêicas de maior grau de complexidade. Estas novas informações nos fazem acreditar que a molécula de DNA em si, pela sua dinâmica, tem um papel ativo na modificação da expressão de seus genes. (Davidson, 1972).

I.II. METABOLISMO DE XENOBIOTICOS

O termo xenobiótico é definido como qualquer substância que seja exógena ao metabolismo normal do organismo.

É evidente que o sistema atual de metabolismo de drogas descende do metabolismo de xenobióticos naturais, como mecanismo de defesa de herbívoros em resposta aos metabólitos secundários produzidos pelas plantas (por exemplo, alcalóides, terpenóides, fenóis, quinonas etc). (Boxembaun, 1983). Os indivíduos da sociedade atual, assim como outros animais estão constantemente expostos a compostos químicos naturais ou sintéticos, como aditivos alimentares, poluentes e medicamentos. A eliminação sem alteração bioquímica destas substâncias se dá através das fezes, urina, bile, expiração ao ar e perspiração, dependendo da solubilidade em água. Compostos lipofílicos presentes nestes fluidos dos excretórios tendem a difundir nas membranas celulares (principalmente pele, pulmão e trato gastrointestinal) e serem reabsorvidos, sendo convertidos em metabólitos mais hidrofílicos. (Cassarett e Doull, 1986). Assim torna-se óbvia a importância das biotransformações na manutenção do equilíbrio móvel da vida.

No campo da farmacologia, o efeito terapêutico de uma droga, dependerá entre outras coisas, da sua concentração no sítio de ação e na maioria dos casos são os metabólitos que constituem as espécies ativas terapêuticamente. Dentro deste contexto, para se tornar estes compostos químicos mais eficientes e específicos em suas ações, é importante se estabelecer as bases moleculares de suas interações com o sistema biológico.

Existem vias metabólicas que têm a função de detoxicação para o organismo, isto é, excreção dos compostos inúteis ou tóxicos. Os mecanismos de detoxicação geralmente compreendem duas fases. Na fase I, as enzimas do metabolismo oxidativo irão catalisar a adição ou exposição de grupos funcionais da molécula, através de oxidações, reduções ou hidrólises, facilitando assim sua excreção direta, ou permitindo as reações da fase II. O sistema microsomal atua nesta fase principalmente através do sistema do citocromo P₄₅₀ ou do sistema amino oxidase de função mista. Já grupos funcionais pré-existentes são expostos por enzimas hidrolíticas, esterases e amidases. (Cassarett e Doull, 1986; Hodgson e Guthrie, 1980).

Na fase II as transferases irão catalisar ligação covalente destes intermediários à aceptores endógenos, tornando-os mais energéticos, com a participação do ATP. São eles: ácido UDP- α -D-glucurônico, glutationa, adenosina-3',-fosfato-5',-fosfossulfato e acetilcoenzima A. (Cassarett e Doull, 1986).

Os produtos da fase II são mais solúveis em água, permitindo significativa ionização no pH fisiológico. Estes conjugados sofrem secreção ou transferência através das membranas hepática, renal e

intestinal. Neste caso os mecanismos de transporte reconhecem o resíduo conjugado. (Cassarett e Doull, 1986).

Embora estes processos sejam normais à defesa do organismo é certo que muitos efeitos tóxicos de certos compostos resultam da ativação metabólica de grupamentos inócuos à intermediários extremamente reativos, sendo responsáveis não só pelo seu efeito terapêutico, como também pelo seu efeito tóxico. (Miller, 1970). Assim fica clara a estreita relação que existe entre os processos de detoxicação e toxicação e a necessidade da compreensão ao nível molecular, dentre eles, dos mecanismos celulares da carcinogênese química.

Dada a grande diversidade de compostos carcinogênicos disponíveis não se pode definir um único mecanismo de ação, mas há alguns processos que são considerados comuns, como por exemplo:

(1) os processos de detoxicação podem levar à metabólitos tóxicos "in vivo".

(2) as formas obtidas nestas biotransformações podem se ligar covalentemente a grupos nucleofílicos presentes em biomoléculas como proteínas e DNA.

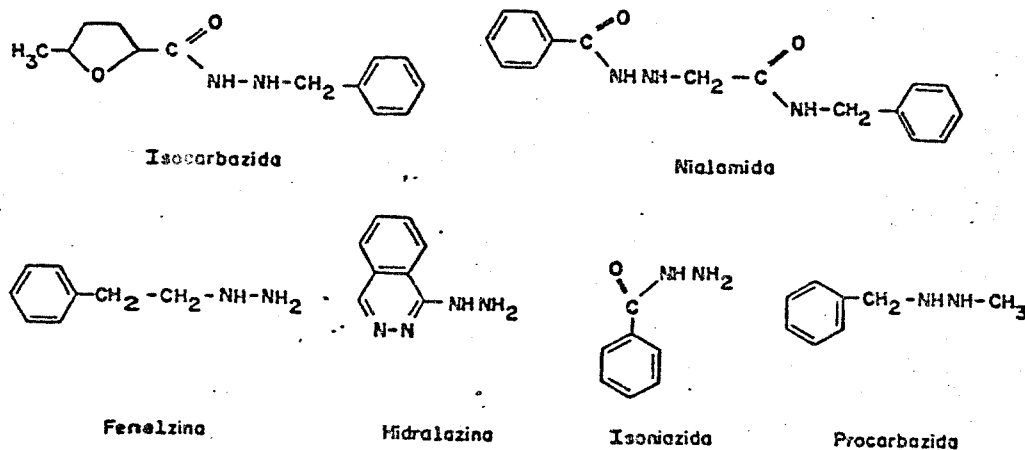
(3) a extensão de ligação a proteínas é quantitativamente maior que à ácidos nucleicos, sendo que os grupos mais suscetíveis são o enxofre da metionina e cisteína, o nitrogênio-1 da histidina e o carbono-3 da tirosina.

(4) tanto o RNA quanto o DNA podem ser alquilados, sendo a guanina a base preferencialmente atacada. Além da alquilação, existem evidências de ocorrência de quebra de fita no DNA e formação de ligações cruzadas. (Crooke e Prestayko, 1980; Cassarett e Doull, 1986).

I.III. DERIVADOS DE HIDRAZINA: FENELZINA

Derivados de hidrazina compreendem uma classe química particularmente importante visto a frequente ocorrência naturalmente, além do seu uso como combustíveis de foguetes, antioxidantes, herbicidas e remédios. (Juchau e Horita, 1972).

Muitas das drogas atualmente em uso devem sua atividade farmacológica à presença do grupo hidrazinico nas suas estruturas. Algumas mais comuns são: o agente antihipertensivo, hidralazina; o agente antituberculose, isoniazida; o agente anticâncer, procarbazida e antidepressivos, inibidores de monoamino oxidase, isocarbazida, nialamida e fenelzina. (Esquema 1). (Goodman e Gilman, 1975).



ESQUEMA 1: Derivados de hidrazina com atividade farmacológica

Todavia a aplicação de derivados de hidrazina fica comprometida pelo fato de serem metabolicamente ativados a espécies que promovem uma série de efeitos tóxicos. Alguns efeitos tóxicos associados à administração de derivados de hidrazina com componentes celulares são a indução de metemoglobina, inibição de síntese de proteínas e ácidos nucleicos, alquilação de macromoléculas, alteração da atividade de ornitina descarboxilase, acúmulo de lipídeos no fígado, teratogênese e inibição de espermatogênese e mutagênese. A longo prazo seus efeitos resultam na necrose hepática e carcinogênese. (Moloney e Prough, 1983).

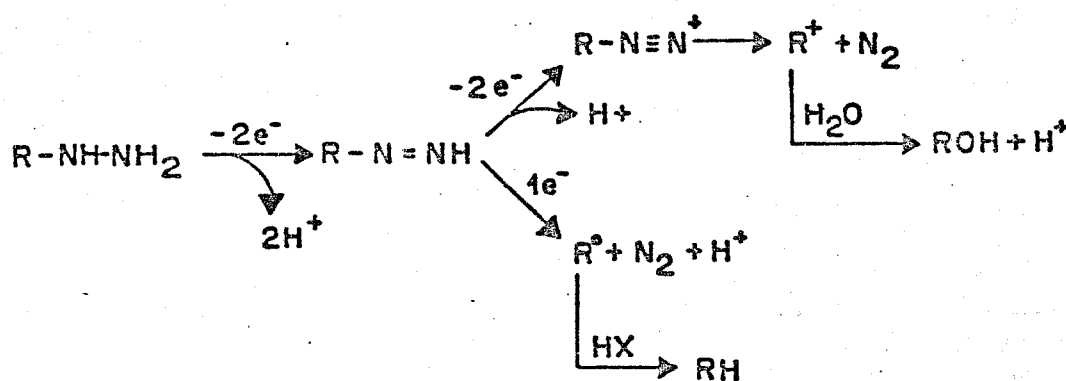
A fenelzina é um inibidor de monoamino oxidase, utilizada em casos de estados depressivos moderados e agudos em adultos, ou em certos estados de ansiedade fóbica. Ela atua por inibição da degradação de aminas biogênicas como serotonina, adrenalina, noradrenalina, dopamina etc., levando a um aumento de seus níveis no cérebro, provocando alteração no humor. Ela é administrada na forma de sal de sulfato, em doses diárias de 30-40mg na primeira semana e ajustada a 15-75mg depois das duas primeiras semanas. (Goodman e Gilman, 1975).

Apesar de terem sido registradas propriedades carcinogênicas em animais experimentais, não sendo caracterizado em humanos, a fenelzina continua sendo usada terapeuticamente. (Toth, 1976).

As hidrazinas tem a fórmula $\text{NH}_2\text{-NH}_2$ e os derivados de hidrazina são compostos em que um ou mais hidrogênios estão substituídos por grupamentos alquila, arila ou acila. As

alquilidrazinas tri e tetra substituídas são praticamente não básicas e as mono e di-alquilidrazinas formam sais com um equivalente de ácido. (Krueger, 1975). Embora suas propriedades eletroquímicas lhes permitam funcionar como oxidantes, são as redutoras as mais pronunciadas, havendo quebra da ligação N-N. (Moloney e Prough, 1983).

As reações de oxidação são mais complexas envolvendo 1 ou 2 elétrons. As hidrazinas tri e tetra substituídas sofrem oxidação por 1 elétron formando cátions radiculares estáveis. Hidrazinas 1,2 substituídas formam o derivado intermediário azo pela oxidação por 2 elétrons. Já a oxidação por 2 elétrons de hidrazinas monossustituídas leva à formação do diazeno, podendo sofrer novo processo oxidativo via 1 ou 2 elétrons. Nesta etapa são formados intermediários radiculares e/ou catiónicos (Esquema 2), os quais têm sido considerados como possíveis agentes alquilantes de biomoléculas. (Moloney e Prough, 1983).



ESQUEMA 2: Reações propostas para a oxidação de derivados de hidrazina monossustituídos

A fenelzina compartilha as propriedades químicas dos derivados de hidrazina monossustituídos. Apresenta um certo caráter básico, intermediário entre monoalquilidrazinas e monoarilidrazinas, com $pK_a = 6,75$. (Krueger, 1975). A fenelzina pode ser oxidada facilmente quimicamente e tem caráter nucleofílico, podendo reagir com grupos carboxílicos com formação de hidrazonas. (Moloney et. al., 1985). As suas propriedades químicas, principalmente seu caráter nucleofílico e redutor, parecem ser os principais fatores de sua reatividade bioquímica.

Os efeitos tóxicos dos derivados de hidrazina estão, na maioria das vezes, relacionados com a reatividade do grupo hidrazínico. Dada sua nucleofilicidade e a presença de grupos carbonílicos em biomoléculas geralmente ocorrem condensações formando hidrazonas derivadas, contendo grupos $-C=N-$. Este tipo de reação é importante quando se considera a possibilidade de conjugação com acetil coenzima A, piridoxal-fosfato, piruvato, α -cetogluturato e outros compostos. No caso da fenelzina, sua administração tem sido responsabilizada pela indução de convulsões devido sua associação com piridoxal (no caso, alteração do metabolismo de γ -amino-butirato ou serotonina). (Moloney e Prough, 1983).

Outros efeitos tóxicos têm sido observados para derivados de hidrazina como por exemplo: pelagra (deficiência de niacina, inibição da quinureninase), neurites periférica, degradação sensorial e de nervos motores, sintomas de intoxicação com histamina (inibição de histaminase), hiperamonemia (substituição de amônia no sistema glutamina sintetase) e diminuição nos níveis

de glutathione, um importante elemento de defesa nos processos de detoxicação em muitos organismos. (Moloney e Prough, 1983).

Contudo os derivados de hidrazina são rapidamente metabolizados no organismo, e seu metabolismo oxidativo leva à formação de intermediários reativos capazes de alterar componentes celulares essenciais ao funcionamento normal do organismo.

I. IV. RADICAIS LIVRES

Autoxidação, processos bioquímicos e muitos outros agentes e processos são conhecidos por gerar radicais livres. Uma grande variedade de radicais podem ser gerados em biosistemas devido sua complexa composição.

A contribuição de espécies de radicais livres no metabolismo e ação citotóxica de muitos xenobióticos tem sido sugerida desde 1940.

A participação de radicais livres em carcinogênese, mutação e transformação tem sido proposta por muitos pesquisadores, principalmente nos últimos dez anos e surgiram de estudos de inibição de tumores por antioxidantes, na maioria naturais como vitamina E (α -tocoferol), vitamina C (ácido ascórbico), β -caroteno, ácido úrico, GSH (glutathione reduzida). Estes antioxidantes localizados normalmente na fração citosólica ou fluidos extracelulares bem como aqueles localizados na membrana lipídica, agem como anticarcinogênicos em potencial, por interromperem o processo radicalar responsável pela

carcinogênese. Desde muito sabe-se que câncer aparece não como um passo simples, mas como uma sequência de eventos os quais progridem propícios à condição maligna; e estudos nos conceitos de promoção têm provido considerável discernimento do processo carcinogênico. Entretanto não há evidência definitiva de que o envolvimento de radicais nestes processos seja obrigatória. (Simic, 1988).

O envolvimento de radicais livres em processos carcinogênicos tem sido mais explorado no caso de oxiradicais, o que advém de sua abundância natural e papel central na vida dos organismos aeróbicos. O grande progresso obtido nos últimos 15 anos nesta área foram impulsionados após um trabalho pioneiro que estabeleceu a função e importância da enzima superóxido dismutase.

Investigações sistemáticas de McCord e Fridovich e muitos outros têm contribuído enormemente no estabelecimento do papel de radicais de oxigênio na expressão dos efeitos fisiológicos de vários xenobióticos. (Augusto, 1989).

Já o estudo de radicais não centrados no oxigênio é bem menos conhecida. Estudos de Mason e colaboradores (1984) forneceram as bases para a compreensão do papel biológico de cátions e ânions radicalares de compostos aromáticos que podem ser estudados diretamente por espectroscopia de ressonância paramagnética (EPR).

Radicais intermediários derivados de xenobióticos são muitas vezes espécies transientes e usualmente não apresentam concentrações no estado fundamental maiores que o limite de

detecção do espectrômetro de EPR. Em contraste com espécies ativas de oxigênio, não existe um mecanismo de defesa enzimático documentado para estes radicais e conseqüentemente progressos nesta área dependem de novos métodos experimentais. Um método adequado, a técnica de captação de spin, foi introduzida por volta de 1968-1969 e aplicada a sistemas biológicos com sucesso aproximadamente 10 anos depois. Esta técnica contribuiu grandemente ao estabelecimento de novos conceitos na compreensão da ação de radicais livres em processos bioquímicos e biológicos. De fato a técnica de captação de spin tem sido essencial para progressos no esclarecimento da natureza dos intermediários reativos formados na ativação metabólica de derivados de hidrazina. Tem-se proposto formação de carbocátions ou radicais livres, sendo este ainda um assunto controverso. (Augusto, 1989).

I.V. FOTOQUIMICA DE ACIDOS CARBOXILICOS

Vários estudos na literatura descrevem o papel de radicais livres de carbono nas propriedades genotóxicas dos derivados de hidrazina. Muitos destes derivados foram testados quanto à sua potência de indução de quebras de fita em DNA, podendo até estabelecer uma correlação entre a potência carcinogênica e a indução de quebras no DNA. (Parodi et. al., 1981).

Leite e Augusto (1989) investigaram a formação do radical 2-feniletila através da oxidação da fenelzina e alguns aspectos relacionados à interação com o DNA. Dada a importância em se conhecer o mecanismo dessa interação para se estabelecer pontes

com a carcinogenicidade propusemo-nos, portanto, a abordar este problema estudando a interação do radical 2-feniletila gerado no metabolismo da fenelzina, bem como sua formação fotoquimicamente a partir do ácido 3-fenilpropiónico (ácido hidrocínâmico) com o DNA.

Um dos radicais mais estudados na literatura é sem dúvida o radical benzila, produzido principalmente através da fotodescarboxilação do ácido fenilacético. (Epling e Lopes, 1970).

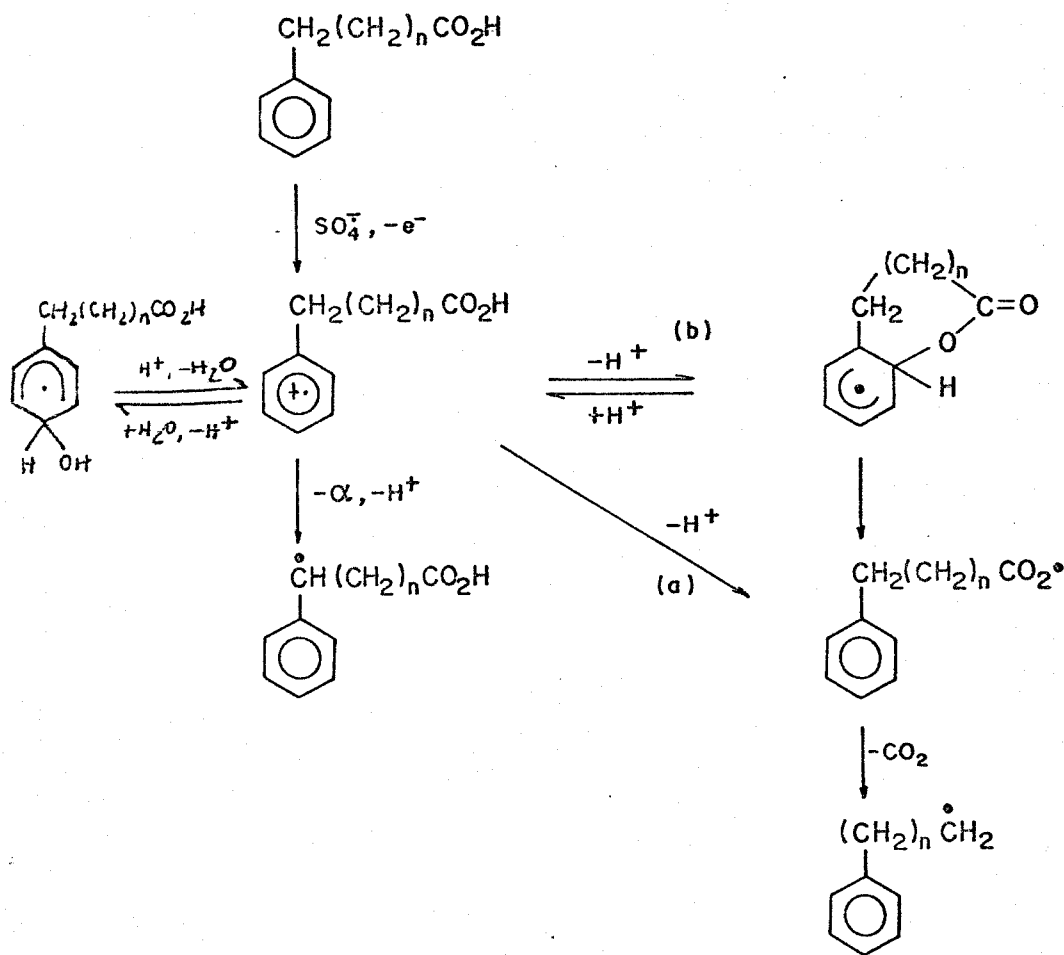
A fotodescarboxilação do ácido hidrocínâmico, um homólogo do ácido fenilacético, foi simultaneamente estudada no início de 1973, através da irradiação com luz ultravioleta. (Mittal et. al., 1973; Van Beek et. al., 1973).

A formação do radical 2-feniletila está bem documentada no trabalho de Mittal e colaboradores (1973) através da fotólise do íon 3-fenilpropionato.

Intermediários radicalares também foram propostos em processos de descarboxilação fotolítica de ácidos acéticos -substituídos mediados por flavinas (Novak et. al., 1980) e ainda em processos fotossensibilizados por radicais hidroxila. (Davies et. al., 1984).

Mais recentemente Gilbert e colaboradores (1987) demonstraram que uma série de radicais cátions são gerados *in situ* nas reações de metilbenzeno, ácido feniletanóico, ácido 3-fenilpropiónico e alguns derivados e análogos cíclicos na presença de SO_4^- e $\cdot\text{OH}$. Os resultados são interpretados em termos de uma variedade de reações rápidas, onde para uma série de

radicais zwitteriônicos $^{\bullet}\text{Ar}(\text{CH}_2)_n\text{CO}_2^-$ ($n=1-3$) a descarboxilação ocorre via transferência de elétrons intramolecular, embora em alguns casos a hipótese de um intermediário não possa ser descartada. (Gilbert et. al., 1987). (Esquema 3).



