

BIBLIOTECA

INSTITUTO DE QUÍMICA

Universidade de São Paulo

16664

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE QUÍMICA

PARTICIPAÇÃO DE RADICAIS LIVRES CENTRADOS EM  
ÁTOMOS DE CARBONO NA TOXICIDADE DE HIDRAZINA

LIGIA FERREIRA GOMES

Tese de Doutorado  
OHARA AUGUSTO  
ORIENTADORA

SÃO PAULO  
1996

**“PARTICIPAÇÃO DE RADICAIS LIVRES  
CENTRADOS EM ÁTOMOS DE CARBONO NA  
TOXICIDADE DE HIDRAZINA”.**

**LIGIA FERREIRA GOMES**

Tese de Doutorado submetida ao Instituto de Química da  
Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à  
obtenção do grau de Doutor em Ciências - Área: Bioquímica.

Aprovada por:



---

Profa. Dra. Ohara Augusto  
IQ-USP  
(Orientadora e Presidente)



---

Prof. Dr. Etelvino José Henriques Bechara  
IQ-USP



---

Prof. Dr. Paolo Di Mascio  
IQ-USP



---

Prof. Dr. Nelson Eduardo Duran Caballero  
IQ - UNICAMP



---

Prof. Dr. Hugo Pequeno Monteiro  
Hemocentro

Para Cilô, Hernan, Iolanda e Sandra,

que me ensinaram muito  
sobre a importância de escolher  
os caminhos para viver a História.

Para meus pais e para minha avó,

pelo amor e pela confiança.

Para André e Débora,

pela alegria.

## AGRADECIMENTOS

À Ohara, pela oportunidade de aprender com ela,

À Virgínia, pelo auxílio nos ensaios com os animais e pelas inúmeras vezes que abriu seu laboratório para estudo ou trabalho experimental,

Aos colegas do FBC, especialmente ao Altair, à Lúcia e à Primavera, pela colaboração e amizade na divisão de tarefas durante este período, e ao Domênico, com saudade,

À Mari e ao Rogério por colocarem os seus laboratórios à disposição e pelo auxílio nos ensaios com células,

Ao Sílvio, pelas parcerias no laboratório e pela coleta da bile dos animais, à Berê e à Edlaine, pela dedicação em manter o laboratório um lugar confortável e bonito para se trabalhar,

Aos colegas de laboratório, por terem compartilhado estes momentos,

À Moema, pelo carinho na revisão da bibliografia,

À Cilô, pelas lições de coragem e pelo incentivo na fase final da construção do texto,

À Iolanda e ao Hernan pela leitura do manuscrito e pela crítica sempre responsável e construtiva,

Ao Luiz Carlos, sempre presente, pelo auxílio com o microcomputador e com as figuras,

À Daisy e ao Ivan pela solidariedade e pelas sugestões na revisão da nomenclatura química,

Aos meus alunos, pelo empenho em aproveitar as aulas e pelo reconhecimento do meu trabalho,

Aos amigos de todas as horas: Adriana, Andrade, Araújo, Ariane, Arthur, Ana Paula, Breno, Carminha, Cassandra, Celina, Chico, Cida, Cleide, Cristina, David, Fábio, Fabíola, Gilda, Henrique, Jacqueline, Jailson, Júlio, Lamara, Leonor, Lua, Luziane, Maki, Marcelo, Márcia, Márcio, Maria, Marisa, Martha, Maurício, Nalú, Neusa, Olga, Paula, Pedro, Politi, Raquel, Roberto, Sandra, Sandro, Sascha, Sérgio, Shirley, Silvia, Sofia, Tharin, Walter e Wilson, por tantos e tão variados motivos que não se podem nomear,

A todos os que, de alguma forma, estiveram presentes durante o período em que esta tese foi construída, principalmente aos funcionários do IQ e da FCF.

## ABREVIATURAS

AU	Unidades arbitrárias
C <sup>8</sup> -MeGua	C <sup>8</sup> -Metil-guanina
DMH	1,2-Dimetilhidrazina
DMPO	5,5-Dimetil-1-pirrolina-N-óxido
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonuclêico
DTPA	Dietilenotriamino-pentacetato de sódio
EDTA	Etilenodiamino-tetracetato de sódio
EPR	Ressonância paramagnética eletrônica
GSH	Glutationa
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
HPRT	Hipoxantina fosforibosiltransferase
N <sup>7</sup> -MeGua	N <sup>7</sup> -Metil-guanina
NADH	Nicotinamida-adenina-dinucleotídeo
NADPH	Fosfato de nicotinamida-adenina-dinucleotídeo
NMR	Ressonância Nuclear Magnética
O <sup>6</sup> -MeGua	O <sup>6</sup> -Metil-guanina
PBN	Fenil- <i>t</i> -butilnitrona
PBS	Solução salina isosmótica com tampão fosfato pH 7,4
PIC-B7	heptano-sulfonato de sódio 100mM em ácido acético (Reagente Waters para cromatografia com par iônico)
RNA	Ácido ribonuclêico
<i>t</i> -NB	<i>t</i> -nitrosobutano

ÍNDICE

RESUMO	
ABSTRACT	
INTRODUÇÃO	1
Hidrazina: metabolismo e toxicidade	5
OBJETIVO	16
MATERIAIS E MÉTODOS	17
Materiais	17
Aparelhagem	20
Animais	21
Métodos	21
Ensaio utilizando o método do captador de spin "in vitro"	21
Formação de radicais de carbono à partir da hidrazona do formaldeído pela catalase	21
Formação de radicais de carbono em células L1210 à partir da hidrazona do formaldeído	22
Estudo "in vitro" da biotransformação de hidrazina em eritrócitos de rato	23
Formação de radicais hidrazinila à partir de hidrazina	23
Ensaio utilizando o método do captador de spin "in vivo"	24
Ensaio de consumo de oxigênio	26
Preparo de amostras de DNA	27
Cromatografia do DNA hidrolisado	28
Pesquisa de bases modificadas	28
RESULTADOS	30
Geração de radicais de carbono "in vivo"	30
Formação do radical tiil-hemoglobina "in vivo"	38
Formação de radicais livres durante a biotransformação da hidrazina "in vitro"	38
Metilação de DNA "in vivo" detecção de C <sup>8</sup> -metil-guanina	56
Detecção de C <sup>8</sup> -metil-guanina em DNA de fígado de rato	59
Ocorrência de C <sup>8</sup> -metil-guanina em animais expostos à hidrazina	62
DISCUSSÃO	70
CONCLUSÕES	84
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85

## RESUMO

A produção de radicais de carbono "in vivo" durante a biotransformação da hidrazina foi demonstrada por ressonância paramagnética eletrônica, utilizando o método do captador de spin. Eritrócitos de rato também oxidaram a hidrazina, formando radicais de carbono e nitrogênio, além de espécies reativas de oxigênio. Todas estas espécies, possivelmente formadas "in vivo", são potencialmente causadoras de dano a macromoléculas. Podem, por exemplo, iniciar reações secundárias formando radicais de componentes celulares, como ocorreu com a hemoglobina que foi oxidada a radicais tiil-hemoglobina em eritrócitos tratados com hidrazina.

Radicais de carbono formados durante a biotransformação da hidrazina em animais expostos provêm necessariamente de substâncias endógenas e podem ser direta ou indiretamente responsáveis pela modificação (alquilação) de bases no DNA "in vivo". A hidrazona do formaldeído é descrita na literatura como um intermediário da alquilação induzida por hidrazina "in vivo". Células L1210, catalase ou oxihemoglobina de rato foram capazes de formar radicais de carbono durante a oxidação da hidrazona do formaldeído.

A oxidação da hidrazona do formaldeído pela catalase foi estudada "in vitro" e os radicais de carbono formados, identificados como radicais metila.

A base modificada C<sup>8</sup>-metil-guanina foi formada em animais expostos, como demonstrado por cromatografia líquida de alta eficiência associada à detecção eletroquímica, sugerindo que ocorreu alquilação do DNA por radicais metila durante a biotransformação da hidrazina "in vivo".

## ABSTRACT

The production of carbon-centered radicals during hydrazine biotransformation "in vivo" was demonstrated by electron paramagnetic resonance ( EPR ) spin trapping technique. Rat red blood cells also oxidized hydrazine, forming carbon and nitrogen centered radicals, besides oxygen reactive species. All these species, possibly formed "in vivo", are potentially harmful to macromolecules. For example, they can initiate secondary reactions in which the radicals from cell components are formed, as it occurred with hemoglobin, forming thiyl-hemoglobin radicals in the red blood cells treated with hydrazine.

Carbon-centered radicals produced during the biotransformation of hydrazine in exposed animals must be derived from endogenous sources and may be directly or indirectly responsible for the modification ( alkylation ) of DNA bases "in vivo". The formaldehyde hydrazone is reported in the literature as an intermediate of hydrazine-induced alkylation "in vivo".

L1210 cells, catalase and rat hemoglobin were able to produce carbon-centered radicals during the oxidation of the formaldehyde hydrazone.

The oxidation of formaldehyde hydrazone by catalase was studied "in vitro" and the generated carbon-centered radicals were identified as methyl radicals.

The modified base C<sup>8</sup>-methylguanine was formed in exposed animals, as demonstrated by high performance liquid chromatography with electrochemical detection, suggesting that DNA alkylation by methyl radicals occurred during hydrazine biotransformation "in vivo."



## INTRODUÇÃO

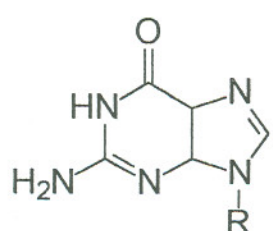
À medida em que aspectos mecanísticos das lesões envolvidas na alteração da função ou da expressão gênica vêm sendo elucidados, tem crescido em importância a discussão sobre o papel de radicais livres em oncologia molecular [Williams, 1989]. Reações de espécies reativas de oxigênio com biomoléculas são bastante conhecidas [Floyd, 1990]. Um tipo de lesão reconhecidamente causada por estas espécies reativas é a modificação das bases de ácidos nucleicos. A base modificada 7,8-di-hidro-8-oxo-guanina, por exemplo, é utilizada como marcador de dano oxidativo ao DNA [Park e cols., 1989, Shigenaga e cols., 1990].

Radicais de carbono também interagem com biomoléculas e participam de reações de abstração de hidrogênio e de adição [Bailey e cols., 1987, Halliwell e Gutteridge, 1989, Augusto, 1993]. Quando radicais de carbono se adicionam a bases do DNA, resultam bases modificadas por alquilação ou arilação [Saffhill e cols., 1985]. A possibilidade da alquilação de DNA por radicais de carbono "in vivo" foi questionada na literatura [Pryor, 1988].

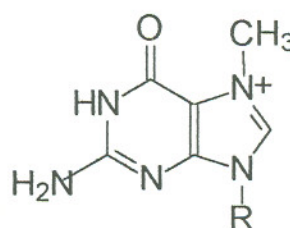
Dentre as reações de adição, a alquilação por espécies reativas do tipo íons de alquildiazônio e carbocátions tem sido bastante estudada [Pohl e Branchflower, 1981]. Os produtos das reações de adição de qualquer uma destas espécies - íons de alquildiazônio, carbocátions ou radicais livres - às bases do DNA são usualmente chamados de adutos da base com a espécie adicionada. Os adutos resultantes das reações de adição de espécies eletrofílicas devem ocorrer preferencialmente em átomos de nitrogênio ou oxigênio. Considera-se, portanto, que o ataque ao DNA por carbocátions produza as lesões promutagênicas N<sup>7</sup>- e O<sup>6</sup>-metil-guanina (Esquema I), como ocorre após a administração de metil-hidrazina [Hawks e cols., 1974] ou 1,2-dimetil-hidrazina [Hawks e Magee, 1974, Hawks e cols. 1974] a animais. A análise de bases modificadas por cromatografia líquida tem sido empregada com sucesso, para detecção de O<sup>6</sup>-metil-guanina e de N<sup>7</sup>-metil-guanina em vários sistemas modelo

[Park e cols., 1989] e até em material biológico proveniente de seres humanos [Stillwell e cols., 1991, Marnett e Burcham, 1993].

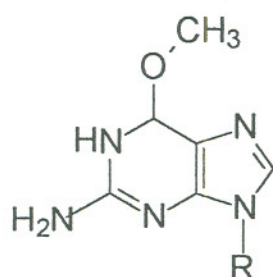
Radicais livres também alquilam o DNA [Castro e Castro, 1980], mas a alquilação de DNA "in vitro" por radicais metila produz a base modificada C8-metil-guanina (Esquema I) como produto principal.



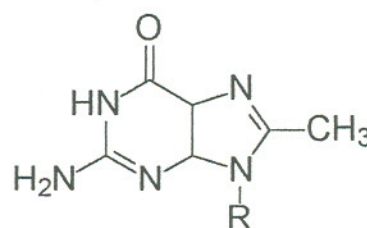
( Gua, DNA )



( N7-MeGua, DNA )



( O6-MeGua, DNA )



( C8-MeGua, DNA )

### ESQUEMA I

A alquilação de purinas na posição 8 por radicais de carbono tem sido descrita desde a década de 70 [Maeda e cols., 1974, Elad, 1976]. Estes estudos não receberam muita atenção, provavelmente devido ao fato de se terem utilizado condições não fisiológicas para a geração dos radicais. Além disso, radicais alquila reagem rapidamente com o oxigênio molecular e os produtos derivados desta reação, por exemplo radicais peroxila, são considerados mais deletérios do que radicais de carbono [Pryor, 1988]. A partir

da década de 80, com o desenvolvimento do método de captação de spin, foi possível demonstrar que vários xenobióticos eram ativados a radicais de carbono em condições fisiológicas [Augusto, 1989].

A interação entre radicais alquila produzidos a partir de derivados de hidrazina e o DNA foi descrita "in vitro" e "in vivo" [Augusto e cols., 1984, Leite e Augusto, 1989, Netto e cols., 1991 e 1992]. Efeitos como quebras de fita simples e alquilação de bases por radicais alquila podem estar relacionados aos efeitos carcinogênicos de derivados de hidrazina. Radicais 2-fenil-etila produzidos durante a oxidação de fenelzina induzem quebras [Augusto e cols., 1984] e alquilação em DNA plasmidial [Leite e Augusto, 1989]. A alquilação do DNA pelo radical 2-fenil-etila foi sugerida pela formação de uma banda eletroforética de DNA extensivamente alquilado e demonstrada pela incorporação de radical  $^3\text{H}$ -fenil-etila [Leite e Augusto, 1989].

Diversos agentes carcinogênicos mostram preferência por regiões ricas em guanina para o dano mediado por alquilação [Mattes e cols, 1988]. Este comportamento foi demonstrado na alquilação de DNA plasmidial pelo radical 2-fenil-etila [Leite e Augusto, 1989]. A preferência por modificações em sítios de guanina pode ser observada também na especificidade das mutações induzidas por *N*-metil-*N*-nitroso-uréia em plasmídeos contendo o cDNA do gene *HPRT* humano [Akagi e cols., 1993]. Este efeito não ocorre ao acaso nas guaninas ao longo do gene [Akagi e cols., 1993].

Foi demonstrada "in vitro" a formação de C8-metil-guanina no DNA de timo bovino tratado com metil-hidrazina, peroxidase de raiz forte e peróxido de hidrogênio, um sistema que gera radicais metila [Augusto, 1990]. A formação deste aduto é inibida por um captador de spin. Seguiu-se a detecção "in vivo" deste aduto, no DNA de fígado e de cólon de ratos tratados com 1,2-dimetil-hidrazina [Netto e cols., 1992]. O mecanismo de formação desta espécie "in vivo" ainda é desconhecido, provavelmente envolve metais ligados ao DNA [Augusto, 1993]. Íons de cobre ligados ao DNA participam da formação de 8-oxo-2'-deoxi-guanosina durante a oxidação de derivados de hidrazina [Gannett e cols., 1991]. A catálise da oxidação de derivados de hidrazina por íons de ferro

ligados ao DNA é demonstrada apenas no caso das hidrazinas monossustituídas [Netto e cols., 1991].

A alquilação de DNA durante a oxidação de derivados de hidrazina "in vivo" e "in vitro" por radicais de carbono [Augusto e cols., 1990; Netto e cols., 1992], leva à formação não só de C8-metil-guanina, mas também de O<sup>6</sup>-metil-guanina e de N<sup>7</sup>-metil-guanina, produtos resultantes de adição eletrofílica ao DNA. Radicais metila produzidos durante a decomposição de hidroperóxido de t-butila alquilam bases de guanina nas posições N<sup>7</sup>, O<sup>6</sup> e C<sup>8</sup> [Hix e cols., 1995]. N<sup>7</sup>- e O<sup>6</sup>-metil-guanina não seriam, portanto, marcadores inequívocos da reação de carbocátions com o DNA, embora esta atribuição, ainda seja geral na literatura. A preferência pelo ataque de radicais centrados em carbono à posição 7 e 8 de anéis de purina é indicada em estudos teóricos [Justo e cols., 1995].

A formação de adutos no DNA representa um risco de mutação. O aduto O<sup>6</sup>-metil-guanina, por exemplo, aumenta o número de GC→AT. Além das regiões codificadoras dos genes, aonde a introdução de adutos representa um risco de mutação na seqüência do DNA, outras regiões podem ser modificadas e produzir-se daí um efeito carcinogênico. Foi observado que a presença de um aduto entre as regiões "enhancer" e promotora de uma construção contendo um gene recombinante SV-40/globina humana diminuiu muito a transcrição, especialmente no caso de protooncogenes. A tumorigênese resulta, neste caso, de uma alteração na expressão gênica.

A metilação de guaninas no DNA hepático pode ser produzida por diversos derivados de hidrazina, entre eles hidralazina, procarbazona, isoniazida, fenil-hidrazina, nialamida, nitro-furazona, hidrazida do ácido malêico, sulfometoxipiridazina, sulfamethiazol e os produtos de polimerização de hidrazina com formaldeído: formaldazina e tetraformil-trisazina [Mathison e cols., 1994]. Os adutos formados são os mesmos obtidos com agentes alquilantes como nitrosaminas e azóxi-alcanos. Estes seriam os produtos esperados no ataque a bases do DNA pelos carbocátions formados a partir dos íons de alquildiazônio, sugerindo que estas espécies são formadas e alquilam o DNA "in vivo".

### Hidrazina: metabolismo e toxicidade

Hidrazina anidra é um líquido higroscópico, cáustico e fumegante nas condições ambientes de temperatura e pressão, o hidrato de hidrazina é constituído por 64 % hidrazina em peso. A hidrazina é uma base forte e um poderoso agente redutor. Sua decomposição em amônia, hidrogênio e nitrogênio, por aquecimento ou exposição à luz ultravioleta, pode ser explosiva, especialmente quando catalisada por metais ou por óxidos metálicos. No ar, hidrazina pode ser degradada rapidamente por reações com ozona, radicais hidroxila e óxido nitroso. Em ar poluído, seu tempo de vida é estimado em minutos. Em atmosfera limpa, chega a cerca de uma hora. A degradação de hidrazina em solução aquosa depende de vários fatores como pH, temperatura, conteúdo de oxigênio, dureza e presença de material orgânico ou de íons metálicos [World Health Organization, 1987]. Sua ocorrência natural é bastante restrita, está presente na planta do tabaco e em algumas espécies de fungos, incluindo algumas de fungos comestíveis [World Health Organization, 1987, Michelot e Toth, 1991]. A hidrazina é, entretanto, usada extensivamente como inibidor de corrosão e na preparação de vários produtos industriais importantes, incluindo catalisadores de polimerização, agentes dispersantes, herbicidas, produtos farmacêuticos e combustíveis de foguete.

A exposição humana é, desta maneira, principalmente ocupacional. Uma outra fonte importante de exposição é clínica. Sulfato de hidrazina é usado para combater o emagrecimento de pacientes de câncer terminal [Chlebowski, 1993]. O interesse clínico pela hidrazina é crescente, tendo sido sugerida sua utilidade na modulação da resposta de macrófagos ao fator de necrose tumoral (TNF) [Jia e cols., 1994, Kosty e cols., 1994]. A hidrazina também é produzida durante a biotransformação de alguns de seus derivados, por exemplo isoniazida e iproniazida, empregadas como medicamentos, e hidralazina [Noda, 1985, Gent e cols., 1992]

A absorção de hidrazina pela pele ou por qualquer via de exposição é bastante rápida, bem como sua distribuição no organismo e sua eliminação dos

vários tecidos [Nelson e Gordon, 1982]. A bioacumulação não é provável, estimada pela sua baixa partição para octanol "in vitro" [World Health Organization, 1987].

A hidrazina apresenta um comportamento hepatotóxico causando esteatose e em alguns casos até necrose hepática em animais de laboratório. Pode ainda promover lesões em sistema nervoso central e tumores em vários órgãos. Efeitos adversos graves foram observados em exposição acidental de seres humanos à hidrazina, principalmente em sistema nervoso central, fígado e rins. Entre os efeitos deletérios menos graves relatados está a irritação dos olhos, da pele e de mucosas do trato respiratório. É também um potente sensibilizador cutâneo [World Health Organization, 1987]. Não foi demonstrada ação carcinogênica em seres humanos [Toth, 1994].

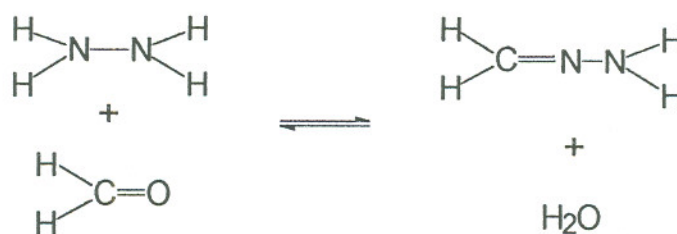
O mecanismo pelo qual a hidrazina promove a esteatose não é completamente conhecido. Parece que a secreção deficiente é parcialmente responsável pelo acúmulo de triglicérides. A hidrazina diminui as concentrações de ATP e glutatona (GSH) hepáticos e modifica a atividade das isoenzimas do citocromo P<sub>450</sub> [Jenner e Timbrell, 1994]. Algumas alterações podem ser observadas precocemente após a administração de hidrazina, como a inibição na síntese protéica [Lopez Mendoza e Villa Trevino, 1971], o aumento na síntese de diglicérides [Lamb e Banks, 1979; Haghghi e Honarjou, 1987] e a depleção de ATP [Preece e cols., 1990]. Esta depleção do ATP hepático pode ser secundária à diminuição na velocidade de síntese. Isto porque a hidrazina diminui na célula constituintes essenciais do metabolismo intermediário, por exemplo formando hidrazonas com o piruvato e o  $\alpha$ -ceto-glutarato [Nelson e Gordon, 1982], inibindo as reações de transaminação dependentes de piridoxal fosfato [Cornish, 1969] ou a etapa da gliconeogênese catalisada pela enzima fosfoenolpiruvato carboxiquinase [Fortney et cols, 1967 e Ray et cols, 1970]. Além da diminuição na síntese de ATP, pode ocorrer também um aumento na sua demanda, devido ao desacoplamento da mitocôndria [Hardler e Cook, 1978] ou à utilização de ATP em ciclos fúteis, na síntese de análogos de glutamina [Speck, 1949] ou carbamoil-fosfato [Mc Kinley et al, 1967]. Está descrita a acidose láctica causada

por hidrazina "in vivo" [Fortney e cols., 1967]. Estudos "in vivo" mostraram que a depleção de ATP e a queda no pH hepático precedem a citotoxicidade e a letalidade, não sendo, portanto, conseqüências da toxicidade de hidrazina [Preece e cols., 1990], embora este dado não seja confirmado por estudos em hepatócitos isolados [Noda et cols, 1987].

Tanto a hidrazina base como seus derivados mostraram propriedades carcinogênicas em animais de laboratório [Toth, 1994, Parodi e cols., 1981]. Em humanos, estudos não mostram aumento do risco de cancer associado à exposição ocupacional à hidrazina [Toth, 1994]. O comportamento tumorigênico de hidrazina tem sido preferencialmente atribuído à modificação do DNA por espécies reativas de oxigênio ou à modificação no padrão de metilação normal do DNA. O mecanismo pelo qual se estabelece a correlação entre a toxicidade de hidrazina e carcinogênese é ainda controverso. Efeitos genotóxicos conhecidos incluem a indução de quebras de fita simples e a troca de cromátides irmãs induzida por hidrazina. A hidrazina é mutagênica "in vitro" [VonWright e Tikkanen, 1980, Lunn e Sansone, 1994], sendo inclusive um mutagênico mais potente no teste de Ames do que as hidrazinas metil e dimetil-substituídas [VonWright e Tikkanen, 1980]. Altas doses de hidrazina base são necessárias para que se evidencie sua atividade carcinogênica em fígado e em narinas de rato [Severi e Biancifiori, 1962; MacEwen e cols, 1981]. Recentemente, estudos com camundongos transgênicos contendo o gene LacZ de *Escherichia coli* não mostraram evidências de que sulfato de hidrazina, mesmo em doses letais, seja mutagênico "in vivo" [Douglas e cols., 1995]. A comparação com estudos anteriores de tumorigênese de hidrazina na cepa parental destes camundongos sugere que exposições sub-agudas associadas a observação por tempos mais longos que os utilizados talvez sejam necessários para observação de mutagênese "in vivo". O mesmo fenômeno de dependência de exposições repetidas foi observado em hamsters, em ensaios crônicos "in vivo", para a alquilação de guaninas em DNA [Bosan e cols., 1987].

Uma das hipóteses para a carcinogênese induzida por hidrazina considera que a diferenciação celular alterada e a transformação sejam induzidas

por modificação do padrão de metilação normal do DNA. A correlação entre metilação de DNA e a produção de necrose ou a formação de tumores foi sugerida em estudos de exposição crônica a hidrazina [Bosan e cols, 1987]. Estudos realizados com ratos recém-nascidos mostraram que a modificação nos padrões de restrição em DNA hepático não se distribui ao acaso, sugerindo que pode ocorrer alteração nos mecanismos normais de metilação do DNA [Leakakos e Shank, 1994]. Regiões ricas em guanina foram descritas como os alvos mais susceptíveis ao dano induzido por hidrazina [ Said e Shank, 1991]. O mecanismo proposto, neste caso, para a ativação de hidrazina em hepatócitos inicia-se com a formação de uma hidrazona pela condensação da hidrazina com o formaldeído endógeno ( Esquema II ).



## ESQUEMA II

Shank e colaboradores propõem, em uma série de estudos, que a hidrazina pode ser ativada "in vivo" pela formação da hidrazona do formaldeído [Becker e cols., 1981, Bosan e Shank, 1983, Bosan e cols., 1986 e 1987, Lambert e cols., 1986, Lambert e Shank, 1988]. As unidades de formaldeído seriam provenientes do "pool" de unidades de um carbono disponíveis para as reações catalisadas por folatos e por S-adenosil-metionina "in vivo". A concentração de formaldeído endógeno é suficiente para apoiar esta hipótese [Lambert e Shank, 1988, Leakakos e Shank, 1994]. Ocorre um aumento da metilação no nitrogênio da posição 7 e no oxigênio ligado ao carbono 6 da guanina, quando animais são expostos à hidrazina [Barrows e Shank, 1978 e 1981; Quintero-Ruiz e cols., 1981; Becker e cols., 1981, Bosan e Shank, 1983]. A formação de N<sup>7</sup>- e O<sup>6</sup>-metil-guanina no DNA hepático de animais expostos a hidrazina está demonstrada em mais de uma espécie [Barrows e Shank, 1978 e 1981; Quintero-Ruiz e cols, 1981; Becker e cols, 1981, Bosan e Shank, 1983,



Shank, 1983]. Esta metilação depende da ação da catalase sobre a hidrazona do formaldeído endógeno e pode ser reproduzida em sistemas experimentais "in vitro" [Lambert e Shank, 1988].

A formação de hidrazonas, proposta como uma etapa da ativação de hidrazina, é de fato descrita em animais expostos à hidrazina. Alguns produtos da biotransformação de hidrazina "in vivo" foram caracterizados a partir de estudos sobre a excreção urinária [Preece e cols., 1991 e Sanins e cols., 1992], embora apenas uma fração da dose absorvida seja "rastreadável" a partir desta via de eliminação. Em ratos e camundongos, parte da hidrazina absorvida é eliminada inalterada e parte como conjugados lábeis ou derivados hidrolizáveis por ácidos. Uma quantidade considerável é também eliminada como nitrogênio pela expiração [Nelson e Gordon, 1982]. O metabolismo do nitrogênio parece ser comprometido e aumenta a excreção urinária de taurina, de lactato, de alanina e de metilamina. Dentre os produtos identificados na urina, destacam-se ainda a amônia, a uréia, os produtos mono e diacetilados e as hidrazonas dos ácidos pirúvico e oxo-glutárico [Preece e cols., 1991 e Sanins e cols., 1992]. Estudos de ressonância magnética nuclear (NMR) de nitrogênio mostraram ainda formação de ácido carbáxico, o aduto de hidrazina e dióxido de carbono [Preece e cols., 1991].