ESQUEMA 3: Reações propostas para a oxidação de ácidos carboxílicos fenil substituídos por $^{\bullet}\text{OH}$ e $\text{SO}_4^{\bullet-}$. (a) via transferência de elétrons direta, (b) via intermediário σ^{\bullet}

I.VI. MODIFICAÇÃO NO DNA INDUZIDA POR AGENTES ALQUILANTES

Há muito se conhece que câncer pode derivar da exposição a uma variedade de agentes, e estudos mecanísticos têm revelado que compostos químicos puros podem, eles próprios, induzir câncer. A prevenção depende da extensão das possibilidades de eliminação da exposição endógena e ambiental aos agentes carcinogênicos. (Saffhil et. al., 1985).

Agentes alquilantes são hábeis a reagir em muitos sítios do DNA, em particular, no nitrogênio e carbono do anel e átomos de oxigênio exocíclicos das bases do DNA. Tem-se dado mais atenção às reações que ocorrem nas posições 7 e 8 da guanina, as quais são os principais sítios de reação para agentes metilantes e etilantes. (Saffhil et. al., 1985). Castro (1984) tem dedicado uma série de artigos relacionados à produção de um derivado da guanina e adenina durante ativação metabólica de CCl_4 , onde radicais $\cdot CCl_3$ são produzidos.

Duker e colaboradores (1985) também propõem como produtos principais derivados guanínicos e adenínicos fotoalquilados na posição 8 quando DNA FM2 superenrolado é submetido à fotoreação com isopropanol.

Muitas das observações feitas primariamente relacionadas à alquilação de DNA "in vitro" foram também aplicadas à processos "in vivo". E através de muitas dessas descobertas que hoje podemos explicar as propriedades mutagênicas e carcinogênicas dos agentes alquilantes em termos de suas reações com o DNA, levando à modificações na estrutura proposta por Watson e Crick. Também são estudos desse tipo que nos levam a uma maior compreensão dos processos de reparo mediados por proteínas, bem como de remoção

espontânea. O uso de sistemas modelo são de utilidade para adquirir informações as quais poderão ser aplicadas ao estudo de carcinogênese no homem. (Saffhil et. al., 1985).

OBJETIVOS

Como foi verificado, o DNA desempenha uma função biológica muito importante, seja na preservação das espécies através da replicação, ou na síntese de proteínas que são vitais aos organismos vivos.

A partir de 1981, principalmente devido à aplicação do método do captador de spin em sistemas biológicos, estudos demonstraram a formação de radicais de carbono durante o metabolismo oxidativo de várias drogas, dentre elas derivados de hidrazina monossustituídos. (Kalyanaramann e Sivarajahk, 1984). Alguns efeitos biológicos como hemólise e destruição do grupo heme de proteínas foram relacionados à formação de tais espécies. (Augusto et. al., 1982; Leite e Augusto, 1989; Hill e Thornalley, 1983).

O papel de radicais livres centrados no carbono nas propriedades genotóxicas de hidrazinas não fora considerado até recentemente e ainda é pouco conhecido os seus efeitos sobre os ácidos nucleicos. (Parodi et. al., 1981; Leite e Augusto, 1989).

Sabe-se, no entanto, que alguns sistemas em estudo têm apresentado alterações em DNA. A fenelzina, droga amplamente administrada no tratamento de alterações do humor, foi ensaiada como geradora de radicais de carbono, principalmente no metabolismo oxidativo de microsossomos de fígado de rato e oxihemoglobina. (Ortiz de Montellano et. al., 1983; Leite e Augusto, 1989).

Dentre muitos estudos que foram feitos com sistemas geradores de radicais de carbono, ainda é pouco conhecido os aspectos mecanísticos da interação com os ácidos nucleicos.

Propusemo-nos, portanto, a abordar esse problema estudando a interação do radical 2-feniletila, gerado no metabolismo da fenelzina e na irradiação do ácido hidrocínâmico, com o DNA.

Primeiro procuramos estabelecer a importância do radical 2-feniletila como produto da fotoirradiação do ácido hidrocínâmico. A geração do radical fotoquimicamente foi escolhida não só para evitar as complexidades do sistema químico de oxidação da fenelzina por ferricianeto, como também verificar a aplicação de sistemas miméticos de oxidações biológicas complexas. Para os estudos de geração do radical 2-feniletila foi também necessário sintetizar o peróxido de dihidrocinaoila, fotoquimicamente proposto como gerador de tais radicais.

Investigamos a possibilidade do radical 2-feniletila interagir com o DNA com o auxílio de métodos espectroscópicos (fluorescência, HPLC) e reações químicas, postulando alterações estruturais induzidas no DNA.

Discutimos ainda alguns aspectos mecanísticos desta interação esclarecendo alguns pontos obscuros da importância do estudo de radicais livres de carbono quanto a sua potência carcinogênica.

CAPITULO II

DESENVOLVIMENTO EXPERIMENTAL

REAGENTES E PROCEDENCIA

Os seguintes reagentes foram adquiridos da Aldrich Chemical Co.: PQBN, Tempol, DAPI, cloreto de hidrocinaoila e ácido hidrocinaâmico. DNA de timo de bezerro (tipo I), DETAPAC, 2-feniletildrazina- H_2SO_4 e horseradish peroxidase (tipo VI) foram adquiridos da Sigma Chemical Co.. Formaldeido e cloreto de térbio hexahidratado foram obtidos da Fisher Scientific Co. e Alfa Products respectivamente.

O plasmideo pBR 322 e culturas de *E. coli* HB 101 foram gentilmente cedidos pela Profa. Dra. Adelaide Faljoni-Alário (IQ-USP).

A solução de DAPI foi preparada em água bidestilada e sua concentração dosada pela absorvância a 224nm ($\epsilon=23500 M^{-1}cm^{-1}$).

Em todos os experimentos foi utilizada água bidestilada e/ou deionizada. Os demais reagentes utilizados foram da mais alta pureza encontrada.

II.a. Os tampões foram preparados segundo o método de Gomori (1975).

II.b. Horseradish peroxidase (HRP) (PM. 40000; $\epsilon = 102000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ a 403 nm).

Foi preparada uma solução estoque de 0,2mM, dissolvendo-se cuidadosamente 8,0mg em 1,0mL de água deionizada.

II.c. Acido Desoxirribonucléico (DNA) ($\epsilon = 6700 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ a 260nm).

Preparou-se soluções que variavam de 1,0 a 5,0mg/mL em água deionizada e protegida da luz, na geladeira. Tomou-se uma alíquota de volume conhecido, diluiu-se em 2,0ml de água deionizada e leu-se a absorbância (DO) em 260nm. (Ames e Dubin, 1970). Sabe-se que 1 DO corresponde a uma concentração de 45 $\mu\text{g/mL}$, portanto calculou-se a concentração de DNA do seguinte modo:

$$\begin{array}{l} 1\text{DO} \text{-----} 45 \mu\text{g/mL} \\ A(260\text{nm}) \text{-----} z \mu\text{g/mL} \end{array}$$

Tendo-se o valor de z, calculou-se o valor real da concentração de DNA em $\mu\text{g/mL}$.

II.d. Filtro para irradiação.

Usou-se uma mistura de 2,5mL da solução A e 1,0mL da solução B para permitir a incidência de irradiação de comprimento de onda somente na faixa de 265-375nm. (Kopecký e Liska, 1978).

Solução A: 350g $\text{NiSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 100g $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ em 1,0l de água destilada.

Solução B: 15g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ em 1,0l de água destilada.

II.e. Preparação do DNA para complexação com térbio(III).

Os DNAs tratados nos sistemas de reação foram dialisados por 72h usando-se o tampão da reação. Coleta-se esta solução aquosa e adiciona-se NaCl 0,1M final, para tornar o meio isotônico. Posteriormente, agrega-se 3 volumes de etanol absoluto para precipitação do DNA (Kelmers et. al., 1971), seguida de centrifugação à 4°C e 10000rpm por 10 minutos. O sobrenadante é então desprezado e o DNA seco em uma corrente leve de nitrogênio. O DNA é ressuspenso em 3,0mL de tampão cacodilato de sódio 20mM (pH=6,0) e 10mM em KCl, sendo sua concentração verificada pela absorção em 260nm. Uma vez conhecida a concentração de DNA, acrescenta-se um volume conhecido de cloreto de térbio tal que a razão da concentração molar de DNA por concentração de térbio seja aproximadamente 6. Segundo Ringer e colaboradores (1980), esta é uma condição necessária para se obter uma maior intensidade de fluorescência do complexo DNA-Tb(III).

Os estudos de fluorescência foram desenvolvidos em um espectrofluorímetro da Perkin-Elmer (MPF-44B). O λ_{exc} foi de 290nm.

II.f. Cloreto de térbio hexahidratado (PM. 453,15).

A solução estoque foi de 0,1M, sendo preparada pela dissolução de 45,32mg em 1,0mL de tampão cacodilato de sódio 20mM (pH=6,0) e 10mM em KCl. Segundo Prados e colaboradores (1974) isto previne a formação de hidróxidos.

II.g. Citrato de sódio/Cloreto de sódio (PM. 294,12/PM. 58,45).

Preparou-se uma solução estoque de 25mL, contendo citrato de sódio 10mM (73,50mg/25mL H₂O) e cloreto de sódio 30mM (43,80mg/25mL H₂O). Esta solução forneceu um pH de 8,3.

II.h. Malonaldeído sódico (PM. 94).

Foi preparado segundo o método modificado descrito por Innocentini-Mei (1986).

II.i. Hidrólise ácida de DNA.

A obtenção dos DNAs pré-tratados foi feita segundo o procedimento discutido no item II.e. Neste caso, as amostras de DNA foram ressuspensas em 2,0mL de água deionizada e suas concentrações foram medidas em 260nm como estabelecido no item II.c. Uma vez igualada as concentrações das amostras, adicionou-se ácido clorídrico concentrado para se obter soluções de aproximadamente 1,0N. A seguir, colocou-se as mesmas em tubos de

ensaio, os quais foram selados e submetidos a um banho de água em ebulição por 45min. Depois de atingir a temperatura ambiente, os tubos foram abertos e as amostras foram elevadas a pH 7,0 com NaOH 1,0N. Seguiu-se a análise por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC), num HPLC da Varian 8000. A temperatura da coluna foi de 28°C e um detector U.V. a 280nm foi utilizado. Os picos foram identificados por comparação com amostras autênticas de guanina, adenina, timidina e citosina. As razões G/A foram calculadas segundo as áreas dos picos correspondentes.

II.j. Reação de DNA com formaldeído.

Após tratar e isolar os DNAs, ressuspendeu-se os mesmos em 2,0ml de uma solução citrato de sódio/cloreto de sódio (item II.g). Depois de ter acertado as concentrações das amostras pelo valor de suas absorções a 260nm e ter adicionado formaldeído a 30%, colocou-se as mesmas em um banho a 60°C. A seguir, leu-se a variação de absorbância à 260nm, para cada amostra, em intervalos de tempo regulares e construiu-se um gráfico de variação de absorbância (ΔA) (a 260nm) x tempo (minutos). (pg 45-47). (Schothorst et. al., 1983).

II.k. Reação de DNA com 4',6'-diamidino-2-fenilindol (DAPI).

A extração dos DNAs tratados foi feita segundo o item II.e. A seguir ressuspendeu-se os DNAs em água deionizada sendo a concentração verificada pela absorção em 260nm. Uma vez conhecida

a concentração do DNA, acrescentou-se um volume conhecido de solução estoque de DAPI tal que a razão da concentração molar de DNA por DAPI seja aproximadamente 12. Segundo Manzini e colaboradores (1983) nestas condições todo o DAPI se complexa ao DNA, obtendo-se maior intensidade de fluorescência. A complexação é feita em tampão TRIS 50mM e 50mM em NaCl pH 7,4.

Os estudos de fluorescência foram desenvolvidos em um espectrofluorímetro da Perkin-Elmer (MPF-44B). O λ_{exc} foi de 372nm.

II.1. Reação de DNA com ácido hidrocínâmico.

A mistura padrão de reação utilizada para os estudos de interação de radical 2-feniletila com o DNA continha concentrações de DNA que variavam de 0,4mg/mL a 2,0mg/mL e de ácido hidrocínâmico entre 0,55mM e 5,0mM, em tampão cacodilato de sódio 100mM pH 6,8, num volume final de 2,0mL. As soluções foram desaeradas utilizando-se fluxo de nitrogênio por 45min. Procedeu-se a irradiação por tempos variados utilizando-se o filtro descrito no item II.d e lâmpada de vapor de mercúrio Osram ($\lambda_{máx}=254nm$, fluxo=3,1 W/m²).

II.m. Reação de DNA com fenelzina.

A mistura padrão de reação continha 0,1mM DETAPAC, concentrações de fenelzina que variavam até 5,0mM e 2,5 equivalentes de ferricianeto, em tampão TRIS 100mM pH 8,0, num

volume final de 1,0mL. As misturas de reação foram desaeradas por 45min. através de fluxo de nitrogênio e concentrações de DNA variando de 0,4mg/mL a 2,0mg/mL foram adicionadas. Seguiu-se incubação sob agitação a 37°C por 30min. Soluções estoque de fenelzina, neutralizadas com NaOH, foram preparadas imediatamente antes do uso.

II.n. Estudos de Ressonância Paramagnética Eletrônica do ácido hidrocínâmico.

A mistura padrão de reação para acompanhar a formação de radicais livres durante a irradiação do ácido hidrocínâmico utilizando-se filtro (item II.d) (volume final de 100 μ l) continha ácido hidrocínâmico 0,75mM em tampão cacodilato de sódio 100mM, pH 6,8, além do captador de spin α -(4-piridil-1-óxido)N-tert-butilnitrona (POBN) 100mM. A solução estoque de POBN foi preparada em acetonitrila a uma concentração 10 vezes maior. A irradiação foi acompanhada em condições próximas à anaerobiose (item II.1). Aliquotas das misturas de reação contidas em tubos permeáveis a gás, de diâmetro interno 0,80mm com espessura de parede de 0,05mm de Zeus Industrial Products Inc., Raritan, N. J., foram analisadas em espectrômetro de EPR (Bruker ER-2000) à temperatura ambiente.

II.o. Síntese do peróxido de dihidrocínamoila.

Empregou-se o método descrito por Wieland e colaboradores (1934). A 30mL de solução de hidroperóxido 10% com boa refrigeração e agitação constante, foram adicionados gota a gota 19ml de hidróxido de sódio 4,0N e 8,5g de cloreto de hidrocinaoila. Segundo Wieland e colaboradores (1934) se o meio de reação permanecer alcalino o peróxido separa em forma cristalina. Depois de acabada a adição, agitou-se por mais 2-3 minutos, filtrou-se e lavou-se primeiro com solução de soda, depois com água destilada. A cristalização foi feita logo em seguida com pouco álcool, aquecendo-se e colocando-se em banho de água-gelo rapidamente. Obtêve-se placas brilhantes com ponto de fusão entre 37^o-39^oC.

II.p. Estudos de Ressonância Paramagnética Eletrônica do peróxido de dihidrocinaoila.

A mistura de reação continha peróxido de dihidrocinaoila 6,0mM (volume final de 100 μ l) em tampão cacodilato de sódio 100mM pH 6,0, além do captador de spin POBN 100mM. A irradiação foi acompanhada em condições próximas à anaerobiose, borbulhando-se nitrogênio por 45min. e utilizando-se lâmpada de vapor de mercúrio Osram ($\lambda_{m\acute{a}x}$ =254nm, fluxo=3,1 W/m²).

Aliquotas das misturas de reação contidas em tubos permeáveis a gás, de diâmetro interno 0,8mm com espessura de parede de 0,05mm da Zeus Industrial Products Inc., Raritan, N. J., foram analisadas em espectrômetro de EPR (Bruker ER-2000) à temperatura ambiente. A concentração do radical foi calculada

comparando-se a altura do pico central a campo baixo do espectro de EPR da mistura de reação com a altura do pico central de espectros de EPR de soluções de concentração conhecida de TEMPOL. Um fator de 3,7, determinado experimentalmente com solução de concentração conhecida do radical aduto 2-feniletila-POBN purificado foi utilizado para normalizar as diferenças em número e largura das linhas dos espectros de EPR do radical aduto e TEMPOL.

II.q. Obtenção de DNA de plasmídeo

II.q.1. Transformação de bactérias com DNA de plasmídeo carregando marcadores genéticos de resistência à antibióticos.

Inoculou-se 5,0mL de meio LB líquido (pg 36) com uma colônia de bactérias *E. coli* HB101 e incubou-se a 37°C overnight sob forte agitação (250rpm). Diluiu-se a pré-cultura 1/100 em 10mL de meio LB e incubou-se a 37°C, sob agitação até atingir-se uma $OD_{600nm}=0,3$ (fase logarítmica de crescimento). Transferiu-se a cultura para o gelo e coletou-se as bactérias por centrifugação a 4000rpm por 5min. Ressuspendeu-se o sedimento em 5,0mL de tampão acetato de sódio 20mM e 0,1M $CaCl_2$, pH 6,5. Incubou-se no gelo por 20min. Coletou-se as bactérias (4000rpm, 5min.) e ressuspendeu-se em 5,0mL do mesmo tampão. Após 5hrs no gelo, estas bactérias competentes podem ser transformadas.

Para a transformação, distribuiu-se 0,1mL/tubo da suspensão de bactérias competentes em outros dois tubos. Adicionou-se o DNA

transformante (0,5 μ g de DNA de pBR 322, em 10 μ l de tampão TRIS 10mM, pH7,5 e 1,0mM EDTA) a um dos tubos. O outro foi usado como controle. Incubou-se em gelo por 20min. antes do choque térmico (42°C por exatamente 2min.). Adicionou-se 1,0mL/tubo de meio LB e incubou-se a 37°C, sem agitação, em banho-maria por 1hr. Diluiu-se as suspensões de bactérias de cada tubo 1/10 e 1/100 em 2,0mL de meio LB. Usando-se espalhador de vidro plaqueou-se 50 μ l de suspensão original e de cada diluição em placas de agar-LB e LB-A, cuidadosamente marcadas. Incubou-se na estufa a 37°C overnight para fazer a avaliação dos resultados (obteve-se de 50 a 100 colônias de transformantes na diluição 1/100).

II.q.2. Preparação de DNA de plasmídeos.

Inoculou-se 200 ou 400mL de meio seletivo LB-A (pg 36) com uma colônia de bactéria transformante. Incubou-se overnight a 37°C sob forte agitação (250rpm). Centrifugou-se em garrafa plástica (5000rpm, 10min.). Removeu-se o sobrenadante decantando a maior parte e utilizando-se pipeta Pasteur para o restante. Adicionou-se, na própria garrafa, 4,0mL de boiling (pg 36). Ressuspendeu-se todo o precipitado cuidadosamente com ponta de pipeta de 10ml até desfazer-se todos os grumos e transferiu-se para tubo de centrifuga. Adicionou-se 0,5mL de boiling, onde foi dissolvido 15mg de lisozima e deixou-se reagir por 10min. alternando-se gelo e temperatura ambiente. Adicionou-se 2,0mL de EDTA 0,5M pH 8,0 e, a seguir, 2,0mL de boiling. Centrifugou-se a 17000rpm por 30min. Transferiu-se o sobrenadante para tubo corex

(volume do sobrenadante de aproximadamente 7,5ml) e precipitou-se com 1,0 volume de isopropanol à temperatura ambiente e 0,2M de NaCl final por 20min. Centrifugou-se a 8000rpm por 10min. e descartou-se o sobrenadante. Ressuspendeu-se em 2,0mL de TE e aplicou-se em gradiente de césio. Foram adicionados 8,0g de CsCl já que são requeridos 1,0g de CsCl para cada volume de TE.

II.q.3. Verificação da eficiência da transformação previamente à aplicação em gradiente de CsCl.

Separou-se aproximadamente 1,0mL dos 400mL de cultura em Eppendorf e extraiu-se o DNA segundo o procedimento descrito acima. Aplicou-se em minigel de agarose 0,7%, utilizando-se TBE pH 8,0 como tampão de corrida. Aplicou-se as amostras de DNA (20 μ l), previamente preparadas da seguinte maneira. A cada 2,0 μ g de DNA são adicionados 15 μ l de tampão TBE pH 8,0 e 5,0 l de corante azul de bromofenol. Utilizou-se 60V de voltagem constante na fonte de eletroforese. Transferiu-se o gel para uma placa de Petri e cobriu-se com o tampão de corrida. Corou-se com aproximadamente 20 μ l de brometo de etídeo (5,0mg/mL para corar o gel). Após 30min. removeu-se a solução contendo brometo de etídeo cuidadosamente e lavou-se com tampão de corrida para remover o excesso de brometo de etídeo e observou-se o gel sob luz U.V.. O resultado foi comparado com os padrões marcadores de peso molecular (DNA de fago λ digerido com HIND III, fornecendo seis fragmentos visíveis de pesos moleculares 23; 10; 7,4; 2,2 e 2Kb).

II.q.4. Centrifugação com cloreto de césio.

Preparou-se uma solução de brometo de etídeo 20mg/mL em água deionizada. Adicionou-se ao tubo já contendo CsCl e DNA aproximadamente 0,4mL. Adicionou-se nujol cuidadosamente até encher o tubo e retirou-se todas as bolhas, protegendo-o da luz. Centrifugou-se por 24hrs a 45000rpm. Removeu-se os tubos em sala escura e iluminou-se com luz U.V.. Extraiu-se a banda fluorescente (contendo o plasmídeo) perpendicularmente ao tubo com agulha 30/8, diluindo-se o césio remanescente com TE em tubo de centrifuga. Adicionou-se igual volume de álcool isoamílico deixando-se decantar após breve agitação. Removeu-se a fase superior (orgânica). O brometo de etídeo fica na fase orgânica e a operação foi repetida até a solução aquosa ficar limpa. Transferiu-se para tubo corex e adicionou-se 2,5 volumes de etanol absoluto gelado. Agitou-se mantendo-o no freezer overnight. Em seguida centrifugou-se a 8000rpm por 15min. e ressuspendeu-se no menor volume de TE. A medida da concentração foi feita segundo o item II.c.

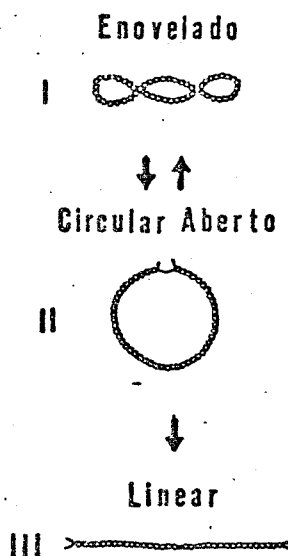
Meio LB: A 1,0l de água bidestilada foram adicionados 10g de triptona, 5g de levedura e 10g de NaCl. O pH foi ajustado em 7,4.

Meio LB-A: Contém 50µg/mL de ampicilina.

Boiling: 8% sacarose, 0,5% triton X-100 em 50mM EDTA, 10mM Tris-HCl (pH 8,0).

II.r. Eletroforese de DNA de plasmídeo em gel de agarose.

Esta técnica se baseia nas propriedades estruturais do DNA de plasmídeo. O DNA de plasmídeo nativo se encontra na forma enovelada (I), passando para a forma circular aberta (II) ao sofrer uma quebra de fita simples. Ao sofrer duas quebras próximas (até dez pares de base) ou uma quebra de fita dupla, o plasmídeo passa para a forma linear (III). (Esquema 4). Devido às diferenças estruturais, estas três formas apresentam mobilidades diferentes quando submetidas à eletroforese em gel de agarose. Esta técnica é muito sensível para a análise de alterações induzidas no DNA, uma vez que apenas uma quebra por plasmídeo é o suficiente para ser detectado.



ESQUEMA 4: Formas do DNA de plasmídeo

Numa primeira fase irradiou-se 2,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de plasmídeo pBR 322 com diferentes concentrações de ácido hidrocínâmico (0,55mM; 1,0mM; 2,0mM e 3,0mM) segundo o protocolo do item II.1. O volume final foi de 1,0mL. Os DNAs foram precipitados com 3 volumes de etanol absoluto overnight, numa solução 0,3M de acetato de amônio final. Após a precipitação os DNAs de plasmídeo foram lavados 3 vezes com etanol 70%. Não foram observadas alterações no DNA induzidas pela precipitação.

Incubou-se 2,0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de pBR 322 com fenelzina 2,0mM e 2,5 equivalentes de ferricianeto segundo descrito no item II.m.

Os DNAs precipitados foram ressuspensos em água bidestilada e adicionou-se azul de bromofenol 0,1%. As amostras foram mantidas em gelo até aplicação em gel de agarose 0,8% (15x13x0,8cm), em tampão TBE para uma eletroforese horizontal corrida no mesmo tampão a 25V, a temperatura ambiente. Terminada a eletroforese, o gel foi corado com 1,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de brometo de etídeo por 30min. e fotografado com transiluminação por luz U.V., através de um filtro laranja.

Numa segunda fase, submeteu-se 9,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de DNA de plasmídeo ao tratamento com ácido hidrocínâmico 0,55mM, a diferentes tempos de irradiação (15; 30; 40 e 50min). Utilizou-se condições descritas no item II.1. Os DNAs foram precipitados e submetidos à eletroforese como descrito anteriormente.

Numa terceira etapa irradiou-se o DNA de plasmídeo (9,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) com ácido hidrocínâmico 1,0mM utilizando-se vidro pirex como filtro ($\lambda_{\text{irr}} > 300\text{nm}$) e comparou-se os resultados.

As condições empregadas nas reações estão descritas nas figuras.

II.s. Cálculos Teóricos.

Os cálculos teóricos foram efetuados pelo método MNDO (Modified Neglect Differential Overlap). (Dewar e Thiel, 1977, 1985), com otimização parcial da geometria e mantendo-se fixa a planaridade dos anéis. Utilizou-se o método UHF (Unrestricted Hartree-Fock) para as espécies radicalares. Os índices de fronteira foram calculados segundo o método descrito por Fukui (1975). O programa utilizado foi o MOPAC (Molecular Package), um programa semiempírico para orbitais moleculares. (Stewart, 1983).

A confiança do método está representada por um erro médio nos valores de entalpia, para compostos, contendo C, N, H, O de 3,8 kcal/mol. (Dewar e Thiel, 1985).

CAPITULO III

RESULTADOS

III.I. Formação de radicais livres na fotoirradiação do ácido hidrocínâmico e peróxido de dihidrocínamoila em anaerobiose.

Para os objetivos deste trabalho foi importante desenvolver um método de geração de radicais 2-feniletila sob condições em que a formação de produtos secundários fosse minimizada. Deste modo a anaerobiose do sistema comporta-se como um fator determinante na escolha do método, já que a geração de radicais centrados no oxigênio ou mesmo o trapeamento dos radicais de carbono gerados em nossos sistemas pelo O_2 traria dificuldades na análise dos efeitos causados ao ácido desoxirribonucléico.

A formação de radicais livres durante a fotoirradiação do ácido hidrocínâmico foi investigada utilizando-se o método do captador de spin, uma vez que este foi empregado por Netto e colaboradores (1987), e Leite e Augusto (1989) na oxidação de hidrazinas monossustituídas.

Sob as condições indicadas no espectro de EPR, na figura 12, a irradiação do ácido hidrocínâmico, em presença do captador de spin, POBN, demonstra a formação de um radical aduto estável ($a^N=15,82$; $a^H=2,746$), após 1h de irradiação. Tais parâmetros sugerem que o radical captado é o radical 2-feniletila, por comparação com os parâmetros do radical aduto detectado na oxidação da fenelzina, tanto química quanto catalisada por oxihemoglobina ($a^N=15,81$; $a^H=2,756$). (Leite e Augusto, 1989). Devido certas limitações do procedimento de irradiação, outros processos fotolíticos que não são observados podem estar ocorrendo.

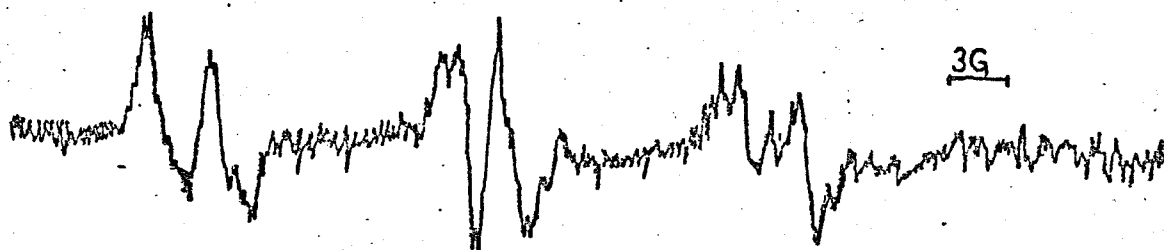
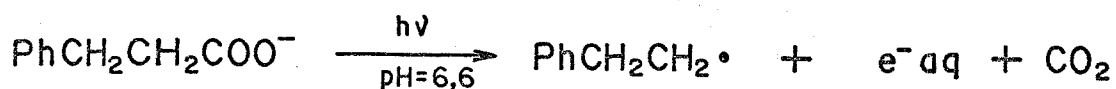


FIGURA 12: Espectro de EPR do radical aduto 2-feniletila-POBN obtido após 1h de irradiação do ácido hidrocinâmico 0,55mM, POBN 100mM em tampão cacodilato de sódio 20mM, pH 6,8. Condições do espectrômetro de EPR: potência de microonda, 20mW; amplitude de modulação, 1,0G; constante de tempo, 0,1s; velocidade de varredura, 0,2G/s

Entretanto, os resultados experimentais publicados por Mittal e colaboradores (1973) demonstram que o processo fotolítico indicado no esquema 5 é mais efetivo, principalmente quando comparado à ruptura da ligação $\text{PhCH}_2\text{-CH}_2\text{COO}^-$. Neste caso um rendimento quântico 2,3 vezes maior foi calculado para a fotoionização do ion 3-fenilpropionato.



ESQUEMA 5: Reação principal do ion 3-fenilpropionato

A formação de radicais 2-feniletila na reação de oxidação da fenelzina está bem documentada por Leite e Augusto (1989). Neste caso, a verificação da geração do radical foi realizada na presença do captador de spin tert-nitrosobutano (t-NB). Este captador de spin fornece informações adicionais sobre a estrutura do radical captado, uma vez que o radical adiciona-se diretamente ao nitrogênio do captador, levando à formação de um radical aduto

que apresenta os desdobramentos hiperfinos do radical a ser identificado.

Não nos foi possível fazer o cálculo do rendimento de radicais gerados na fotoreação, mas podemos estimar que foi obtido em pequenas quantidades. Todavia, para os objetivos do trabalho e considerando os resultados obtidos em experimentos com o ácido desoxirribonuclêico, a quantidade de radicais 2-feniletila foi suficiente. A dificuldade em se estimar o rendimento de radical aduto 2-feniletila-POBN também se verifica no sistema químico de oxidação da fenelzina por ferricianeto, devido à influência do meio de reação no sinal de EPR. Neste caso o sinal de EPR obtido após 30min. de incubação não é estável e a intensidade aumenta gradativamente após 2 h de aeração. Mesmo quando a reação não é submetida à desaeração, este efeito é observado. (Leite e Augusto, 1989). Podemos estimar que na reação da fenelzina 5mM com 2,5 equivalentes de ferricianeto foram produzidos aproximadamente 1,15mM de radical aduto 2-feniletila em anaerobiose. (Leite e Augusto, 1989).

A confirmação de que o radical de carbono gerado em nosso sistema fotoquímico é o radical 2-feniletila foi obtida seguindo-se paralelamente a formação de radicais livres a partir da irradiação do peróxido de dihidrocinamoila. A formação do radical 2-feniletila neste sistema foi primeiro demonstrada por Krusic e Kochi em 1969.

Nós obtivemos, após 10min. de irradiação de uma solução de peróxido de dihidrocinamoila 6,0mM contendo POBN, 15,72 μ M de radical aduto ($a^N=15,88$; $a^H=2,756$). (Figura 13).

A fotólise de peróxidos de diacila, perésteres e compostos correlatos, como demonstrado por Krusic e Kochi (1969), constitui um método conveniente de geração de radicais alquila específicos em solução, onde procedimentos alternativos dependentes da abstração de hidrogênio de hidrocarbonetos parentes não são aplicáveis.

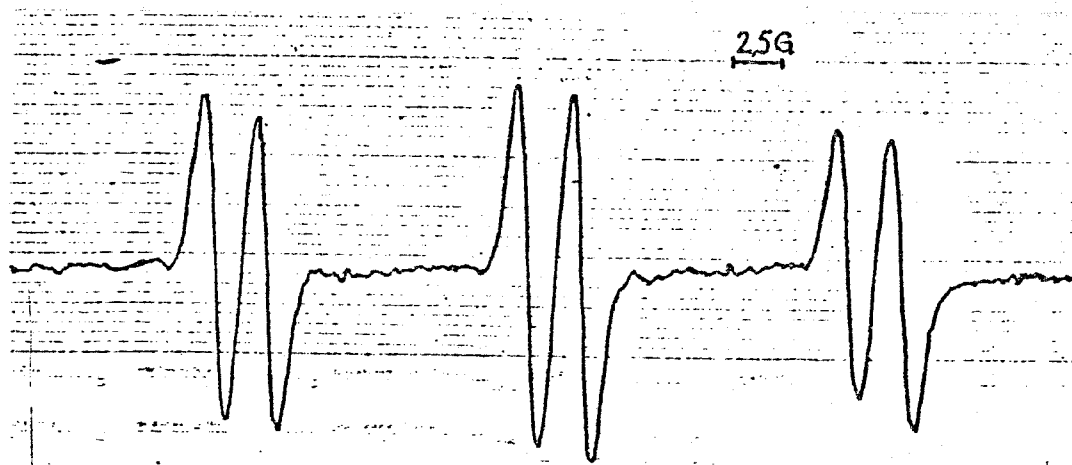


FIGURA 13: Espectro de EPR do radical aduto 2-feniletila-POBN obtido após 10min de irradiação do peróxido de dihidrocinamoila 6,0mM, POBN 100mM. Condições do espectrômetro de EPR: potência de microonda, 20mW; amplitude de modulação, 1,0G; constante de tempo, 0,3s; velocidade de varredura, 0,2G/s

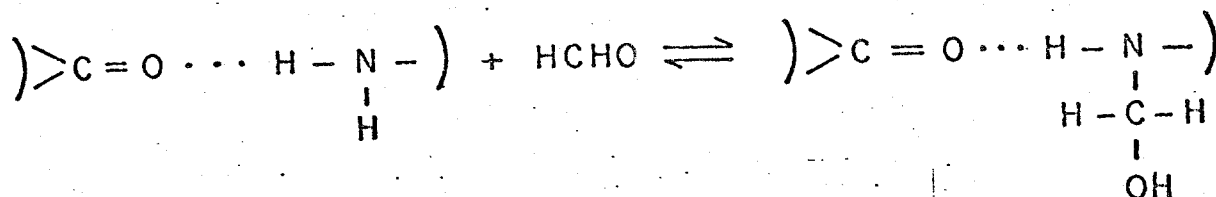
III.II. Estudos com o DNA.

III.II.1. Reação com formaldeído.

A fim de investigar os efeitos no DNA submetido ao radical 2-feniletila, nós utilizamos um método químico envolvendo a reação com formaldeído.

Segundo Lewin(1966), os átomos de hidrogênio dos grupos amino ($-NH_2$) que não são requeridos para formar a ligação de

Watson-Crick (pontes de hidrogênio) entre os pares de bases, são capazes de reagir com formaldeído para formar metilol, de acordo com o esquema 6.



ESQUEMA 6: Reação de DNA com formaldeído

Para que a reação se processe é necessário que os grupos reagentes do DNA sejam previamente expostos ou deslocados, para que o contato deles com o formaldeído seja facilitado.

Assim, quanto mais expostos ou deslocados os grupos reagentes mais facilitado será o contato com o formaldeído e mais rápida a reação irá se processar.

Observando-se as figuras 14, 15 e 16 (resultado de três medidas experimentais) notamos que os DNAs quando submetidos ao radical 2-feniletila gerado em nossos sistemas, reagiram mais rapidamente com formaldeído em relação aos DNAs não tratados desta maneira. Durante a primeira hora, em particular, os DNAs tratados com o radical 2-feniletila reagem com formaldeído rapidamente, resultando em um aumento pronunciado do coeficiente de extinção a 260nm.

Resultado semelhante foi obtido por Scothorst e colaboradores (1983), em que o DNA submetido ao produto da fotodegradação de clorpromazina pelo O_2 apresentou uma velocidade

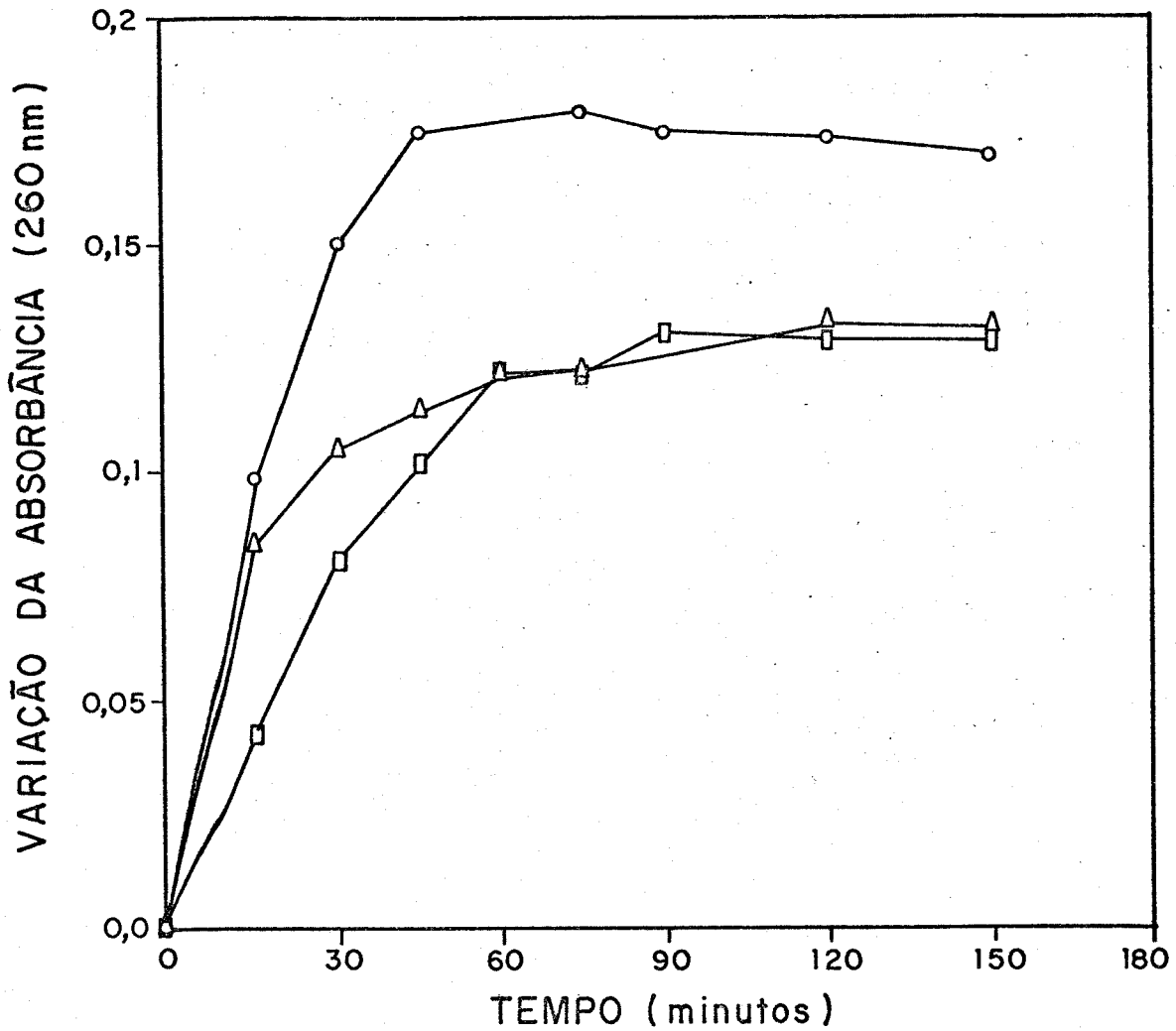


FIGURA 14: Variação da absorbância do DNA a 260 nm, após incubação com formaldeído 30% a 60°C em um meio constituído pela mistura de citrato de sódio 10mM e cloreto de sódio 30mM, pH 8,3:

- (a) DNA nativo □-□
- (b) DNA pré-irradiado por 1h, pH 6,8 ($265 < \lambda_{irr} < 375\text{nm}$) Δ-Δ
- (c) DNA pré-irradiado por 1h com ácido hidrocínâmico 0,55mM, pH 6,8 ($265 < \lambda_{irr} < 375\text{nm}$) ○-○