Hidrazonas são tautômeros dos azocompostos formados na primeira etapa de oxidação de hidrazinas substituídas ( Esquema III ).



ESQUEMA III

A formação de azocompostos é bem estabelecida na literatura para uma série de hidrazinas mono [Prough e cols., 1981, Jonen e cols., 1982] e dissustituídas [ Raaflaub, e Schwartz, 1965, Dunn e cols., 1979, Wiebkin e Prough, 1980] . Segundo os esquemas mais aceitos para o metabolismo de

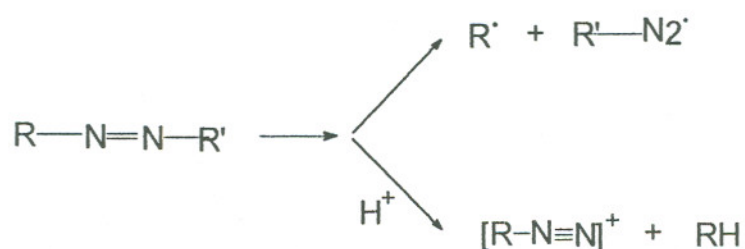


1969, Prough e cols. 1981]. A hidrazona do formaldeído é formada durante a oxidação de 1,1-dimetil-hidrazina na presença de peróxido de hidrogênio, além de *N*-nitroso-dimetilamina, dimetilamina, metanol, dimetil-hidrazona do formaldeído e tetrametil-tetrazeno [Lunn e Sansone, 1994]. A seqüência das vias de biotransformação propostas para derivados de hidrazina substituídos pode ser estendida desta maneira às hidrazonas e, por conseguinte, à hidrazina, não substituída.

Não há consenso na literatura sobre as modificações que se seguem à formação dos azocompostos, no metabolismo das hidrazinas substituídas. Tampouco estão estabelecidas quais espécies são diretamente responsáveis pelo dano biológico. Mesmo assim propõem-se que as espécies reativas formadas, as reações que resultam na produção desses intermediários e seus sítios de formação possam ser comuns entre os derivados metilados de hidrazina. Isto se verifica, por exemplo, nos estudos sobre o metabolismo da procarbazina, um derivado dissustituído. Uma das possibilidades inicialmente propostas na literatura foi a da isomerização do azocomposto da procarbazina a hidrazona, seguida de hidrólise, resultando o aldeído correspondente e a metil-hidrazina [Dost e Reed, 1967]. Esta hipótese foi posteriormente descartada por não se detectar a formação de metil-hidrazina durante este metabolismo [Weinkam e Shiba, 1978, Shiba e Weinkam, 1982, Moloney e Prough, 1983, Bosan e Shank, 1983]. Estudos sobre produtos de biotransformação de procarbazina mostraram que a metil-hidrazina, bem como a própria procarbazina e o seu azoderivado inibem seletivamente a desaminação de benzilamina pelas aminoxidases sensíveis a inibição por semicarbazida [Holt e cols., 1992]. Um substrato para esta atividade "in vivo" é a metilamina, cuja excreção urinária aumenta em animais expostos à hidrazina [Sanins e cols., 1992]. Embora a origem do nitrogênio presente na metilamina excretada não seja a molécula de hidrazina [Sanins e cols., 1992], é interessante notar que a metilamina é metabolizada "in vivo" a CO<sub>2</sub> via formaldeído [Boeninger, 1987]. O formaldeído possui efeito sinérgico na mutagênese "in vitro" induzida por *N*-metil-*N*-nitroso-uréia [Grafström e cols., 1993]. A administração de procarbazina ou de metil-

hidrazina marcadas com  $^{14}\text{C}$  leva à excreção urinária de metilamina marcada. Embora rota a metabólica dessa biotransformação não seja conhecida [Schwartz, 1966], é possível que o aumento de metilamina deva-se à inibição da aminoxidase sensível à semicarbazida, como observado por Holt [Holt e cols., 1992].

A partir de um volume considerável de dados experimentais de diversos grupos de pesquisa, propõem-se na literatura duas hipóteses principais sobre qual seria a natureza das espécies reativas formadas no metabolismo de derivados de hidrazina mono e dissustituídos ( Esquema V ).



ESQUEMA V

Defende-se a formação de espécies reativas catiônicas, do tipo alquildiazônio, ou neutras, radicais livres centrados em átomos de carbono ( Esquema V ).

A formação de formaldeído no metabolismo de metil-hidrazina e 1,1-dimetil-hidrazina sugere que as reações participantes do metabolismo das hidrazinas metil-substituídas e das metil-nitrosaminas podem ser comuns [Nagasawa e cols., 1972, Godoy e cols., 1983]. Derivados metilados de hidrazina, também partilham com as nitrosaminas a modificação de biomoléculas por formação de adutos, a partir de intermediários reativos [Godoy e cols., 1983]. A formação de azoxiderivados da 1,2-dimetil-hidrazina e, conseqüentemente de íons de alquildiazônio, foi inicialmente proposta por analogia com as nitrosaminas e *N*-nitroso-compostos estruturalmente relacionados. Foi demonstrado que a 1,2-dimetil-hidrazina e seus azo- e azoxiderivados tinham o mesmo comportamento organotrópico, sugerindo um intermediário reativo comum. A

alquilação mediada por azóxi-alcanos ocorre por mecanismos semelhantes aos das nitrosaminas, que produzem íons de alquildiazônio [Shank e Magee, 1967]. A formação de íons de carbônio foi demonstrada no caso de metilazoximetanol, considerado um produto de transformação de metilazoximetano, durante a reação com acetato de sódio e esta espécie foi então proposta como o agente alquilante final na carcinogênese induzida por derivados metilados dissustituídos de hidrazina.

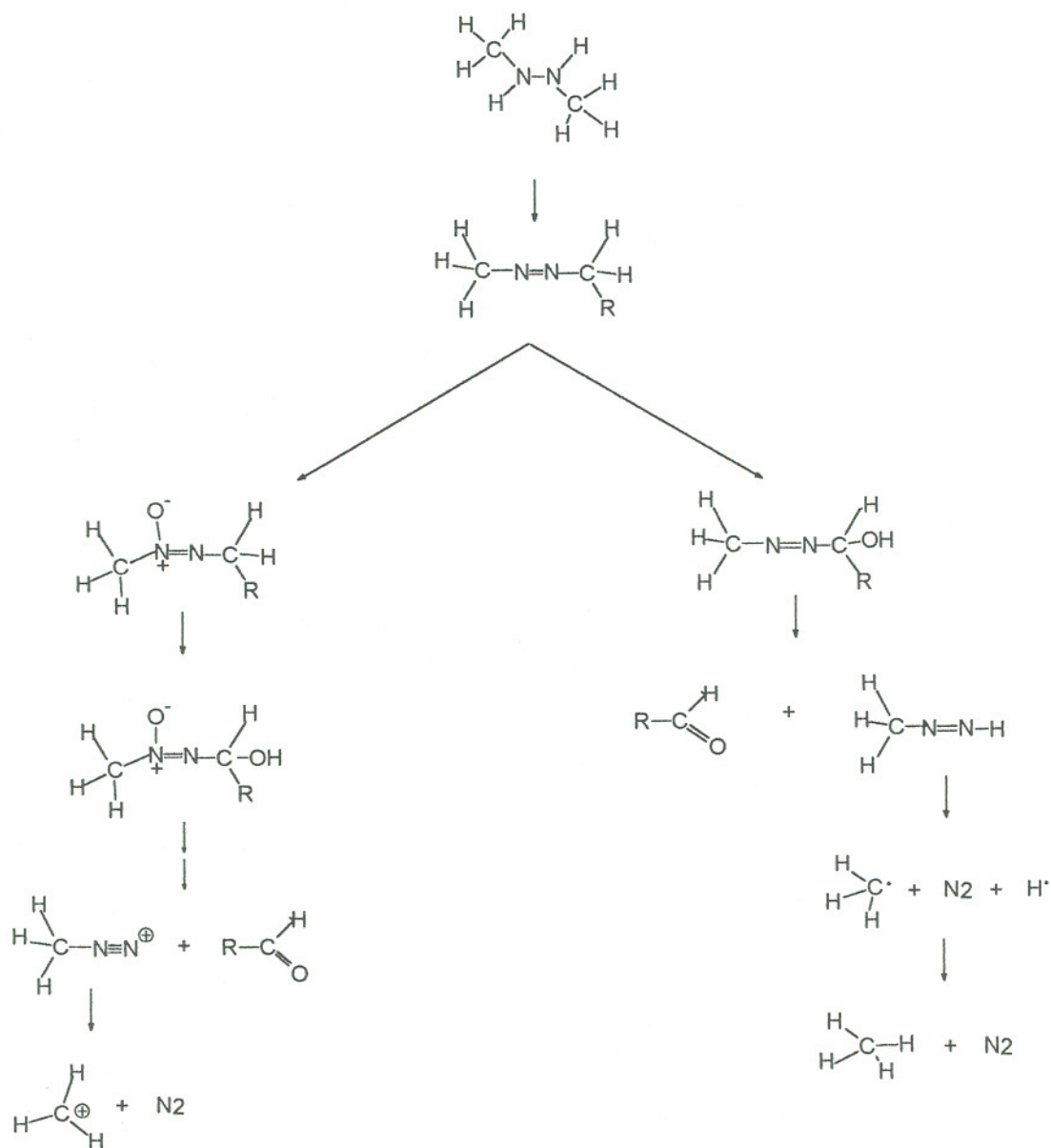
O esquema foi ampliado pelos estudos de Fiala e cols. [1976] com a 1,2-dimetil-hidrazina, resultando a proposta de mecanismo que envolve a formação dos intermediários azo-, azóxi- e hidroxí-azóxi- e em que a espécie alquilante é catiônica. Prough e colaboradores [1977] descreveram um mecanismo equivalente na oxidação microsomal de procarbazina. Demonstraram ainda que o derivado metil-azóxi- da procarbazina é mais ativo na oxidação de proteínas do que o derivado benzil-azóxi- [Wiebkin e Prough, 1980, Moloney e cols., 1985]. Estudos deste tipo, realizados principalmente com a 1,2-dimetil-hidrazina e com a procarbazina, formam a base da hipótese mais aceita para o metabolismo de derivados dissustituídos ( Esquema VI ).

No caso dos derivados de hidrazina monossustituídos, é importante considerar a toxicidade devida à formação de espécies reativas de oxigênio, além da possível formação de íons de alquildiazônio.

A formação de radicais livres durante a biotransformação de monoalquil-hidrazinas foi sugerida por Prough e colaboradores [1979], para explicar a formação de hidrocarbonetos durante o metabolismo microsomal destes compostos.

A expiração de metano e benzeno durante o metabolismo de derivados de metil-hidrazina ou da fenil-hidrazina já havia sido observada "in vivo" e sugeria a formação de radicais metila e fenila [Dost e Reed, 1967]. A formação de produtos de adição entre radicais livres e o grupo prostético heme, durante o metabolismo de metil-hidrazina e fenil-hidrazina por hemoproteínas como hemoglobina, catalase, peroxidase e citocromo P450, acrescentou evidências à esta hipótese [Augusto e cols. 1982] . Durante o metabolismo de

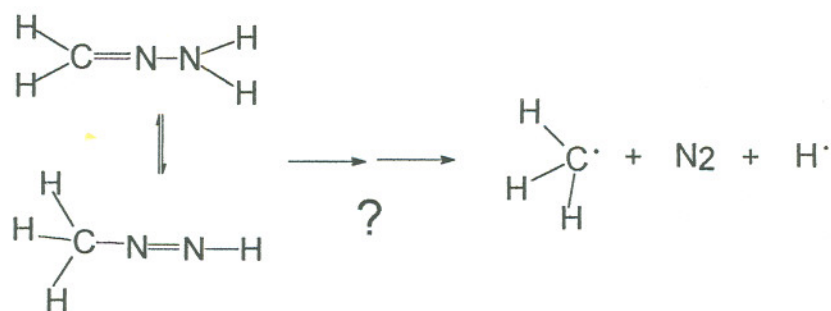
procarbazina "in vitro" [Moloney e cols., 1985] e de 1,2-dimetil-hidrazina "in vivo" [Kang e cols., 1988] observou-se a formação de metano e de etano, estendendo a hipótese de formação de radicais livres à biotransformação de derivados dissustituídos de hidrazina.



Como a sugestão inicial de que metil-hidrazina seria um intermediário desta via [Dost e Reed, 1967] foi descartada, atribuiu-se a formação de metano aos radicais metila resultantes da decomposição do

metildiazeno formado pela hidroxilação do azocomposto. A oxidação de derivados de hidrazina mono- [Augusto e cols., 1981, Kalyanaraman e Sinha, 1985, Tomasi e cols., 1987, Augusto, 1989] e dissustituídos [Sinha, 1984, Augusto e cols., 1985, Tomasi e cols., 1987, Sinha, 1991, Goria-Gatti e cols, 1992 e Netto e cols, 1992] a radicais de carbono, detectáveis através da técnica de captação de spin, foi observada em diferentes sistemas experimentais modelo. Microsomas de fígado de rato metabolizam a fenil-etil-hidrazina principalmente por via radicalar [Ortiz de Montellano e cols, 1983, Ortiz de Montellano e Watanabe, 1987]. Radicais de carbono também foram detectados na biotransformação "in vivo" de derivados mono e dissustituídos de hidrazina [Albano e Tomasi, 1987, Goria-Gatti e cols., 1992]. Existem, portanto, evidências de que ambas as espécies reativas, carbocátions e radicais livres, sejam formadas "in vivo".

A possibilidade de que a hidrazina, através da formação de hidrazonas, venha formar o mesmo tipo de intermediários reativos ( Esquema VII ) motivou este trabalho.



ESQUEMA VII

O estudo da participação de radicais de carbono na biotransformação de hidrazina incluiu a detecção de dano a biomoléculas e a descrição de métodos analíticos aplicáveis à avaliação deste dano.

OBJETIVO

Verificar a possibilidade da formação de radicais de carbono e de seus produtos de adição ao DNA "in vivo", durante a biotransformação de hidrazina.



## MATERIAIS E MÉTODOS

### Materiais

Hidrazina foi empregada tanto na forma anidra ( Pierce, Rockford, FGR ) quanto como seu sal, sulfato de hidrazina ( Sigma, St. Louis, USA ). Sulfato de metil-hidrazina foi preparado a partir da base livre ( Aldrich ) por titulação com ácido sulfúrico e recristalizado de uma solução em etanol. 1,2-dimetil-hidrazina.HCl ( Sigma ) e fenil-hidrazina.HCl ( Sigma ) foram empregadas na forma comercial. A hidrazona do formaldeído foi preparada pela mistura equimolar de soluções de formaldeído a 37 % em água ( E. Merck, Darmstadt, FGR ) e hidrazina em soluções diluídas, de 5 a 50 mM seguida de análise por ressonância magnética nuclear ( MNR ) de próton.

Os captadores de spin comerciais foram tratados para diminuir a contaminação por radicais aduto espúrios. 5,5-Dimetil-1-pirrolina-*N*-óxido ( DMPO, Sigma ) foi passado por coluna de carvão e fenil-*t*-butilnitrona ( PBN, Sigma ) foi recristalizado de acetonitrila a quente, ambos foram acondicionados em freezer a -80 °C enquanto não eram utilizados. *t*-Nitrosobutano ( *t*-NB, Sigma ) foi preparado para uso em solução 0,57 M em acetonitrila, preparada 1 h antes do uso e mantida, durante todo o tempo, ao abrigo da luz.

Os adutos de PBN-metila e PBN-metoxila usados como referência para comparação das constantes de desdobramento hiperfino dos radicais obtidos "in vivo" foram preparados em solução para uso e adicionados imediatamente à bile de animais não expostos na proporção de 1 %. O aduto PBN-metila foi obtido a partir da oxidação da metil-hidrazina pela peroxidase de raiz forte ( HRP, Sigma ). O aduto PBN-metoxila foi preparado a partir de uma Reação de Fenton conduzida na presença de dimetilsulfóxido ( DMSO ) 15 % v/v. O aduto de interesse, o PBN-metoxila é produzido pelo ataque de radicais hidroxila, formados na reação de oxido-redução entre peróxido de hidrogênio e ions de ferro II, ao DMSO em solução aerada. Ocorre a formação de ambos os radicais, metoxila e metila, a partir desta reação, dependendo da

oxigenação da solução. Na proporção de DMSO 15 % v/v, obtêm-se apenas o sinal de EPR do radical metoxila na solução estoque.

Células da linhagem L1210 ( ATCC CCL 219 ), estabelecidas originalmente a partir de uma leucemia murina, foram cultivadas em meio RPMI 1640 ( Sigma ) suplementado com glutamina ( Sigma ) para uma concentração final de 2 mM e adicionado de 10 % v/v de soro fetal bovino ( Cultiab Lote nº 1111 ), sem antibiótico. Para manutenção das culturas foram utilizadas garrafas plásticas de 25 cm<sup>2</sup> ( Descarplast ou Costar ) mantidas, sem agitação, em atmosfera úmida de 95 % ar e 5 % CO<sub>2</sub>. As determinações de concentração das suspensões celulares, foram realizadas por contagem em hemocítômetro tipo câmara de Neubauer ou em contador eletrônico ( CELM CC 510, Brasil ), previamente ajustado e calibrado por comparação com a contagem manual.

Eritrócitos de rato foram obtidos por punção venosa da veia cava abdominal do animal, centrifugados e lavados 3 vezes ( 5 volumes ) com solução salina isosmótica tamponada para remoção do plasma. O concentrado de eritrócitos foi mantido em gelo antes do uso nos ensaios de EPR e foi usado no máximo por 12 h após a coleta.

Oxi-hemoglobina foi preparada para uso no mesmo dia, a partir de hemoglobina de rato comercial ( Sigma ), por redução com ditionito de sódio ( Merck ). A seguir, a solução foi filtrada por uma coluna preenchida com Sephadex G 25 ( Pharmacia ) para separar a proteína do ditionito de sódio. A solução resultante foi mantida em gelo até o momento do uso. A concentração da oxi-hemoglobina na solução final foi calculada a partir do espectro de absorção de luz visível (  $\epsilon_{540\text{ nm}} = 15300\text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ,  $\epsilon_{577\text{ nm}} = 14600\text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  ) [Wever e cols., 1973; Maples e cols., 1988].

Os padrões para cromatografia das bases Adenina e Guanina e das bases modificadas N<sup>7</sup>-metil-guanina e O<sup>6</sup>-metil-guanina ( Sigma ) foram usados sem purificação. C<sup>8</sup>-Metil-guanina foi sintetizada no laboratório segundo procedimento de Maeda e colaboradores ( 1974 ), purificada por cromatografia líquida de alta eficiência ( HPLC ) e caracterizada por espectrometria de ressonância nuclear magnética e de massa [Augusto e cols., 1990].

O fenol em solução aquosa tamponada, empregado no protocolo de extração de DNA, foi preparado a partir de cristais de fenol ( Merck ) fundidos a 70 °C aos quais se adicionam dois volumes de tampão Tris a pH 9,0. Esta solução, depois de estabilizada por adição de *m*-cresol ( 140 ml/kg ) e 8-hidroxiquinolina ( 1 g/kg ), foi tamponada a pH 7,6 por meio de duas lavagens em funil de separação com tampão Tris pH 9,0 seguidas por uma lavagem com tampão Tris pH 8,0 ( sempre na proporção de 2 :1 v/v ). Dodecil-sulfato de sódio ( SDS ) foi obtido da Aldrich.

A Ribonuclease T<sub>1</sub> livre de desoxirribonuclease foi obtida fervendo-se a enzima comercial ( Sigma ) em solução 10 U/ $\mu$ l em frasco selado por 5 min em banho-maria a 100 °C. A solução, resfriada, foi mantida em geladeira até o momento de uso.

Etilenodiamino-tetracetato de sódio ( EDTA ), dietilenotriamino-pentacetato de sódio ( DTPA ) e 2,2'-bipiridil-6-ila ( bipiridil ) foram obtidos da Sigma. Sulfato de sódio anidro foi obtido da Merck.

Éster dietilmalêico ( Sigma ) foi preparado para uso injetável em soluções em óleo de milho comercial ( Mazola ).

Pentobarbital para uso injetável foi obtido da Farmácia Industrial do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

As substâncias marcadas com carbono 13, a saber: metionina, formiato de sódio, metanol e formaldeído, foram obtidas da Sigma.

Todas as outras soluções utilizadas, incluindo as soluções tampão, foram preparadas com reagentes Sigma (borato de sódio, formiato de amônio, ácido fórmico, Trisma base, heptano-sulfonato de sódio e fosfato de sódio ou de potássio mono e dibásicos ) ou Merck ( ácido acético, ácido clorídrico, dimetilsulfóxido, ferricianeto férrico, cloreto férrico, cloreto de cobre ), à exceção da fase móvel para cromatografia que empregava o reagente Waters PIC B7 ( heptano-sulfonato de sódio 100 mM em ácido acético ).

Dos solventes utilizados nos ensaios, a acetona, o clorofórmio e o metanol ( Merck ) usados na extração dos homogenatos de fígado tinham grau

espectroscópico, os solventes para HPLC tinham grau cromatográfico, os demais tinham grau "pro-análise".

### Aparelhagem

Espectros de ressonância paramagnética eletrônica ( EPR ) foram obtidos em um aparelho Bruker ER-200 provido de uma interface de comunicação ( Links Informática ) com um computador IBM AT 80286 equipado com um co-processador matemático 80387 para aquisição de espectros. Os dados obtidos diretamente do espectrômetro Bruker, bem como os espectros calculados foram utilizados para a confecção das figuras depois de transformados em arquivos de 1024 pontos no formato padrão ASCII por um programa desenvolvido no laboratório da Profa. Shirley Shreier pelo físico Claudio Shida. As análises e os cálculos de simulação de espectros de EPR foram efetuadas por programas desenvolvidos para este fim ( Links Informática, Sinapse Informática ). A cavidade usada para as medidas comportava igualmente as celas de quartzo planas ou tubos cilíndricos de quartzo ( Vilmad ) usados para suporte dos capilares de diâmetro interno 0,80 mm com espessura de parede de 0,05 mm da Zeus industrial Products, Inc. Raritan, N.J..

O consumo de oxigênio foi medido polarograficamente em um monitor de oxigênio ( Gilson 5/6 Oxigraph ) termostatizado por um banho-maria com circulação de água a 37 °C.

O espectro de ressonância magnética nuclear ( NMR ) de próton (  $^1\text{H}$  ) da hidrazona do formaldeído foi obtido em um espectrômetro Bruker AC - 200 - F, da Central Analítica do Instituto de Química.

As cromatografias líquidas de alta eficiência ( HPLC ) foram realizadas em um equipamento Waters 625 LC, equipado com um detector de arranjo de fotodiodos ( Waters 991 ), um detector de fluorescência ( Waters 470 ) e um detector eletroquímico ( Waters 460 ). Este equipamento funciona acoplado a um computador semi-dedicado à aquisição de dados através do programa PDA ( Waters ). Todo o material de suporte para a técnica cromatográfica, a saber:

filtros variados, membranas, ferramentas e acessórios necessários foram obtidos da Waters.

As medidas espectrofotométricas, nas regiões do visível e do ultravioleta, foram feitas em um espectrômetro Hitachi U-2000 ou SLM Aminco DW 2000.

As amostras de DNA hidrolisado foram concentradas ou liofilizadas em um equipamento Speed-vac ( Savant ) e os extratos de fígado para EPR, em um evaporador rotativo ( Buchler PTFE 1GN ).

As cirurgias para a obtenção de material biológico nos ensaios "in vivo" foram feitas sobre uma mesa artesanal aquecida, construída pela oficina de marcenaria do Instituto de Química da USP. Para a obtenção de bile foram usadas cânulas de polietileno com diâmetros externo 0,61 mm e interno 0,28 mm tipo PE-10 n° 7401 ( Clay Adams/ B&D ).

### Animais

Os ensaios com animais utilizaram ratos machos da linhagem Wistar com idade de 6 a 8 semanas e aproximadamente 200 g de peso corporal, provenientes de criação mantida no Biotério do Instituto de Química da USP.

### Métodos

#### Ensaio utilizando o método do captador de spin "in vitro"

#### Formação de radicais de carbono a partir da hidrazona do formaldeído pela catalase

Misturas de reação contendo 5 mM formaldeído, 5 mM hidrazina e 2  $\mu$ M catalase em tampão fosfato 0,1 M pH 7,4 foram incubadas na presença de um dos captadores de spin, 25 mM DMPO, 14 mM *t*-NB. Ensaio análogo foram feitos na presença de 50 mM PBN, em que tanto o formaldeído quanto a

hidrazina tiveram suas concentrações aumentadas para 10 mM. Controles da reação sem a enzima, sem a hidrazina ou sem o formaldeído foram pareados com os ensaios de amostra. Alíquotas de 100  $\mu$ l das misturas de reação, contidas em tubos permeáveis a gás, foram analisadas à temperatura ambiente.

#### Formação de radicais de carbono em células L1210 a partir da hidrazona do formaldeído

As células L1210 foram mantidas em cultura líquida e subcultivadas por diluição. As diluições, efetuadas com meio novo a cada 48-72 h, mantinham a concentração nas garrafas entre  $10^5$  células/ml, mínimo abaixo do qual as células crescem mal, e o limite máximo de  $2 \times 10^6$  células/ml. Curvas de crescimento foram determinadas em placas tipo "multiwell" de 96 poços, para confirmar este comportamento da linhagem e o tempo de dobramento de 12 h. Cada ponto foi contado em triplicata após remoção do conteúdo do poço ( 200  $\mu$ l ), lavagem do mesmo com salina em três etapas de lavagem ( 50  $\mu$ l, 100  $\mu$ l e 100  $\mu$ l ) e fixação das células contidas em todo o volume coletado ( 450  $\mu$ l ) com formaldeído 37,5 % ( 50  $\mu$ l ). A viabilidade celular foi determinada em hemocitômetro, por exclusão do corante Azul de Tripán. As células utilizadas nos ensaios de EPR estavam sempre na fase estacionária, atingida quando a concentração chega a  $2 \times 10^6$  células/ml. Nestas condições 90 % das células diferenciam-se em linfócitos grandes.

As células L1210 foram centrifugadas para remoção do meio, lavadas duas vezes com salina, ressuspensas para uso nos ensaios de EPR em salina numa concentração de  $10^7$  células/mm<sup>3</sup>, e mantidas em gelo. As suspensões foram utilizadas por no máximo 6 h. A viabilidade das células da suspensão estoque, medida por exclusão de corante ao fim do período de uso, foi sempre maior do que 90 %. Uma mistura de reação típica, excetuando os controles, continha  $1,2 \times 10^6$  células/ml, 10 mM hidrazina, 10 mM formaldeído e

0,1 M DMPO. Uma incubação a 37 °C sob agitação por 30 min precedeu as medidas de EPR.

#### Estudo "in vitro" da biotransformação de hidrazina em eritrócitos de rato

Foram estudadas diferentes misturas de reação contendo eritrócitos de rato e hidrazina ou hidrazona, usando DMPO ( 100 mM ) como captador de spin em solução salina isosmótica tamponada com fosfato pH 7,4 adicionada de 0,1 mM DTPA e de 5 mM azida sódica. Nos ensaios em que o hematócrito usado era de 50 % as quantidades empregadas foram 20 mM hidrazina e 20 mM formaldeído, só 20 mM hidrazina ou 5 mM metil-hidrazina; quando o hematócrito usado na mistura final era de 5 %, as quantidades foram aumentadas, nos ensaios correspondentes, para 40 mM hidrazina e 40 mM formaldeído. Soluções de hemoglobina de rato 0,66 mM em tampão fosfato 100 mM pH 7,8 contendo DTPA 0,1 mM também foram estudadas na presença de 20 mM formaldeído, 20 mM hidrazina em ensaios na presença de 100 mM DMPO.

O aparecimento do radical aduto da proteína ou de outros radicais aduto foi acompanhado por períodos de 5 min a 2 h. Alíquotas de 200 µl da mistura de reação, mantidas a 37 °C e sob agitação durante os tempos de incubação, foram transferidas para celas planas de quartzo para as medidas, efetuadas à temperatura ambiente.

#### Formação de radicais hidrazinila a partir de hidrazina

A oxidação monoeletrônica de hidrazina catalisada por íons de cobre foi estudada em soluções contendo, além de 1 mM hidrazina, 50 µM cloreto cúprico e 17 mM DMPO em tampão borato 0,1 M pH 9,0. Alíquotas de 200 µl da mistura de reação foram imediatamente transferidas para celas planas de quartzo para as medidas, efetuadas à temperatura ambiente.