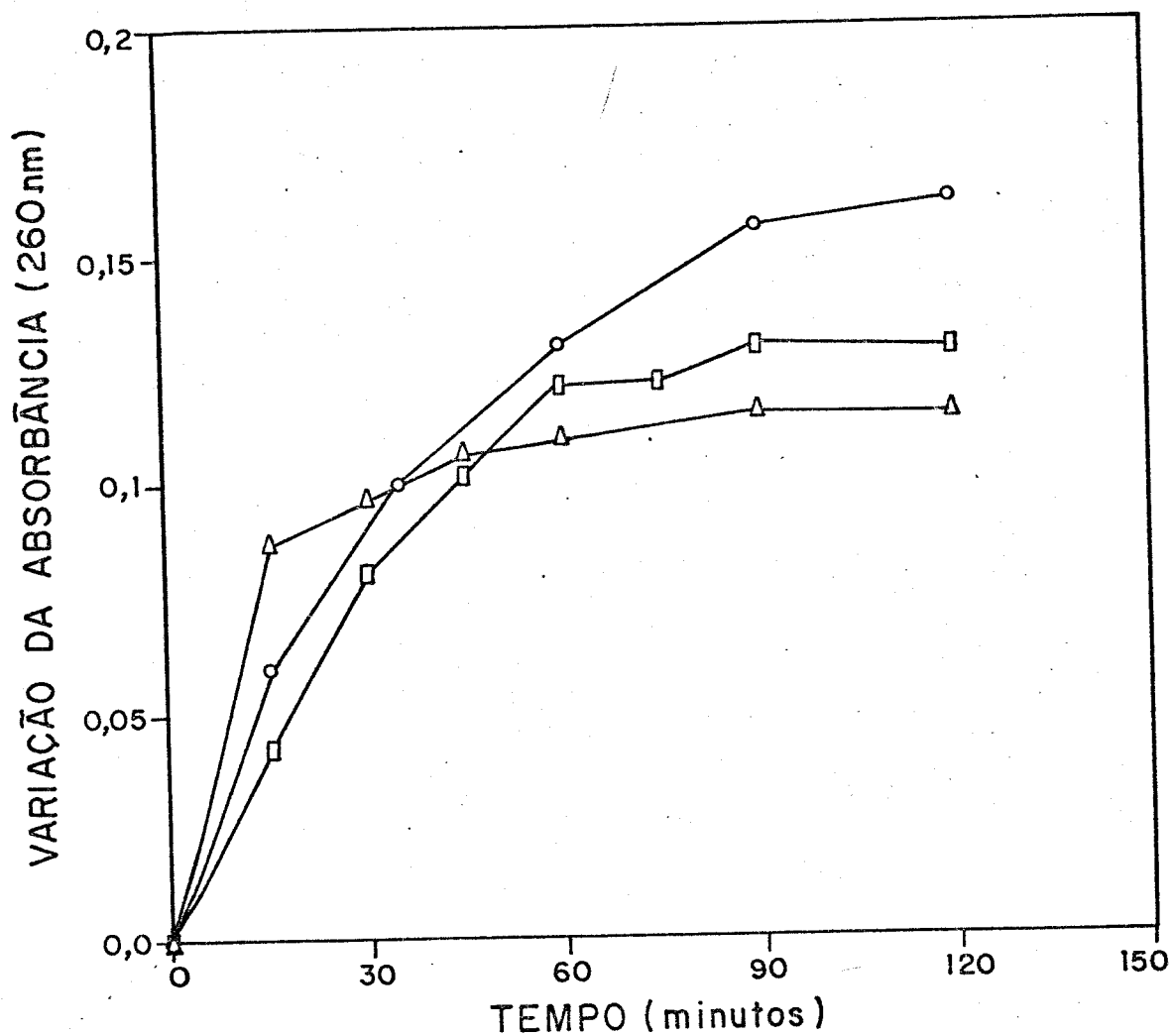


FIGURA 15: Variação da absorbância do DNA a 260 nm, após incubação com formaldeído 30% a 60°C em um meio constituído pela mistura de citrato de sódio 10mM e cloreto de sódio 30mM, pH 8,3:

- (a) DNA nativo □-□
- (b) DNA pré-irradiado por 2h, pH 6,8 ($265 < \lambda_{irr} < 375\text{nm}$) Δ-Δ
- (c) DNA pré-irradiado por 2h com ácido hidrocínâmico 0,55mM, pH 6,8 ($265 < \lambda_{irr} < 375\text{nm}$) ○-○

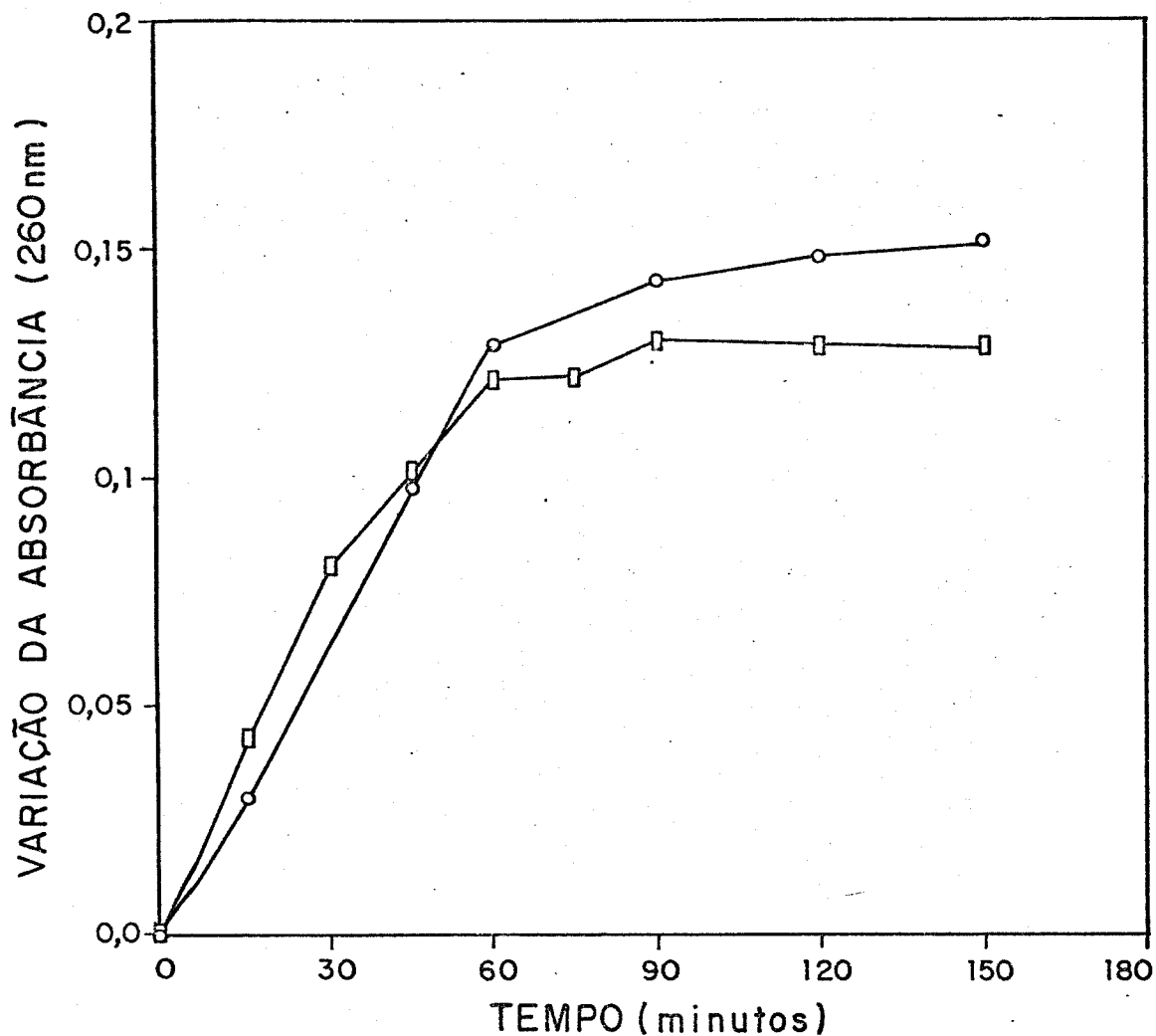


FIGURA 16: Variação da absorbância do DNA a 260 nm, após incubação com formaldeído 30% a 60°C em um meio constituído pela mistura de citrato de sódio 10mM e cloreto de sódio 30mM, pH 8,3:

(a) DNA nativo □-□

(b) DNA pré-incubado com fenelzina 0,55mM e 2,5 equivalentes de ferricianeto a 37°C por 30min, pH 8,0 ○-○

Os reagentes incubados com o DNA separadamente tiveram efeito tal qual o DNA nativo

de hidrólise maior, com formaldeído, em relação ao não tratado. Embora se saiba que três das bases que constituem o DNA possuem o grupo $-NH_2$ (guanina, adenina e citosina), o método não especifica qual delas, ou, se todas elas, estão sofrendo maior ou menor interação. Mesmo assim isto sugere que os efeitos causados no DNA pela ação do radical 2-feniletila têm uma influência disruptiva da integridade local da estrutura do DNA, proporcionando um maior contato entre os grupos amino das bases e o formaldeído.

Nas figuras 15 e 16 observamos uma denaturação do DNA menos pronunciada quando tratados, em relação ao DNA nativo. Assim nossos experimentos demonstram, a princípio, que lesões primárias no DNA, onde a variação da quantidade de regiões denaturadas indicam a disponibilidade dos grupos amino à reação com formaldeído, levam a variações na velocidade de hidrólise. De fato, nossos experimentos revelam que com 2h de irradiação o dano causado ao DNA pela luz U.V. é mais severo que com 1h de irradiação, e podemos concluir que, sob circunstâncias anaeróbicas, o aumento do dano ao DNA não é causado por geração de uma espécie ativa de oxigênio, visto que no sistema representado na figura 16 não há participação de tais espécies. (Leite e Augusto, 1989).

III.II.2. Complexação e fluorescência do complexo DNA-térbio(III).

Informações fundamentais relacionadas às características gerais da conformação de biomoléculas podem ser obtidas, em

particular, por técnicas de cristalografia de raio-X, espectroscopia RMN e outros métodos físicos, como por exemplo, dicroísmo circular.

Entretanto, estas técnicas apresentam um número de limitações, já que tais métodos não fornecem informação sobre uma pequena região do biopolímero, cujas propriedades estruturais são diferentes daquelas do resto da macromolécula. (Ringer et. al., 1980).

Recentes avanços na tecnologia do DNA recombinante levou à possibilidade de utilização de hibridação de ácidos nucleicos como um método em larga escala, não apenas em biologia molecular mas também em diagnósticos clínicos (Topal e Fresco, 1980); não obstante nenhum destes procedimentos competem com radiomarcadores em termos de simplicidade e sensibilidade.

Em comparação a dois outros métodos de detecção de alterações no DNA, térbio(III) oferece algumas vantagens. Relativo à sonda específica de regiões de fita simples S_1 nuclease o íon $Tb(III)$ não requer incubação e subsequente fracionamento da amostra, sendo tecnicamente mais simples e rápido, requerendo menos amostra de DNA, além de não consumi-la durante a análise. Em comparação com brometo de etideo, uma sonda bem estudada para regiões de dupla-fita do DNA, $Tb(III)$ possui a vantagem de ser um quelante principalmente de regiões de fita-simples. DNAs, cujas formações de fita-simples são pequenas, são mais prontamente avaliados com aumento de fluorescência do $Tb(III)$ do que diminuição de fluorescência do brometo de etideo. Uma diferença de 5 vezes em sensibilidade faz com que $Tb(III)$

seja aplicado em amostras para identificar regiões de fita-simples não detectáveis por brometo de etídeo. (Topal e Fresco, 1980).

Este lantanídeo trivalente exibe um baixo nível de fluorescência intrínseca em solução aquosa que é grandemente aumentada quando quelado a ligantes orgânicos tais como os anéis aromáticos das bases dos ácidos nucleicos, formando complexos de transferência de energia. Particularmente o resíduo guanosina induz forte aumento e verificou-se, recentemente, que a sonda de Tb(III) fluorescente foi aplicada, com sucesso, na análise de bases guanina presentes em regiões de dupla-fita distorcidas do DNA, onde apenas o empilhamento vertical dos pares de bases foi alterado. (Balcarová e Brabec, 1989).

Nossa atenção durante este trabalho foi dirigida à interação do íon Tb(III) com ácidos nucleicos, preferencialmente com o resíduo guanosina do DNA.

Trabalhos como os de Ringer e colaboradores (1980, 1985), Topal e Fresco (1980), dentre outros, concordam que a guanina é a base diretamente envolvida. Em um trabalho de Rudman e colaboradores (1985) sobre a natureza da emissão dos complexos DNA-Tb(III) eles admitem que a geometria do complexo é muito importante na transferência de energia das bases para este íon.

Com base em trabalhos que relatam a propriedade do resíduo guanosina do DNA complexado ao íon térbio para sondar alterações na estrutura duplex do DNA, resolvemos investigar o comportamento da emissão dos complexos DNA-Tb(III) quando o DNA foi previamente tratado nos sistemas fotodinâmicos, bem como no sistema químico

de metabolização da fenelzina.

Dado os inúmeros trabalhos (Saffhill et. al., 1985; Castro, 1984; Duker et. al., 1985; Leite e Augusto, 1989) que concordam em que guanina e adenina são as bases preferencialmente atacadas por agentes alquilantes, nosso interesse foi o de verificar se o radical 2-feniletila, gerado em nossos sistemas, interagia de fato com os resíduos guanosina de DNA.

As figuras 17-20 ilustram os resultados de fluorescência dos complexos DNA-Tb(III) em que o ácido nucléico foi previamente submetido aos seguintes sistemas geradores de radical 2-feniletila:

- ácido hidrocínâmico irradiado em anaerobiose por 1h a pH 6,8 ($265 < \lambda_{irr} < 375\text{nm}$);
- mesmas condições anteriores, exceto irradiação por 2h;
- fotossensibilização por NaNO_2 a pH 3,0 ($\lambda_{irr} > 300\text{nm}$) e
- fenelzina 2,0mM catalisada por 2,5 equivalentes de ferricianeto a pH 8,0 por 30min. a 37°C , em anaerobiose.

Como podemos verificar pelos resultados, a fluorescência do complexo aumenta quando o DNA é tratado com o radical 2-feniletila. Lembrando as experiências de Ringer e colaboradores (1980, 1985) e Justo e colaboradores (1990) acreditamos que este efeito deva contribuir para o aumento de resíduos guanosina livres que estão disponíveis para complexação com Tb(III).

O aumento da emissão se dá, provavelmente, devido ao aparecimento de regiões de fita-simples no DNA (Leite e Augusto, 1989), embora não possamos descartar a hipótese de formação de sítios álcali-lábeis que devem alterar a estrutura secundária do

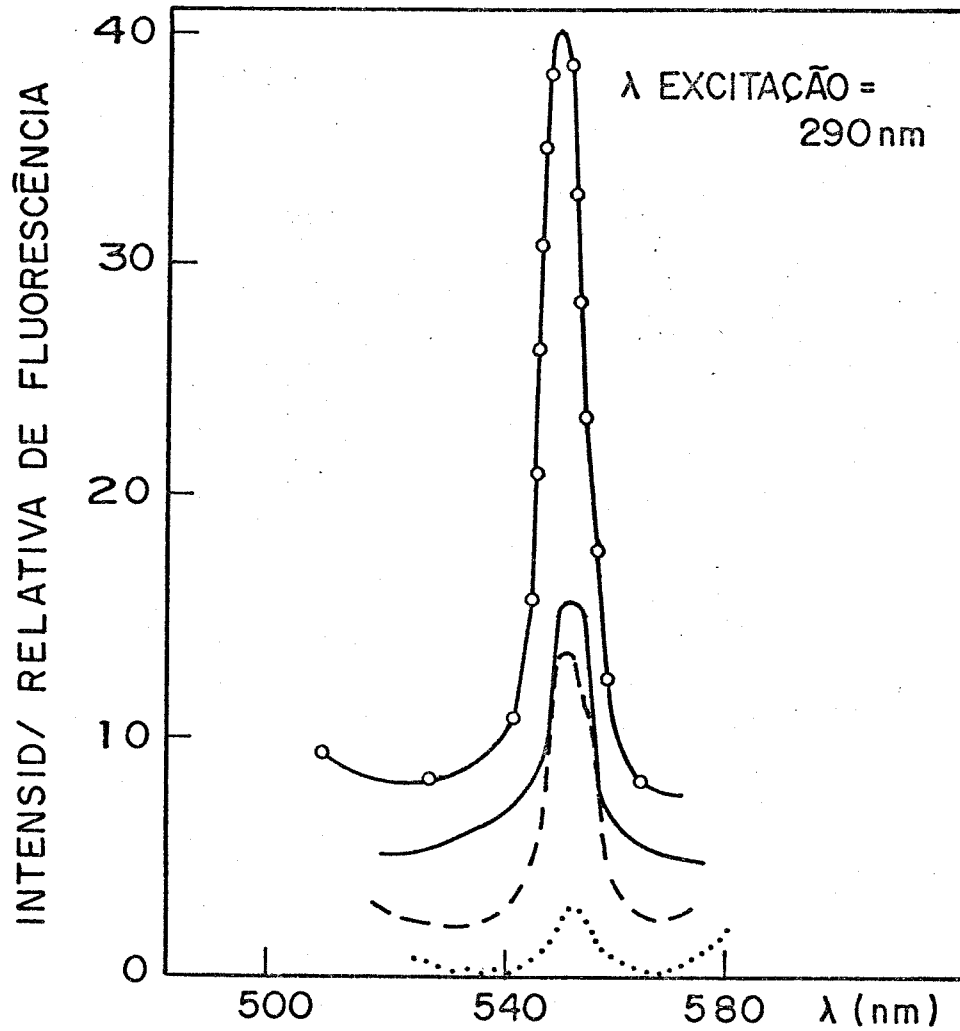


FIGURA 17: Intensidade relativa de fluorescência de Tb (III) em tampão cacodilato de sódio 20mM e 10mM em KCl, pH 6,0..... :
 (a) na presença de DNA nativo ----
 (b) na presença de DNA pré-irradiado por 1h, pH 6,8 (265 λ_{irr} <math>< 375\text{nm}</math>) —
 (c) na presença de DNA pré-irradiado por 1h com ácido hidrocínâmico 0,55mM, pH 6,8 (265 λ_{irr} <math>< 375\text{nm}</math>) —o—o—

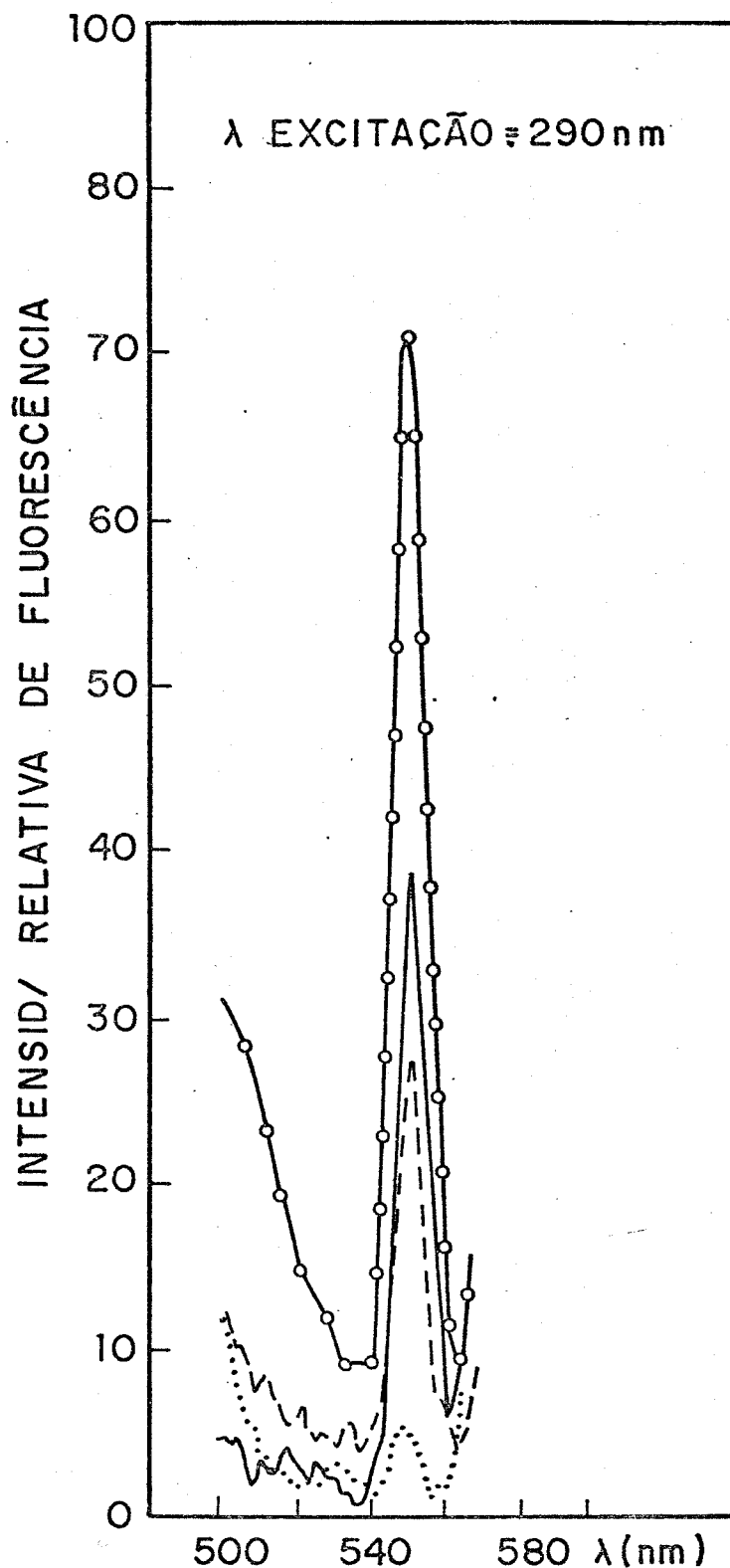


FIGURA 18: Intensidade relativa de fluorescência de Tb (III) em tampão cacodilato de sódio 20mM e 10mM em KCl, pH 6,0 :
 (a) na presença de DNA nativo ----
 (b) na presença de DNA pré-irradiado por 2h, pH 6,8 ($265 < \lambda_{irr} < 375$ nm) ———
 (c) na presença de DNA pré-irradiado por 2h com ácido hidrocínâmico 0,55mM, pH 6,8 ($265 < \lambda_{irr} < 375$ nm) —○—

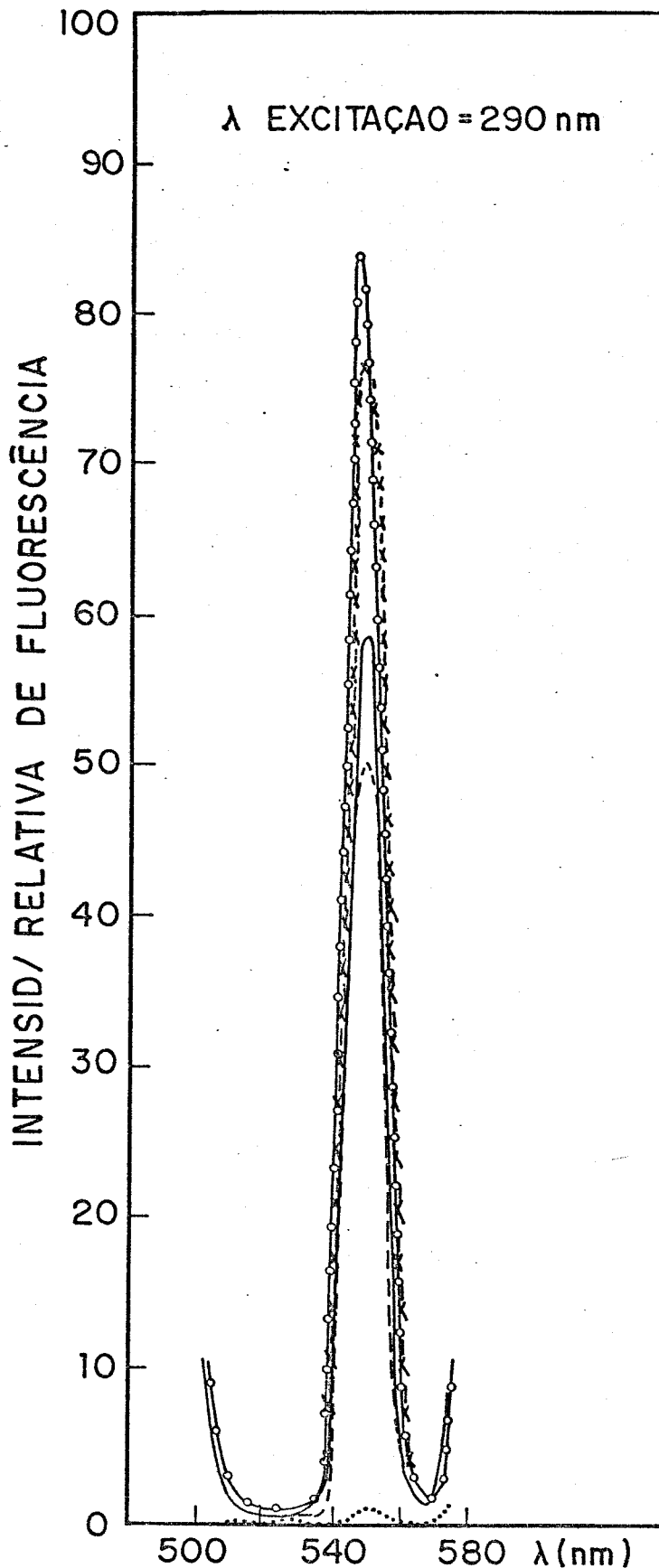


FIGURA 19: Intensidade relativa de fluorescência de Tb (III) em tampão cacodilato de sódio 20 mM e 10mM em KCl, pH 6,0.....:

(a) na presença de DNA nativo ----

(b) na presença de DNA pré-irradiado por 1h, pH 3,0 ($\lambda_{irr} > 300\text{nm}$) —

(c) na presença de DNA pré-irradiado por 1h com NaNO_2 0,6mM, pH 3,0 ($\lambda_{irr} > 300\text{nm}$) ---

(d) na presença de DNA pré-irradiado por 1h com ácido hidrocínâmico 0,6mM fotossensibilizado por NaNO_2 0,6mM, pH 3,0 ($\lambda_{irr} > 300\text{nm}$) o-o

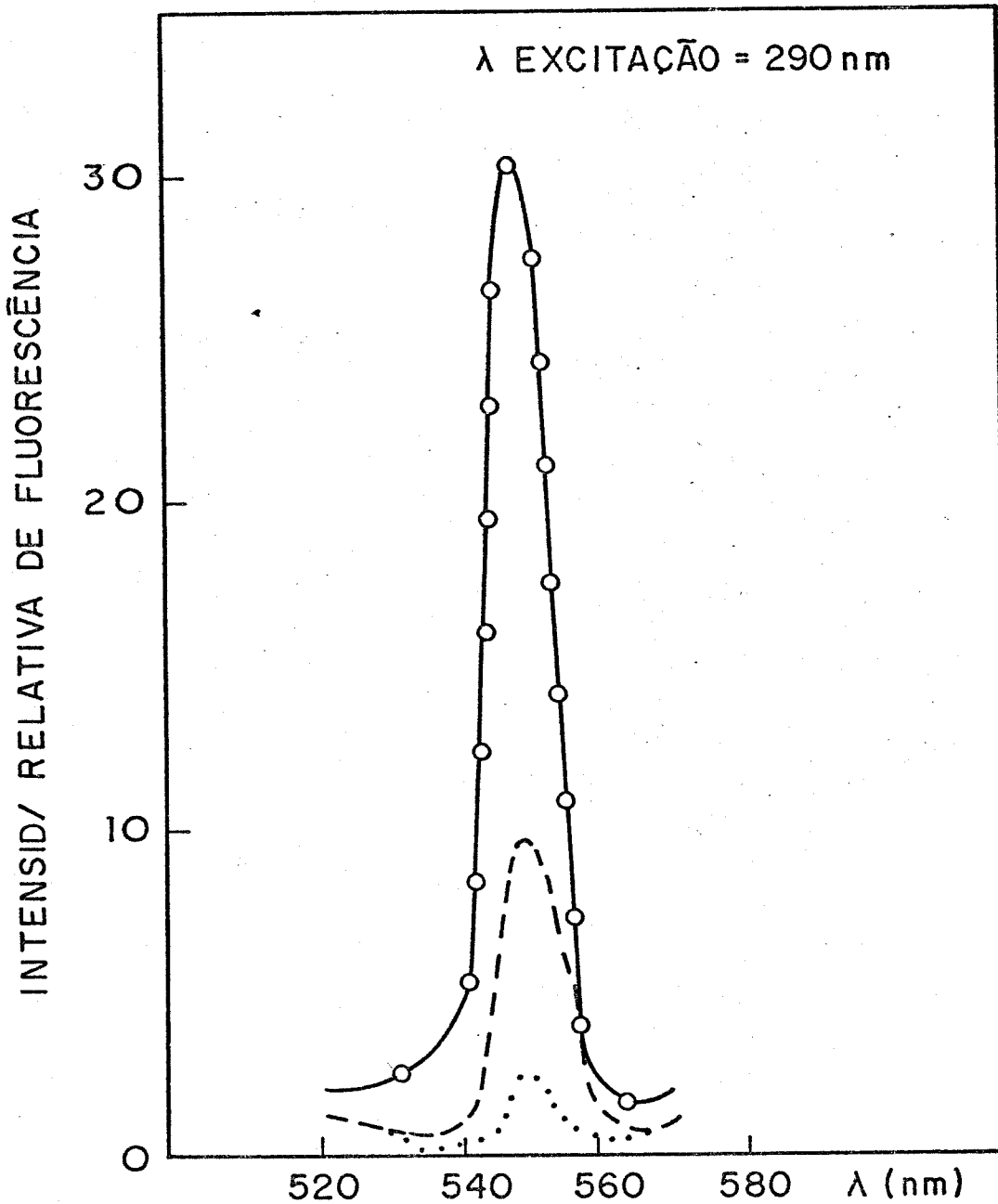


FIGURA 20: Intensidade relativa de fluorescência de Tb (III) em tampão cacodilato de sódio 20mM e 10mM em KCl, pH 6,0.....:

(a) na presença de DNA nativo ----

(b) na presença de DNA pré-incubado com fenzelzina 2,0mM e 2,5 equivalentes de ferricianeto a 37°C por 30min, pH 8,0 -o-o-

Nenhum dos reagentes isolados exerceram efeito sobre o DNA controle

DNA com destruição de pontes de hidrogênio e a formação de regiões de fita-simples, sendo consistente com as observações de Ringer e colaboradores (1985), Topal e Fresco (1980), Leite e Augusto (1989) e Justo e colaboradores (1990).

III.II.3 Complexação e fluorescência do complexo DNA-DAPI.

DAPI (Figura 21) é uma molécula que apresenta um grande aumento no rendimento quântico de fluorescência como resultado da interação com moléculas tais como os ácidos nucleicos. (Manzini et. al., 1983). Este aumento é ainda acentuado em regiões ricas em pares A-T, para DNAs de fita-dupla. (Kapuscinski e Skocylas, 1977).

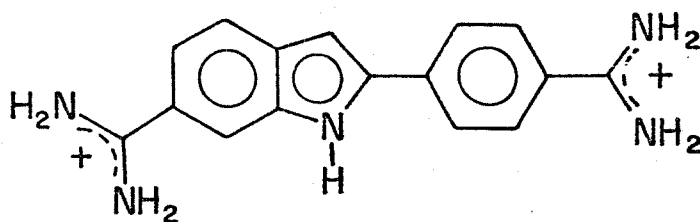


FIGURA 21: Estrutura da molécula de DAPI

São estas propriedades que fazem com que DAPI seja útil em investigações citoquímicas, como um marcador em eletroforese de DNA e em estudos de interação entre DNA e proteínas. (Brunk e James, 1988).

Estudos de dicroísmo circular mostraram que DAPI se liga ao DNA em dois sítios espectroscopicamente distintos. Especulações acerca da estrutura do complexo DNA-DAPI foram feitas com base em comparações com outros agentes intercalantes. (Manzini et. al., 1983; Kubista et. al., 1987).

Kubista e colaboradores (1987) repetiram as medidas de dicroísmo circular de Manzini e colaboradores (1983) e puderam confirmar a existência de dois sítios, com razões de ligação intermediárias, nos sulcos menor e maior do DNA. DAPI forma ligações hidrogênio com as bases do DNA e com uma atração eletrostática entre os grupos amidino do DAPI e os fosfatos do DNA. Entretanto, informações estruturais das medidas espectroscópicas são limitadas devido a estrutura eletrônica desconhecida da molécula de DAPI e mais trabalho nesta área é necessário para uma compreensão completa da interação entre DAPI e DNA.

Estudos relacionados à natureza do dano causado ao DNA pelo radical 2-feniletila foram feitos, já que o método parece ser mais sensível do que outros previamente publicados, além de DAPI exibir uma preferência por contínuos pares de base A-T.

Para avaliar a aplicabilidade deste método ao DNA pós-tratado, decidiu-se primeiramente investigar o efeito quando DNA foi tratado em um sistema gerador de $^1O_2^*$. Trabalhos realizados em nosso laboratório demonstraram que a degradação enzimática de malonaldeído leva a uma diminuição dos resíduos guanosina, já que a base guanina reage com tais espécies singlete. Neste caso, os complexos de DNA-DAPI apresentaram um aumento de fluorescência superior duas vezes ao aumento observado para o DNA nativo. (30 para o DNA tratado com malonaldeído x 18 para o DNA nativo).

Do mesmo modo uma intensificação da fluorescência, quando o DNA foi submetido ao ataque do radical 2-feniletila, foi observada. A solução de DAPI não mostrou significante

fluorescência nestas condições experimentais. (Tabela 1).

Os resultados apresentados aqui, os quais são consistentes com aqueles observados para o tratamento com malonaldeído, indicam que a oxidação química da fenelzina e a reação fotoquímica mimética procedem através de uma alteração na dupla hélice que favorece a complexação com DAPI.

TABELA 1: % de Fluorescência Relativa do Complexo DNA-DAPI

DNA	% Fluorescência
nativo	21
pré-irradiado por 1h, pH 6,8 ($265 < \lambda_{irr} < 375\text{nm}$)	26
pré-irradiado por 1h com ácido hidrocínâmico 2,25mM, pH 6,8 ($265 < \lambda_{irr} < 375\text{nm}$)	31
pré-incubado, pH 8,0, com fenelzina 5,0mM e 2,5 equivalentes de ferricianeto a 37°C por 30min	24

Os controles para os sistemas de reação com fenelzina apresentaram % de fluorescência relativa próximos ao indicado para o DNA nativo.

III.II.4. Interação do radical 2-feniletila com DNA de plasmídeo.

As alterações induzidas no DNA de plasmídeo foram analisadas por eletroforese em gel de agarose. Esta técnica se baseia nas propriedades conformacionais do DNA de plasmídeo. O plasmídeo nativo se encontra na forma enovelada (I); ao sofrer uma quebra de fita simples, este passa para a forma circular aberta (II); e ocorrendo duas quebras próximas ou uma quebra de fita dupla o

plasmídeo passa para a forma linear (III). (Esquema 4).

Apesar de terem basicamente o mesmo peso molecular, devido às suas diferenças estruturais, estas três formas apresentam mobilidades diferentes quando submetidas à eletroforese em gel de agarose. Esta é uma técnica muito sensível para análise de alterações induzidas em DNA, uma vez que apenas uma quebra por plasmídeo, isto é, em 4000 pares de base, seria o suficiente para ser detectado.

Fenelzina incubada com oxihemoglobina ou ferricianeto induz quebras de fita no DNA de plasmídeo pBR 322 enovelado, convertendo-o à forma circular aberta. (Augusto et. al., 1984). Isto foi previamente determinado por Augusto e colaboradores (1984) sugerindo que o radical de carbono metabolicamente gerado é capaz de escapar do sítio ativo e induzir quebra de fita no DNA.

Nossos experimentos foram conduzidos com intenção de, inicialmente, obter as melhores condições de tratamento levando-se aos melhores resultados na eletroforese.

Com isso verificou-se que com 1h de irradiação, utilizando-se filtro ($265 < \lambda_{irr} < 375\text{nm}$) e anaerobiose a extensão de quebras de fita no DNA de plasmídeo pBR 322 aumentou com o aumento da concentração de ácido hidrocínâmico. (Figura 22).

Nestas condições a irradiação do plasmídeo na ausência do ácido hidrocínâmico induziu uma pequena quantidade de quebras no DNA (Figura 22, linha c), provavelmente devido o efeito da luz U.V. sobre o DNA.

a b c d e f g h

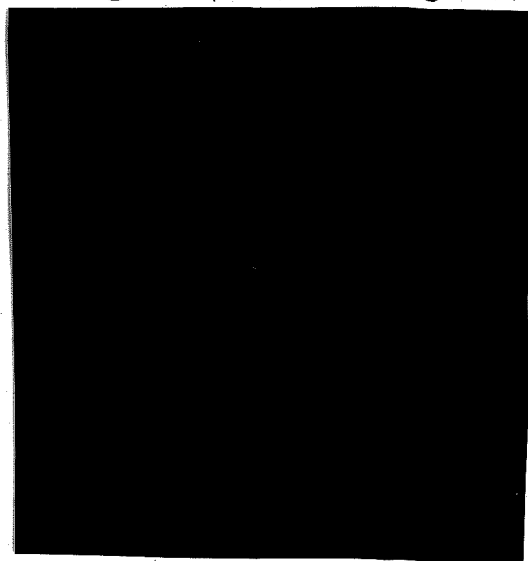


FIGURA 22: Efeito da concentração de ácido hidrocínâmico na irradiação por 1h de plasmídeo pBR 322 ($265 < \lambda_{\text{irr}} < 375 \text{nm}$):

- (a) fago λ
 - (b) pBR 322 nativo
- A mistura de reação contendo $2,0 \mu\text{g/ml}$ de pBR 322 em tampão cacodilato de sódio 100mM , $\text{pH } 6,8$ foi irradiada com:
- (c) nenhuma adição
 - (d) ácido hidrocínâmico $1,0 \text{mM}$
 - (e) ácido hidrocínâmico $2,0 \text{mM}$
 - (f) ácido hidrocínâmico $3,0 \text{mM}$
 - (g) pBR 322 incubado com fenelzina $2,0 \text{mM}$ e $2,5$ equivalentes de ferricianeto a 37°C por 30min , $\text{pH } 8,0$
 - (h) pBR 322 incubado com fenelzina $5,0 \text{mM}$ e $2,5$ equivalentes de ferricianeto a 37°C por 30min , $\text{pH } 8,0$

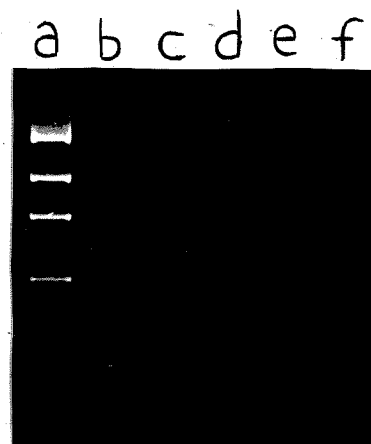


FIGURA 23: Efeito do tempo de irradiação ($265 < \lambda_{irr} < 375 \text{nm}$) na presença de ácido hidrocínâmico sobre plasmídeo pBR 322:

(a) fago λ

(b) pBR 322 nativo

A mistura de reação contendo $9,2 \mu\text{g/ml}$ de pBR 322 e $0,55 \text{mM}$ de ácido hidrocínâmico em tampão cacodilato 100mM , $\text{pH } 6,8$ foi irradiada com os seguintes tempos:

(c) 15min

(d) 30min

(e) 40min

(f) 50min

Experimentos controle mostraram que o DNA de plasmídeo não é alterado quando é incubado com a mistura de reação pré-incubada e após a precipitação com etanol.

Uma avaliação do tempo de reação mostrou uma correlação clara com a formação de quebras induzidas no DNA: (Figura 23).

Mesmo o plasmídeo apresentando uma fração de forma circular aberta quando irradiado na ausência do substrato, pudemos observar uma diminuição significativa de DNA enovelado nas condições do tratamento. (Figuras 22 e 23).

Para se estabelecer mais claramente o papel da luz U.V. sobre o DNA, o rendimento do radical 2-feniletila, usando-se filtro pirex na irradiação ($\lambda_{irr} > 300\text{nm}$), foi estudado. (Dados não mostrados). Este experimento teve pouco efeito na indução de quebras no DNA, devido a diminuição na velocidade de formação do radical. Isto era esperado já que o comprimento de onda máximo de absorção do ácido hidrocínâmico se encontra em 258nm. (Sadtler, 1960).

Os resultados obtidos demonstrando a conversão parcial do plasmídeo enovelado para a forma circular aberta é mais uma indicação da capacidade do radical de carbono em induzir quebras de fita simples em DNA.

III.II.5. Cálculos teóricos efetuados pelo método MNDO.

A habilidade de radicais livres centrados no carbono em alquilar DNA vem sendo discutida extensivamente a muitos anos.

Agentes alquilantes são capazes de reagir com muitos sítios do DNA, em particular, nos átomos N-7 e C-8 do anel das bases purínicas. (Duker et. al., 1985; Leite e Augusto, 1989; Maeda et. al., 1974; Zady e Wong, 1977).

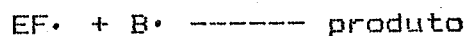
Em um trabalho de Duker e colaboradores (1985), estudos foram feitos para confirmar quais bases do DNA estavam envolvidas na fotoalquilação pelo isopropanol. Muitos outros autores consideraram, úteis modelos para ilustrar este ponto. (Maeda et. al., 1974; Nakayama et. al., 1984; Díaz Gómez e Castro, 1981).

A possível relevância do radical 2-feniletila promover alquilação no DNA foi previamente discutida por experimentos utilizando-se fenelzina tritiada e fósforo 32 como marcadores de fragmentos de DNA (Leite e Augusto, 1989).

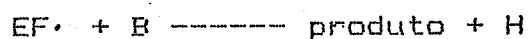
Com base em cálculos teóricos efetuados com o método MNDO, pudemos comprovar que os resíduos guanina e adenina são ambos preferencialmente atacados. Os resultados baseados nos índices de reatividade (Tabelas 2 e 3) sugerem que a posição 8 destas bases é privilegiada, condizendo com os resultados descritos na literatura por Duker e colaboradores (1985), Maeda e colaboradores (1974), e Simic (1988) para alquilação de DNA. De fato, a posição 8 é, dentre as posições 2,4 e 8 aquela que apresenta maior densidade de carga, devendo ser preferencialmente atacada por eletrófilos.