### Ensaio utilizando o método do captador de spin "in vivo"

Ratos machos da linhagem Wistar com 6 a 8 semanas de idade e peso aproximado de 200 g foram mantidos em jejum por 12 h, no período noturno. Pela manhã foram pesados e receberam em seguida uma injeção intraperitoneal de uma solução 14 % de dietilmaleato em óleo de milho comercial, na dose de 0,6 g/kg de peso. Meia hora depois receberam uma outra injeção intraperitoneal, de 125 mg de PBN/kg de peso, ou de 500 µl de DMPO/kg de peso. Vinte minutos depois da injeção do captador foram anestesiados com Pentobarbital na dose de 50 mg/kg de peso. Foram então expostos, 30 min após a injeção do captador, a uma dose equivalente à dose letal 50 % (LD<sub>50</sub>) de hidrazina ou de um de seus derivados, em injeção intragástrica de uma solução salina tamponada neutra (PBS). No caso da hidrazina, a dose utilizada na literatura cujos efeitos de alquilação "in vivo" eram mais significativos foi escolhida para efeito de comparação.

As doses empregadas, administradas num volume de 500 µl foram as seguintes:

Tabela I

Doses de hidrazina e seus derivados utilizadas nos ensaios de captação de spin "in vivo"

	DOSE	LD <sub>50</sub>
hidrazina	90 mg/kg	60 mg/kg [Witkin, 1956], 90 mg/kg [Reid, 1976]
sulfato de hidrazina	365 mg/kg	-calculada como dose de hidrazina-
metil-hidrazina	35 mg/kg	35 mg/kg [Hawks e cols., 1974]
1,2 - dimetil-hidrazina	478 mg/kg	478 mg/kg [Hawks e cols., 1974]
hidrazona do formaldeído	125 mg/kg	calculada como dose de hidrazina
fenil-hidrazina	188 mg/kg	188 mg/kg



Os animais, acomodados sobre a mesa cirúrgica aquecida, tiveram então seus abdômens abertos, o duto biliar exposto, isolado e canulado para a coleta de bile. Os tubos de ensaio utilizados para a coleta de bile continham DTPA para concentração final aproximada de 0,1 mM; nos controles efetuados para a verificação da ocorrência de formação de radicais ex-vivo foi ainda adicionado biperidil em excesso [Burkitt e Mason, 1991]. Durante a coleta manteve-se sobre a cavidade peritoneal aberta uma camada de gaze continuamente umidecida em soro fisiológico, para impedir a desidratação do animal. Para evitar artefatos de manuseio inadequado e autoxidação do material, a cânula e o tubo de ensaio foram protegidos da luz, este último foi mantido em banho de gelo durante a coleta. Obteve-se desta maneira o material correspondente ao período de 15 a 35 min da exposição, exceto quando dos estudos que determinaram ser este o período mais adequado à coleta. Depois de coletar a bile, procedeu-se à obtenção do sangue e do fígado dos animais. Os fígados foram congelados a -80 °C até serem processados. Este processamento, apenas no caso dos fígados de animais tratados com PBN, consistiu em homogeneizá-los em um Potter com tampão fosfato isosmótico pH 7,4, 1 ml/g de fígado e extraí-los em seguida 3 vezes com com clorofórmio ( 2 v/v ). O extrato, seco sobre sulfato de sódio, foi filtrado e evaporado a vácuo em um evaporador rotativo operando sob pressão reduzida por trompa de água pressurizada. Os tubos secos foram mantidos a -80 °C até serem ressuspensos em tampão para as medidas de EPR. A bile, o sangue e os extratos de fígado dos animais, estes ressuspensos em tampão, foram então mantidos por 1 min sob fluxo de ar. Só então foram examinados por EPR. Este é um procedimento indicado para reoxidar os radicais aduto presentes que tenham reagido com redutores normalmente contidos nestes materiais, o que os torna invisíveis ao espectrômetro [Janzen, 1984; Rosen e Rauckman, 1984]. Os espectros foram medidos em celas de quartzo plano à temperatura ambiente.

Padrões dos adutos dos radicais metila e metoxila com o PBN foram preparados em tampão fosfato pH 7,4, na presença de 50 mM PBN. No caso do metila, 10 mM metil-hidrazina foi oxidada com 25 mM ferricianeto de

potássio. No caso do metoxila, uma reação de Fenton foi feita em meio aquoso contendo 15 % v/v de dimetilsulfóxido, com 1 mM peróxido de hidrogênio e 1,5 mM complexo Fe-EDTA. A solução obtida foi examinada no aparelho de EPR, verificando-se que continha os radicais aduto. Cada aduto foi adicionado, num volume correspondente a 1 % do volume final, à bile de animais não expostos. O espectro dos radicais aduto foi novamente medido nesta solução.

A formação de radicais tiil-hemoglobina "in vivo" foi examinada no sangue de animais que receberam DMPO, mas não nos que foram tratados com PBN.

Para a marcação com  $^{13}\text{C}$  do "pool" de unidades de um carbono, as estratégias utilizadas foram a injeção intraperitoneal de metionina, formiato ou metanol marcados, sempre 1 h antes do início do protocolo experimental de captação de spin "in vivo". No caso da metionina, foi empregada alternativamente uma seqüência de quatro injeções de 1 mg, intercaladas com intervalos de meia hora [Sakami, 1946, Sakami e Welch, 1950]. Esta seqüência foi também iniciada 1 h antes dos procedimentos referentes ao ensaio de captação de spin "in vivo". Nos ensaios desta série realizados com a hidrazona do formaldeído, a mesma foi preparada com formaldeído marcado.

#### Ensaio de consumo de oxigênio

A mistura padrão de reação utilizada para estudos de consumo de oxigênio continha 5 mM formaldeído, 5 mM hidrazina e DTPA 0,1 mM em tampão fosfato 0,1 M pH 7,4. Quando o efeito de captadores de spin sobre o sistema era o objetivo do estudo foi acrescentado 25 mM DMPO ou 14 mM *t*-NB. O efeito da presença de 2  $\mu\text{M}$  catalase sobre o efeito medido foi estudado isoladamente e na presença dos captadores. O consumo de oxigênio foi medido a 37 °C; a saturação de oxigênio a esta temperatura, que corresponde a 100 % na escala do eletrodo foi considerada como 0,20 mM. Todas as medidas foram feitas em duplicata.

### Preparo de amostras de DNA

Os animais foram mantidos em jejum por 12 h no período noturno antes da exposição a uma dose letal 50 % de hidrazina ou de dimetil-hidrazina, pela manhã. A hidrazina foi administrada por via intragástrica e a dimetil-hidrazina, intraperitoneal. Após a exposição os animais tiveram acesso livre à ração comercial ( Purina ). Doze horas depois os animais foram anestesiados com éter, tiveram seu abdômen aberto e foram sacrificados por hemorragia, durante a reperfusão do fígado com salina gelada. Cada fígado inteiro foi rapidamente lavado com salina e mergulhado numa solução a 2 % de dodecilsulfato de sódio em tampão Tris 10 mM contendo 10 mM EDTA e 0,15 M cloreto de sódio, pH 7,8.

Nesta solução o fígado foi picotado finamente com uma tesoura e permaneceu por uma noite. A mistura resultante foi extraída duas vezes com dois volumes de fenol tamponado pH 7,8 e, depois, com um volume de uma solução de clorofórmio/butanol 24:1. Dois volumes de etanol gelado foram adicionados à fração aquosa resultante, e a mistura resultante foi mantida em congelador a -20 °C por pelo menos 3 h. Caso os ácidos nucléicos não se apresentassem visíveis nesta etapa, adicionava-se à mistura uma solução salina 5 M gelada, na proporção de 10 % do volume inicial, para induzir a precipitação. O precipitado era então centrifugado, lavado com etanol gelado e seco a vácuo.

Para eliminar a fração de RNA desse precipitado de ácidos nucléicos, redissolveu-se o mesmo em tampão Tris 10 mM e tratou-se a solução com ribonuclease T1 livre de desoxirribonuclease ( 2000 U/mg de ácido ) por 1 h a 37 °C. O DNA livre de RNA foi novamente precipitado com etanol gelado, centrifugado, lavado e seco sob vácuo.

As separações cromatográficas de bases livres foram realizadas a partir de soluções de DNA, hidrolisado em duas condições diferentes. Um protocolo, sequencial, empregava uma solução de DNA 3 mg/ml, submetida uma hidrólise "neutra" inicial, em fosfato de sódio 10 mM pH 7,0 por 30 min a 100 °C

seguida por uma hidrólise “ácida”, em ácido clorídrico 0,1 M por 1 h a 70 °C. Entre as etapas o DNA era precipitado com ácido clorídrico 0,1 M gelado e rapidamente centrifugado para a separação do sobrenadante ( hidrolisado neutro ). Os sobrenadantes das soluções submetidas a cada etapa da hidrólise sequencial foram secos a vácuo em tubos plásticos tipo “Eppendorf” e ressuspendidos para uso na fase móvel. Este procedimento foi posteriormente substituído por uma etapa única de hidrólise “ácida”, em que o DNA em solução 1 mg/ml era diretamente submetido a uma hidrólise idêntica à da etapa sequencial “ácida”, utilizada anteriormente. Neste caso, a solução das bases em ácido clorídrico 0,1 M foi injetada diretamente, após filtração, no cromatógrafo.

### Cromatografia do DNA hidrolisado

#### Pesquisa de bases modificadas

Diversos sistemas de cromatografia foram utilizados no estudo da ocorrência de C8-metil-guanina no DNA dos animais expostos. Nas análises de cromatografia com par iônico, empregou-se uma coluna de  $\mu$ Bondapak C18 com 250 mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro, em que as partículas são irregulares, com 10  $\mu$ m de diâmetro. A fase móvel utilizada neste ensaios consistia de uma solução de fosfato monobásico de sódio 50 mM pH 3,2 adicionado de PIC-B7 ou 5 mM de heptano-sulfonato de sódio mais 5 % v/v de ácido acético concentrado pH 3,2 em água desionizada. Ambas as fases móveis forneceram resultados indistinguíveis, a escolha dependendo basicamente da disponibilidade dos materiais para sua confecção. As amostras utilizadas nestes ensaios foram hidrolisadas em duas etapas e uma injeção adequada usava o equivalente ao obtido de 50 a 200  $\mu$ g de DNA, tipicamente 100  $\mu$ g.

Nas cromatografias de troca iônica, empregaram-se igualmente colunas de troca catiônica Partisil SCX ( Phenomenex ou Whatman ). Nestes casos foram estudados dois tipos de fase móvel: fosfato de sódio pH 2,5 ou

formiato de amônio pH 2,7 ou 2,9. Em alguns experimentos, foi adicionada uma porcentagem de 1 ou 2 % de metanol, como indicado no capítulo de resultados. As concentrações de sal das fases móveis empregadas foram sendo diminuídas à medida que as colunas envelheciam, para manter os tempos de retenção em valores aceitáveis. Estes procedimentos, por si só, não alteram a ordem de saída dos picos e nem a sua distância proporcional relativa, desde que seja sempre mantido o mesmo pH final. As amostras utilizadas nestes ensaios foram hidrolisadas em uma única etapa, e as quantidades ótimas injetadas variam de 25 a 150  $\mu\text{g}$  de amostra, embora esta faixa possa ser estendida, com algum prejuízo da resolução dos picos detectados.

A detecção das bases cromatografadas foi acompanhada por absorção de luz ultravioleta, por fluorescência e por amperometria. A absorção de luz foi medida no detector de arranjo de fotodiodos entre 230 e 320 nm, com fenda de 3 nm, em intervalos de tempo de 5 a 15 s por espectro coletado, representando cada espectro a média de medidas obtidas em intervalos de 50 a 100 ms. O acerto dos tempos de obtenção das medidas individuais foi feito segundo as condições de calibração e ajuste de sensibilidade do próprio equipamento. Consideravam-se, neste ajuste, basicamente, a idade da lâmpada e as características de absorção de luz pela fase móvel utilizada na região de interesse. Este último fator é mais relevante no caso das fases móveis que utilizam ácido acético, para comprimentos de onda menores do que 235 nm. A emissão de fluorescência, após excitação a 285 nm, foi acompanhada, em todos os casos, a 365 nm. A detecção eletroquímica de C8-metil-guanina foi efetuada segundo protocolo especialmente desenvolvido utilizando potenciais aplicados de oxidação na faixa compreendida entre 0,85 V e 0,95 V contra eletrodos de referência de prata/cloreto de prata, a magnitude do potencial de detecção dependendo basicamente da fase móvel utilizada. As amostras foram oxidadas na superfície de eletrodos planos de trabalho construídos em carbono vítreo, em celas de fluxo de 20  $\mu\text{l}$ . Cromatogramas de misturas de padrões com composição conhecida foram pareados com cromatogramas de amostra a cada variação de potencial de oxidação.

## RESULTADOS

### Geração de radicais de carbono "in vivo"

Radicais aduto de PBN são detectáveis na bile e em extratos orgânicos de fígado de animais expostos a hidrazina ou aos derivados testados como se pode observar nas figuras 1 e 2. O espectro de EPR dos radicais aduto já é detectável na bile 15 min após a exposição e começa a diminuir após 1 h. Embora os animais cujo acesso livre à ração tenha sido mantido antes da exposição à droga apresentem espectros dos mesmos radicais aduto mensuráveis na bile, o sinal de EPR é mais intenso em animais mantidos em jejum e naqueles submetidos a depleção de glutathiona com éster dietilmalêico. A exposição prévia ao éster dietilmalêico por tempos superiores a 2 h leva ao desaparecimento do sinal. As constantes de desdobramento hiperfino observadas em qualquer um dos casos são compatíveis com as esperadas para adutos de radicais alquila ( figuras 1 e 2, Tabela II ), exceção feita aos adutos observados em animais expostos à fenil-hidrazina, em que as constantes de desdobramento hiperfino correspondem às dos radicais aduto do radical fenila no caso da bile e de um radical de lipídio centrado no oxigênio, no caso dos extratos orgânicos ( figuras 1F e 2F, Tabela II) [Buettner, 1987].

Controles não expostos não mostram nenhum sinal ou mostram apenas as duas linhas estreitas que correspondem ao espectro do radical ascorbila. O sinal correspondente ao radical ascorbila também aparece ocasionalmente somado aos sinais dos radicais aduto presentes nos animais expostos à hidrazina ou a seus derivados, como pode ser observado nos espectros da figura 1, linhas C e D. As constantes de desdobramento hiperfino dos radicais aduto provenientes dos animais expostos à hidrazina são bastante semelhantes àquelas medidas nos espectros de bile ou extrato de fígado dos animais expostos aos derivados de hidrazina substituídos com o grupo metila. A exceção é a 1,2-dimetil-hidrazina, que não apresenta espectro de aduto de PBN na bile.

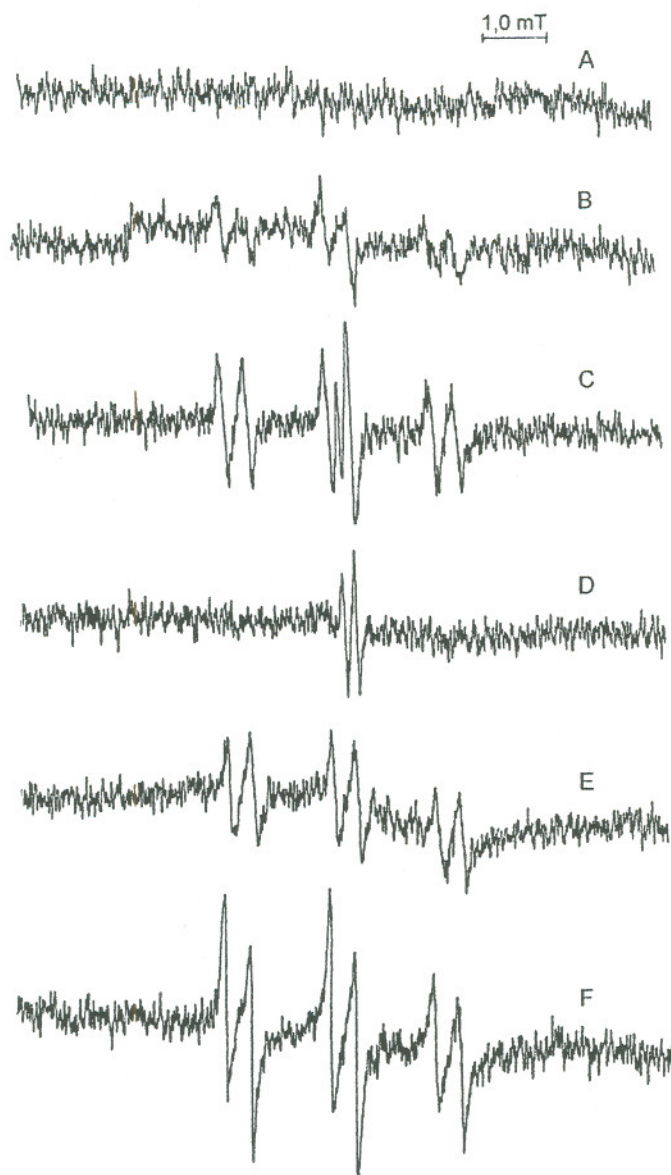


FIGURA 1 - Espectros de EPR medidos na bile de animais que receberam uma injeção intraperitoneal de PBN, 125 mg/kg de peso, e uma dose única de ( A ) solução fisiológica, 500  $\mu$ l; ( B ) hidrazina, 90 mg/kg de peso; ( C ) metil-hidrazina, 35 mg/kg de peso; ( D ) 1,2-dimetil-hidrazina, 478 mg/kg de peso; ( E ) hidrazona do formaldeído, 125 mg/kg de peso; ( F ) fenil-hidrazina, 188 mg/kg de peso. A bile foi reoxidada por um fluxo de ar mantido por 1 min, antes das medidas. Condições empregadas para a medição: potência: 20 mW, amplitude de modulação: 0,1 mT, constante de tempo: 0,5 s, velocidade de varredura: 0,05 mT/s.

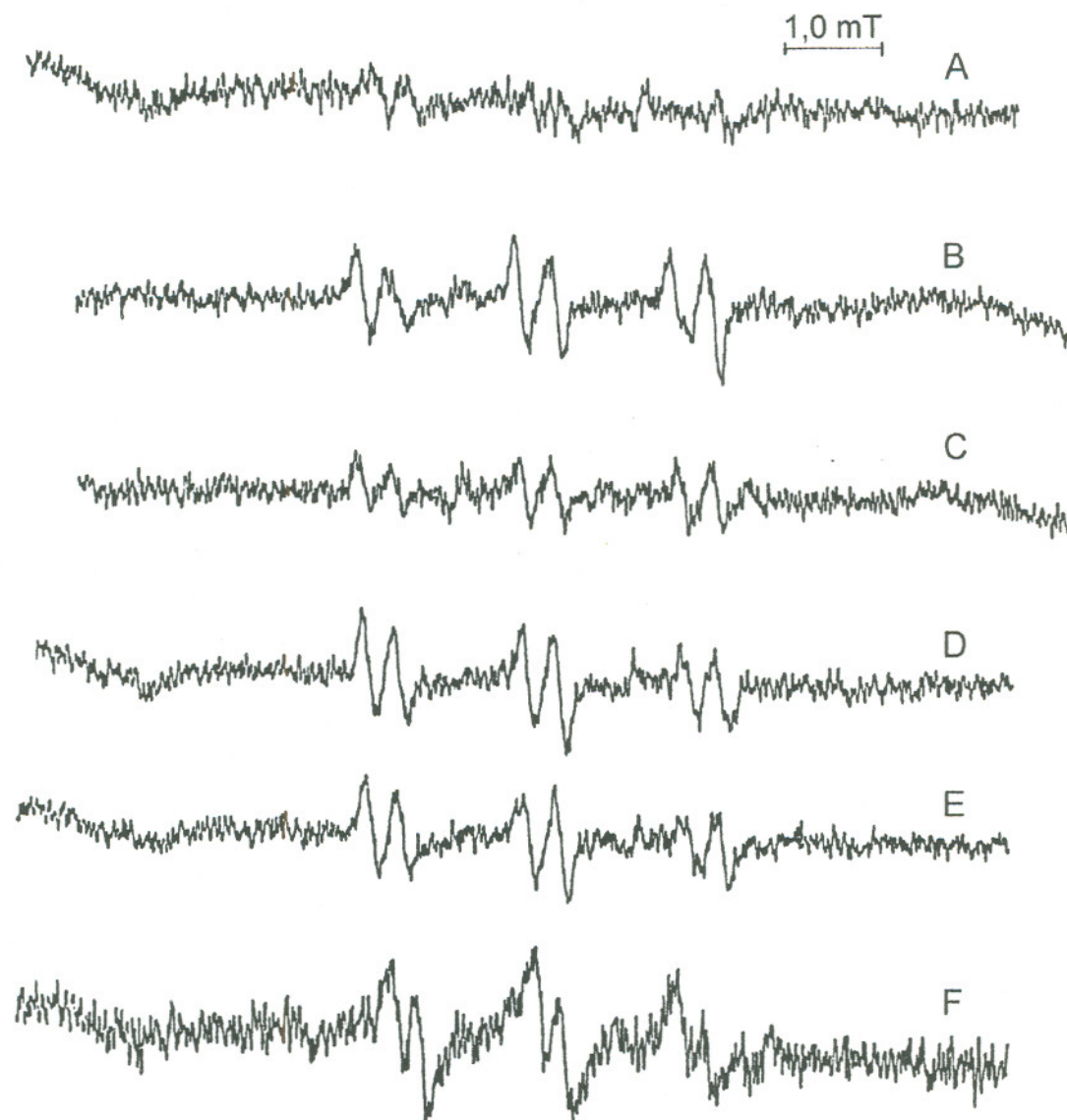


FIGURA 2 - Espectros de EPR medidos em solução aquosa obtida por ressuspensão do extrato orgânico de fígado de animais que receberam uma injeção intraperitoneal de PBN, 125 mg/kg de peso, e uma dose única de ( A ) solução fisiológica, 500  $\mu$ l; ( B ) hidrazina, 90 mg/kg de peso; ( C ) metil-hidrazina, 35 mg/kg de peso; ( D ) 1,2-dimetil-hidrazina, 478 mg/kg de peso; ( E ) hidrazona do formaldeído, 125 mg/kg de peso; ( F ) fenil-hidrazina, 188 mg/kg de peso. Condições empregadas para a medição: potência 20 mW, amplitude de modulação 0,1 mT, constante de tempo 0,5 s, velocidade de varredura 0,05 mT/s, número de varreduras acumuladas: 3



Tabela II  
Constantes de desdobramento hiperfino dos radicais aduto de PBN  
captados "in vivo"\*

	Bile		Fígado (extratos orgânicos)	
	$a_N$ , mT	$a_H$ , mT	$a_N$ , mT	$a_H$ , mT
Controle**	-	-	-	-
Hidrazina	1,62***	0,36***	1,63	0,32
Metil-hidrazina	1,67	0,35	1,63	0,32
1,2-dimetil-hidrazina	-	-	1,62	0,32
Hidrazona do formaldeído	1,63	0,35	1,65	0,32
Fenil-hidrazina	1,64	0,41	1,47	0,23

\* valores médios para dois ou três animais, a variação máxima entre as medidas é 5 %.

\*\* n=3.

\*\*\* n=6,  $a_N = 1,616 \pm 0,005$  mT,  $a_H = 0,360 \pm 0,006$  mT.

Como uma indicação complementar comparamos espectros de adutos dos radicais metila e metoxila com o PBN, produzidos "in vitro" e adicionados à bile de animais não expostos ( figura 3 ). Como o efeito do solvente sobre os espectros de EPR pode ser importante, verificamos as constantes de desdobramento hiperfino do radical aduto proposto, o PBN-metila em bile:  $a_N = 1,64$  mT,  $a_H = 0,36$  mT . A bile foi usada como solvente na proporção 99:1 com o tampão de reação. O espectro do radical obtido "in vivo" assemelha-se bastante ao do PBN-metila em bile.

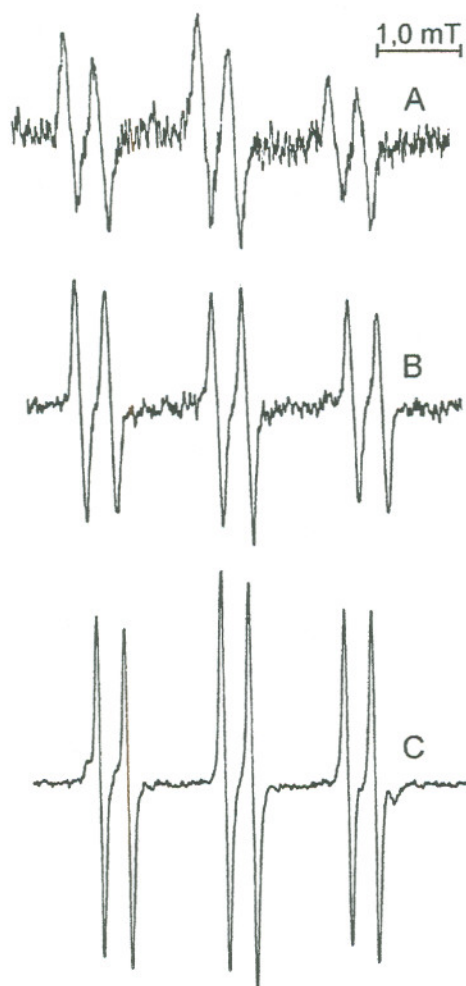


FIGURA 3 - Comparação do espectro de EPR correspondente ao radical aduto de PBN medido na bile ( A ) de animais expostos à hidrazina, espectro representativo da amostragem (  $a_N = 1,615 \pm 0,005$  mT,  $a_H = 0,361 \pm 0,006$  mT,  $n=6$  ) com os adutos ( B ) PBN-metila (  $a_N = 1,64$  mT,  $a_H = 0,36$  mT ) e ( C ) PBN-metoxila (  $a_N = 1,58$  mT  $a_H = 0,33$  mT ) preparados "in vitro" e adicionados à bile de animais não expostos.

O espectro do radical metoxila também foi comparado ao espectro do radical aduto obtido "in vivo" porque é sabido que radicais centrados no carbono reagem facilmente com o oxigênio. Em condições compatíveis com as observadas "in vivo" geram, desta maneira, radicais centrados no oxigênio. Estes participam, como intermediários de reações de lipoperoxidação, por exemplo. O radical metoxila poderia ser resultado da decomposição de um radical peroxila instável formado pela reação de um radical metila, primário, com o oxigênio molecular [Britigan e cols., 1990]. O espectro do aduto obtido na bile dos animais não é tão próximo ao obtido para o PBN-metoxila em bile  $a_N = 1,58$  mT,  $a_H = 0,33$  mT. Não observamos nenhuma diferença entre o rendimento dos radicais aduto da bile de animais tratados com hidrazina colhida sobre quelantes de ferro ou não.

Radicais aduto de DMPO também são detectáveis na bile ( figura 4 ) de animais tratados com a hidrazina e qualquer um dos derivados testados. Neste caso também as constantes de desdobramento hiperfino são compatíveis com as esperadas para adutos de radicais alquila ( figura 4 ), exceto no caso da fenil-hidrazina. Neste caso, as constantes correspondem às esperadas para o radical DMPO-fenila (  $a_N = 1,604$  mT,  $a_H = 2,473$  mT ) [Buettner, 1987]. Mesmo atribuíveis a radicais alquila, as constantes de desdobramento hiperfino obtidas ( Tabela III ) são ligeiramente maiores do que as descritas para o radical metila. Dentre as constantes de desdobramento hiperfino relatadas para adutos de DMPO, os valores de  $a_H$  maiores do que 2,5 mT correspondem a radicais DMPO-alquila obtidos durante a oxidação de nitrosaminas. A atribuição de identidade dos radicais primários não foi possível também neste caso [Buettner, 1987]. Em alguns animais aparecem outras linhas somadas ao espectro do aduto DMPO-alquila. Estas linhas aparecem também em animais controle e devem originar-se de decomposição do captador ou de processos inespecíficos do próprio animal. ,

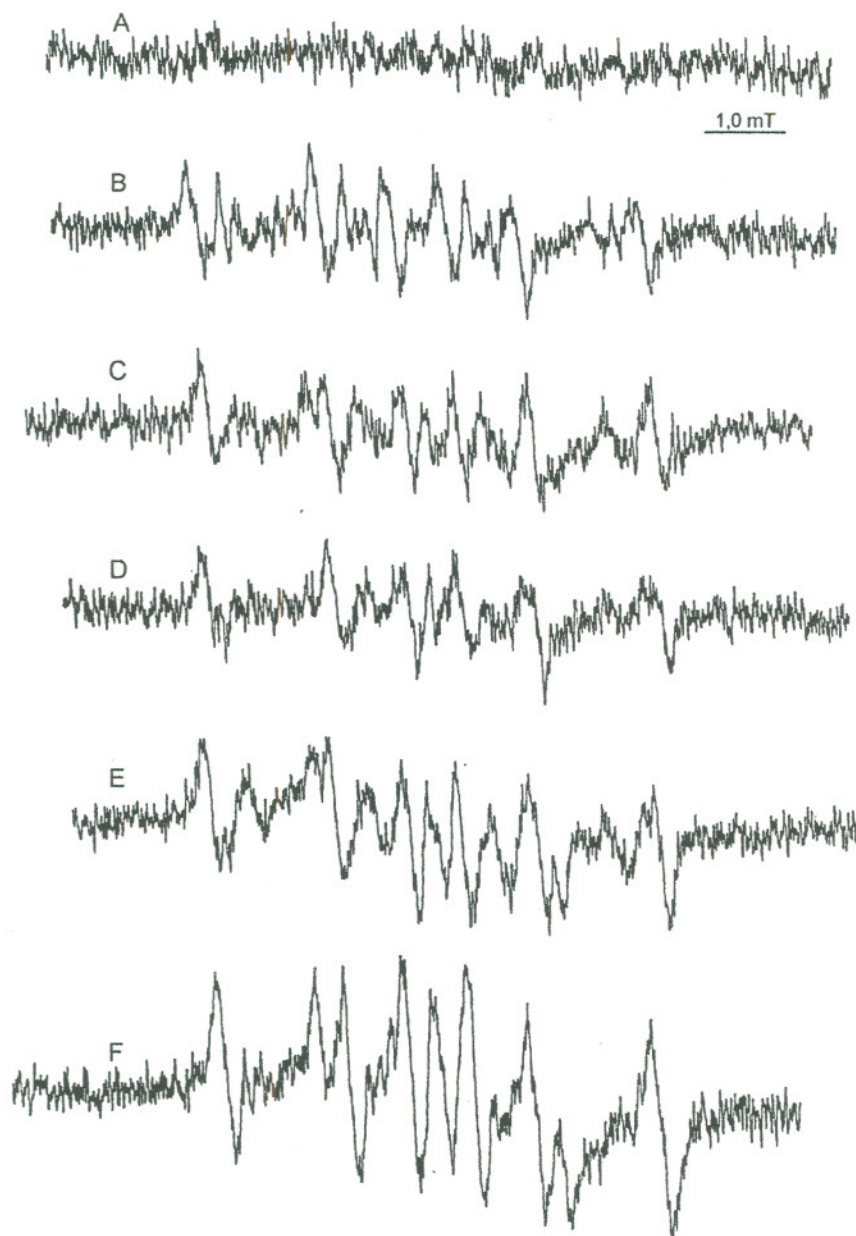


FIGURA 4 - Espectros de EPR medidos na bile de animais que receberam uma injeção intraperitoneal de DMPO, 500  $\mu$ l/kg de peso, e uma dose única de ( A ) solução fisiológica, 500  $\mu$ l; ( B ) hidrazina, 90 mg/kg de peso; ( C ) metil-hidrazina, 35 mg/kg de peso; ( D ) 1,2-dimetil-hidrazina, 478 mg/kg de peso; ( E ) hidrazona do formaldeído, 125 mg/kg de peso; ( F ) fenil-hidrazina, 188 mg/kg de peso. A bile foi reoxidada por um fluxo de ar mantido por 1 min antes das medidas. Condições empregadas para a medição: potência: 20 mW, amplitude de modulação: 0,1 mT, constante de tempo: 0,5 s, velocidade de varredura: 0,05 mT/s.

Identificação dos radicais aduto gerados "in vivo" pode ser obtida pelo uso de doadores de grupos metila marcados com carbono 13 [Mottley e Mason, 1989, Connor e cols, 1986]. Neste sentido, testamos metionina ou formiato de sódio, bem como metanol e até mesmo a hidrazona do formaldeído marcados. Com ambos os captadores, os espectros obtidos "in vivo" mostraram, em qualquer caso, as mesmas constantes apresentadas nas tabelas II e III. Não se conseguiu obter o espectro do radical aduto marcado com carbono 13 com nenhuma das estratégias de marcação empregadas.

Tabela III

Constantes de desdobramento hiperfino dos radicais aduto de DMPO captados "in vivo"

	Bile	
	$a_N$ , mT	$a_H$ , mT
Controle**	1,46	1,65
	-	-
Hidrazina	1,63	2,55
Metil-hidrazina	1,60	2,54
1,2-dimetil-hidrazina**	1,59	2,52
	1,46	1,65
Hidrazona do formaldeído	1,64	2,59
Fenil-hidrazina	1,62	2,45

\* valores médios para dois animais, a variação máxima entre as medidas é 2 %.

\*\*Resultados apresentados por animal. No caso da 1,2-dimetil-hidrazina um dos animais apresentou apenas o sinal observado no controle.

### Formação do radical tiil-hemoglobina "in vivo"

O sangue de animais tratados com hidrazina mostra traços do radical de tiil-hemoglobina [Maples e cols., 1988], captado pelo DMPO ( figura 5 ). Este radical é formado em grande quantidade em animais tratados com fenil-hidrazina e pode ser observado em animais tratados com metil-hidrazina e com dimetil-hidrazina ( figura 5 ), mas não com a hidrazona do formaldeído. O radical aduto de DMPO com a tiil-hemoglobina já tinha sido descrito em animais tratados com hidrazina [Maples e cols., 1988], e sua formação foi atribuída à reação entre a hemoglobina e espécies reativas de oxigênio.

Como não foi possível observar a formação desse aduto no sangue de animais tratados com a hidrazona do formaldeído, estudamos a reação de eritrócitos de rato isolados e oxihemoglobina de rato "in vitro" com a hidrazina e com a hidrazona do formaldeído.

### Formação de radicais livres durante a biotransformação de hidrazina "in vitro"

A hidrazona do formaldeído é transformada por soluções de oxi-hemoglobina de rato a radicais de carbono captáveis por DMPO. O sinal resultante aparece na figura 6 - linhas B e C - e mostra a presença de dois radicais aduto. Um dos adutos tem espectro com constantes de desdobramento compatíveis com as do aduto do radical metila (  $a_N = 1,62$  mT,  $a_H = 2,30$  mT ). Este espectro aparece somado com um outro, correspondente ao espectro de um produto de redução do DMPO, o radical do dímero reduzido do captador (  $a_N = 1,475$  mT,  $a_H = 1,64$  mT ) [Thornalley, 1984]. A hemoglobina incubada com a hidrazina não produz o aduto DMPO-alquila, aparecendo neste caso apenas o espectro do dímero reduzido do captador ( figura 6 A ).

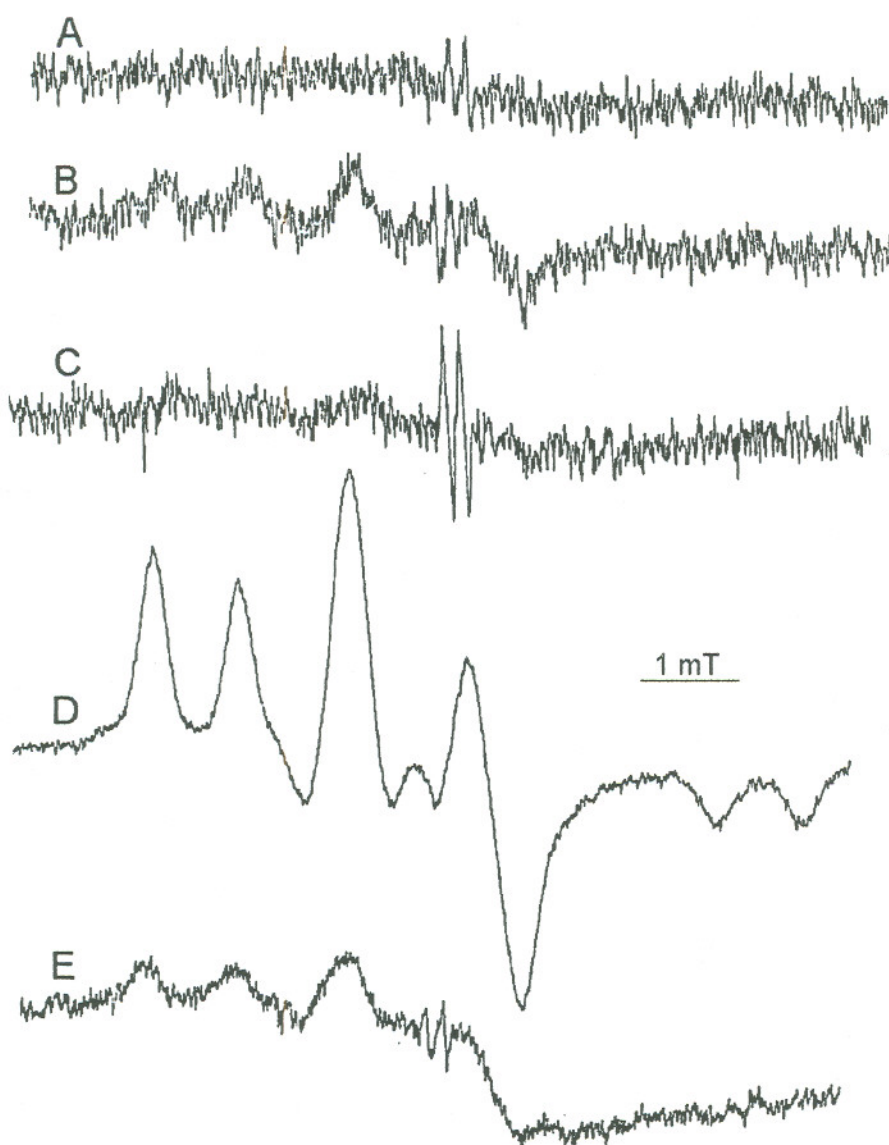


FIGURA 5 - Espectros de EPR medidos no sangue de animais que receberam uma injeção intraperitoneal de DMPO, 500  $\mu$ l/kg de peso, e uma dose única de ( A ) solução fisiológica, 500  $\mu$ l; ( B ) hidrazina, 90 mg/kg de peso; ( C ) metilhidrazina, 35 mg/kg de peso; ( D ) fenilhidrazina, 188 mg/kg de peso ( E ) 1,2-dimetil-hidrazina, 478 mg/kg de peso. O sangue foi reoxidado por um fluxo de ar mantido por 1 min antes das medidas. Condições empregadas para a medição: potência: 20 mW, amplitude de modulação: 0,1 mT, constante de tempo: 0,5 s, velocidade de varredura: 0,05 mT/s. Apenas no caso da 1,2-dimetil-hidrazina o espectro foi acumulado, número de varreduras acumuladas: 3. Ganho:  $2 \times 10^6$ , exceto para a linha D:  $4 \times 10^5$ .

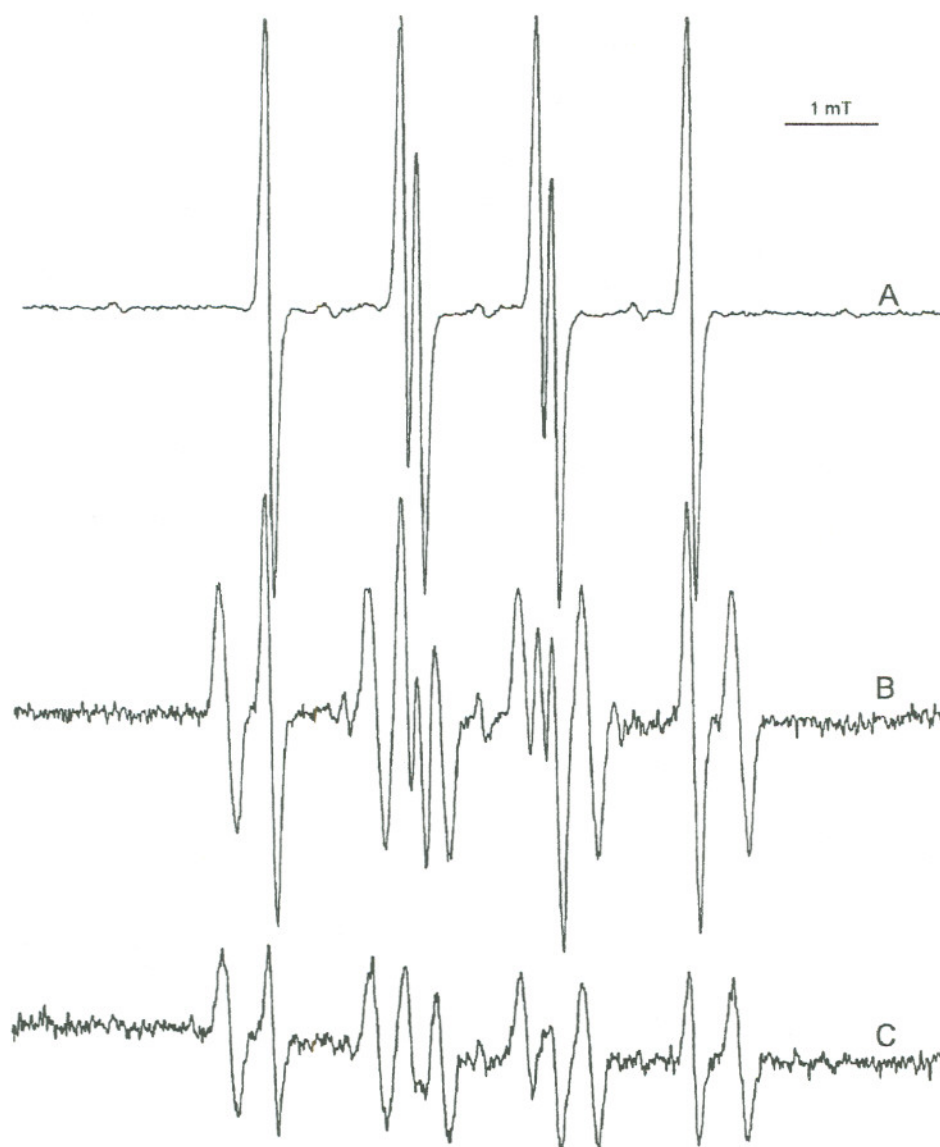


FIGURA 6 - Espectros de EPR dos radicais aduto de DMPO obtidos de misturas de reação contendo hemoglobina de rato 0,66 mM e DMPO 0,1 M em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4 na presença de hidrazina 40 mM, após 30 min incubação a 37 °C ( A ); ou de hidrazona 40 mM, após 10 min ( B ) ou 30 min de incubação a 37 °C ( C ). Condições empregadas para a medição: potência: 20 mW, amplitude de modulação: 0,1 mT, constante de tempo: 0,5 s, velocidade de varredura: 0,05 mT/s.



Suspensões de eritrócitos de rato com hematócrito de 50 %, incubadas por 90 min a 37 °C com a hidrazina ou com a hidrazona do formaldeído 20 mM mostram a formação de adutos de tiil hemoglobina, embora a formação só seja sempre evidente na presença de azida ( figuras 7E a 7H ), utilizada para inibir a catalase. Nestas condições, apenas a hidrazina mostra a formação de tiil-hemoglobina em suspensões de eritrócitos na ausência de azida ( figura 7B ).

Radicais aduto de tiil-hemoglobina são formados mais rapidamente quando os eritrócitos são tratados com metil-hidrazina do que nos tratamentos com hidrazina ou hidrazona. Quantidades mensuráveis do radical aduto são obtidas após 10 min de incubação a 37 °C ( figura 8 ) com suspensões de eritrócitos com 50 % de hematócrito, mesmo na ausência de azida. Neste caso, superpõem-se os espectros do radical DMPO-tiil-hemoglobina e o do aduto de um radical de carbono (  $a_N = 1,62$  mT,  $a_H = 2,30$  mT ), provavelmente o radical metila ( figura 8 ).

Para estudar os radicais primários envolvidos no ataque à hemoglobina utilizam-se suspensões de eritrócitos mais diluídas [Maples e cols., 1988 e 1990]. Como a 37 °C mesmo as suspensões diluídas mostravam apenas o radical tiil-hemoglobina, efetuamos medidas à temperatura ambiente. Mesmo à temperatura ambiente, o radical aduto de DMPO-tiil-hemoglobina forma-se em quantidades detetáveis após 1 h de incubação das suspensões de eritrócitos com hematócrito de 50 % com a hidrazona e é claramente visível após 2 h de incubação ( figuras 9D a 9F ). A exposição à hidrazina, mas não à hidrazona, nestas mesmas condições, leva ao aparecimento de um espectro composto com o espectro do radical aduto DMPO-tiil-hemoglobina. Este espectro pode ser simulado como a combinação dos espectros dos adutos DMPO-H (  $a_N = 1,64$  mT,  $a_H = 2,275$  mT ) e de um radical de nitrogênio, provavelmente o DMPO-hidrazinila (  $a_N = 1,54$  mT,  $a_H = 1,88$  mT,  $a_{N'} = 0,185$  mT ) na proporção de 10:3 ( figura 10C ).

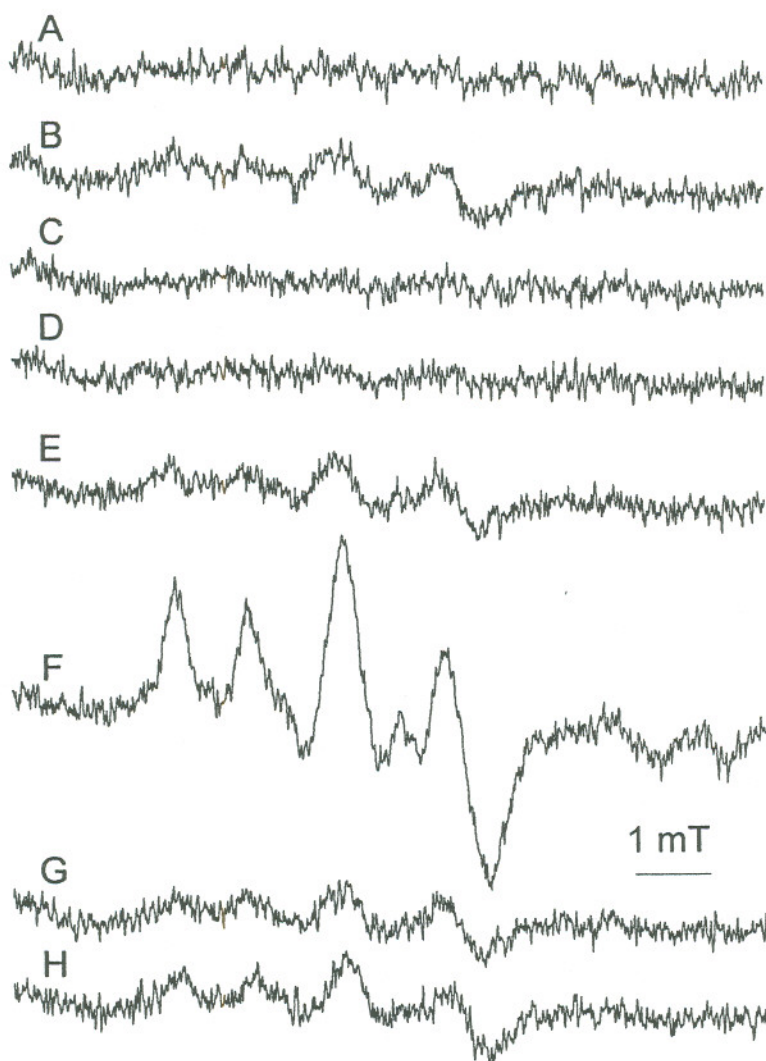
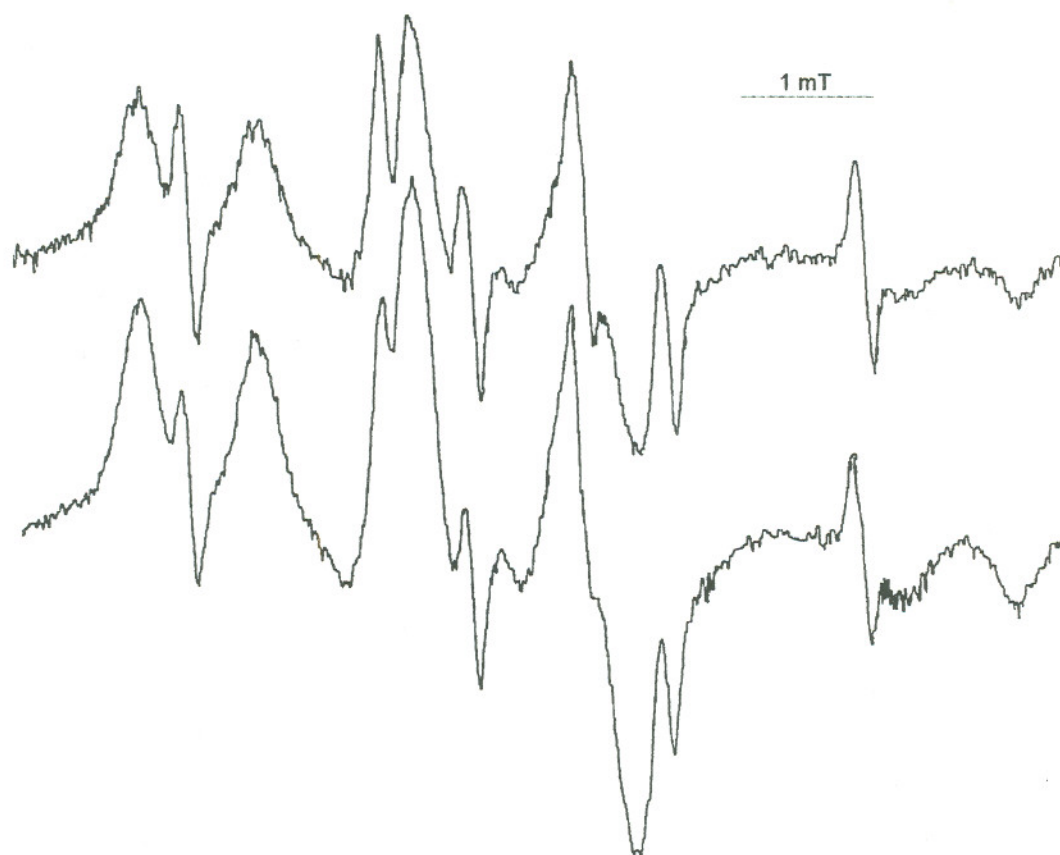


FIGURA 7 - Espectros de EPR dos radicais aduto de DMPO obtidos após incubação, por 90 min a 37 °C, de misturas de reação contendo DMPO 0,1 M e eritrócitos de rato em solução salina tamponada a pH 7,4 na ausência ( A, B, C e D ) ou na presença ( E, F, G e H ) de azida sódica 5 mM. As linhas A, C, E e G correspondem a misturas de reação contendo suspensões celulares com hematócrito de 5 %, enquanto as linhas B, D, F e H correspondem a hematócritos de 50 %. Cada uma das suspensões foi incubada com hidrazina 20 mM ( A, B, E e F ), ou hidrazona do formaldeído 20 mM ( C, D, G e H ). Condições empregadas para a medição: potência: 20 mW, amplitude de modulação: 0,1 mT, constante de tempo: 0,5 s, velocidade de varredura: 0,05 mT/s.



**FIGURA 8** - Espectros de EPR dos radicais aduto de DMPO-til-hemoglobina obtidos após incubação, por 10 min a 37 °C, de misturas de reação contendo 0,1 M DMPO e eritrócitos de rato com hematócrito de 50 % em solução salina tamponada a pH 7,4 e metil-hidrazina 5 mM sem nenhuma adição ( A ) ou na presença de azida sódica 5 mM ( B ). Condições empregadas para a medição: potência: 20 mW, amplitude de modulação: 0,1 mT, constante de tempo: 0,5 s, velocidade de varredura: 0,05 mT/s.

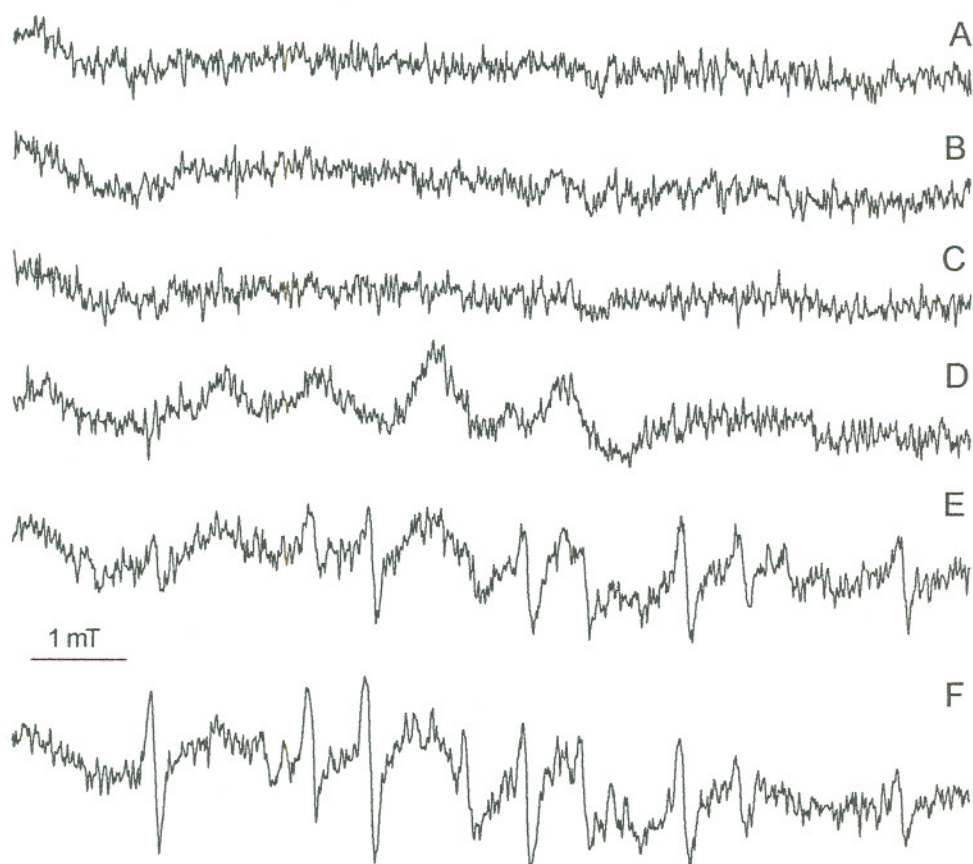


FIGURA 9 - Espectros de EPR dos radicais aduto de DMPO obtidos após incubação, por 2 h a 25 °C, de misturas de reação contendo eritrócitos de rato com hematócrito de 50 % em solução salina tamponada a pH 7,4 e formaldeído 40 mM ( A e B ), hidrazona do formaldeído 40 mM ( C e D ) ou hidrazina 40 mM ( E e F ). As linhas B, D e F correspondem a incubações feitas na presença de azida sódica 5 mM. Condições empregadas para a medição: potência: 20 mW, amplitude de modulação: 0,1 mT, constante de tempo: 0,5 s, velocidade de varredura: 0,05 mT/s.