A Tabela 4 ilustra os cálculos de entalpia de reação (ΔH^0) para os seguintes tipos de reação a serem considerados:

a) Reação radicalar ou reação de acoplamento, onde ambas as espécies envolvidas (base e substrato) estão na forma radicalar.



b) Reação de substituição eletrofilica aromática, onde apenas o substrato está na forma radicalar. Este mecanismo foi proposto para substituição da cafeína pelo radical metila por Zady e Wong (1977).



c) Reação de substituição onde ambas as espécies estão na forma neutra.

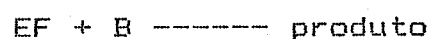


TABELA 2: Índices de Reatividade para Guanina

posição	Q(u.e.)	f _R (E)	f _R (N)	f _R (R)
1	-0,4002	0,0292	0,1330	0,0811
2	0,3996	0,1033	0,6784	0,3908
3	-0,3501	0,2967	0,0459	0,1713
4	0,1618	0,2546	0,4621	0,3584
5	-0,2271	0,5588	0,2570	0,4079
6	0,4637	0,0105	0,0091	0,0089
7	-0,1436	0,0922	0,0006	0,0464
8	0,0435	0,4002	0,1149	0,2576
9	-0,2339	0,0036	0,0179	0,0916
N-2	-0,3636	0,1172	0,1116	0,1144
O-6	-0,3192	0,1337	0,0076	0,0706

$$\mu = 5,6689 \text{ Db}$$

$$I_{PO} = 8,5622 \text{ eV}$$

$$\Delta H_f = 11,4482 \text{ Kcal/mol}$$

TABELA 3: Índices de Reatividade para Adenina

posição	Q(u.e.)	$f_R(E)$	$f_R(N)$	$f_R(R)$
1	-0,3806	0,0597	0,0031	0,0314
2	0,1974	0,1418	0,5334	0,3376
3	-0,3051	0,2595	0,1757	0,2175
4	0,1582	0,1329	0,0518	0,0924
5	-0,2143	0,4667	0,1952	0,3309
6	0,3436	0,1201	0,4525	0,2864
7	-0,1863	0,1370	0,0660	0,1015
8	0,0875	0,3087	0,3259	0,3173
9	-0,2559	0,0265	0,0991	0,0628
N-6	-0,3262	0,3471	0,0972	0,2221

$$\mu = 2,0340 \text{ Db}$$

$$I_{Po} = 8,8546 \text{ eV}$$

$$\Delta H_f = 56,5639 \text{ Kcal/mol}$$

TABELA 4: Entalpias de Reação (ΔH^0) (Kcal/mol)

reação	radicalar	subst. elet. arom.	subst.
G·+EF· (8)	-92,0773	28,0150	3,6517
G·+EF· (7)	-37,8949	42,6873	18,3240
A·+EF· (8)	-93,6500	27,3971	3,0338
A·+EF· (7)	-41,0479	45,1308	20,7675
C·+EF· (5)	-105,0017	33,8160	9,4527
C·+EF· (4)	-72,2802	31,6481	7,2848
C·+EF· (3)	-29,4594	52,4113	28,0480
T·+EF· (1)	-53,6158	47,0334	22,6701
T·+EF· (4)	-81,9994	35,7925	11,4292

Os números entre parênteses representam as posições nos anéis das bases.

O cálculo das entalpias de formação dos produtos e das bases e substratos radicalares e neutros estão indicados no apêndice 1.

Os resultados apresentados na Tabela 4 demonstraram haver uma preferência por uma reação de acoplamento em relação à reação de substituição eletrofílica aromática, embora tal processo não possa ser excluído mediante as observações experimentais descritas na literatura. (Steenken, 1989). Os valores de ΔH^0 para tais reações são positivos comparados aos valores negativos obtidos para a reação radicalar.

No caso a termodinâmica geral para a reação de substituição eletrofílica aromática implica em se considerarem as reações de terminação do processo, mas a etapa endotérmica principal inviabiliza o processo geral.

Ao compararmos o ataque nas posições 7 e 8 para guanina e adenina podemos propor que o ataque se dê, preferencialmente, na posição 8 da porção imidazólica dos anéis purínicos. (Tabela 4). Analizando-se cuidadosamente a tabela 4, verifica-se que os cálculos teóricos indicam a base citosina como preferencial ao ataque radicalar, apresentando um valor de $-105,0017$ Kcal/mol para o H^0 . Entretanto, devemos considerar cálculos teóricos são limitados em considerar as estabilidades das bases. No caso, a citosina deve ser pouco estável em sua forma radicalar, restabelecendo facilmente a forma neutra. Com base nos valores para as entalpias de formação dos produtos (tabela 10) e entalpias de formação das bases (tabela 9) a alquilação deveria ocorrer preferencialmente na timidina. Novamente, tal como a base citosina, a timidina deve ser altamente reativa na sua forma

radicalar podendo levar à formação de dímeros por exemplo. Tal hipótese é confirmada no trabalho de Nakayama e colaboradores (1984), onde apenas a base guanina radicalar é estável para ser detectada diretamente por EPR. As várias limitações dos métodos teóricos devem ser consideradas também para se analisar os valores dos índices de reatividade, já que as reações experimentais envolvem uma molécula de DNA altamente complexa, com estrutura dinâmica, com pontes de hidrogênio e ligações N-glicosídicas e fosfodiésteres.

Estando as bases desoxirribonucleotídicas ligadas ao anel ribose através da posição 9 da porção imidazólica, decidiu-se verificar o comportamento da entalpia de reação para as reações de acoplamento de guanina e adenina, impedidas estericamente em tal posição, com o radical 2-feniletila. Os resultados apresentados na Tabela 5 demonstram que nestas condições de reação a posição 8 de ambas as bases é, de fato, preferencialmente atacada pelo radical.

TABELA 5: Entalpias de Reação (ΔH^0) (Kcal/mol) para as bases guanina e adenina substituídas na posição 9 por metila

reação	ΔH^0 para a reação radicalar
MG· + EF· (8)	-86,2712
MG· + EF· (7)	-46,7024
MA· + EF· (8)	-91,0207
MA· + EF· (7)	-50,6580

Os números entre parênteses representam as posições nos anéis das bases.

III.II.6. Estudos por cromatografia líquida de alta pressão.

Na intenção de isolar e caracterizar os produtos da reação de DNA com o radical 2-feniletila, decidiu-se utilizar um método de separação que fosse direto e simples. Dadas as condições experimentais de trabalho, optou-se pela hidrólise completa do DNA obtendo-se as bases que puderam ser facilmente separadas cromatograficamente utilizando-se acetonitrila 5% em água como eluente (1,0ml/min) e uma coluna de fase reversa C-18.

Não foram detectados produtos para a reação utilizando-se detector U.V. embora este resultado não seja conclusivo quanto a formação de tais adutos, visto que as concentrações são, provavelmente, inferiores ao limite de detecção do aparelho. Um detector eletroquímico seria talvez mais conveniente, permitindo a caracterização dos produtos finais de interação da fenelzina com o DNA.

Entretanto pudemos estabelecer relações entre a guanina e a adenina (razão G/A) nos sistemas de reação para a fenelzina e ácido hidrocínâmico, averiguando-se alterações na composição das bases. (Tabela 6).

TABELA 6: Razão G/A

DNA	G/A
nativo	0,76
pré-irradiado por 1h, pH 6,8 ($265 < \lambda_{irr} < 375\text{nm}$)	0,78
pré-irradiado por 1h com ácido hidrocínâmico 0,55mM, pH 6,8 ($265 < \lambda_{irr} < 375\text{nm}$)	0,65
pré-incubado com fenelzina 2,0mM e 2,5 equivalentes de ferricianeto a 37°C por 30min, pH 8,0	0,56

Observou-se que com os tratamentos a razão diminuiu, uma vez demonstrado que a guanina é a base preferencialmente atacada. (Leite e Augusto, 1989). Resultado por nós confirmado.

O valor inferior detectado para o sistema de oxidação da fenelzina incorre da maior concentração de radical gerado na metabolização da droga por ferricianeto. Estes resultados confirmam a hipótese de ataque à base guanina verificada através de cálculos teóricos mostrados na seção anterior.

CAPITULO IV

DISCUSSAO

O agente antidepressivo, fenelzina, quando administrado em ratos é extensivamente metabolizado já que menos que 5% da droga inalterada é excretada num período de 8 horas. (Caddy et. al., 1978). Uma série de sistemas enzimáticos estão envolvidos no seu metabolismo oxidativo. Quando o composto é incubado com monoaminooxidase, a fenelzina é metabolizada e convertida para a hidrazona. (Tripton e Spires, 1972).

"In vitro" o composto foi também metabolizado quando incubado com a fração citosólica de fígado de rato e fígado humano. (Tilstone et. al., 1979).

Ortiz de Montellano e Watanabe (1987) demonstraram que a oxidação microsomal da fenelzina gerava o radical 2-feniletila como intermediário na formação de etilbenzeno. Este radical foi isolado e caracterizado por espectrometria de massa. (Ortiz de Montellano e Kerr, 1983).

Leite e Augusto (1989) sugeriram que oxihemoglobina promove a oxidação da fenelzina, bem como a reação mimética catalisada por ferricianeto, através do radical 2-feniletila. "In vivo" foi descrita a captação de um radical derivado da hemoglobina em ratos injetados com fenilidrazina ou fenelzina (Mason, 1984).

Recentemente foi sugerido que mieloperoxidase de neutrófilos, induzem formação de radical 2-feniletila podendo ter um papel importante na correlação entre sítios inflamatórios crônicos e a indução de certos tumores. (Leite, 1991).

Assim a conversão metabólica de derivados de hidrazina a radicais centrados no carbono pode ser catalisada por hemoproteínas, citocromo P450, horseradish peroxidase,

hemoglobina e prostaglandina sintetase entre outros.

Nossos estudos decorrem da importância em se estabelecer o mecanismo de participação do radical 2-feniletila na indução de alterações no DNA levando à indução de tumores. Nos sistemas estudados, consistentemente obtivemos o radical 2-feniletila.

Os experimentos de ressonância paramagnética eletrônica demonstram que a fotólise do ácido hidrocinâmico leva à formação do radical 2-feniletila. O espectro de EPR do radical aduto obtido quando a reação é realizada na presença do captador de spin, POBN, (Figura 12), apresenta parâmetros espectrais idênticos ao radical aduto 2-feniletila-POBN, obtido previamente na oxidação da fenelzina catalisada por ferricianeto e oxihemoglobina (Leite e Augusto, 1989). O mesmo radical aduto foi isolado e caracterizado na oxidação microsossomal da fenelzina. (Ortiz de Montellano e Kerr, 1983).

Segundo Mittal e colaboradores (1973) o principal processo envolvido ocorre através da liberação de um elétron em solução (e^-_{aq}) detectado pelos autores a 720nm (Esquema 5). Nenhuma outra absorção para o e^-_{aq} foi antes publicada.

Uma conclusão similar de formação do radical 2-feniletila foi obtida por Davies e colaboradores (1984) e Gilbert e colaboradores (1987) através da oxidação da cadeia lateral de ácidos carboxílicos substituídos por $\cdot OH$ e $SO_4^{\cdot -}$. (Esquema 3). Nestes casos a altos valores de pH, a protonação leva a um caminho de descarboxilação devendo envolver transferência eletrônica direta, em lugar de um intermediário σ . Este processo iniciado pelos radicais $\cdot OH$ e $SO_4^{\cdot -}$ foi utilizado em experimentos

com o DNA e comparado à interação com o radical 2-feniletila gerado na fotoirradiação do ácido hidrocínâmico e na oxidação química da fenelzina.

A confirmação da identidade do radical de carbono formado em nosso sistema foi obtida irradiando-se o peróxido de dihidrocinamoila. Sabe-se que na primeira região de absorção de peróxidos de alquila e arila (aproximadamente 280nm) a fotodissociação primária procede via ruptura da ligação RO-OR, fraca. Segundo Krusic e Kochi (1969) a formação do radical 2-feniletila ocorre através da fotólise do peróxido de dihidrocinamoila. De fato, os parâmetros obtidos dos espectros de EPR para tais espécies são consistentes com os valores obtidos para o radical 2-feniletila na oxidação química da fenelzina e na fotoirradiação do ácido hidrocínâmico. (Figura 13).

Uma vez estabelecido que o radical 2-feniletila é um importante produto da oxidação da fenelzina e também da fotólise do ácido hidrocínâmico, partimos para explorar a sua possível importância na indução de processos carcinogênicos provocados por este derivado.

Considerando-se que foi estabelecida uma correlação entre a potência carcinogênica de indução de quebras em DNA de derivados de hidrazina (Parodi et. al., 1981), bem como aspectos relacionados à interação do radical 2-feniletila, gerado através da oxidação da fenelzina, com o DNA (Leite e Augusto, 1989), investigamos a capacidade do radical de carbono gerado em nossos sistemas em interagir sítio-especificamente com o DNA.

A especificidade conformacional da variação da fluorescência do ion térbio como sonda, tem amplas aplicações para investigações de alterações em ácidos nucléicos. O efeito é observado tanto para resíduos desoxirribonucleotídicos como ribonucleotídicos. (Balcarová e Brabec, 1989).

Uma das explicações para a variação da fluorescência deriva da perturbação da estrutura eletrônica das bases com relação às pontes de hidrogênio. (Adams et. al., 1967).

Os dados da literatura suportam duas conclusões gerais ao aumento da fluorescência do ion térbio. Este fenômeno implica em ser uma sonda válida para:

- a) detectar resíduos guanina em ácidos nucléicos;
- b) detectar a extensão na qual os resíduos guanina foram modificados pela reação com carcinogênicos.

A utilidade do aumento da fluorescência do Tb(III) como ferramenta para a detecção e investigação da estrutura e função de ácidos nucléicos, em parte, depende de uma adequada compreensão das características dos ácidos nucléicos, as quais permitem tal aumento. Neste contexto, alguns aspectos do aumento da fluorescência do Tb(III) pelo RNA ou DNA foram revelados através de estudos a nível de nucleotídeos por Ringer e colaboradores (1978) e Formoso (1973).

Sabe-se que o aumento da fluorescência do ion Tb(III) pelo DNA é, primariamente, uma propriedade dos resíduos guanosina do DNA, principalmente em regiões de fita-simples, embora a variação da fluorescência não esteja relacionada às diferenças na estrutura primária do polímero. (Ringer et. al., 1985).

Nossos sistemas revelaram que quando o DNA foi submetido ao radical 2-feniletila, a complexação resultou em aumento da fluorescência, relativa ao DNA nativo. Este aumento pode derivar da ruptura de regiões de fita-dupla do DNA. A formação de sítios álcali-lábeis como proposto por Leite e Augusto (1989) alterando a estrutura secundária do DNA com destruição das pontes de hidrogênio e alterações no empilhamento normal das bases, favorece a complexação com Tb(III).

Segundo Ringer e colaboradores (1978) modificações nas posições 1; N-2; 7 ou 8 dos nucleotídeos guanínicos resultam em decréscimo da fluorescência do Tb(III). O efeito é derivado de alterações no estado eletrônico do anel contribuindo para as mudanças observadas na fluorescência. De fato, térbio é importante na detecção de interações de carcinogênicos com DNA e RNA. Um conceito chave na indução de câncer seria a ligação covalente do carcinogênico, ou de um metabólito ativado a macromoléculas funcionais intracelulares. (Kriek, 1974).

Em investigações de carcinogênicos específicos quanto aos sítios de ligação covalente aos ácidos nucleicos, demonstra-se que a guanina é o principal alvo de ataque, especificamente nas posições 7 e 8 da porção imidazólica. Recentemente Augusto e colaboradores (1990) demonstraram a formação de 8-metilguanina como resultado da alquilação de DNA por radicais metila gerados durante a oxidação de metilidrazina catalisada por horseradish peroxidase. Duker e colaboradores (1985) também propõem um derivado fotoalquilado na posição 8, na interação de DNA de plasmídeo com isopropanol.

Derivados alquilados "in vivo" foram detectados com relação à hepatotoxicidade de hidrazinas e trabalhos "in vivo" foram realizados recentemente por Augusto (1991) a fim de detectar o derivado alquilado na posição 8 da guanina tratada com hidrazina monossubstituída.

A hipótese de formação de um aduto guanínico alquilado na posição 8 quando o DNA foi submetido ao radical 2-feniletila é suportada pelos resultados apresentados por Leite e Augusto (1989). Experimentos sem sucesso foram conduzidos a fim de se detectar tal espécie e este fracasso primário não descarta tal possibilidade. Assim, de encontro à nossos resultados, seria razoável esperar que se tais adutos fossem formados a fluorescência com térbio deveria diminuir, concordando com os resultados publicados para o DNA submetido à $^{10}_2$ * no sistema de oxidação do malonaldeído (Justo et. al., 1990). Mas experimentos demonstram que perturbações na conformação de DNA dupla-fita ocorrem próximas a regiões de fita-simples. (Brabec e Palecek, 1972); Mingot et. al., 1978). Balcarová e Brabec (1989) reinterpretaram a fluorescência dos complexos DNA-Tb(III) investigando o efeito de drogas antitumorais sobre o DNA. As figuras 17-20 demonstram que mudanças na dupla hélice do DNA, resultando em um número maior de resíduos guanina capazes de interagir com Tb(III), aumentam a fluorescência do lantanídeo. Nossos resultados refletem que tal modificação no DNA podem derivar de dois fenômenos com efeitos opostos na variação de fluorescência do lantanídeo: a formação de regiões de fita-simples, resultando em um aumento proporcional de resíduos

guanossina acessíveis à reação com íon térbio, levando a um aumento na fluorescência relativa e por outro lado, o deslocamento do íon térbio dos sítios guanínicos alterados pela ligação da droga; resultando em inibição da fluorescência do íon. Em outras palavras a ação do radical 2-feniletila à dupla hélice do DNA deve resultar em formação de segmentos denaturados que fazem com que térbio seja hábil a reagir com a base guanina, elevando a intensidade de fluorescência, concordando com os resultados de Balcarová e Brabec (1989).

Fica claro, portanto, que o fotoproduto de ácido hidrocínâmico com DNA, formado durante a irradiação, bem como o derivado radicalar proveniente da oxidação da fenelzina por ferricianeto, tem uma influência disruptiva na integridade local da estrutura do DNA. Tais espécies alteram o espaçamento internucleotídico, rompem as ligações hidrogênio normais e causam perda do empilhamento das bases.

Nossos experimentos de hidrólise de DNA promovida pela reação com formaldeído (Figuras 14-16) confirmam as observações com o íon térbio. Regiões previamente denaturadas na molécula de DNA podem reagir prontamente com formaldeído. As regiões denaturadas aumentam em tamanho com a perda das ligações hidrogênio e empilhamento das bases, facilitando a reação adicional com formaldeído. Segundo Rahn (1973) a velocidade de reação, por exemplo, de DNA previamente irradiado com formaldeído pode também ser usada como uma medida quantitativa de alterações em DNA.

Os experimentos com formaldeído demonstraram uma diferença entre as amostras submetidas ao radical 2-feniletila e aquelas não tratadas. Segundo Schothorst e colaboradores (1983) os grupos amino das bases livres reagem com formaldeído a 25°C. As bases são ligadas por pontes de hidrogênio e a reação procede lentamente. Entretanto, em temperaturas elevadas existe uma "respiração" da hélice do DNA, e a 60°C a reação leva à completa denaturação em poucas horas.

A figura 14 mostra que a absorbância dos DNAs aumentam rapidamente principalmente na primeira hora, indicando, segundo Schothorst e colaboradores (1983), que o dano causado deva ser restrito a áreas de tamanho pequeno da dupla-fita do DNA.

4',-6-diamidino-2-fenilindol.2HCl (DAPI) é um corante fluorescente, tripanocida, que apresenta a estrutura indicada na figura 21.

Ele se liga reversivelmente às cadeias do DNA, mostrando um marcado aumento no rendimento quântico de fluorescência.

O mecanismo molecular de interação entre DAPI e DNA é ainda obscuro, apesar do grande uso da droga em bioquímica e citologia. O aumento de fluorescência associado à ligação de DAPI apenas a polímeros contendo "clusters" A-T sugerem uma interação forte. (Manzini et. al., 1983). De fato, estudos de dicroísmo circular claramente evidenciaram que DAPI interage de duas maneiras distintas com polidesoxirribonucleotídeos independentemente do conteúdo de suas bases e sequência. A única diferença consiste na força de interação: para um maior conteúdo de "clusters" A-T, uma maior constante intrínseca é exibida. (Kubista et. al., 1987).

Como indicado pelo comportamento exibido no aumento da concentração salina, ambos os sítios de ligação não são puramente eletrostáticos, sendo o sítio 1 menos influenciado pela força iônica. Por analogia com outras drogas que interagem com o DNA, netropsina por exemplo, e sob argumentos estéricos, Manzini e colaboradores (1983) propuseram que o sítio 1 está localizado no sulco secundário da hélice do DNA, caracterizado principalmente por duas ligações hidrogênio. Pares A-T localizados no sulco secundário ligam-se por pontes de hidrogênio entre o N-3 do anel purínico e O-2 do anel pirimidínico. Ligações hidrogênio entre o nitrogênio indólico e as bases do DNA no sítio 2 (provavelmente localizado no sulco primário) são menos favoráveis, dada a maior sensibilidade à força iônica, sendo menos estáveis. (Manzini et. al., 1983).