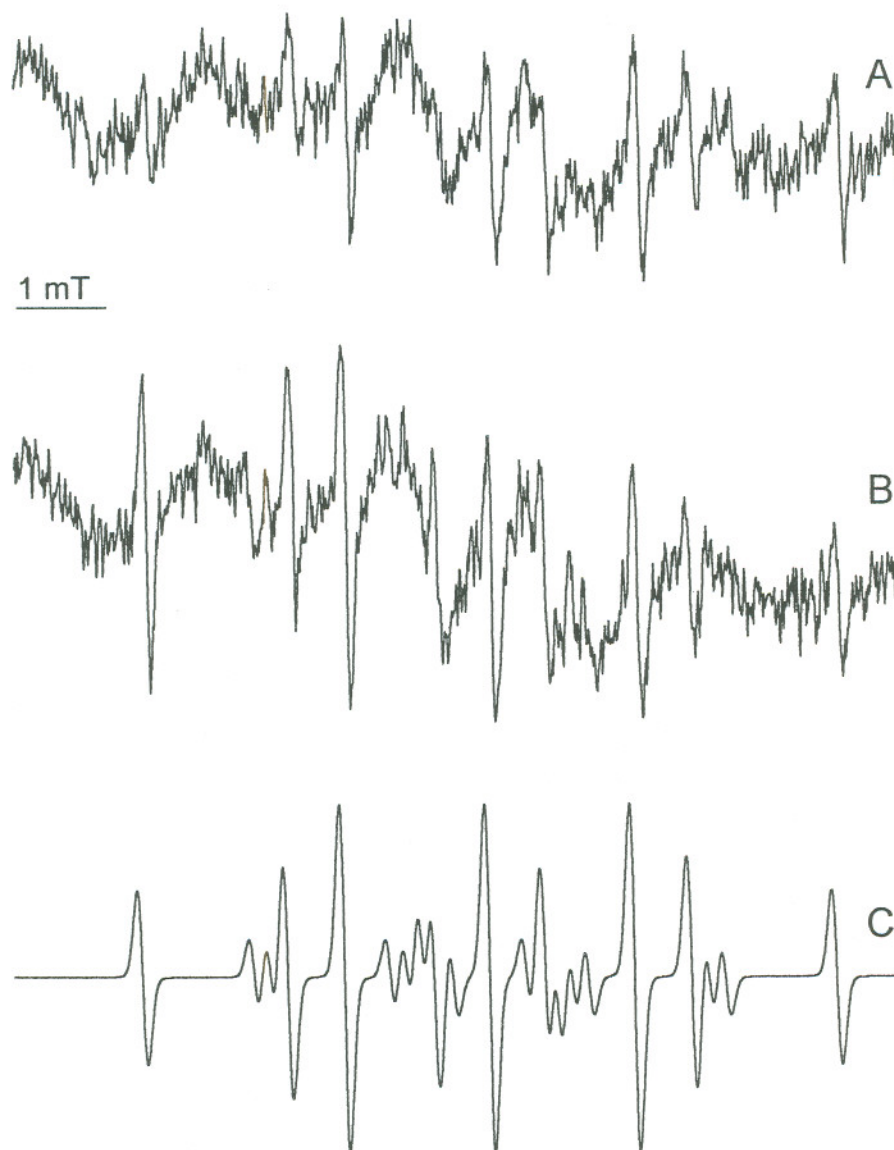


FIGURA 10 - Comparação entre (A, B) os espectros experimentais dos radicais aduto de DMPO obtidos de misturas de reação contendo eritrócitos de rato com hematócrito de 50 %, DMPO 0,1 M e hidrazina 40 mM, mostrados na figura 9, e (C) o espectro calculado para a soma dos adutos DMPO-H e DMPO-hidrazinila na proporção de 10:3. A linha B representa a amostra incubada na presença de azida. Condições empregadas para o cálculo: largura de linha 0,12 mT, proporção relativa de lorentziana 30 %, deslocamento relativo nulo entre os espectros.

Como o espectro do radical aduto DMPO-hidrazinila ( $a_N = 1,54$  mT,  $a_H = 1,88$  mT,  $a_{N'} = 0,185$  mT) não está descrito na literatura, foi feito um estudo das suas características para comparação com o espectro obtido nos eritrócitos.

O radical hidrazinila foi obtido durante a reação de hidrazina com peróxido de hidrogênio na presença de íons de cobre como descrito por Lim e Zhong [Lim e Zhong, 1989; Zhong e Lim, 1989]. As condições para a formação do radical hidrazinila foram verificadas pela obtenção do aduto de PBN, descrito por Noda e colaboradores [1985 e 1988]. O espectro do aduto DMPO-hidrazinila está mostrado na figura 11.

À temperatura ambiente as suspensões de eritrócitos com hematócrito de 5 % apresentam espectro detectável nas amostras incubadas com hidrazina 40 mM ( figura 12 ). Uma mistura de espectros aparece neste caso, ao invés do sinal do aduto DMPO-tiil hemoglobina ( figuras 12E e 12F ). Esta mistura de espectros parece corresponder a uma soma dos radicais aduto DMPO-H ( $a_N = 1,64$  mT,  $a_H = 2,275$  mT ), DMPO-hidrazinila ( $a_N = 1,54$  mT,  $a_H = 1,88$  mT,  $a_{N'} = 0,185$  mT ) e DMPO-alquila, simulado como DMPO-CH<sub>3</sub> ( $a_N = 1,62$  mT,  $a_H = 2,30$  mT ) na proporção 2:2:1 ( figura 13C ). Na presença de azida, a soma dos radicais adutos DMPO-H, DMPO-OH ( $a_N = 1,51$  mT,  $a_H = 1,51$  mT ) e DMPO-CH<sub>3</sub> na proporção 2:2:1 simula melhor a mistura de radicais obtida ( figura 13D ). Controles da reação não mostram a formação de radicais pelas células na presença apenas de formaldeído, em nenhuma das condições de exposição ou de incubação utilizadas para a hidrazona do formaldeído ( figuras 9 e 12 ).

A catalase foi apontada por Lambert e Shank [1988] como uma enzima importante na origem do dano por metilação em animais expostos à hidrazina, tendo como intermediário a hidrazona do formaldeído. Decidimos então investigar se a reação de oxidação da hidrazona do formaldeído pela catalase formava radicais metila "in vitro".

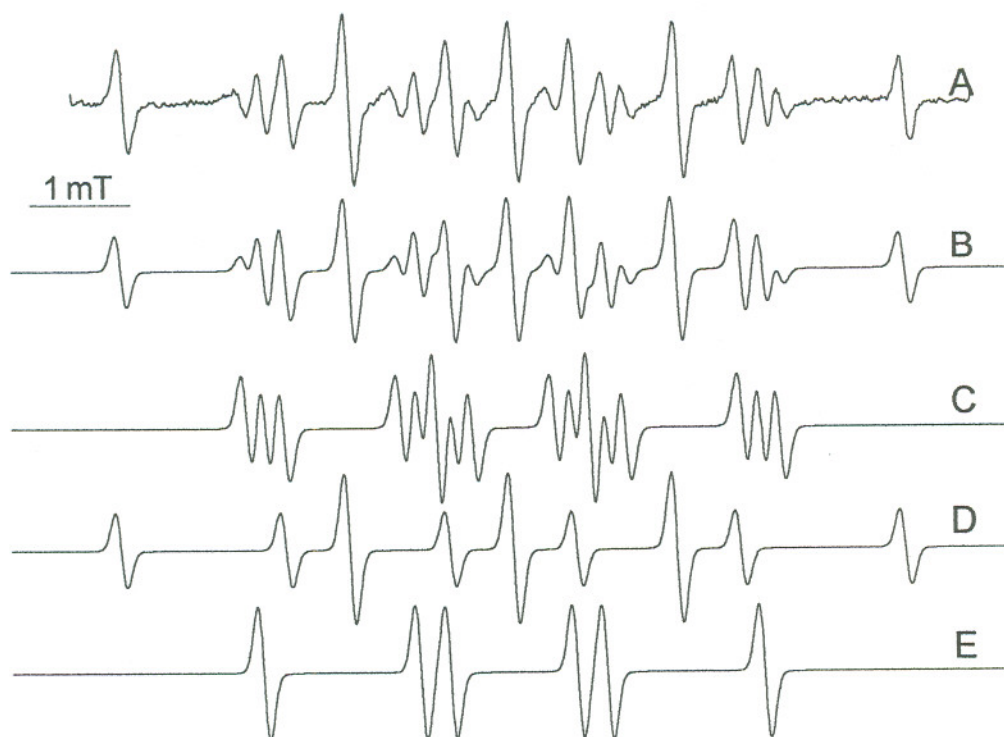


FIGURA 11 - A - Espectro de EPR dos radicais aduto obtidos por oxidação da hidrazina base ( 1 mM ) por íons de cobre ( 50  $\mu$ M ) na presença de DMPO ( 17 mM ), em tampão borato 0,1 M, pH 9,0. Condições empregadas para a medição: potência do gerador de microondas: 20 mW, amplitude de modulação: 0,1 mT, constante de tempo: 0,5 s, velocidade de varredura: 0,05 mT/s. B - Espectro calculado para simulação dos dados mostrados em A como soma das componentes apresentadas em C a E, na proporção de 1:5:2. C - Espectro calculado para a componente DMPO-hidrazinila (  $a_N = 1,54$  mT,  $a_H = 1,88$  mT,  $a_{N'} = 0,185$  mT ) D - Espectro calculado para a componente DMPO-H (  $a_N = 1,64$  mT,  $a_H = 2,275$  mT ) e E - Espectro calculado para a componente DMPO-CO<sub>2</sub> (  $a_N = 1,57$  mT,  $a_H = 1,87$  mT ). Condições empregadas para o cálculo: largura de linha 0,12 mT, proporção relativa de lorentziana 50 %, deslocamento relativo nulo entre os espectros.

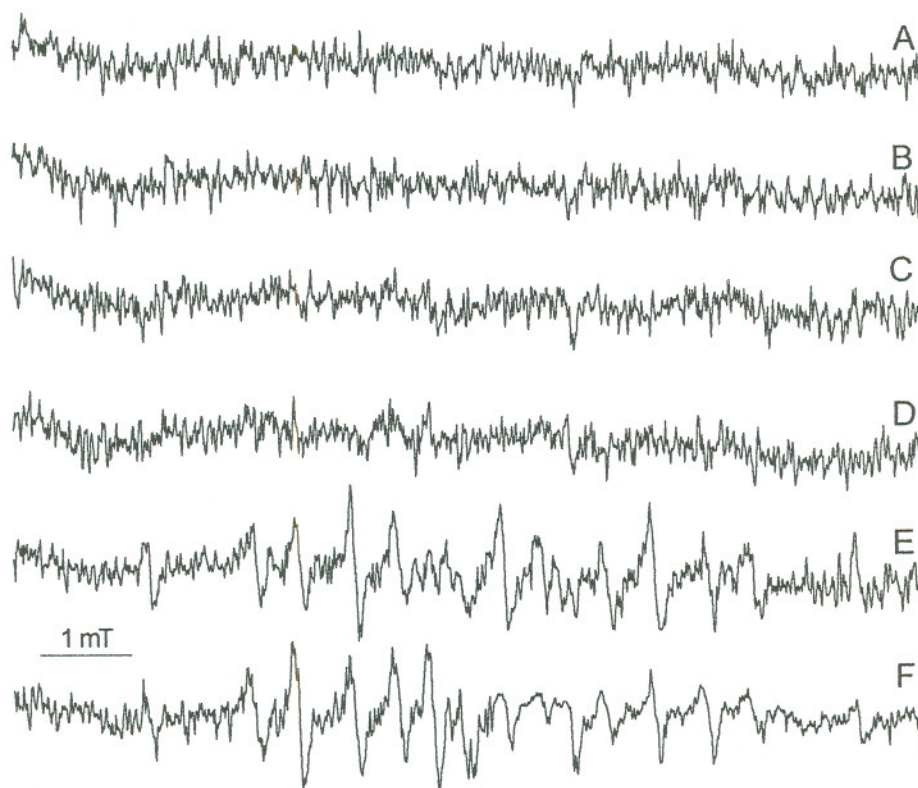
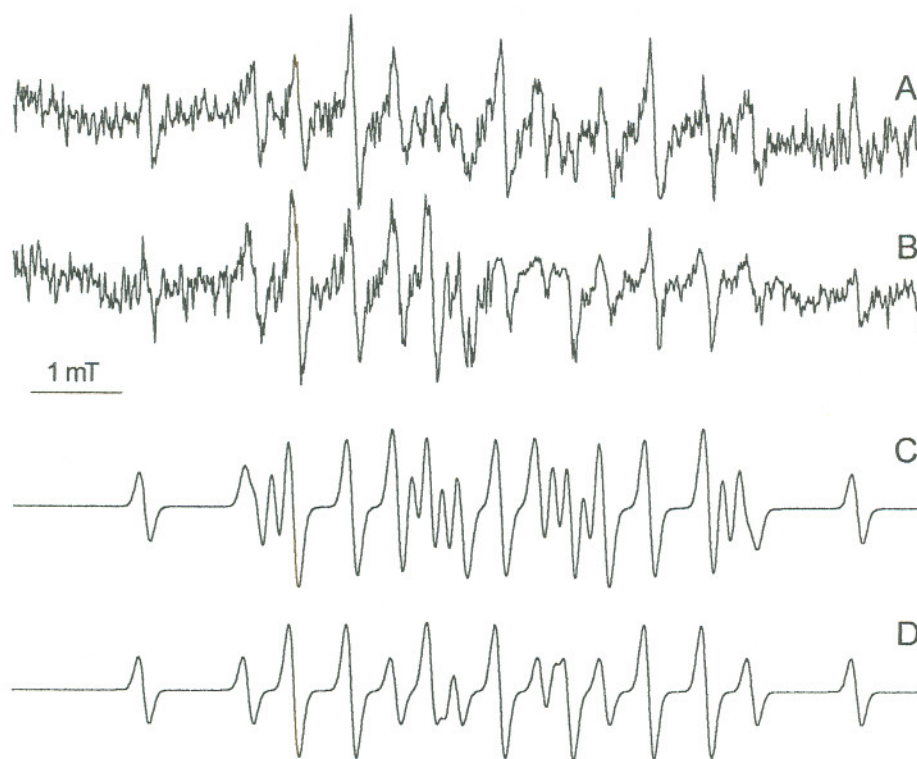


FIGURA 12 - Espectros de EPR dos radicais aduto de DMPO obtidos após incubação, por 2 h a 25 °C, de misturas de reação contendo 0,1 M DMPO e eritrócitos de rato com hematócrito de 5 % em solução salina tamponada a pH 7,4 com formaldeído 40 mM ( A e B ), hidrazona do formaldeído 40 mM ( C e D ) ou hidrazina 40 mM ( E e F ). As linhas B, D e F correspondem a incubações feitas na presença de azida sódica 5 mM. Condições empregadas para a medição: potência: 20 mW, amplitude de modulação: 0,1 mT, constante de tempo: 0,5 s, velocidade de varredura: 0,05 mT/s.





**FIGURA 13** - Comparação entre os espectros experimentais dos radicais aduto de DMPO obtidos de misturas de reação contendo eritrócitos de rato com hematócrito de 5 %, DMPO 0,1 M e hidrazina 40 mM, mostrados na figura 12 ( A e B ), e os espectros calculados para a soma dos adutos DMPO-H, DMPO-hidrazinila e DMPO-metila na proporção 2:2:1 ( C ) e dos adutos DMPO-H, DMPO-OH e DMPO-metila na proporção 2:2:1 ( D ). A linha B representa a amostra incubada na presença de azida. Condições empregadas para o cálculo: largura de linha 0,12 mT, proporção relativa de lorentziana 30 %, deslocamento relativo nulo entre os espectros.

A incubação da hidrazona do formaldeído com catalase, na presença do captador de spin DMPO, resulta na formação do espectro composto mostrado na figura 14A. As constantes de desdobramento hiperfino, observadas para as espécies radicalares que o compõem, correspondem às apresentadas pela literatura para os adutos do captador com o radical hidroxila ( DMPO-OH,  $a_N = 1,51$  mT,  $a_H = 1,51$  mT ), com um radical alquila, provavelmente o radical metila ( DMPO-R,  $a_N = 1,62$  mT,  $a_H = 2,30$  mT ) e traços do radical do captador reduzido ( DMPO-H,  $a_N = 1,64$  mT,  $a_H = 2,275$  mT (2H) ) [Buettner, 1987]. O radical aduto DMPO-R só aparece na mistura de reação contendo a hidrazona do formaldeído e a catalase; a hidrazona do formaldeído em solução sem a enzima, tanto quanto a hidrazina incubada com a catalase, são capazes de promover apenas a formação de DMPO-OH e de traços de DMPO-H ( figuras 14B e 14C ). O formaldeído não gera radicais aduto na presença de catalase ( figura 14D ), os traços de DMPO-OH observados são resultado de contaminação do captador de spin.

A maneira mais direta de identificar o radical alquila gerado é a utilização de um captador de spin do tipo nitroso composto, em que a adição do radical primário se faz diretamente no nitrogênio que participa do grupo nitróxido no radical aduto [Mottley e Mason, 1989]. Por este motivo, o captador de spin t-butil-nitróxido ( t-NB ) foi utilizado para identificar o radical de carbono formado na oxidação da hidrazona do formaldeído pela catalase, embora não seja suficientemente estável para estudos "in vivo" [Ohkuma e cols., 1981].

O radical secundário formado com o t-NB tem o espectro característico do aduto do radical metila: doze linhas dispostas como na figura 15A, segundo as constantes de desdobramento hiperfino  $a_N = 1,73$  mT e  $a_H = 1,45$  mT ( 3H ). O mesmo radical aduto foi observado na ausência da enzima, com rendimentos bem menores ( figura 15B e tabela I ). Nem a hidrazina nem o formaldeído produzem este aduto quando incubados isoladamente com a catalase na presença do t-NB ( figuras 15C e 15D ).

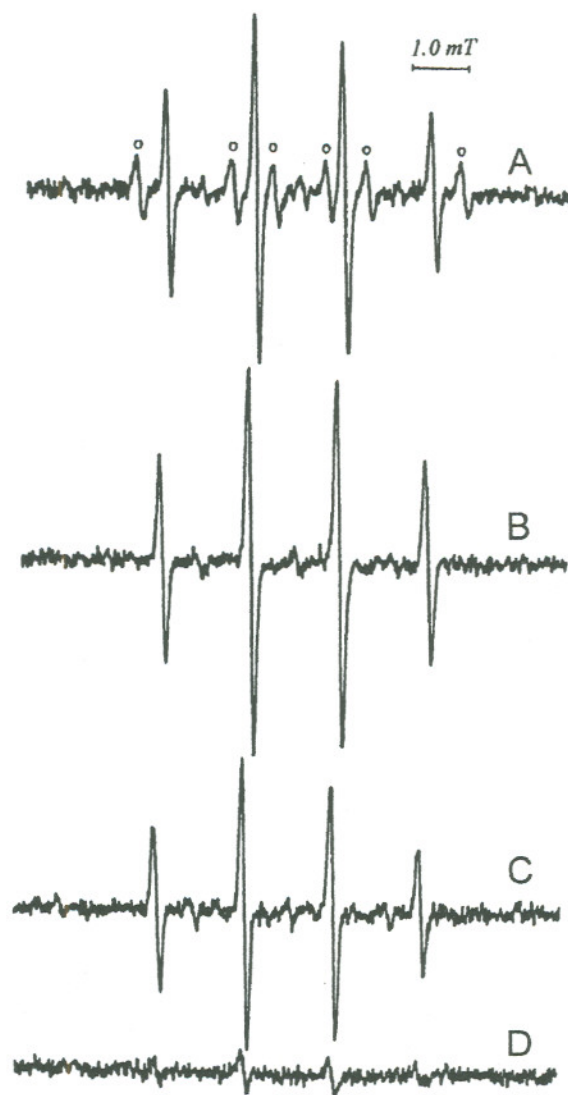


FIGURA 14 - Espectros de EPR dos radicais aduto de DMPO obtidos após incubação das misturas de reação indicadas abaixo por 10 min a 37 °C, na presença de 25 mM DMPO e 0,1 mM de DTPA em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4. A - hidrazona do formaldeído 5 mM, catalase 2  $\mu$ M; B - hidrazona do formaldeído 5 mM; C - hidrazina 5 mM, catalase 2  $\mu$ M; D - formaldeído 5 mM, catalase 2  $\mu$ M. Condições empregadas para a medição: potência: 20 mW, amplitude de modulação: 0,1 mT, constante de tempo: 0,5 s, velocidade de varredura: 0,02 mT/s

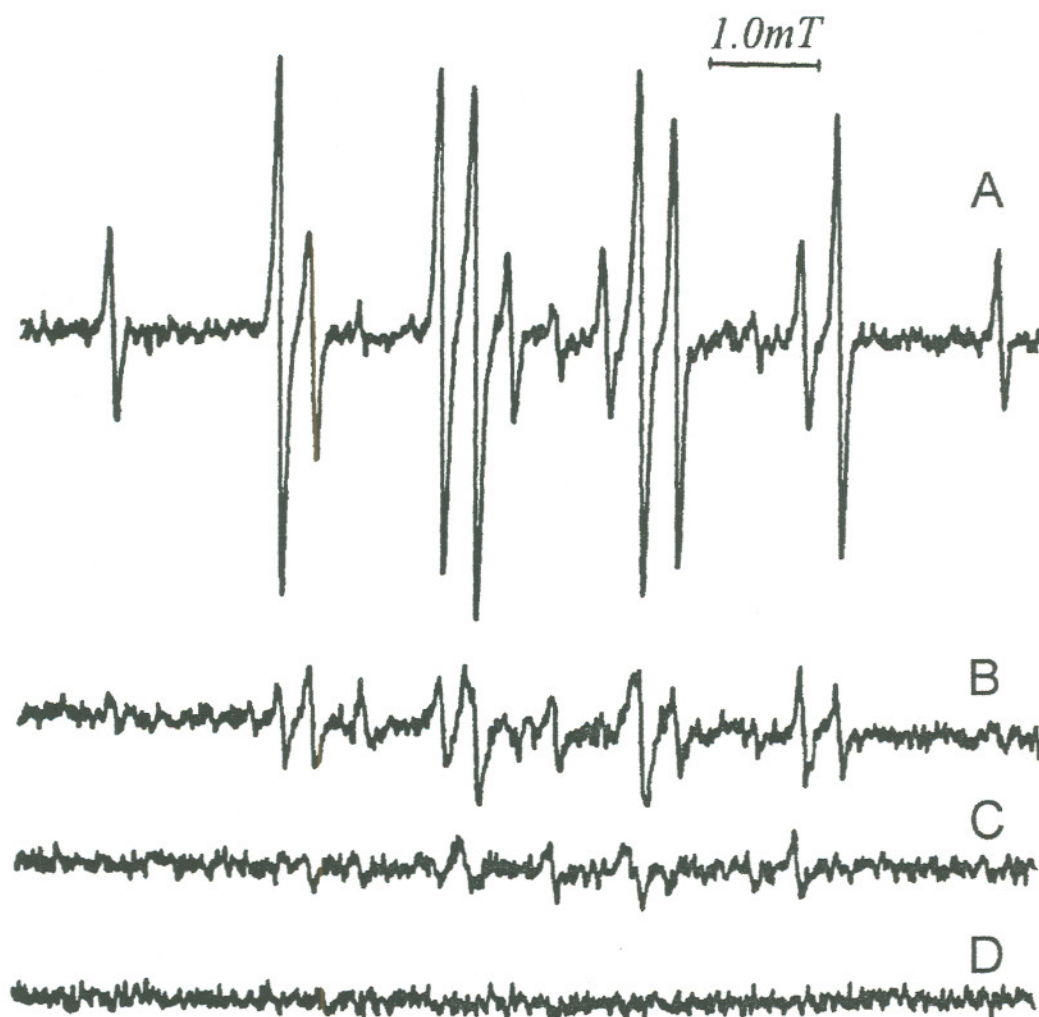
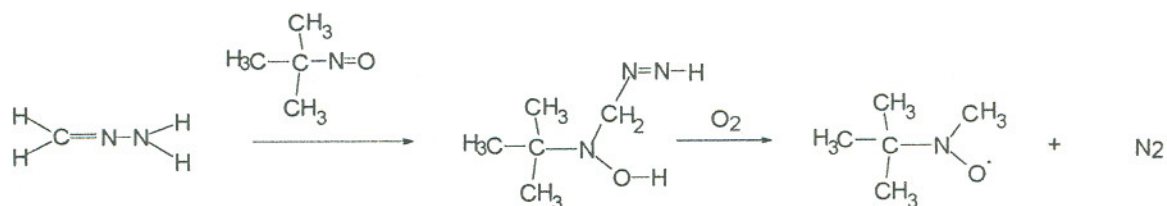


FIGURA 15 - Espectros de EPR dos radicais aduto de t-NB obtidos após incubação das misturas de reação indicadas abaixo por 10 min a 37 °C, na presença de 14 mM t-NB e 0,1 mM de DTPA em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4. As misturas finais de reação continham acetonitrila 2,5 % em volume. A - hidrazona do formaldeído 5 mM, catalase 2  $\mu$ M; B - hidrazona do formaldeído 5 mM; C - hidrazina 5 mM, catalase 2  $\mu$ M; D - formaldeído 5 mM, catalase 2  $\mu$ M. Condições empregadas para a medição: potência: 20 mW, amplitude de modulação: 0,1 mT, constante de tempo: 0,5 s, velocidade de varredura: 0,02 mT/s.

Neste caso, formam-se apenas traços dos produtos de decomposição, di-t-butil-nitróxido  $a_N = 1,73$  mT, e de redução do t-NB, o aduto do radical de hidrogênio t-NB-H  $a_N = 1,45$  mT,  $a_H = 1,43$  mT. Como esperado, à medida que o t-NB não é um captador adequado para radicais de oxigênio, os ensaios de captação de spin utilizando t-NB não mostram evidências da presença de radicais hidroxila como no caso dos ensaios com DMPO,.

Está descrita para o t-NB, entretanto, uma reação de adição a duplas ligações [Kalyanaraman, 1982]. ( Esquema VII )



ESQUEMA VII

Uma reação deste tipo com a hidrazona levaria à formação do radical aduto por simples oxidação, explicando o espectro mostrado na figura 15B. Para avaliar em que extensão esta reação estaria acontecendo, foram realizados ensaios de consumo de oxigênio. Os resultados obtidos estão mostrados na tabela IV.

A velocidade de consumo de oxigênio por autooxidação da hidrazona do formaldeído aumenta cerca de dez vezes, apenas pela presença de t-NB no meio de reação. Demonstra-se assim que, de fato, a adição da hidrazona do formaldeído ao t-NB pode ocorrer diretamente, sem a participação de radicais alquila. A catalase, por sua vez, aumenta muito mais este consumo. O aumento é de mais de duas ordens de grandeza na ausência do captador de spin, efeito este parcialmente compensado pela presença de um captador de spin, seja ele o DMPO ou o t-NB.

Tabela IV  
Consumo de oxigênio durante a oxidação da hidrazona do  
formaldeído mediada pela catalase

Adições à mistura de reação	Velocidade inicial de consumo de oxigênio ( $\mu\text{Ms}^{-1}$ )
nenhuma	0,05
DMPO 25 mM	0,05
<i>t</i> -NB 14 mM	0,74
catalase ( 2mM )	11,60
catalase ( 2mM ) + DMPO 25 mM	6,40
catalase ( 2mM ) + <i>t</i> -NB 14 mM	2,50

Mostra-se, portanto, que a reação de adição mostrada no esquema VII deve comportar-se como uma interferência pequena e que a catalase oxida a hidrazona do formaldeído a radicais metila.

A formação de radicais de carbono a partir de hidrazona do formaldeído é observada também em células isoladas. Células L1210 suspensas em salina são capazes de gerar radicais de carbono a partir de hidrazona do formaldeído, mas não de hidrazina ou de formaldeído somente, como ilustra a figura 16. Além do espectro devido ao aduto do radical hidroxila, aparece o espectro de um aduto de radical de carbono com constantes de desdobramento hiperfino compatíveis com as do aduto do radical metila com o DMPO ( $a_N = 1,62 \text{ mT}$ ,  $a_H = 2,30 \text{ mT}$ ).

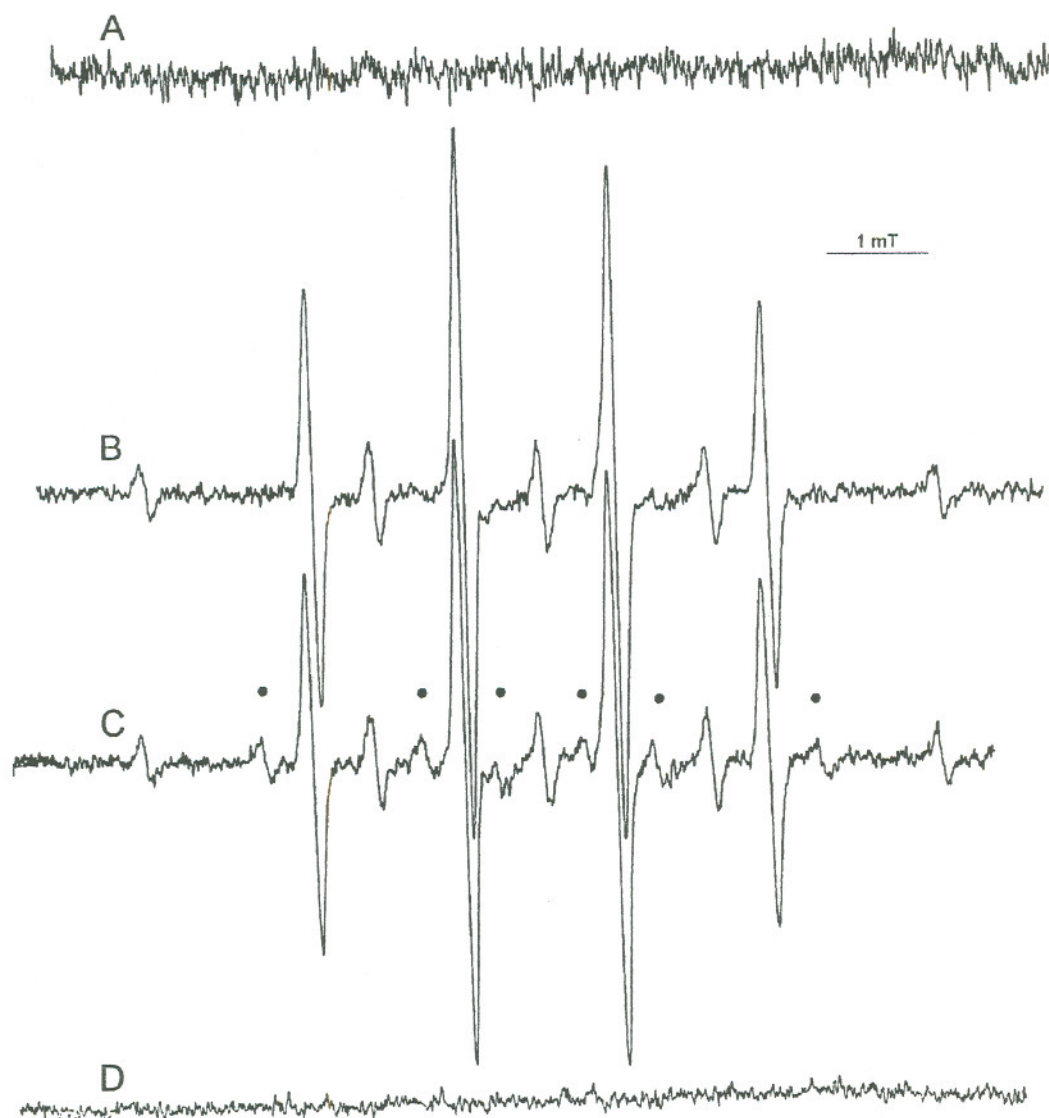


FIGURA 16 - Espectros de EPR dos radicais aduto de DMPO obtidos após incubação, por 30 min a 37 °C, de misturas de reação contendo células L1210 na concentração de 1,2 milhões/ml e 0,1 M DMPO em solução salina tamponada pH 7,4 ( A ); idem, adicionados de 10 mM hidrazina ( B ) ou 10 mM de hidrazona do formaldeído ( C ). O espectro D é obtido quando a hidrazona do formaldeído é incubada com o DMPO sem as células, nas mesmas condições utilizadas para a obtenção do espectro C. O sinal do radical aduto DMPO-alquila está marcado na linha C (•). Condições empregadas para a medição: potência: 20 mW, amplitude de modulação: 0,1 mT, constante de tempo: 0,5 s, velocidade de varredura: 0,05 mT/s.

Estes radicais de carbono são captados pelo DMPO em suspensões contendo as células, a hidrazona e o captador, após incubação a 37 °C por 30 min ( figura 16C ). Apenas o aduto do radical hidroxila com o captador é observável quando a suspensão de células é exposta somente à hidrazina ( figura 16B ). Quando, a título de controle do ensaio, o captador de spin foi incubado com as células ou com a hidrazona do formaldeído isoladamente, nenhum aduto foi formado ( figuras 16A e 16D ).

#### Metilação de DNA "in vivo": detecção de C<sup>8</sup>-metil-guanina

Para verificar a ocorrência de C<sup>8</sup>-metil-guanina foi necessário o desenvolvimento de metodologia adequada para sua detecção em hidrolisados de DNA obtidos dos animais expostos. A separação cromatográfica de padrões das bases modificadas N<sup>7</sup>- e C<sup>8</sup>-metil-guanina e das purinas guanina e adenina, cuja ocorrência nos interessava pesquisar nas amostras de DNA hidrolisado, está mostrada na figura 17. A partir deste resultado, procedeu-se ao estudo da detecção eletroquímica do C<sup>8</sup>-metil-guanina. A figura 17 ilustra também que para C<sup>8</sup>-metil-guanina a sensibilidade da detecção eletroquímica é maior do que a detecção por absorção de luz U.V. ou por fluorescência, comparando as escalas utilizadas para as medidas dos diversos detectores.

O voltamograma de C<sup>8</sup>-metil-guanina foi determinado em cada condição cromatográfica utilizada. A curva obtida depende da natureza do eletrólito, do pH e da composição da fase móvel utilizada. Em fase contendo heptanossulfonato, o pico devido ao aduto é detectável por amperometria a potenciais maiores do que 0,85 V, com potencial de oxidação de meia onda de cerca de 0,93 V. Em fosfato de sódio pH 2,5 os potenciais de oxidação são mais baixos e o aduto é detectável em potenciais acima de 0,75 V, com potencial de meia onda de 0,86 V.



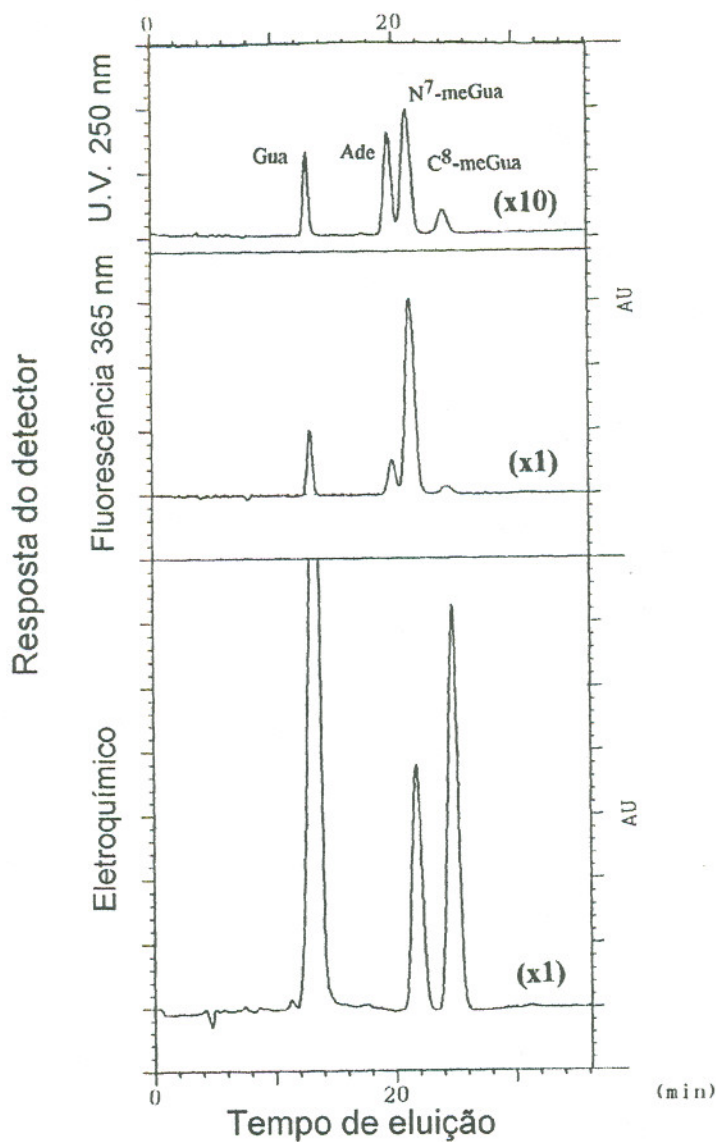


FIGURA 17 - Perfil cromatográfico típico para o sistema de cromatografia com par iônico ( PIC-B7 ) em coluna de fase reversa (  $\mu$ Bondapak C<sub>18</sub> ) de uma mistura de padrões sintéticos como indicado: guanina ( Gua ), 75 ng; adenina ( Ade ), 90 ng; N<sup>7</sup>-metil-guanina ( N<sup>7</sup>-meGua ), 165 ng; C<sup>8</sup>-metil-guanina ( C<sup>8</sup>-meGua ), 100 ng. Detecção por fluorescência a 365 nm,  $\lambda_{exc} = 285$  nm. Detecção eletroquímica a 0,97 V. Os números entre parênteses indicam os fatores de escala.

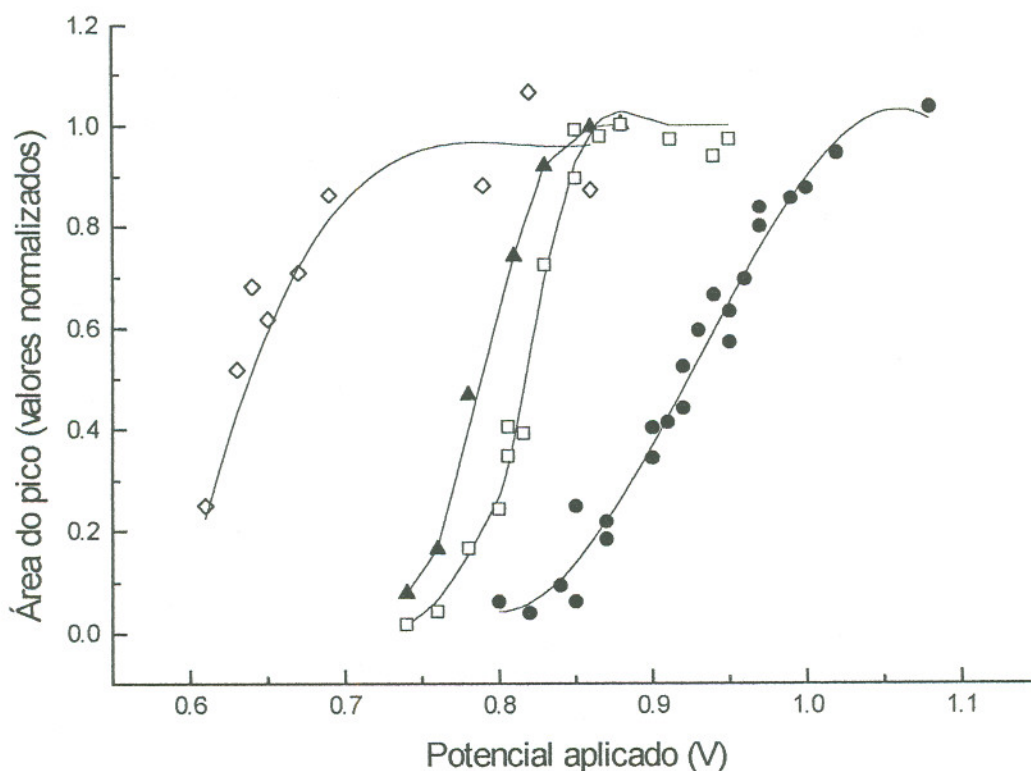


FIGURA 18 - Voltamogramas hidrodinâmicos de C<sup>8</sup>-metil-guanina nas diversas condições testadas: (◇) formiato de amônio 15 mM contendo 2 % metanol, pH 2,7; (▲) fosfato de sódio 50 mM, pH 2,5; (□) formiato de amônio 30 mM, pH 2,9; (●) fosfato de sódio 50 mM, heptanossulfonato de sódio 5 mM, ácido acético 1 % em volume, pH 3,3 fluxo 0,7ml/min.

Em formiato de amônio, o voltamograma desenha-se a valores próximos a estes últimos, mas na presença de metanol podem ser ainda mais baixos ( figura 18 ). O limite de detecção, estimado pela quantificação dos picos obtidos da injeção de volumes idênticos de diluições seriadas do padrão de C<sup>8</sup>-metil-guanina é cerca de 0,1 ng para a cromatografia com par iônico e 0,01 ng para as outras condições testadas. Neste caso, considerou-se como limite de sensibilidade, o pico que correspondesse a uma relação sinal-ruído de duas vezes.

#### Detecção de C<sup>8</sup>-metil-guanina em DNA de fígado de rato

A utilidade de detecção eletroquímica de C<sup>8</sup>-metil-guanina, em material biológico, foi analisada em amostras que sabidamente continham a lesão: DNA de fígado de animais expostos à 1,2-dimetil-hidrazina hidrolisadas em meio neutro. A separação obtida para o aduto procurado e para os outros picos presentes no cromatograma, entre eles outras bases metiladas, está mostrada na figura 19, para o sistema de fase reversa, com cromatografia de par iônico ( PIC-B7 ). Para as condições empregadas neste ensaio, C<sup>8</sup>-metil-guanina é visualizável numa etapa única de cromatografia. Os voltamogramas obtidos para os picos correspondentes à C<sup>8</sup>-metil-guanina, presentes nas amostras de fígado e cólon dos animais tratados, estão mostrados na figura 20. A faixa de valores de potencial aplicado para a medida dos voltamogramas hidrodinâmicos do pico de C<sup>8</sup>-metil-guanina na amostra é limitada por contaminantes da linha base. O efeito obtido é um aumento do ruído e da corrente de fundo, que provoca a perda de sensibilidade em regiões de potencial mais baixo e instabilidade em regiões de potencial próximo de 1,00 V. Os sistemas de cromatografia de troca iônica apresentam a vantagem de uma fase móvel mais barata e com menos componentes. No caso do formiato de amônio a fase móvel é volátil, facilitando a purificação de componentes da amostra, caso fosse necessária uma segunda etapa de cromatografia.

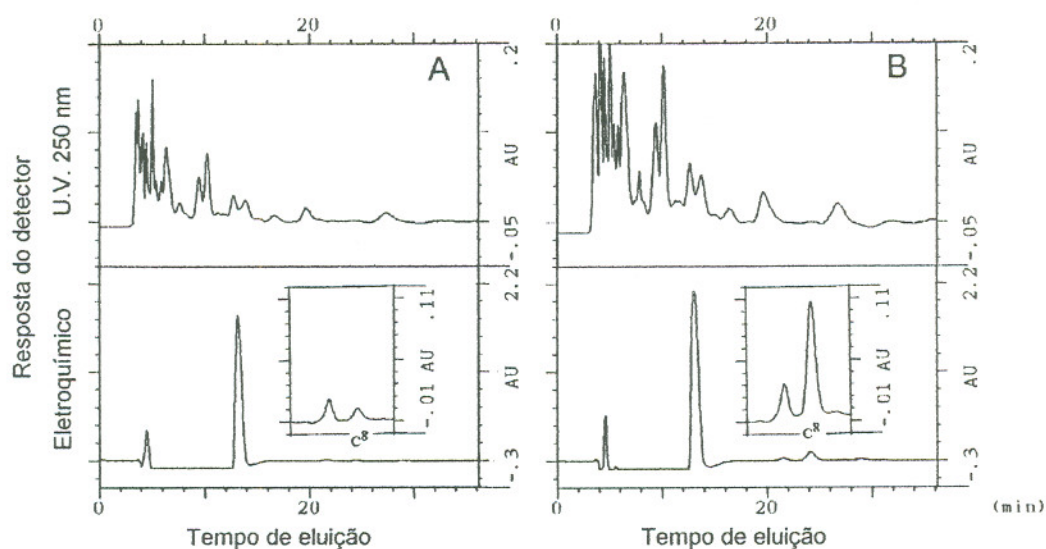


FIGURA 19 - Detecção eletroquímica de  $C^8$ -metil-guanina formada "in vivo", em animal exposto a 1,2-dimetil-hidrazina. (A) Solução correspondente a 100  $\mu\text{g}$  de DNA hepático, hidrolisado neutro; (B) solução correspondente a 200  $\mu\text{g}$  de DNA hepático, hidrolisado neutro, adicionada de 0,6 ng de  $C^8$ -metil-guanina como padrão interno. Hidrolisado neutro do DNA hepático cromatografado em coluna de  $\mu\text{Bondapak } C_{18}$  com fosfato de sódio 50 mM, heptano-sulfonato de sódio 5 mM, ácido acético 1 % em volume; pH 3,3; fluxo: 0,7ml/min; potencial aplicado: 0,99 V. Os mesmos cromatogramas obtidos utilizando a detecção por absorção a 250 nm são apresentados para comparação.

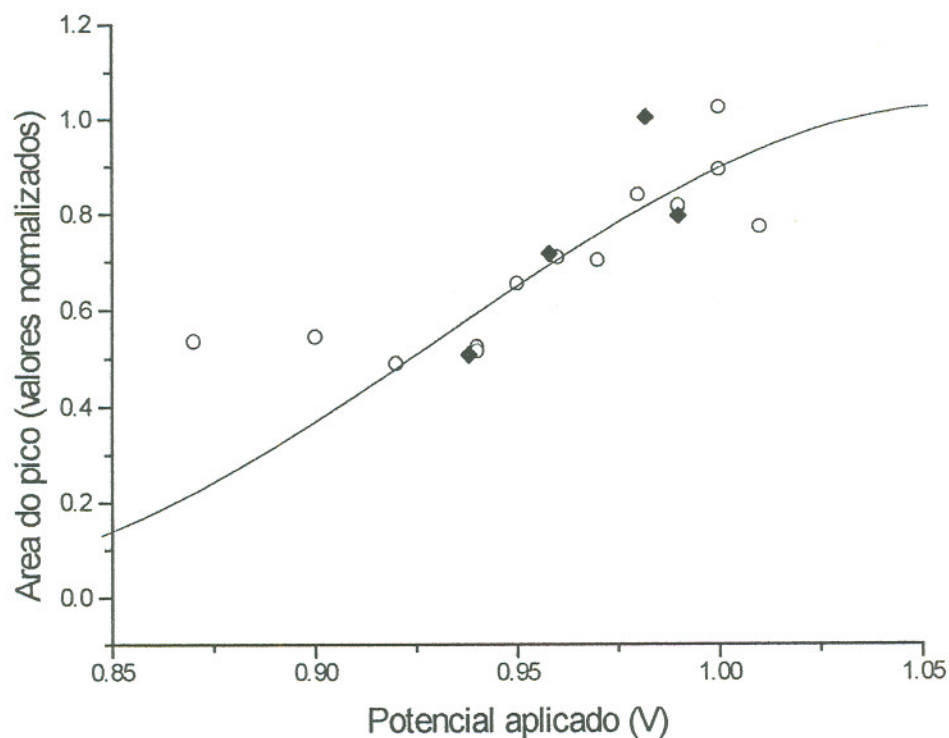


FIGURA 20 - Voltamogramas hidrodinâmicos de C8-metil-guanina em DNA de fígado ○ e de cólon ◆ de animal exposto a 1,2-dimetil-hidrazina. Amostras dos hidrolisados neutros, cromatografadas em coluna de  $\mu$ Bondapak C<sub>18</sub> com fosfato de sódio 50 mM, heptanossulfonato de sódio 5 mM, ácido acético 1 % em volume; pH 3,3; fluxo: 0,7ml/min. O voltamograma hidrodinâmico do padrão sintético, de C8-metil-guanina, apresentado na figura 18, está representado pela linha contínua e foi repetido para comparação.

### Ocorrência de C<sup>8</sup>-metil-guanina em fígado de animais expostos à hidrazina

C<sup>8</sup>-metil-guanina aparece nos cromatogramas de amostra proveniente do fígado de animais expostos à hidrazina medidos em duas condições experimentais diferentes ( figuras 21 e 22 ).

A presença de C<sup>8</sup>-metil-guanina é confirmada pela adição de padrão à amostra injetada no cromatógrafo ("spike") ( figuras 21 e 22 ), pela coincidência dos voltamogramas obtidos para padrão e amostra, ensaiados nas mesmas condições experimentais ( figura 23 ), e pelo espectro obtido para o pico de C<sup>8</sup>-metil-guanina de uma amostra de hidrolisado ácido total de DNA hepático de um animal tratado que foi coletada após uma separação cromatográfica e novamente injetada em quantidade dez vezes maior do que a normalmente utilizada para a análise amperométrica ( figura 24 ). Tomados em conjunto os dados obtidos confirmam a ocorrência da lesão no DNA hepático dos animais expostos.

Animais expostos à hidrazina formam C<sup>8</sup>-metil-guanina em seu DNA em quantidades menores que os expostos à dimetil-hidrazina, como pode ser verificado pelos valores apresentados na tabela V.

Quantidades equivalentes de C<sup>8</sup>-metil-guanina são detetadas em amostras hidrolisadas em duas etapas ou em uma única etapa, consideradas as massas obtidas de aduto por massa de DNA hidrolisado.

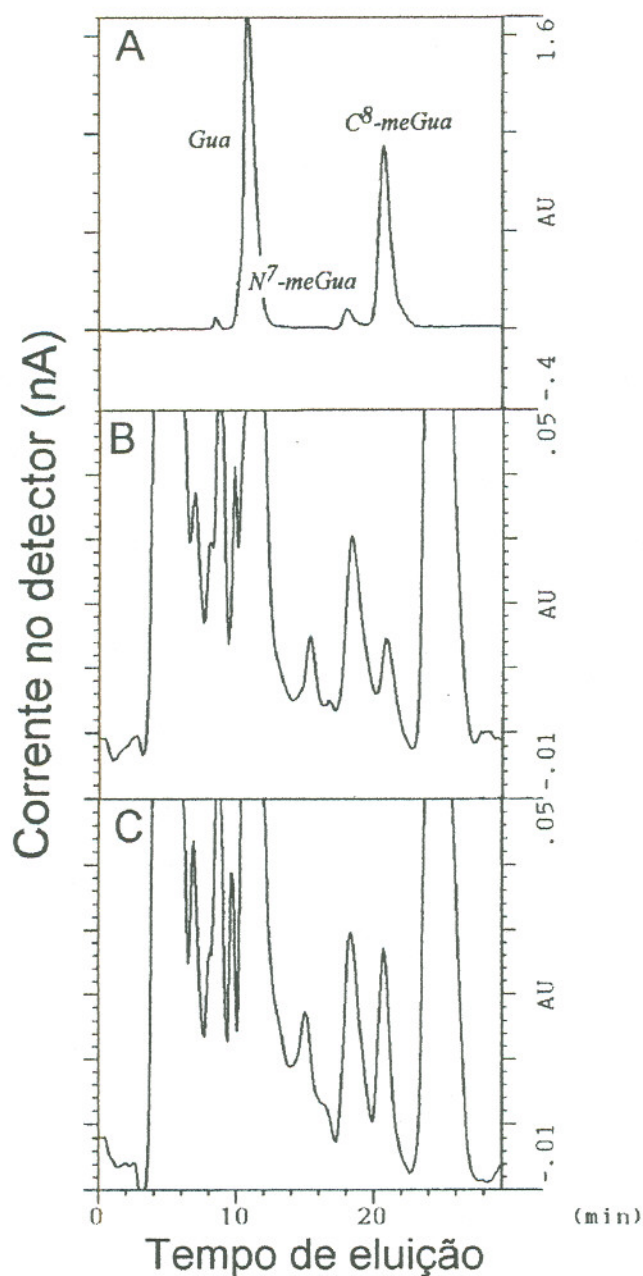


FIGURA 21 - Detecção eletroquímica de C<sup>8</sup>-metil-guanina formada "in vivo", em animal exposto à hidrazina (0,99 V). (A) Padrões como indicado: guanina 75 ng, N<sup>7</sup>-metil-guanina 165 ng, C<sup>8</sup>-metil-guanina 100 ng; (B) Solução correspondente a 200 µg de DNA, hidrolisado neutro; (C) Solução correspondente a 200 µg de DNA hepático, hidrolisado neutro, adicionado de 0,1 ng de C<sup>8</sup>-metil-guanina como padrão interno. Fase móvel: fosfato de sódio 50 mM, heptano-sulfonato de sódio 5 mM, ácido acético 1 % em volume, pH 3,3; coluna: µBondapak C<sub>18</sub> 25 cm x 4,6 mm; fluxo 0,7ml/min.

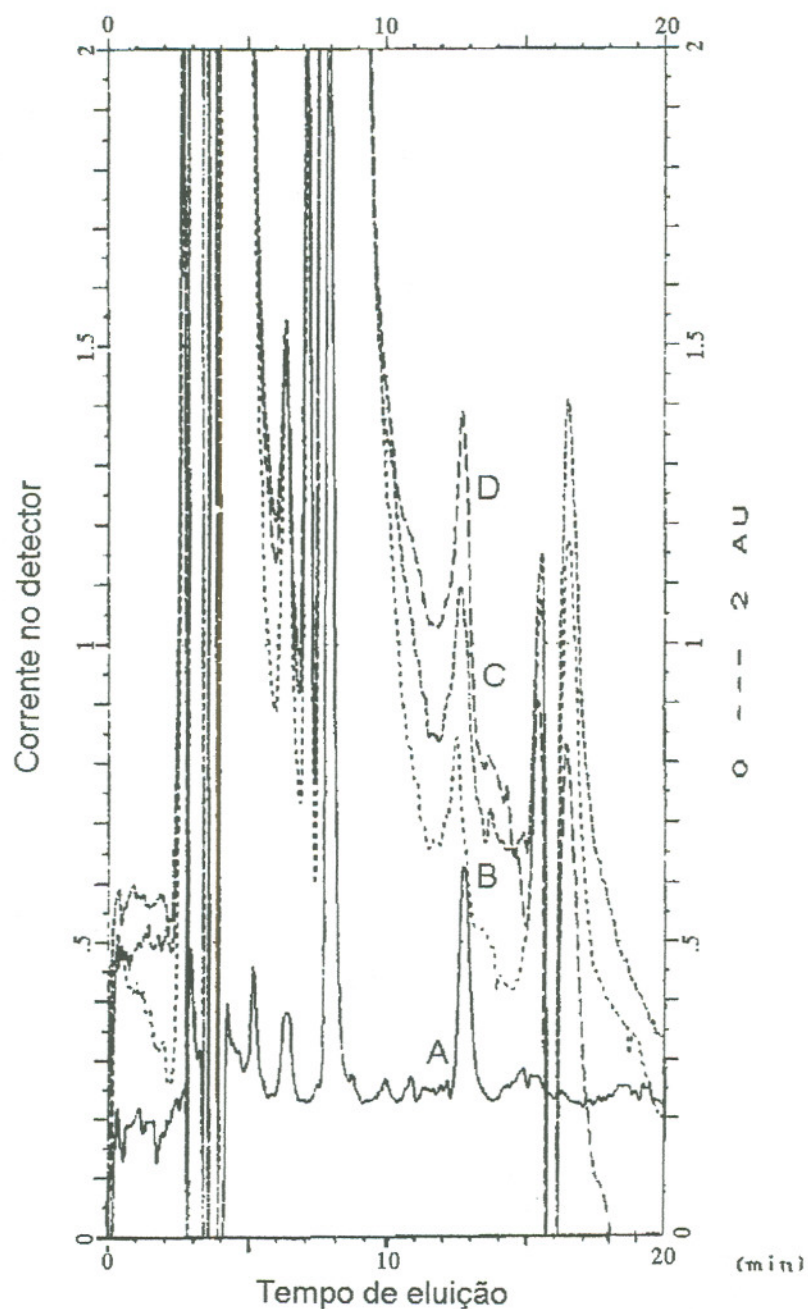


FIGURA 22 - Detecção eletroquímica de  $C^8$ -metil-guanina formada "in vivo", em animal exposto à hidrazina. Hidrolisado ácido cromatografado em coluna de troca catiônica Partisil SCX com formiato de amônio 15 mM contendo 2 % metanol, pH 2,65; fluxo: 1,0 ml/min; potencial aplicado: 0,86 V. ( A ) Padrão de  $C^8$ -metil-guanina 0,18 ng; ( B ) Solução correspondente a 20  $\mu$ g de DNA; ( C ) Solução correspondente a 20  $\mu$ g de DNA, adicionada de 0,09 ng de  $C^8$ -metil-guanina como padrão interno; ( D ) Solução correspondente a 20  $\mu$ g de DNA adicionada de 0,18 ng de  $C^8$ -metil-guanina como padrão interno.