Uma baixa força de interação e a maior sensibilidade a sais demonstraram a ausência de ligações hidrogênio satisfatórias com pares de base C-G. Ainda não se estudou satisfatoriamente a estrutura eletrônica da molécula de DAPI e Kubista e colaboradores (1987) evidenciaram que pode haver interações entre moléculas de DAPI ligadas em dois sítios próximos.

Em ambos os sítios a molécula de DAPI mostrou ligar-se ao DNA de uma maneira não intercalativa com o eixo principal, ligando-se aproximadamente paralelo aos sulcos da hélice do DNA.

Com isto em mente tentamos checar a aplicação de DAPI como sonda de alterações induzidas no DNA. Nossos resultados mostraram um aumento na fluorescência relativa da molécula de DAPI complexada ao DNA, após tratamento. (Tabela 1). Prever qualquer

resultado relevante à interação de DAPI com os DNAs tratados seria difícil. Segundo Manzini e colaboradores (1983) a longa molécula de DAPI não pode fazer ligações hidrogênio dentro do mesmo par A-T sem ruptura da estrutura polimérica, mas pode se acomodar no sulco secundário e estabelecer ligações hidrogênio com pares A-T adjacentes. Não se sabe se isso é possível sem uma pequena mudança conformacional do polímero, visto que não há evidência referente a uma molécula de DAPI planar ou com certo grau de rotação na ligação entre os anéis fenil e indol. Estudos de dicroísmo circular poderiam fornecer informações adicionais relevante às interações de DAPI com o DNA, inclusive esclarecendo o efeito do radical 2-feniletila à dupla-hélice do DNA.

Associado à complexidade da interação de DAPI ao DNA sabemos que apenas suposições acerca da ligação do radical 2-feniletila ao residuo guanosina do DNA foram estabelecidas. Segundo o resultado apresentado para a complexação de DAPI com DNA tratado com malonaldeído, onde a base guanina reage com 10_2^* , sabemos que o conteúdo de resíduos guanosina diminui (Justo et. al., 1990) e quando comparado ao resultado obtido quando DNA é tratado nos sistemas geradores do radical de carbono podemos inferir que ainda é difícil se estabelecer modelos equivalentes para análise com DAPI. Seria necessário maior esclarecimento relevante à interação de DAPI com DNA e tal complexidade nos leva a propor, com base em nossos resultados, que apenas alterações na dupla hélice estão ocorrendo, favorecendo a complexação com DAPI. Informações acerca das regiões A-T são difíceis de serem obtidas para sequências de base diferentes de polímeros A-T.

Considerando-se que foi estabelecida uma correlação entre a potência carcinogênica e a potência de indução de quebras em DNA de derivados de hidrazina (Parodi et. al., 1981), investigamos a capacidade do radical de carbono gerado em nossos sistemas em induzir quebras em DNA de plasmídeo.

A conversão do plasmídeo na forma enovelada para a forma circular aberta, observada quando este é incubado com o sistema gerador do radical de carbono e submetido à eletroforese em gel de agarose, indicam que esta espécie é capaz de induzir quebras de fita em DNA. A capacidade do radical em danificar o DNA foi estabelecida em ambos os sistemas, fotoirradiação com ácido hidrocínâmico e oxidação química da fenelzina. (Figura 22). Sob as condições observadas, obteve-se uma boa correlação entre o rendimento do radical 2-feniletila e a extensão de quebra no DNA. (Figura 23). A fotoirradiação do ácido hidrocínâmico, bem como a oxidação da fenelzina por ferricianeto, sob atmosfera de nitrogênio, são importantes para determinar a reatividade do radical 2-feniletila em relação ao DNA; nestes casos, o radical é gerado sob baixas concentrações de oxigênio, evitando assim a formação de espécies ativas de oxigênio ($O_2^{\cdot -}$ e $\cdot OH$), inclusive a formação do radical peroxila, derivado da reação do radical 2-feniletila com oxigênio molecular. Esta última espécie tem sido responsabilizada por uma série de efeitos induzidos por radicais de carbono. (Brattin et. al., 1985).

A participação de outras espécies na indução do processo de quebra observado no DNA não pode ser totalmente eliminada, mas nossos resultados mostram que estes são processos secundários. Um

pequeno efeito de indução de quebras no DNA, observado quando este é incubado somente com fenelzina (Leite e Augusto, 1989) foi atribuído à formação do radical por autooxidação. O mesmo efeito foi observado quando o DNA é irradiado livre do ácido hidrocínâmico em nossos sistemas. Neste caso o efeito da luz U.V. sobre o DNA está bem caracterizado nos resultados com o plasmídeo.

Concordando com estes resultados, experimentos utilizando oxihemoglobina como catalisador na oxidação da fenelzina levam à formação do radical 2-feniletila e à indução de quebras em DNA. (Augusto et. al., 1984). Em conjunto, estes dados estabelecem claramente que o radical 2-feniletila é a principal espécie responsável pela indução de quebras de fita em DNA. O radical de carbono é capaz de induzir diretamente a quebra de fita no DNA; no entanto, segundo Leite e Augusto (1989) é mais eficiente na indução de sítios álcali-lábeis. Estes compreendem alterações no DNA que não provocam diretamente a quebra da cadeia de fosfato, mas quando este é submetido a um meio alcalino, a quebra de fita é induzida. Certos processos de alquilação são considerados como geradores de sítios álcali-lábeis (Maxam e Gilbert, 1980; Vadi e Reed, 1983). Leite e Augusto, (1989) observaram que quando o DNA de plasmídeo é submetido à concentrações mais elevadas do radical 2-feniletila, o processo de alquilação se torna evidente e o tratamento alcalino do DNA com piperidina provoca a fragmentação completa do DNA. Tal processo de formação de sítios álcali-lábeis não foi estudado em nosso sistema de irradiação embora não possamos excluir a indução de tal dano.

Ligação covalente de carcinogênicos químicos a macromoléculas celulares especialmente o DNA, é um passo crítico na iniciação de processos carcinogênicos. Muitos requerem prévia ativação metabólica a intermediários eletrofílicos antes de reagirem com os nucleófilos celulares. Geralmente os derivados de hidrazina sofrem transformações a metabólitos catiônicos radicalares; e espécies radicalares centradas no carbono são menos consideradas. (Augusto et. al., 1990).

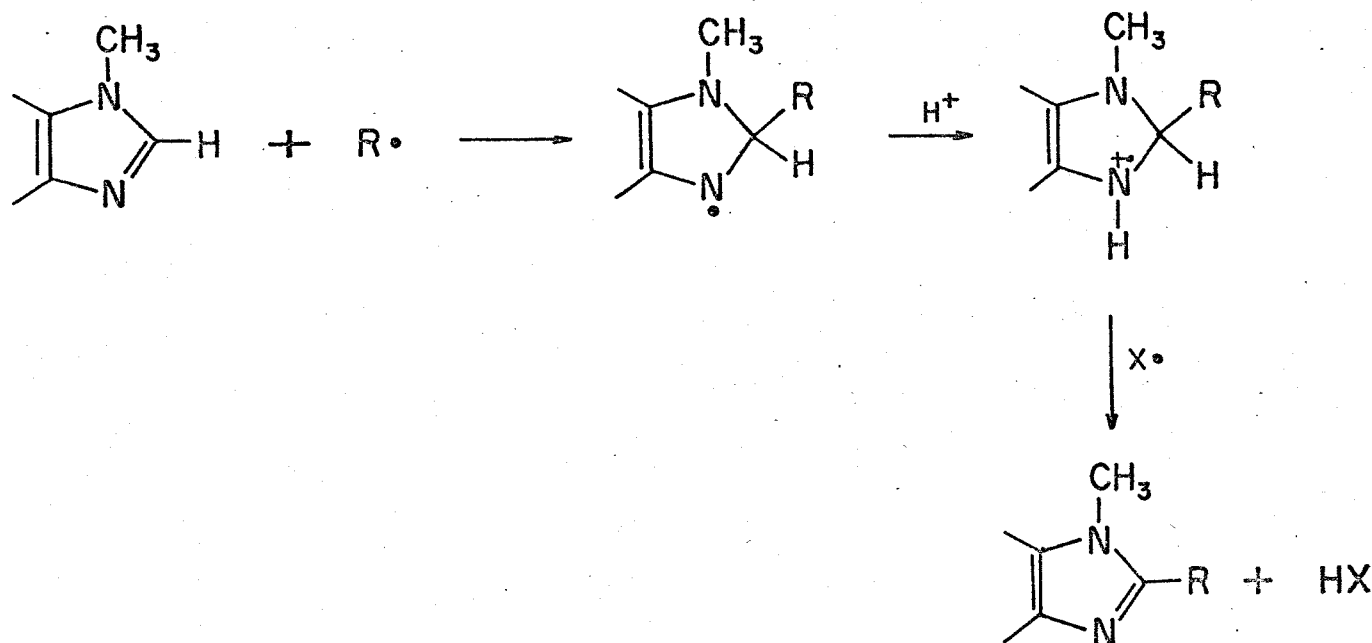
Alquilação de DNA por radicais metílicos em meio ácido ou gerados fotoquimicamente atacam guanina e adenina por substituição na posição 8 do anel purínico. Recentemente Augusto e colaboradores (1990) demonstraram a formação de 8-metilguanina como resultado do ataque ao DNA por radicais metílicos gerados durante oxidação de metilidrazina; e estudos vem sendo conduzidos na determinação "in vivo" de C-8 metilação na guanina do DNA de ratos (Augusto, 1991).

Entretanto a compreensão dos mecanismos de reação que levam às alquilações permanece ainda obscuro.

Nossos resultados teóricos demonstraram claramente a preferência de ataque, principalmente, pelas posições 7 e 8 da guanina e adenina confirmando os resultados apresentados na literatura como os de Augusto e colaboradores (1990), Leite e Augusto (1969), Díaz Gómez e Castro (1981), Duker e colaboradores (1985) e M. Maeda e colaboradores (1974).

Os dados de entalpia de reação obtidos sugerem dois mecanismos possíveis para a alquilação. Um deles está baseado no mecanismo de substituição eletrofílica aromática da cafeína por

radical metila, proposto por Zady e Wong (1977). (Esquema 7)



ESQUEMA 7: Mecanismo de substituição eletrofilica aromática da cafeína por radical metila

Tais mecanismos envolvendo formação de radicais cátions foram recentemente, revisados e discutidos por Steenken (1989). O autor propõe tanto reação preferencial com a posição 8 como com a posição 7 das bases guanina e adenina.

Nossa hipótese de reação radicalar está baseada principalmente no trabalho de Nakayama e colaboradores (1984) que detectaram radicais livres por EPR para a base guanina, nucleotídeo e polinucleotídeo, na interação de peróxido de metilnolenato.

Os valores para a entalpia de reação radicalar obtidos são negativos em relação aos valores positivos obtidos para a reação de substituição eletrofilica aromática. Podemos concluir que há grande possibilidade de ocorrência de tal mecanismo radicalar na promoção de alquilações em DNA, levando à processos deletérios.

Esta tese certamente contribui para esclarecer alguns pontos do envolvimento de radicais de carbono com biomoléculas e certamente reforça a necessidade de se aprofundar os estudos sobre as interações entre tais espécies em processos carcinogênicos.

CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Nossos resultados demonstram que o radical 2-feniletila é um produto importante da fotoirradiação do ácido hidrocínâmico, bem como da oxidação química da fenelzina.

Quando o DNA de timo de bezerro esteve presente nos sistemas de geração do radical 2-feniletila, ele sofreu mudanças conformacionais atribuídas às espécies radicalares formadas. Com base nas experiências realizadas, sugerimos que sua estrutura secundária tenha sido afetada, provavelmente devido à perda de ligações hidrogênio entre as bases, por alterações das mesmas.

A formação de regiões de fita-simples deve ocorrer, de acordo com o aumento de fluorescência do complexo DNA-Tb(III) e do complexo formado com o tripanocida DAPI. Certamente estudos envolvendo dicroísmo circular forneceria maiores informações com relação às alterações conformacionais induzidas no DNA.

Nossos resultados comprovam a hipótese de Leite e Augusto (1989) de que o radical 2-feniletila, gerado durante a oxidação da fenelzina pela oxihemoglobina, é capaz de escapar do sítio ativo da proteína e induzir a formação de quebras de fita no DNA, considerando que pouca atenção tem sido dada às interações entre radicais de carbono e biomoléculas. Estes resultados reforçam a necessidade de se aprofundar os estudos sobre estas interações, para estabelecer o envolvimento de radicais de carbono em processos deletérios, inclusive na carcinogênese.

A preferência dos radicais de carbono por ataque às guaninas em conjunção com a hipótese destes serem capazes de alquilar o

DNA, levanta a questão sobre a estrutura dos adutos formados. A caracterização destes adutos será fundamental para estabelecer o papel destas espécies na indução de processos carcinogênicos.

Em suma, dentro do contexto da investigação dos intermediários reativos envolvidos na indução de processos carcinogênicos por derivados de hidrazina, esta tese esclarece alguns pontos do mecanismo pelo qual esses radicais poderiam promover esta indução.

SUMARIO

A fotoirradiação do ácido hidrocínâmico, bem como do peróxido de dihidrocinaoila, geram eficientemente o radical 2-feniletila, como demonstrado por experimentos de captação de spin.

Na oxidação do anti-depressivo fenelzina (2-feniletilidrazina), promovida por ferricianeto, a formação do radical 2-feniletila demonstrada recentemente por outros pesquisadores comprovam nossos resultados. Estudos recentes demonstraram que o radical 2-feniletila também é um importante produto da oxidação da fenelzina catalisada por oxihemoglobina, microsossomos de fígado de rato e neutrófilos.

A possível relevância de radicais de carbono na indução de processos carcinogênicos por derivados de hidrazina foi explorada por estudos de interação entre o radical 2-feniletila, gerado nos sistemas químico e fotoquímico, e na presença do DNA. O radical de carbono gerado em nossas reações induz quebras de fita-simples em DNA de plasmídeo pBR 322. Experimentos envolvendo complexação de DNA de timo de bezerro com Tb(III) e DAPI (4',6'-diamidino-2-fenilindol), bem como hidrólise com formaldeído comprovam tal afirmação. A hipótese de uma boa correlação entre a extensão de quebras no plasmídeo e a formação do radical 2-feniletila deriva destes experimentos.

O radical tem preferência por ataque a resíduos de guanina, como observado por experimentos de cromatografia líquida de alta pressão e cálculos teóricos efetuados pelo método MNDO (modified

neglect differential overlap). Os resultados indicam que o radical 2-feniletila é, além de produto da oxidação da fenelzina, também resultado importante da irradiação do ácido hidrocínâmico sob anaerobiose e que esta espécie pode danificar o DNA.

Este trabalho complementa dois aspectos que devem ser considerados para se analisar a relevância da ocorrência de espécies radicalares de carbono em processos biológicos. Um deles está relacionado com as consequências que tais espécies causam nas células, referente aos danos oxidativos. O outro está relacionado com o papel funcional destes radicais nos sistemas biológicos como iniciadores dos mecanismos de carcinogênese, nos quais poderiam estar envolvidos processos mutagênicos.

SUMMARY

The photoirradiation of the hydrocinnamic acid (3-phenylpropionic acid), likewise dihydrocinnamoyl peroxide, efficiently generates the 2-phenylethyl radical, as demonstrated by spin-trapping experiments.

In the oxidation of the anti-depressant, phenelzine (2-phenylethyldiazine), promoted by ferricyanide the formation of the carbon centered radical was also demonstrated by other researchers that confirmed our results.

Recent results showed that the 2-phenylethyl radical is also an important product of the microsomal oxidation and in the catalysis by oxyhemoglobin.

The relevance of carbon-centered radicals in induced carcinogenesis is explored by studies of interaction between the 2-phenylethyl radical and the DNA. The carbon-centered radical, generated in our reactions, induces DNA strand scission in pBR 322. Complexation of the DNA with Tb(III) and DAPI studies, likewise hydrolysis with formaldehyde have a clear correlation between the 2-phenylethyl radical formation and the strand scission activity.

The carbon-centered radical has a selectivity for attacking guanine residues as established by liquid chromatography and theoretical calculations (MNDO method).

The results indicate that the 2-phenylethyl radical is an important product in the photochemical system and that this species can directly damage DNA.

This work shows two aspects that might be considered to analyse the relevance of radical species in biological process: the consequences regarding oxidative damages at cellular levels and their role in biological systems as initiators of carcinogenic mechanisms, including mutagenic process.

BIBLIOGRAFIA

- Adams, A., Lindahl, T. e Fresco, J. R., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 57, 1684 (1967).
- Ames, B. N. e Dubin, T., J. Biol. Chem., 235, 769 (1970).
- Augusto, O., Kunze, K. E. e Ortiz de Montellano, P. R., J. Biol. Chem., 257, 6231 (1982).
- Augusto, O., Faljoni-Alário, A., Leite, L. C. C. e Nóbrega, F. G., Carcinogenesis, 5, 781 (1984).
- Augusto, O., DuPlessis, L. R. e Weingrill, C. L. V., Biochem. Biophys. Res. Commun., 126, 853 (1985).
- Augusto, O., "Handbook of Biomedicine of Free Radicals and Antioxidantes", J. Miguel ed., CRC Press, N.Y., Vol. III, 193 (1989).
- Augusto, O., Cavaliere, E. L., Rogan, E. G., Ramakrishna, N. V. S. e Kolar, C., J. Biol. Chem., 265, 22093 (1990).
- Augusto, O., SBBq, Resumos da XX Reunião Anual, Caxambú, MG, 11 (1991).
- Balcarová, Z. e Brabec, V., Biophys. Chem., 33, 55 (1989).
- Barker, R., "Organic Chemistry of Biological Compounds", Lowell Hager e Finn Wold eds, Prentice-Hall, N.J., 281 (1971).
- Birboim, H. C. e Doly, J., Nucleic Acids Res., 7, 1513 (1979).
- Borg, D. C., "Free Radicals in Biology", W. A. Pryor ed, Academic Press, N.Y., Vol. I, 69-147 (1972).
- Boxembaun, H., Drug Metab. Rev., 14, 1057 (1983).
- Brabec, V. e Palecek, E., Biopolymers, 11, 2577 (1972).
- Brattin, W. J., Glende Jr., E. A. e Recknagel, R. D., J. Free Rad. Biol. Med., 1, 27 (1985).
- Brunk, C. F. e James, T. W., Abst. 7th Ann. Meeting Am. Soc. Cell Biol., 136a, CR618 (1988).
- Caddy, B., Stead, A. H. e Johnstone, E. C., Br. J. Clin. Pharmacol., 6, 185 (1978).
- Cassarett e Doull, J., "Toxicology, The Basic Science of Poisons", C. Klaasen, M. Amdur e J. Doull eds, Macmillan Pub. Comp., N.Y., 3rd ed., 33-98 (1986).

- Castro, J. A., Proceedings of the IUPHAR 9th International Congress of Pharmacology, Macmillan Press Ltda, Vol II, 245 (1984).
- Chalfont, G. R., Perkins, M. J. e Horsfield, A., J. Am. Chem. Soc., 90, 7141 (1968).
- Chargaff, E., Experientia, 6, 201 (1950).
- Costa, S. O. P. (ed), "Genética Molecular e de Microorganismos, Os Fundamentos da Engenharia Genética", Editora Manole Ltda, S.P. 1-38 e 117-134 (1987).
- Crooke, S. T. e Prestayko, A. W. (eds), "Cancer and Chemotherapy", Academic Press, N.Y., Vol I-III (1980).
- Díaz Gómez, M. I. e Castro, J. A., Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol., 32, 147 (1981).
- Davidson, J. N. (ed), "The Biochemistry of Nucleic Acids", Cox & Wyman, G.B., 23 e 29 (1972).
- Davies, M. J., Gilbert, B. C., McClelland, C. W., Thomas, C. B. e Young, B., J. Chem. Soc., Chem. Commun., 966 (1984).
- Dewar, M. J. S. e Thiel, W., J. Am. Chem. Soc., 99, 4899 (1977).
- Dewar, M. J. S. e Thiel, W., J. Am. Chem. Soc., 89, 2145 (1985).
- Duker, N. J., Jensen, D. E. e Hart, D. M., Rad. Res., 103, 114 (1985).
- Epling, G. A. e Lopes, A., J. Am. Chem. Soc., 99, 2700 (1970).
- Evans, C. A., Aldrichimica Acta, 12, 23 (1979).
- Formoso, C., Biochem. Biophys. Res. Commun., 53, 1084 (1973).
- Fukui, K., "Theory of Orientation and Stereoselection", K. Hafner, C. W. Rees, B. M. Trost, J-M. Lehn, P. von R. Schleyer e R. Zahradnik eds, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, N.Y. (1975).
- Gilbert, B. C., Scarrat, C. J., Thomas, C. B. e Young, J., J. Chem. Soc. Perkin Trans. II, 371 (1987).
- Gomori, G., Methods Enzymol., 1, 967 (1975).
- Goodman, L. S. e Gilman, A. (eds), "The Pharmacological Bases of Therapeutics", Macmillan Publishing Co., N.Y., 5th ed. (1975).
- Hill, H. A. O. e Thornally, P. J., Biochim. Biophys. Acta, 762, 44 (1983).