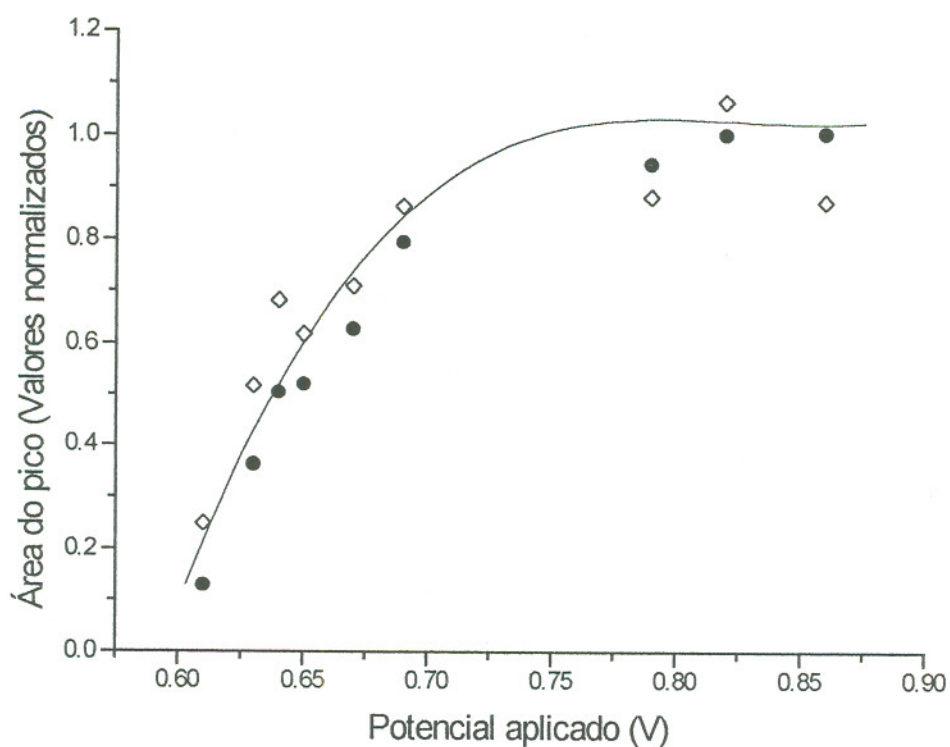


FIGURA 23 - Voltamograma hidrodinâmico de C<sup>8</sup>-metil-guanina em DNA de fígado de animal exposto a hidrazina, •. Hidrolisado ácido cromatografado em coluna de troca catiônica Partisil SCX com formiato de amônio 15 mM contendo 2 % metanol, pH 2,65 fluxo: 1,0 ml/min. O voltamograma hidrodinâmico do padrão sintético de C<sup>8</sup>-metil-guanina, apresentado na figura 18, está repetido para comparação, ◊.

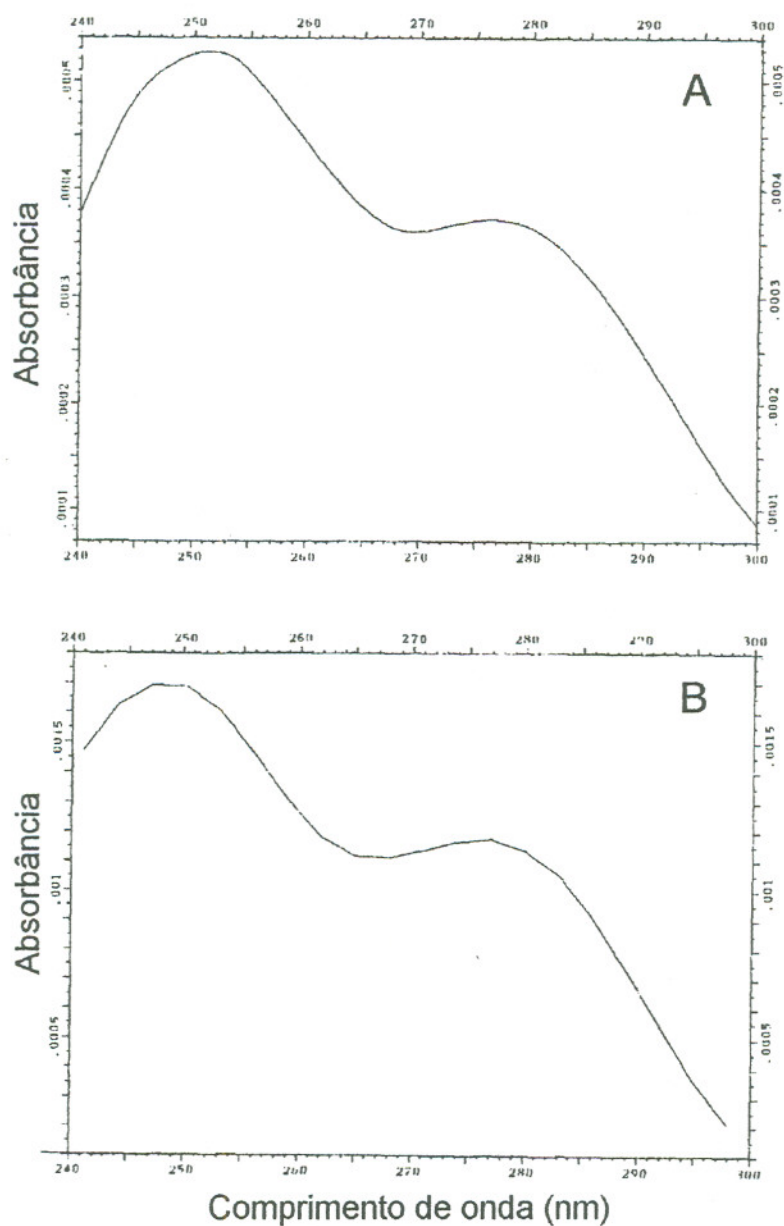


FIGURA 24 - Espectro de absorção de luz registrado no detetor de arranjo de fotodiodos para o pico de C<sup>8</sup>-metil-guanina formada "in vivo", em animal exposto à hidrazina. Amostra do hidrolisado ácido coletada e reinjetada em volume de 500  $\mu$ l, quantidade equivalente a 300  $\mu$ g de DNA hepático (A) e para o padrão sintético (B). Condições para ambas as separações cromatográficas: coluna de troca catiônica Partisil SCX com formiato de amônio 15 mM contendo 2 % metanol, pH 2,65 fluxo: 1,0 ml/min. O espectro do pico da amostra foi obtido após subtração da linha base e suavizado por cálculo a cada 5 pontos, utilizando recurso do programa PDA.

Tabela V

Quantificação das bases modificadas no DNA hepático dos animais tratados, cromatografia com par iônico de amostras tratadas por hidrólise seqüencial

Amostra	Massa de aduto ( ng/mg de DNA )			Detecção
	C <sup>8</sup> -MeGua	N <sup>7</sup> -MeGua	O <sup>6</sup> -MeGua	
Controle	0,85	8,2	N.D.*	UV/EQ/Fluoresc.
Hidrazina 6h	4,0	-	-	UV/EQ
Hidrazina 12h	8,0	104,5	16	UV/EQ/Fluoresc.
DMH 12h	27	207,5	16	UV/EQ/Fluoresc.
DMH 12h, amostra 2	73,9	330	9,44	UV/Fluoresc.
Cólon DMH A	94	370	-	UV/EQ

\*n.d.: não detetado; -: medida não efetuada

Em qualquer dos casos os picos de C<sup>8</sup>-metil-guanina, observados nos cromatogramas das amostras de DNA extraído dos animais, apresentam contaminantes difíceis de serem eliminados. Parte destes contaminantes forma uma "cauda" depois do volume vazio da coluna, ou mesmo a partir dos primeiros picos cromatografados. A estratégia de diminuir a carga de injeção melhora este tipo de erro, mas a sensibilidade do método limita a diminuição das quantidades injetadas. As tentativas de diminuir outros erros por contaminação basearam-se na correção de problemas apontados pela literatura [Biancini e Wild, 1994]. Uma maior purificação da amostra em que as etapas de precipitação, lavagem e tratamento do DNA com RNase foram cumpridas em duplicata antes da hidrólise do DNA, não foi bem sucedidas. Os cromatogramas são equivalentes aos obtidos sem estas etapas. O uso de filtros seletivos de amostra do tipo "Sep-Pak" (Waters) também foi ineficiente. Neste caso, a perda de

reprodutibilidade no perfil cromatográfico foi muito grande. O uso de colunas de troca iônica associadas a uma fase móvel contendo formiato de amônio, por outro lado, permitiu uma diminuição na massa de amostra sem perda de sensibilidade. A detecção eletroquímica de C<sup>8</sup>-metil-guanina, em cromatografia de troca iônica, permitiu a detecção de quantidades menores do aduto, mas apresenta problemas maiores de interferência por contaminantes na amostra.

O detector eletroquímico é saturado pela injeção de quantidades muito grandes de amostra. O efeito observado é uma resposta não linear da área do pico medido pelo detector eletroquímico. A quantidade injetada que produz este efeito varia e pode ser determinada cada vez que o eletrodo de trabalho é limpo ou trocado e cada vez que a fase móvel é trocada. Este efeito de "saturação" do detector produz, antes de uma perda completa de linearidade, resultados em que área do pico e concentração de amostra são proporcionais, com coeficientes de dependência angular menores do que um.

A detecção simultânea das várias bases modificadas num mesmo cromatograma também fica prejudicada quando a massa de amostra injetada aumenta muito. A perda de definição dos picos por excesso de massa injetada pode começar a ocorrer em quantidades correspondentes à faixa de trabalho, como pode ser visto na figura 22. Como se poderia esperar, estes problemas são mais importantes no caso do sistema mais sensível, colunas de troca iônica com fase móvel de formiato de amônio, embora a identificação de C<sup>8</sup>-metil-guanina seja bastante mais inequívoca. A obtenção do voltamograma mostrado na figura 23, por exemplo, só é possível com a relação sinal/ruído obtida para a amostra no sistema de cromatografia de troca iônica. A detecção eletroquímica de C<sup>8</sup>-metil-guanina em cromatografia com par iônico requer quantidades maiores de amostra. A detecção de outras bases modificadas, entretanto, pode ser convenientemente obtida segundo este protocolo.

A quantificação de C<sup>8</sup>-metil-guanina no DNA dos animais tratados nas diversas condições testadas, está mostrada na tabela VI. Medidas de C<sup>8</sup>-metil-guanina em hidrolisados de DNA, em níveis menores do que os estudados nestas amostras, podem requerer que as medidas sejam efetuadas em duas etapas de cromatografia.

Tabela VI  
Quantificação de C<sup>8</sup>-metil-guanina no DNA hepático dos animais tratados

Amostra	Número de amostras	C <sup>8</sup> ng/mg
Controle	3	1,0 ± 0,2
DMH 12h	4	75 ± 38
Cólon DMH	1	94
Hidrazina 12h	3	14 ± 8
Hidrazina 6h	1	4
Hidrazina + PBN 12h	1	20

## DISCUSSÃO

Radicais livres já haviam sido propostos entre os mediadores de dano induzido por hidrazina em sistemas biológicos. Consideram-se especialmente as espécies reativas de oxigênio como efetores deste dano [Thornalley, 1984; Wong e cols., 1988; Yamamoto e Kawanishi, 1991, Kawanishi e Yamamoto, 1991]. Radicais centrados em átomos de nitrogênio também foram detectados durante a oxidação de hidrazina [Noda e cols., 1985, 1988] e de alguns de seus derivados [Sinha e Motten, 1982, Sinha, 1983, Matsuki e cols., 1991].

Aplicando o método do captador de spin pudemos observar a formação de radicais aduto e demonstrar a ocorrência de radicais de carbono "in vivo", em animais expostos à hidrazina ( figuras 1-4 ). Neste caso, a presença de radicais aduto na bile e nos extratos orgânicos de fígado, atribuíveis a radicais primários do tipo alquila ocorre necessariamente a partir de fontes endógenas, uma vez que a molécula de hidrazina é desprovida de átomos de carbono.

O fato de que apenas radicais de carbono foram captados nos estudos "in vivo" não significa que radicais de oxigênio ou nitrogênio não sejam formados. Radicais de oxigênio e nitrogênio são formados nos ensaios com eritrócitos "in vitro" ( figuras 9, 10, 12 e 13 ) e é de se supor que estejam sendo formados "in vivo". Adutos de PBN com radicais de oxigênio são menos estáveis do que com radicais de carbono e decaem antes que se possa detectá-los nas amostras [Kotake e Janzen, 1991]. As evidências da geração de radicais hidroxila "in vivo" obtidas com o uso de técnicas de EPR, são indiretas: radicais aduto de PBN-metila são captados após reação de radicais hidroxila gerados "in vivo" com dimetil-sulfóxido, administrado aos animais juntamente com o captador [Burkitt e Mason, 1991, Burkitt e cols., 1993].

Radical aduto, em sistemas biológicos, podem ter seus tempos de vida bastante diminuídos em relação aos medidos em condições ideais [Samuni e cols., 1986]. Além disso, parte dos radicais primários formados decai antes de formar radical aduto, contribuindo inclusive para a formação do radical ascorbila [Chamulitrat e cols., 1992] observado nos espectros de bile e de sangue dos

animais expostos. O próprio radical ascorbila já foi utilizado para monitorar a formação de radicais livres "in vivo" [Pedro e cols., 1993].

Uma série de cuidados são necessários no estudo de radicais livres formados "in vivo" [McCay, 1987, Knecht e Mason, 1993]. Em primeiro lugar, resultados positivos devem ser cuidadosamente discriminados de interferências devidas a reações que porventura ocorram ex-vivo nas amostras coletadas [Burkitt e Mason, 1991]. Resultados negativos, por sua vez, podem dever-se apenas a variáveis que levam ao insucesso na detecção de radicais aduto em organismos vivos e não excluem a participação de radicais primários nos processos em estudo [McCay, 1987, Knecht e Mason, 1993]. Embora a técnica de captação de spin já seja um recurso estabelecido na detecção de radicais livres em organismos vivos [Mottley e Mason, 1989], a farmacocinética dos captadores de spin não é conhecida em todos os casos [Chen e cols. 1990, Cheng e cols., 1993]. Quando a detecção de radicais aduto é feita na bile, a via intraperitoneal é mais utilizada para a administração do captador de spin, embora tenha sido sugerido que a administração endovenosa pode ser mais eficiente [Moore e cols., 1995]. Segundo Chen e colaboradores [1990], após a administração intraperitoneal de PBN, as concentrações hepáticas do captador são máximas nos primeiros 30 min. e seu decaimento tem uma meia vida de 134 min. em ratos. A eliminação de diferentes radicais aduto já estudados "in vivo" parece ocorrer em tempos comparáveis aos observados para o captador de spin [Chamulitrat e cols., 1992, Knecht e Mason, 1988, Knecht e cols., 1992, Moore e cols., 1995]. Como a hidrazina tem distribuição quase imediata por difusão para os tecidos e fluidos biológicos e, além disso, reage rapidamente na presença de traços de metais e de diversos catalisadores [World Health Organization, 1987], sua biodisponibilidade também é compatível com a eliminação rápida dos radicais aduto pela bile. Pudemos, de fato, observar a eliminação de radicais aduto na bile de animais expostos à hidrazina ou aos seus derivados ( Figuras 1 e 4, tabelas II e III ) em intervalos na mesma escala de tempo daqueles observados anteriormente para a eliminação do captador de spin [Chen, 1990; Cheng, 1993].

Verificamos também que os radicais aduto foram formados "in vivo" e não "ex vivo", já que tanto a hidrazina como o captador de spin poderiam reagir na bile apenas por estarem sendo eliminados ao mesmo tempo. Não ocorreu, neste caso, formação de radicais primários "ex-vivo", ou esta via não é significativa no desenho experimental usado, como demonstrado pela incapacidade de se inibir a geração dos radicais na bile por biperidil, que quelata o ferro bloqueando também as reações de oxidação-redução do metal [Burkitt e Mason, 1991; Chamulitrat e cols., 1992]. O aumento do rendimento de radical em animais submetidos à depleção de glutatona também favorece a hipótese de que a geração ocorre "in vivo". Radicais livres podem reagir diretamente com a glutatona, o que resulta em uma diminuição do sinal em experimentos de captação de spin [Tomasi e cols., 1987]. O efeito da diminuição de glutatona sobre o rendimento de radicais aduto não é necessariamente direto. A diminuição da concentração de grupos tiol de origem não protéica aumenta o rendimento de radicais tiil-hemoglobina gerados nos eritrócitos quando a glutatona participa da detoxificação [Maples e cols., 1990]. Está descrito que radicais metila formados durante o metabolismo de hidrazinas metil-substituídas reagem com a glutatona de hepatócitos "in vitro" [Albano e cols., 1989]. Uma depleção parcial da glutatona deve ocorrer pelo jejum de doze horas imposto aos animais no período noturno anterior aos experimentos, além daquela induzida por éster dietilmalêico, que chega a 90 % [Plummer e cols., 1981, Akerboom e Sies, 1981]. Este cuidado é interessante não somente porque a glutatona pode reagir com radicais "in vivo", mas também porque os ensaios utilizando o método do captador de spin interferem com as concentrações de glutatona [Albano e cols., 1986]. Captadores de spin não são inertes "in vitro" [Augusto e cols., 1982] nem "in vivo" [Albano e cols., 1986]. Efeitos descritos dessas moléculas sobre o metabolismo, em animais vivos, incluem inibição de enzimas [Knecht e Mason, 1993] e depleção de glutatona [Albano e cols., 1986]. Esta circunstância foi contornada neste modelo experimental "in vivo" através do uso de dois captadores de spin diferentes e da depleção prévia da glutatona por conjugação com o éster dietilmalêico.



A identificação dos radicais aduto obtidos "in vivo" não é sempre possível. A detecção de radicais aduto de ambos os captadores com constantes de desdobramento hiperfino equivalentes e compatíveis com as esperadas para adutos de radicais alquila na bile de animais expostos à hidrazina e aos seus derivados metil-substituídos ( Figuras 1 a 4, tabelas II e III ), é uma primeira evidência da formação de radicais metila "in vivo". Tanto a metil-hidrazina quanto a 1,2-dimetil-hidrazina produzem radicais metila durante sua biotransformação [Albano e cols., 1989]. Assim, embora a identidade dos radicais aduto de PBN seja dificilmente atribuível de forma inequívoca apenas a partir de dados espectrais, sugere-se que radicais metila são produzidos durante a biotransformação de hidrazina "in vivo". Outra indicação de que o radical captado "in vivo" é o radical metila está no valor obtido para as constantes de desdobramento hiperfino do radical aduto PBN-metila externamente adicionado à bile de animais controle. Este valor é bastante próximo dos obtidos para os radicais produzidos "in vivo" nos animais expostos. A captação do aduto de radical fenila na bile de animais expostos à fenil-hidrazina ( Figuras 1 e 4, tabelas II e III ) também sugere que não se estão captando preferencialmente os radicais provenientes de processos de peroxidação e sim da transformação da hidrazina ou dos seus derivados. A fenil-hidrazina induz, em eritrócitos, peroxidação mais intensa que qualquer dos derivados metil-substituídos utilizados [Goldberg e Stern, 1977, Runge-Morris e cols., 1994].

Uma possibilidade para a geração de radicais alquila em células em geral é a peroxidação lipídica iniciada, por exemplo, pela geração de espécies reativas de oxigênio, já observada no caso do tratamento com derivados de hidrazina e de nitrosaminas [Saprin e Piette, 1977]. A administração de hidrazina a ratos, porém, ao contrário do observado com a fenil-hidrazina, não aumenta a peroxidação lipídica "in vivo" [Preece e Timbrell, 1989]. A peroxidação lipídica deveria ocorrer em ambos os sistemas celulares estudados, eritrócitos e células L1210. Nas células L1210, não são detectados radicais alquila nas exposições à hidrazina, mas sim uma grande quantidade de radicais hidroxila ( figura 16 ). Não se pode excluir, todavia, que os radicais detectados nos diversos ensaios "in

vitro”, identificados como PBN-metila, e os observados “in vitro” originem-se de processos diferentes.

A captação de spin “in vivo” tem revelado a presença de radicais aduto derivados da peroxidação de lipídios. Radicais aduto de PBN, produzidos durante a peroxidação lipídica induzida por cobre, foram observados na bile de ratos deficientes em selênio e vitamina E. Não foi atribuída nenhuma identidade a estes radicais, sugerindo-se apenas que fossem derivados de lipídios, como sugerem as constantes de desdobramento hiperfino observadas [Kadiiska e cols., 1993]. As constantes de desdobramento hiperfino, obtidas com o PBN em ensaios de peroxidação “in vivo”, têm tipicamente valores de  $a_N = 1,54$  mT e  $a_H = 0,25$  mT [Hughes e cols., 1991, Knecht e cols., 1990, Kadiiska e cols., 1993]. Um aduto de PBN com constantes de desdobramento hiperfino de  $a_N = 1,59$  mT e  $a_H = 0,32$  mT foi observado na bile de animais expostos à tetracloreto de carbono. Este radical foi considerado como derivado de processos de lipoperoxidação “in vivo” [Knecht e Mason, 1988], mas sua estrutura não foi determinada [Knecht e Mason, 1988]. Valores elevados de  $a_H$  são considerados compatíveis com radicais derivados de peroxidação de lipídios, mas aparecem na tabela fornecida pelos mesmos autores em radicais aduto cujos valores de  $a_N$  são de 1,44 e de 1,46 mT.

As concentrações de radicais obtidas nos animais estudados são baixas e não permitem afirmar, pela relação sinal-ruído resultante das condições de medição, se há uma soma de espectros com constantes de desdobramento próximas ou o espectro de um único radical. De qualquer maneira, pode-se admitir que as variações entre as constantes de desdobramento hiperfino, observadas para diferentes radicais aduto PBN-alquila, são geralmente pequenas [Buettner, 1987]. Assim, a formação de PBN-metila “in vivo” é sugerida, mas não confirmada.

As constantes de desdobramento hiperfino obtidas para os adutos de DMPO na bile são mais altas do que as geralmente descritas na literatura para os adutos deste captador [Buettner, 1987]. Vale assinalar, todavia, que o limite superior dos valores de constantes de desdobramento hiperfino para radicais

conhecidos corresponde aos de radicais alquila e de radicais alquila *alfa*-hidroxilados [Buettner, 1987], e que estes mesmos valores são extremamente sensíveis ao solvente.

Shank e colaboradores propõem o formaldeído endógeno como a fonte das unidades de um carbono que acabam por metilar o DNA "in vivo" após a exposição à hidrazina [Becker e cols., 1981, Bosan e Shank, 1983, Bosan e cols., 1986 e 1987, Lambert e cols., 1986, Lambert e Shank, 1988]. Resultados obtidos com marcação isotópica comprovam sua hipótese [Lambert e Shank, 1988, Leakakos e Shank, 1994]. A formação da hidrazona do formaldeído é demonstrada nos hepatócitos e, em menor proporção em células renais e pulmonares, onde as concentrações de formaldeído são menores [Bosan e cols., 1986]. Estudamos, então, a formação de radicais metila a partir da hidrazona do formaldeído.

Os espectros apresentados nas figuras 14 e 15 e na tablea IV, demonstram a formação de radicais metila a partir da ação da catalase sobre a hidrazona do formaldeído. A atividade da catalase, neste caso, é semelhante à de uma peroxidase, em que elétrons do substrato são transferidos para o peróxido de hidrogênio [Halliwell e Gutteridge, 1989, Pichorner e cols., 1993]. Resultados equivalentes se obtêm com a hemoglobina de rato em solução ( figura 6 ) ou em sistemas celulares como as células L1210 ( figura 16 ). A catalase é uma enzima onipresente nas células de mamíferos [Halliwell e Gutteridge, 1989], o que implica possa ser um sitio importante na oxidação intracelular da hidrazona do formaldeído, especialmente em células desprovidas de atividade de oxidases. As células L1210, por exemplo, apresentam baixa atividade de enzimas comumente implicadas no metabolismo de derivados de hidrazina, como sistema citocromo P450, monoaminoxidase, aldeído desidrogenase e xantina oxidase [Erikson e cols, 1989].

A análise dos produtos obtidos pela modificação de biomoléculas foi uma outra forma de abordar esta questão para tentar estabelecer a natureza química da espécie reativa formada ou, indiretamente, a sua relevância em mecanismos de dano em um sistema modelo particular. Esta estratégia vem sendo bastante

empregada na literatura, utilizando como biomoléculas alvo principalmente proteínas e DNA [Osterman-Golkar e Bergmark, 1988; Mathison e cols., 1994].

Em animais expostos à hidrazina, por exemplo, a formação do radical tiil de hemoglobina pode ser diretamente atribuída à ação de radicais livres ( figura 5 ).



A formação de radicais tiil-hemoglobina pode ser induzida “in vitro” e “in vivo” por fenil-hidrazina, hidrazina [Maples e cols., 1988] ou hidroperóxidos [Maples e cols., 1990], sendo geralmente atribuída ao ataque de radicais centrados em oxigênio [Maples e cols., 1990]. Uma reação subsequente da tiil-hemoglobina com o DMPO permite visualizar o fenômeno pela formação do radical aduto nitróxido do captador, mais estável. Eritrócitos de rato em suspensão também formam o radical aduto tiil de hemoglobina com o DMPO quando expostos à hidrazina ( figura 7 ) ou à metil-hidrazina ( figura 8 ).

A comparação entre os radicais aduto detectados com as suspensões de eritrócitos a 50 % e a 5 % de hematócrito demonstra que a formação de radicais livres capazes de atacar biomoléculas ocorre com a hidrazina e com a hidrazona do formaldeído. Revela ainda que vários radicais primários ( H•, hidroxila, hidrazinila, alquila) são formados nos eritrócitos expostos ( figuras 10 e 13 ). A formação de traços do radical tiil-hemoglobina também é observada nos estudos “in vivo” com a hidrazina ( figura 5 ). A hidrazona do formaldeído não promove a formação de quantidades detectáveis de tiil-hemoglobina “in vivo”. Este resultado é esperado, comparando-se os rendimentos relativos deste radical com os diversos derivados “in vitro” e “in vivo” ( figuras 5, 7 e 9 ).

Espécies reativas de oxigênio têm sido responsabilizadas pela formação de tiil-hemoglobina [Maples e cols., 1988 e 1990]. A inibição da catalase com a azida, nos ensaios com eritrócitos, melhora a formação do radical tiil-hemoglobina, um efeito mais dramático no caso das exposições à hidrazina à temperatura ambiente. Este resultado sugere que, de fato o peróxido de hidrogênio participa, direta ou indiretamente, da formação do radical tiil-

hemoglobina em eritrócitos. A reação de peróxido de hidrogênio com a hidrazina gera radicais hidrazinila, como descrito por Lim e Zhong [Lim e Zhong, 1989, Zhong e Lim, 1989] e uma inibição da catalase pode modificar, por consequência, as concentrações de radical hidrazinila. Por outro lado, radicais de carbono também são capazes de atacar a molécula de hemoglobina [Maples e cols., 1988], e formar o radical tiil-hemoglobina, como se pode observar durante a oxidação de metil-hidrazina em eritrócitos ( figura 8 ). Qualquer uma das espécies radicalares formadas no sistema de eritrócitos isolados, portanto, poderia ser responsável pela formação do radical de hemoglobina.

Soluções de oxi-hemoglobina de concentração correspondente ao hematócrito de 5 % formaram com a hidrazina apenas o aduto reduzido do DMPO ( figura 6 ). A hidrazona do formaldeído, entretanto, é oxidada a radicais de carbono, indicando que um mecanismo mais complexo pode estar envolvido na transformação da hidrazina em eritrócitos. A formação de hidrazonas pela hidrazina com substâncias presentes nos eritrócitos é conhecida, inclusive a partir de estudos "in vivo" [Nelson e Gordon, 1982, Lambert e Shank, 1988, Preece e cols., 1991]. Esta poderia ser uma origem para os radicais de carbono também neste sistema. Em suspensões de eritrócitos, os rendimentos das espécies radicalares com a hidrazina são maiores do que com a própria hidrazona, que é um intermediário proposto ( figuras 7 e 9 ).

Através de técnicas de cromatografia líquida, estudamos ainda a formação de C<sup>8</sup>-metil-guanina, um produto de metilação formado pelo ataque de radical metila ao DNA [Augusto e cols, 1990, Netto e cols., 1992], no DNA hepático de animais expostos. A análise dos produtos de alquilação tem sido utilizada como uma ferramenta para investigar a importância de substâncias lesivas ao DNA, de forma análoga ao uso de 7,8-di-hidro-8-oxo-guanina como marcador de dano oxidativo ao DNA [Shigenaga e cols., 1990]. A modificação de RNA por radicais metila foi estudada pela análise das bases metiladas C<sup>8</sup>-metil-guanina, C<sup>8</sup>-metil-adenina e C<sup>2</sup>-metil-adenina [Kang e Cohen, 1994]. As implicações desta abordagem ultrapassam os estudos mecanísticos. É discutido o uso de produtos deste tipo, por exemplo as bases modificadas, como

indicadores de risco em carcinogênese [Biancini e Wild, 1994]. A preferência por sítios de guanina para alquilação é observada com derivados de hidrazina [Leite e Augusto, 1989], com metil-benzil-nitrosamina [Wang e cols., 1990] e com dacarbazina, um dimetil-triazeno [Mudipalli e cols, 1995]. Isto aumenta o interesse no estudo sobre a ocorrência de modificações em guaninas, implicando em maior sensibilidade na indicação de lesões por agentes químicos.