- Hodgson, E. e Guthrie, F. E. (eds), "Introduction to Biochemical Toxicology", Elsevier, N.Y. (1980).
- Hurst, D. T. (ed), "Chemistry and Biochemistry of Pyrimidines, Purines and Pteridines", John Wiley & Sons Ltd, G.B., 15 (1979).
- Innocentini-Mei, L. H., Tese de Doutorado, UNICAMP, 59 (1986).
- Janzen, E. G. e Blackburn, B. J., J. Am. Chem. Soc., 90, 5909 (1968).
- Janzen, E. G., "Free Radicals in Biology", W. A. Pryor ed, Academic Press, N.Y., Vol IV, 115-151 (1980).
- Janzen, E. G., Stranks, H. J., Dubose, C. M., Poyer, J. L. e MacCay, P. B., Env. Health Pers. 64, 151 (1985).
- Jope, C., James, T. W. e Wildman, S. G., Abstracts 7th Ann. Meeting Am. Soc. for Cell Biol., 304a, MC413 (1988).
- Juchau, M. R. e Horita, A., Drug Metab. Rev., 1, 71 (1972).
- Justo, G. Z., Innocentini-Mei, L. H. e Durán, N., An. Acad. Bras. Ci., 62, 31 (1990).
- Kalyanaraman, B. e Sivarajah, K., "Free Radicals in Biology", W. A. Pryor ed, Academic Press, N.Y., Vol VI (1984).
- Kapuscinski, J. e Skocylas, B., Anal. Biochem., 83, 252 (1977).
- Kelmers, A. D., Hancher, C. W., Phares, E. S. e Novelli, G. D., Methods Enzymol., 20, 3 (1971).
- Kilgour, G. L. (ed), "Fundamentals of Biochemistry", D. Van Nostrand Co., N.Y., cap. 18 e 19 (1981).
- Kopecký, J. e Liska, F., Chem. Listy, 72, 577 (1978).
- Kriek, E., Biochim. Biophys. Acta, 355, 177 (1974).
- Krueger, P. J., "The Chemistry of Hydrazo, Azo and Azoxy Groups", S. Patai ed, John Wiley & Sons, N.Y., par. I, 159-167 (1975).
- Krusic, P. J. e Kochi, J. K., J. Am. Chem. Soc., 91, 3940 (1969).
- Kubista, M., Akerman, B. e Nordén, B., Biochemistry, 26, 4545 (1987).
- Lehninger, A. L., "Principles of Biochemistry", S. Anderson e J. Fox eds, Worth Publishes Inc., N.Y. (1982).
- Leite, L. C. C. e Augusto, O., Arch. Biochem. Biophys., 270, 560 (1989).

- Leite, L. C. C., SBBq, Resumos da XX Reunião Anual, Caxambú, MG, 227 (1991).
- Lewin, S., Arch. Biochem. Biophys., 113, 584 (1966).
- Maeda, M., Nushi, K. e Kawazoe, Y., Tetrahedron, 30, 2677 (1974).
- Mahler, H. R. e Cordes, E. H. (eds), "Biological Chemistry", Harper & Row Publ., 194 (1971).
- Manzini, G., Barcellona, M. L., Avitabile, M. e Quadrifoglio, F., Nucleic Acids Res., 11, 8861 (1983).
- Mason, R. P., "Spin Labelling in Pharmacology", J. L. Holtzman ed, Academic Press, N.Y., 87-129 (1984).
- Maxam, A. M. e Gilbert, W., Methods Enzymol., 65, 499 (1980).
- Meselson, M., Stahl, F. W. e Vinograd, J., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 43, 581 (1975).
- Miller, J. A., Cancer Res., 30, 559 (1970).
- Mingot, F., Jorcano, J. L. e Davila, C. A., Biochim. Biophys. Acta, 520, 1 (1978).
- Mittal, L. J., Mittal, J. P. e Hayon, E., J. Phys. Chem., 77, 2267 (1973).
- Moloney, S. J. e Prough, R. A., "Reviews in Biological Toxicology", E. Hodgson, J. R. Bend e R. M. Philpot eds, Elsevier, N.Y., Vol V, 313-348 (1983).
- Moloney, S. J., Weibkin, P., Cummings, S. W. e Prough, R. A., Carcinogenesis, 6, 397 (1985).
- Nakayama, T., Kodama, M. e Nagata, C., Agric. Biol. Chem., 48, 571 (1984).
- Netto, L. E. S., Leite, L. C. C. e Augusto, O., Brazil. J. Med. Biol. Res., 20, 865 (1987).
- Novak, M., Miller, A., Bruice, T. e Tollin, G., J. Am. Chem. Soc. 102, 1465 (1980).
- Ortiz de Montellano, P. R., Augusto, O., Viola, F. e Kunze, K. L., J. Biol. Chem., 258, 8623 (1983).
- Ortiz de Montellano, P. R. e Kerr, P. R., J. Biol. Chem., 285, 10558 (1983).
- Ortiz de Montellano, P. R. e Watanabe, M. D., Molec. Pharmacol., 31, 213 (1987).

- Parodi, S., De Flora, S., Carvanna, M., Pino, A., Robbiano, L., Benniselli, C. e Brambilla, G., *Cancer Res.*, 41, 1469 (1981).
- Perkins, M. J., *Adv. Phys. Org. Chem.*, 17, 1 (1980)
- Prados, R., Stadthen, L. G., Donatato, H. e Martin, R. B., *J. Inorg. Nucl. Chem.*, 36, 689 (1974).
- Rahn, R., "Photophysiology VIII", A. C. Grese ed, Academic Press, N.Y., 231 (1973).
- Ringer, D. P., Burchett, S. e Kizer, D. E., *Biochemistry*, 17, 4818 (1978).
- Ringer, D. P., Howell, B. A. e Kizer, D. R., *Anal. Biochem.*, 103, 337 (1980).
- Ringer, D. P., Etheridge, J. L. e Kizer, D. E., *J. Inorg. Biochem.*, 24, 137 (1985).
- Rudman, A., Faoletti, S. e Brittain, H. G., *Inorg. Chem.*, 24, 1285 (1985).
- Sadtler, S., "The Sadtler", 2270 UV (1960).
- Saffhil, R., Margison, G. P. e O'Connor, P. J., *Biochem. Biophys. Acta*, 823, 11 (1985).
- Schothorst, A. A., Suurmond, D. e Schouten, R., *Photochem. Photobiol.*, 38, 659 (1983).
- Simic, M. G., *Mut. Res.*, 202, 377 (1988).
- Steenken, S., *Chem. Rev.*, 89, 503 (1989).
- Stewart, J. J. P., MOPAC, A semiempirical Molecular Orbital Programm, QCPE, 455 (1983).
- Tilstone, W. J., Margot, P. e Johnstone, E. C., *Psychopharmacology*, 60, 261 (1979).
- Topal, M. D. e Fresco, J. R., *Biochemistry*, 19, 5531 (1980).
- Toth, B., *Cancer Res.*, 36, 917 (1976).
- Tripton, K. F. e Spires, I. P. C., *Biochem. Pharmacol.*, 21, 268 (1972).
- Vadi, H. V. e Reed, D. J., *Chem. Biol. Interactions*, 46, 67 (1983).
- Van Beek, H. C. A., Heertjes, P. M. e Schaafisma, K., *Recueil*, 92, 1189 (1973).

Yamazaki, I., "Free Radicals in Biology", W. A. Pryor ed, Academic Press, N.Y., Vol III, 183-195 (1977).

Wang, S. Y. (ed), "Photochemistry and Photobiology of Nucleic Acids", Academic Press, N.Y., Vol II, 2 (1976).

Watson, J. D. e Crick, F. H. C., Nature, 171, 964 (1934).

White, A., "Principles of Biochemistry", P. Handler e E. L. Smith eds, McGraw-Hill, 4th ed., 181 (1968).

Wieland, H., Schapiro, S. e Metzger, H., Ann., 513, 93 (1934).

Zady, M. F. e Wong, J. L., J. Am. Chem. Soc., 99, 5096 (1977).

APENDICE 1

Tabela 7: Índices de Reatividade para Timidina

posição	Q(u.e.)	f _R (E)	f _R (N)	f _R (R)
1	-0,4065	0,0000	0,0302	0,0151
2	0,4847	0,0019	0,0163	0,0091
3	-0,3549	0,2405	0,0475	0,1440
4	0,1798	0,1595	0,4849	0,3222
5	-0,2615	0,4269	0,2466	0,3368
6	0,4185	0,0003	0,0870	0,0436
O-6	-0,3298	0,0612	0,1150	0,0881
O-2	-0,3633	0,0535	0,0098	0,0316
CH ₃ -5	0,1038	0,0121	0,0006	0,0064

$$\mu = 4,0901 \text{ Db}$$

$$I_{p0} = 9,7812 \text{ eV}$$

$$\Delta H_f = -71,9735 \text{ Kcal/mol}$$

Tabela 8: Índices de Reatividade para Citosina

posição	Q(u.e.)	f _R (E)	f _R (N)	f _R (R)
1	-0,3916	0,1652	0,1129	0,1391
2	0,4368	0,0012	0,0049	0,0031
3	-0,3635	0,1971	0,0980	0,1476
4	0,1837	0,1021	0,4287	0,2654
5	-0,2756	0,3532	0,1226	0,2379
6	0,3278	0,0018	0,1874	0,0946
O-2	-0,3427	0,1782	0,0040	0,0911
N-6	-0,3427	0,0013	0,0416	0,0214

$$\mu = 6,0228 \text{ Db}$$

$$I_{p0} = 9,4087 \text{ eV}$$

$$\Delta H_f = -10,4775 \text{ Kcal/mol}$$

Tabela 9: Entalpia de Formação para as bases nas formas neutra e radicalar (ΔH_f) (Kcal/mol)

base	forma neutra		forma radicalar	
	(5)	(3)	(4)	(1)
citosina	-10,4775	76,2382	31,3488	19,2912
timidina	-71,9735	46,6776	-6,2836	-23,4263
adenina	56,7714	125,7165	90,8481	
guanina	11,7044	79,6947	40,1846	

Os números entre parênteses representam as posições nos anéis das bases.

Tabela 10: Entalpia de Formação de Produtos (ΔH_f) (Kcal/mol)

produto	ΔH_f		
etilfenilcitosina	(5) 7,7322	(4) 5,5643	(3) 26,3275
etilfeniltimidina	(1) -40,5464	(4) -51,7873	
etilfeniladenina	(8) 68,5622	(7) 86,2959	
etilfenilguanina	(8) 24,1131	(7) 38,7854	

Os números entre parênteses representam as posições nos anéis das bases.

Tabela 11: Entalpia de Formação de Produtos (ΔH_f) (Kcal/mol)

produto	posição	ΔH_f
etilfenilmetiladenina	(8)	70,1223
	(7)	110,4850
etilfenilmetilguanina	(8)	23,2187
	(7)	62,7867

Tabela 12: Entalpia de Formação de Produtos nas formas radicalar e neutra (ΔH_f) (Kcal/mol)

produto	forma radicalar	forma neutra
etilfenil	36,4957	8,7570
9-metiladenina	124,6473	
9-metilguanina	72,9918	

$\Delta H_f H\cdot = 52,1179$ Kcal/mol

APENDICE 2

O Método do Captador de Spin

A detecção direta de radicais livres foi possível após o surgimento da ressonância paramagnética eletrônica, através das propriedades dos elétrons desemparelhados. Entretanto, devido a alta reatividade dos radicais livres, eles apresentam um curto tempo de vida em fase condensada dificultando a obtenção de concentrações satisfatórias para detecção no estado estacionário.

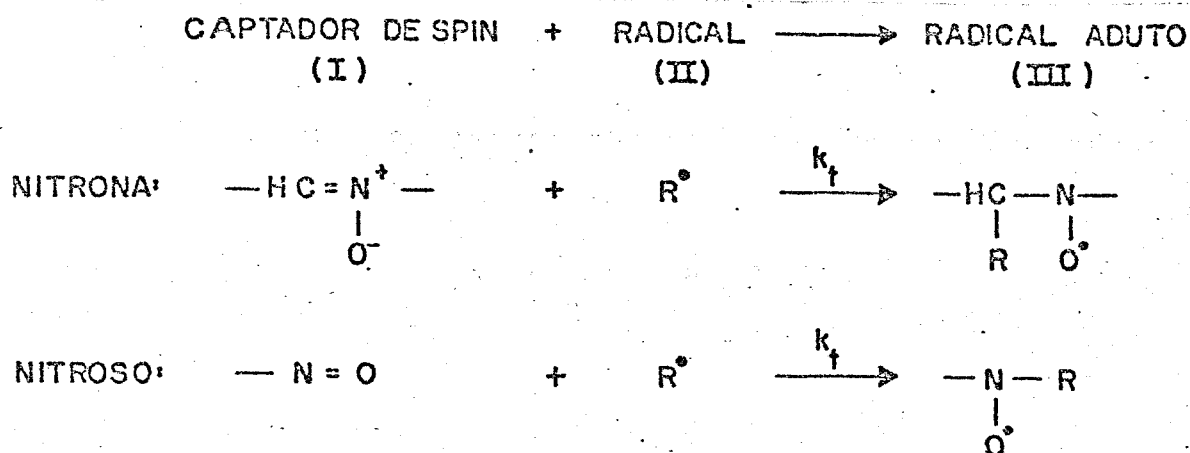
Para detecção por EPR é necessário obter uma concentração maior que $10^{-8}M$, e de 100 a 1000 vezes este valor para uma resolução razoável do espectro do radical. O tempo de medida mínimo está na ordem de décimos de segundo, enquanto que o tempo de vida dos radicais em solução em geral são bem menores que 1 milissegundo; com isto, as concentrações de estado estacionário se mantêm, em geral, abaixo de $10^{-7}M$.

Algumas técnicas, como radiólise in situ de aumento de energia, fotólise de alta intensidade, resfriamento e técnicas de fluxo contínuo, foram utilizadas, mas estas em geral são dispendiosas e de aplicabilidade limitada em sistemas biológicos. (Yamazaki, 1977; Borg, 1972).

Assim a detecção por EPR em sistemas biológicos era restrita aos radicais mais estáveis. A técnica da captação de spin foi introduzida em 1968 (Janzen e Blackburn, 1968; Chalfont et. al., 1968) possibilitando um desenvolvimento extensivo no estudo do envolvimento de radicais livres no metabolismo de muitos

xenobióticos.

A técnica de captação de spin consiste em empregar um composto diamagnético, o captador de spin (I) que ao reagir com um radical livre instável (II) leva ao acúmulo de um radical aduto secundário, relativamente estável (III), detectável por EPR em fase líquida e à temperatura ambiente. (Esquema 8).



Esquema 8: Reação de captação de spin por nitronas e nitroso derivados

Os captadores de spin ao reagirem com um radical livre produzem um radical aduto nitróxido de estabilidade conhecida. Os nitróxidos contêm um elétron desemparelhado, deslocalizado entre o nitrogênio e o oxigênio conferindo sua estabilidade. Seu espectro de EPR apresenta pelo menos três linhas, um desdobramento hiperfino devido ao momento magnético do nitrogênio ($I=1$). Núcleos com momentos magnéticos nos substituintes ligados ao nitrogênio do nitróxido podem produzir outros desdobramentos

hiperfinos.

Os captadores de spin empregados contém, na sua maioria, os grupos funcionais nitrona ou nitroso. (Evans, 1979) (Esquema 8). Os captadores de spin da classe das nitronas sempre terão um hidrogênio no carbono- α , e portanto, o radical aduto derivado de qualquer radical captado terá 6 linhas, ou 4 linhas quando as constantes de desdobramentos hiperfinos coincidirem. Neste caso, a diferença entre os radicais adutos derivados de diferentes radicais primários com um mesmo captador, estará nos valores das constantes de desdobramentos hiperfinos do nitrogênio (a^N) e do hidrogênio (a^H), o que não é suficiente para uma identificação inequívoca da estrutura do radical captado. (Janzen, 1980; Janzen et. al., 1985).

Os captadores pertencentes à classe dos nitroso derivados oferecem mais informações sobre a estrutura do radical captado, uma vez que esse se liga diretamente ao nitrogênio do captador e os desdobramentos hiperfinos devidos ao radical primário são observáveis. No entanto, nitroso derivados são térmica e fotoquimicamente instáveis, formando dímeros inertes. Além disto, estes compostos tem baixa solubilidade em água, o que dificulta a sua utilização em sistemas biológicos. (Perkins, 1980).

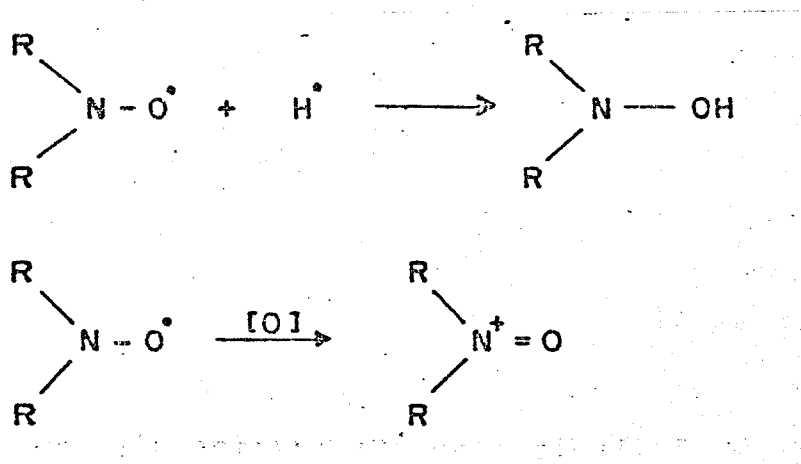
Uma abordagem que foi utilizada com sucesso na identificação do radical primário, foi no metabolismo microssomal da fenelzina, onde o radical 2-feniletila-POBN foi purificado e caracterizado por espectrometria de massa. Outra abordagem é a substituição isotópica no composto precursor do radical, no elemento onde será localizado o elétron desemparelhado, o que provoca o aparecimento

de desdobramentos hiperfinos adicionais no espectro de EPR.

O uso desta técnica está se tornando bastante difundido, dada sua simplicidade requerendo pequenas quantidades de material, além de ser a única para detectar radicais altamente transientes em fases condensadas. Entretanto, o método apresenta vários problemas inerentes principalmente a sistemas biológicos complexos. (Janzen, 1980; Janzen et. al., 1985; Augusto, 1986).

Assim, deve-se considerar a escolha do captador adequado quanto a velocidade de reação de captação e a estabilidade do radical aduto formado no meio de reação. Em geral, as reações de captação podem competir com outras reações radicalares, quando utilizadas altas concentrações de captador.

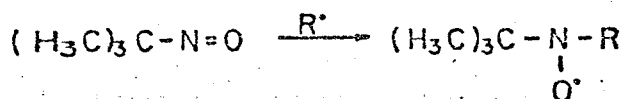
A estabilidade dos radicais adutos é menos estudada. Os processos mais comuns de decaimento dos nitróxidos são por redução ou por oxidação (Esquema 9), anulando o sinal de EPR.



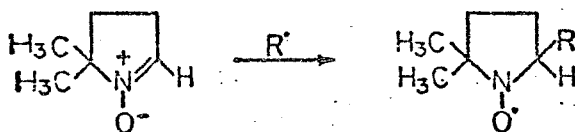
Esquema 9: Processos mais comuns de Decaimento de Nitróxidos

Levando-se em consideração estes fatores, os captadores de spin mais utilizados são PBN, POBN e t-NB; e DMPD, para radicais de carbono e de oxigênio respectivamente. (Esquema 10).

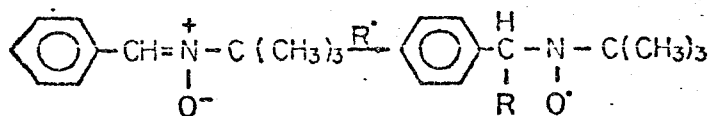
4. **tert-NITROSOBUTANO (t-NB)**



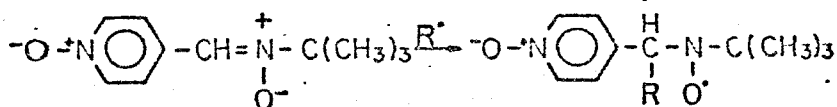
5,5-DIMETILPIRROLINA-N-OXIDO (DMPD)



FENIL-tert-BUTILNITRONA (PBN)



α-(4-PIRIDIL-1-OXIDO)N-tert-BUTILNITRONA (POBN)



Esquema 10: Captadores de spin mais utilizados

A quantificação de radicais formados é mais complexa, uma vez que a formação do radical aduto é, em geral, menor do que a formação do radical primário. Todavia, manipulações do sistema podem ser usadas para estudar os fatores relevantes na formação do radical e para fazer correlações, já que a intensidade

integrada do sinal de EPR é proporcional à concentração do radical. (Janzen et. al., 1985; Augusto et. al., 1985).

Apesar dos problemas inerentes ao método, a técnica, quando criteriosamente aplicada, é um instrumento poderoso para a investigação de aspectos mecanísticos de processos fisiológicos envolvendo radicais livres. Com sua aplicação é possível não só detectar a formação de radicais livres e até sua estrutura, como também estabelecer seu envolvimento em alterações de um alvo biológico.