A formação e a persistência de adutos de bases no DNA pode estar relacionada à carcinogênese, tendo sido sugerida participação na especificidade do órgão-alvo para a formação de tumores [Kadlubar e cols, 1981; Herron e Shank, 1982]. O aumento de N<sup>7</sup>-metil-guanina durante a vida de animais de laboratório [Park e Ames, 1988], bem como a formação de adutos de DNA com malondialdeído produzido durante a peroxidação lipídica endógena, em fígado humano sadio [Chaudhary e cols., 1994], foram sugeridos como fontes potenciais de carcinogênese.

Quebras em DNA e metilação são efeitos bastante conhecidos de hidrazinas [Augusto, 1993], mas o papel desempenhado, nos efeitos carcinogênicos da própria hidrazina, por cada uma das espécies reativas produzidas não está estabelecido. Mesmo no caso de derivados de hidrazina com substituintes metila, a oxidação enzimática deve ser importante para produzir dano por alquilação [Sedgwick, 1992]. Os produtos de adição no DNA, já descritos na literatura, sugerem adição eletrofílica de carbocátions a átomos de nitrogênio ou de oxigênio, como no caso da alquilação promovida por nitrosaminas a biomoléculas [Osterman-Golkar e Bergmark, 1988].

O jejum e a depleção de glutatona podem ter papel na carcinogênese induzida por hidrazina "in vivo". Estudos com a procarbazine estabelecem a participação do radical metila [Goria-Gatti e cols, 1992] e demonstram que a depleção de glutatona intensifica o efeito embriotóxico [Elbron-McCoy e cols., 1995]. A metilação em DNA hepático induzida pelo agente alquilante metil-azóxi-metanol também é maior em ratos submetidos a jejum, embora este efeito não seja observado com outros agentes, como o etanol [Sohn e Fiala, 1995]. A depleção de GSH induzida por hidrazina não depende de conjugação da

hidrazina pela ação de GSH-S-transferases. O metabolismo hepático está associado às enzimas microsomais, podendo a mitocôndria participar da biotransformação [Jenner e Timbrell, 1995]. Bosan e Shank não observaram modificações no padrão da metilação no DNA hepático induzida por hidrazina em ratos depletados de glutatona. A depleção de glutatona, entretanto, aboliu a metilação induzida por hidrazina em hamsters [Bosan e Shank, 1983]

Diversos sistemas enzimáticos podem estar envolvidos na biotransformação da hidrazona do formaldeído, como descrito para os derivados de hidrazina [Kalyanaraman e Sinha, 1985]. A conversão de hidrazinas 1,2-dissubstituídas ao azocomposto correspondente, por exemplo, envolve o citocromo P450 e a monoaminoxidase [Dunn, 1979; Coomes e Prough, 1983]. A flavina-monooxigenase é mais importante na oxidação de hidrazinas 1,1-dissubstituídas [Prough e cols., 1981]. A aminoxidase sensível à inibição por semicarbazida, de tecido adiposo marrom, foi recentemente descrita como uma enzima envolvida na oxidação de procarbazina e de metil-hidrazina [Holt e cols., 1992].

Derivados de hidrazina 1,2-dissubstituídos são eficientemente ativados a radicais de carbono somente por sistemas com alto potencial redox, como peroxidase de raiz forte-peróxido de hidrogênio, prostaglandina sintetase-ácido araquidônico e sistema microsomal suplementado com NADPH [Moloney e Prough, 1983; Sinha, 1983, Moloney e cols., 1984; Augusto e cols., 1985]. Oxi-hemoglobina ou eritrócitos inteiros catalisam a oxidação de fenelzina, um derivado monossustituído, mais eficientemente do que a de 1,2-dimetil-hidrazina [Augusto e cols, 1982; Netto, 1992]. A estabilidade dos produtos da oxidação por um ou dois elétrons dos derivados mono- e dissustituídos da hidrazina também é diferente: diazenos são mais instáveis que azoalcanos. Peroxidases podem catalisar algumas das etapas do mecanismo que culmina com a produção de radicais livres, como no caso das reações catalisadas "in vitro" pela catalase e pela hemoglobina. Complexos metálicos também podem participar de reações de óxido-redução que, no caso da hidrazina, formam o radical hidrazinila e espécies reativas de oxigênio, por exemplo ( figura 11 ). A oxi-hemoglobina pode mediar,

"in vitro" quebras de fita em DNA por radicais livres produzidos a partir de hidrazina, bem como de alguns de seus derivados alquil- e aril- substituídos [Runge-Morris e cols., 1994]. Este dano não foi inibido por antioxidantes, mas o foi por captadores de spin, tendo sido sugerida a participação de radicais de carbono ou nitrogênio [Runge-Morris e cols., 1994].

As enzimas microsomais são importantes na mediação do dano causado por derivados de hidrazina a biomoléculas [Nelson e cols., 1976]. Recentemente foi demonstrado que a própria hidrazina é metabolizada "in vitro" pelas enzimas microsomais e mitocondriais, com efeito sinérgico de NADH e NADPH [Jenner e Timbrell, 1995]. Diferentes isoenzimas do citocromo P-450 tem eficiências diferentes nesta transformação [Jenner e Timbrell, 1995], A forma induzível por P-4502E1 pode ser importante, como observado na ativação de hidrazinas com substituintes alquil- a radicais de carbono [Albano e cols., 1993 e 1995]. Há diferenças importantes entre tecidos maternos, fetais ou de recém nascidos expostos quanto ao rendimento de produtos da alquilação por hidrazina "in vivo" [Wiestler e cols., 1984].

Os dados obtidos de captação de spin mostram a formação de radicais de carbono a partir da hidrazina ou da hidrazona do formaldeído pela catalase ( figuras 14 e 15 ), pelas células L1210 ( figura 16 ), por eritrócitos de rato ( figuras 9 e 10 ), por hemoglobina ( figura 6 ) e sugerem a sua formação "in vivo", em ratos expostos ( figuras 1-4 ).

Não foi possível determinar a origem dos radicais observados "in vivo", uma vez que os ensaios de marcação isotópica com  $^{13}\text{C}$  não mostraram a formação do radical marcado. Estes resultados implicam ou um insucesso na marcação do "pool" de unidades de um carbono ou uma fonte alternativa dos radicais alquila, por exemplo a peroxidação de lipídios. É possível que a marcação do "pool" não tenha sido obtida. No rato, a oxidação de formaldeído é extremamente rápida, a meia-vida estimada para a exposição por via intraperitoneal sendo cerca de 1 min.. As concentrações de formaldeído no sangue são de  $2,2 \pm 0,2$  ng/ml. Uma meia vida muito mais longa para a eliminação é descrita para a via endovenosa ( 17 dias ), pelo equilíbrio com o



compartimento intra-eritrocitário, implicando marcação em diversos tecidos [Heck e Casanova-Schmitz, 1984]. A metionina marcada não resultou mais eficiente, talvez pela toxicidade do composto. A metionina depende de transaminação para uma das vias de seu metabolismo e a hidrazina inibe as transaminases hepáticas. No plasma, a forma transportada de unidades formil, o formiltetrahidrofolato, existe principalmente ligada à  $\alpha$ 2-macroglobulina, uma proteína de transporte de folatos que é extremamente sensível à inibição por hidrazinas e por metilamina.

De toda forma, considerar a peroxidação lipídica como a origem dos radicais obtidos "in vivo" admite a hipótese complementar de que a metilação do DNA "in vivo", ao menos no caso da hidrazina, possa ser modificada pela presença do estresse oxidativo de forma indireta e não como resultado direto da adição de espécies reativas produzidas. De acordo com esta hipótese foi descrito o aumento de outras espécies alquiladas, como N<sup>7</sup>-metil-guanina e O<sup>6</sup>-metil-guanina em resposta à exposição a etanol e tetracloreto de carbono [Shank, 1987, Said e Shank, 1991].

Como a distribuição das modificações em sítios de restrição em DNA de ratos recém-nascidos expostos à hidrazina não é ao acaso, Leakakos e Shank [1994] sugeriram que a hidrazina provoque um efeito de modificação no padrão de metilação normal do DNA. Outros efeitos podem ainda estar envolvidos nesta assimetria: a metilação em nitrogênio 7 de guanina por N-metil-N-nitroso-uréia é inibida pela presença vicinal de C<sup>5</sup>-metil-citosina [Mathison e cols., 1993]. É conhecido que a presença de O<sup>6</sup>-metil-guanina em DNA pode gerar um padrão de clivagem assimétrico por algumas enzimas de restrição [Voight e Topal, 1990], mas não foi estudada a atividade das enzimas de restrição sobre sequências contendo C<sup>8</sup>-metil-guanina.

Pudemos observar a formação de C<sup>8</sup>-metil-guanina no DNA hepático dos animais tratados ( figuras 21-24 ). Esta lesão foi recentemente descrita como resultante do ataque de radicais metila ao DNA "in vivo" [Netto e cols., 1992]. Assumindo-se que a metilação é uma reação importante de alquilação promovida por hidrazina "in vivo", a formação de C<sup>8</sup>-metil-guanina é um indicador de que

também a hidrazina não substituída promove modificações em DNA atribuíveis ao radical metila ( figuras 21-24 e tabelas V e VI ).

A quantificação de bases metiladas não é um problema trivial. Biancini e Wild [1994] compararam recentemente resultados publicados para as concentrações de N<sup>7</sup>-metil-guanina em diversas condições, demonstrando que a dispersão de resultados abrange várias ordens de magnitude, mesmo em amostras equivalentes. O principal problema identificado com relação às medidas é a contaminação por RNA. Esta contaminação resulta em valores falsamente elevados de N<sup>7</sup>-metil-guanina em DNA, já que esta base metilada é um constituinte normal do RNA, onde aparece na proporção de 1 base modificada para 500 guaninas [Biancini e Wild, 1994]. Valores muito altos de N<sup>7</sup>-metil-guanina ( Tabela V ) sugerem, portanto que esta contaminação está presente em nas amostras, embora os dados apresentados estejam de acordo com os obtidos por outros autores [Park e Ames, 1988, Netto e cols., 1992].

C<sup>8</sup>-metil-guanina não é, entretanto, um constituinte normal do RNA e não se espera que a contaminação por RNA implique em aumento desta base modificada. A metilação de guaninas do RNA por radicais metila pode produzir esta modificação, como descrito por Kang e Cohen [Kang e Cohen, 1994]. A dispersão dos valores de concentração de C<sup>8</sup>-metil-guanina é bastante grande nas amostras ( Tabela VI ). Uma interferência provável, a ser resolvida num futuro próximo, é a contaminação das amostras por outros constituintes celulares. Proteínas podem formar ligações covalentes com ácidos nucleicos em lesões iniciadas por radicais livres. Este efeito pode responder pela dificuldade em solubilizar completamente as amostras de DNA, mesmo ao fim da hidrólise ácida feita em uma única etapa. As concentrações de C<sup>8</sup>-metil-guanina podem, por isto, estar subestimadas nas medidas obtidas.

A extensão da metilação na posição 8 de guanina, entretanto, é sempre maior nas amostras de animais expostos à 1,2-dimetil-hidrazina do que à hidrazina, o que poderia sugerir uma correlação com a carcinogênese. A estabilidade da lesão no DNA não é conhecida ainda, o que implica que as

quantificações obtidas são apenas preliminares, não refletem necessariamente a quantidade formada "in vivo".

Um outro ponto interessante revelado pelos dados coletados é a presença de C<sup>8</sup>-metil-guanina nos controles. Quantidades muito pequenas deste aduto, aliadas aos problemas técnicos discutidos acima, não permitem estender ainda o estudo à importância deste aduto como um aduto endógeno. A detecção eletroquímica de C<sup>8</sup>-metil-guanina é potencialmente útil em estudos de agentes alquilantes que produzam dano a DNA via radical metila, de forma análoga à proposta para outras bases modificadas [Park e cols., 1989]. O desenvolvimento continuado da metodologia por nós desenvolvida para a detecção de C<sup>8</sup>-metil-guanina em hidrolisados de DNA ( figuras 17 a 20) deve permitir testar estas hipóteses, bem como estudar a existência de reparo a esta lesão.

## CONCLUSÕES

A hidrazina é capaz de promover a produção de radicais de carbono "in vivo".

A formação da hidrazona do formaldeído e a sua transformação em radicais metila pela catalase simulam "in vitro" um possível mecanismo para a formação de radicais alquila "in vivo" durante a biotransformação de hidrazina.

Células L1210, de linhagem linfocitária, podem formar radicais de carbono a partir da hidrazona do formaldeído, um intermediário descrito na literatura para a alquilação de DNA "in vivo" por hidrazina.

A hidrazina pode ser metabolizada, sem qualquer conjugação, em eritrócitos isolados, formando radicais de carbono e nitrogênio, além de espécies reativas de oxigênio. Todas estas espécies, possivelmente formadas "in vivo", são potencialmente causadoras de dano a macromoléculas. Podem, por exemplo, iniciar reações secundárias em que se formam radicais dessas macromoléculas, como ocorre com a hemoglobina contida nos eritrócitos, nas reações estudadas "in vitro".

Os radicais de carbono, formados durante a biotransformação da hidrazina, podem ser direta ou indiretamente responsáveis pela modificação ( alquilação ) de bases no DNA "in vivo".

A base modificada C<sup>8</sup>-metil-guanina, cuja caracterização é possível por cromatografia líquida de alta resolução associada à detecção eletroquímica, é formada durante a biotransformação da hidrazina "in vivo", sugerindo que ocorre alquilação do DNA por radicais metila.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AKAGI, T., HIROMATSU, K., IYEHARA, O., KIMURA, H., KATO, T. - Specificity of mutations induced by N-methyl-N-nitrosourea in a cDNA of the hprt gene. Carcinogenesis, London, v. 14, n. 4, p. 725-729, 1993.
2. AKERBOOM, T.P.M., SIES, H. - Assay of glutathione, glutathione disulfide and glutathione mixed disulfides in biological samples. Methods Enzymol., New York, v.77, p.376, 1981.
3. ALBANO, E., CHEESEMAN, K.H., TOMASI, A., CARINI, R., DIANZANI, M.U., SLATER, T. - Effect of spin traps in isolated rat hepatocytes and liver microsomes. Biochem.Pharmacol., Oxford, v.35, n.22, p.3955-3960, 1986.
4. ALBANO, E., COMOGLIO, A., CLOT, P., JANNONE, A., TOMASI, A., INGELMAN-SUNDBERG, M. - Activation of alkylhydrazines to free radical intermediates by ethanol-inducible cytochrome P-450E1 (CYP2E1). Biochim. Biophys. Acta, Amsterdam, v. 1243, p. 414-420, 1995.
5. ALBANO, E., GORIA-GATTI, L., CLOT, P., JANNONE, A., TOMASI, A. - Possible role of free radical intermediates in hepatotoxicity of hydrazine derivatives. Toxicol. Ind. Health, Princeton, v. 9, n. 3, p. 529-538, 1993.
6. ALBANO, E., TOMASI, A. - Spin trapping of free radical intermediates produced during the metabolism of isoniazid and iproniazid in isolated hepatocytes. Biochem.Pharmacol., Oxford, v.36, n.18, p.2913-2920, 1987.
7. ALBANO, E., TOMASI, A., GORIA-GATTI, L., JANNONE, A. - Free radical activation of monometil and dimethylhydrazines in isolated hepatocytes and liver microsomes. Free Radical Biol.Med., New York, v.6, n.1, p.3-8, 1989.
8. AUGUSTO, O. - Carbon-centered radicals: DNA alkylation and biological sources. In: DAVIES, K.J.A., ed. Oxidative damage and repair: chemical, biological and medical aspects. Oxford: Pergamon, 1991. p. 148-153.
9. AUGUSTO, O. - Alkylation and cleavage of DNA by carbon-centered radicals metabolites. Free Radical Biol. Med., New York, v.15, n. , 1993.
10. AUGUSTO, O., BEILAN, H.S., ORTIZ DE MONTELLANO, P.R. - The catalytic mechanism of cytochrome P-450: spin trapping evidence for one electron substrate oxidation. J. Biol. Chem., Baltimore, v.257, n. 19, p. 11288-11295, 1982.

---

\*De acordo com a norma NBR 6023/89, preconizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). As abreviaturas dos títulos dos periódicos seguem o Chemical Abstract Service Source Index (CASI) 1995.

11. AUGUSTO, O., DUPLESSIS, L.R., WEINGRILL, C.L.V. - Spin trapping of methyl radical in the oxidative metabolism of 1,2-methylhydrazine. Biochem. Biophys. Res. Commun., New York, v. 126, p. 853-858, 1985.
12. AUGUSTO, O., FALJONI-ALARIO, A., LEITE, L.C.C., NÓBREGA, F.G. - DNA strand scission by the carbon radical derived from 2-phenylethylhydrazine metabolism. Carcinogenesis, London, v. 5, n. 6, p. 781-784, 1984.
13. AUGUSTO, O., ORTIZ DE MONTELLANO, P.R., QUINTANILHA, A. - Spin trapping of free radicals formed during microsomal metabolism of ethylhydrazine and acetylhydrazine. Biochem. Biophys. Res. Commun., New York, v. 101, n. 4: 1324-1330, 1981.
14. AUGUSTO, O., CAVALIERI, E.L., ROGAN, E.G. - Formation of 8-methylguanine as a result of DNA alkylation by methyl radicals generated during horseradishperoxidase catalysed oxidation of methylhydrazine. J. Biol. Chem., Baltimore, v. 265, p. 22093-22096, 1990.
15. BAILEY, E., FARMER, P.B., SHUKER, D.E.G. - Estimation of exposure to alkylating carcinogens by the GC-MS determination of adducts to hemoglobin and nucleic acid bases in urine. Arch. Toxicol., Berlin, v. 60, p. 187-191, 1987.
16. BARROWS, L.R., SHANK, R.C. - Chemical modification of DNA in rats treated with hydrazine. Toxicol. Appl. Pharmacol., New York, v. 45, p. 324, 1978.
17. BARROWS, L.R., SHANK, R.C. - Aberrant methylation of liver DNA in rats during hepatotoxicity. Toxicol. Appl. Pharmacol., New York, v. 60, p. 334-345, 1981.
18. BECKER, R.A., BARROWS, L.R., SHANK, R.C. - Methylation of liver DNA guanine in hydrazine hepatotoxicity: dose-response and kinetic characteristics of N<sup>7</sup>-methylguanine and O<sup>6</sup>-methylguanine formation and persistence in rats. Carcinogenesis, London, v. 2, p. 1181-1188, 1981.
19. BIANCINI, F., WILD, C.P. - 7-Methyldeoxyguanosine as a marker of exposure to environmental methylating agents. Toxicol. Lett., Amsterdam, v. 72, p. 174-184, 1994.
20. BIANCIFIORI, C., RIBACCHI, R. - Pulmonary tumours in mice induced by oral isoniazid and its metabolites. Nature, London, v. 194, p. 488-489, 1962.
21. BOENIGER, M.F. - Formate in urine as a biological indicator of formaldehyde exposure. Am. Ind. Hyg. Assoc. J., Akron, v. 48, p. 900-908, 1987.

22. BOSAN, W.S., LAMBERT, C.E., SHANK, R.C. - The role of formaldehyde in hydrazine-induced methylation of liver DNA guanine. Carcinogenesis, London, v. 7, n. 3, p. 413-418, 1986.
23. BOSAN, W.S., SHANK, R.C. - Methylation of liver DNA guanine in hamsters given hydrazine. Toxicol. Appl. Pharmacol., New York, v.70, p. 323-344, 1983.
24. BOSAN, W.S., SHANK, R.C., MacEWEN, J.D., GAWORSKI, C.L., NEWBERNE, P.M. - Methylation of DNA guanine during the course of induction of liver cancer in hamsters by hydrazine or dimethylnitrosamine. Carcinogenesis, London, v. 8, p. 439-444, 1987.
25. BRITIGAN, B.E., COFFMAN, T.J., BUETTNER, G.R. - Spin trapping evidence for the lack of significant hydroxyl radical production during the respiration burst of human phagocytes using a spin adduct resistant to superoxide-mediated destruction. J. Biol. Chem., Baltimore, v. 265, n. 5, p. 2650-2656, 1990.
26. BUETTNER, G.R. - Spin trapping: ESR parameters of spin adducts. Free Radical Biol. Med., New York, v. 3, p. 259-303, 1987.
27. BURKITT, M.J., KADIISKA, M.B., HANNA, P.M., JORDAN, S.J., MASON, R.P. - Electron spin resonance spin-trapping investigation into the effects of paraquat and desferrioxamine on hydroxyl radical generation during acute iron poisoning. Mol. Pharmacol., New York, v. 43, p. 257-263, 1993.
28. BURKITT, M.J., MASON, R.P. - Direct evidence for in vivo hydroxyl-radical generation in experimental iron overload: An ESR spin-trapping investigation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Washington, v. 88, p. 8440-8444, 1991.
29. CASTRO M.I.D., CASTRO, J.A. - Covalent binding of carbon tetrachloride metabolites to liver nuclear DNA, proteins and lipids. Toxicol. Appl. Pharmacol., New York, v.56, p. 199-206, 1980.
30. CHAMULITRAT, W., JORDAN, S.J., MASON, R.P. - Fatty acid radical formation in rats administered oxidized fatty acids: in vivo spin trapping investigation. Arch. Biochem. Biophys., New York, v. 299, n. 2, p. 361-367, 1992.
31. CHAUDHARY, A.K., NOKUBO, M., REDDY, G.R., YEOLA, S.N., MORROW, J.D., BLAIR, I.A., MARNETT, L.J. - Detection of endogenous malondialdehyde-deoxyguanosine adducts in human liver. Science, Washington, v.265, p. 1580-1582, 1994.

32. CHEESEMAN, K.H., ALBANO, E.F., TOMASI, A., DIANZANI, M.U., SLATER, T.F. - The effects of the spin traps PBN and 4-POBN on microsomal drug metabolism and hepatocyte viability. Life Chem. Rep., Chur, v. 3, p. 259-264, 1985.
33. CHEN, G., GRIFFIN, M., POYER, J.L., McCAY, P.B. - HPLC procedure for the pharmacokinetic study of the spin-trapping agent,  $\alpha$ -phenyl-N-tert-butyl nitron (PBN). Free Radical Biol. Med., New York, v. 8, p. 93-98, 1990.
34. CHENG, H.Y., LIU, T., FEUERSTEIN, G., BARONE, F.C. - Distribution of spin trapping compounds in rat blood and brain: in vivo microdialysis determination. Free Radical Biol. Med., New York, v. 14, p. 243-250, 1993.
35. CHLEBOWSKI, R.T., HELLERSTEIN, M.K., McARDLE, A.H., WILLE, J.J., RICHARDS, E.W., COPE, F.O. - New directions in the nutritional management of the cancer patient. Nutr. Res., New York, v. 13, p. 3-21, 1993.
36. CORNISH, H.H. - The role of vitamin B<sub>6</sub> in the toxicity of hydrazine. Ann. N.Y. Acad. Sci., New York, v. 166, p. 136-145, 1969.
37. COOMES, M.W., PROUGH, R.A. - The mitochondrial metabolism of 1,2-disubstituted hydrazines, procarbazine and 1,2-dimethylhydrazine. Drug Metab. Dispos., Baltimore, v. 11, n. 6, p. 550-555, 1983.
38. CONNOR, H.D., THURMAN, R.G., GALIZI, M.D., MASON, R.P. - The formation of a novel free radical metabolite from CCl<sub>4</sub> in the perfused rat liver and in vivo. J. Biol. Chem., Baltimore, v. 261, n.10, p. 4542-4548, 1986.
39. DOST, F.N., REED, D.J. - Methane formation in vivo from N-isopropyl  $\alpha$ (2-methylhydrazino)-p-toluamide hydrochloride, a tumor-inhibiting methylhydrazine derivative. Biochem. Pharmacol., Oxford, v. 16, p. 1741-1746, 1967.
40. DOUGLAS, G.R., GINGERICH, J.D., SOPER, L.M. - Evidence for in vivo non-mutagenicity of the carcinogen hydrazine sulfate in target tissues of lacZ transgenic mice. Carcinogenesis, London, v. 16, n. 4, p. 801-804, 1995.
41. DUNN, D.L., LUBET, R.A., PROUGH, R.A. - Oxidative metabolism of N-isopropyl- $\alpha$ -(2-methylhydrazino)-p-toluamide hydrochloride (procarbazine) by rat liver microsomes. Cancer Res., Philadelphia, v. 39, p. 4555-4563, 1979.
42. ELAD, D. - Photoproducts of purines. In: WANG, S.Y., ed. Photochemistry and photobiology of nucleic acids. New York: Academic, 1976. v.1, p. 357-380.



43. ERIKSON, J.M., TWEEDIE, D.J., DUCORE, J.M., PROUGH, R.A. - Cytotoxicity and DNA damage caused by the azoxy metabolites of procarbazine in L1210 tumor cells. Cancer Res., Philadelphia, v. 49, p. 127-133, 1989.
44. FIALA, E.S., BOBOTAS, G., KULAKIS, C., WEISBURGER, J.H. - Separation of 1,2-dimethylhydrazine metabolites by high-pressure liquid chromatography. J. Chromatog., Amsterdam, v. 117, p. 181-185, 1976.
45. FLOYD, R.A. - Role of oxygen free radicals in carcinogenesis and brain ischemia. FASEB J., Bethesda, v.4, p. 2587-2597, 1990.
46. FORTNEY, S.R., CLARK, D.A., STEIN, E. - Inhibition of gluconeogenesis by hydrazine administration in rats. J. Pharmacol. Exp. Ther., Baltimore, v. 156, p. 277-284, 1967.
47. GANNETT, P.M., DALAL, N.S., XIANGLIN, S., TOTH, B. - 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine formation during the catalytic oxidation of hydrazines in the presence of 2'-deoxyguanosine. Chem. Biol. Interact., Shannon, v. 80, p. 57-72, 1991.
48. GENT, W.L., SEIFART, H.I., PARKIN, D.P., DONALD, P.R., LAMPRECHT, J.H. - Factors in hydrazine formation from isoniazid by paediatric and adult tuberculosis patients. Eur. J. Clin. Pharmacol., Berlin, v.43, p. 131-136, 1992.
49. GODOY, H.M., GOMEZ, M.I.D., CASTRO, J.A. - Metabolism and activation of 1,1-dimethylhydrazine and methylhydrazine, two products of nitrosodimethylamine reductive biotransformation, in rats. J. Natl. Cancer Inst., Bethesda, v., 71, p. 1047-1051, 1983.
50. GOLDBERG, B., STERN, A. - The mechanism of oxidative hemolysis produced by phenylhydrazine. Mol. Pharmacol., New York, v. 13, p. 832-839, 1977.
51. GOMES, L.F., AUGUSTO, O. - Formation of methyl radicals during the catalase-mediated oxidation of formaldehyde hydrazone. Carcinogenesis, London, v. 12, n. 7, p. 1351-1353, 1991.
52. GORIA-GATTI, L., JANNONE, A., POLI, G., ALBANO, E. - In vitro and in vivo evidence for the formation of methyl radical from procarbazine: a spin-trapping study. Carcinogenesis, London, v.13, n.5, p. 799-805, 1992.
53. GRAFSTRÖM, R.C., HSU, I.C., HARRIS, C.C. - Mutagenicity of formaldehyde in chinese hamster lung fibroblasts: synergy with ionizing radiation and N-nitroso-N-methylurea. Chem. Biol. Interact., Shannon, v. 86, p. 41-49, 1993.

54. HAGHIGHI, B., HORNAJOU, S. - The effects of hydrazine on the phosphatidate phosphohydrolase activity in rat liver. Biochem. Pharmacol., Oxford, v.36, p. 1163-1166, 1987.
55. HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M. - Free radicals in biology and medicine, 2. ed. Oxford: Clarendon, 1989. p. 86-105.
56. HARLER, H.I., COOK, G.L. - A requirement of Pi for the transitory uncoupling of rat liver mitochondria by hydrazine, when b-hydroxybutyrate is the substrate. J. Environ. Pathol. Toxicol., Park Forest South, v. 1, p. 419-432, 1978.
57. HAWKS, A., HICKS, R.M., MAGEE, P.N. - Morphological and biochemical effects of 1,2-dimethylhydrazine and 1-methylhydrazine in rats and mice. Br. J.Cancer, London, v. 30, p. 429-439, 1974.
58. HAWKS, A., MAGEE, P.N. - The alkylation of nucleic acids of rat and mouse in vivo by the carcinogen 1,2-dimethylhydrazine. Br. J.Cancer, London, v. 30, p. 440-447, 1974.
59. HECK, H.A., CASANOVA, M., STARR, T.B. - Formaldehyde toxicity: new understanding. Crit. Rev.Toxicol., Cleveland, v. 20, n. 6, p. 397-426, 1990.
60. HECK, H.A., CASANOVA-SCHMITZ, M. - Biochemical toxicology of formaldehyde. Rev. Biochem. Toxicol., New York, v. 6, p. 155-189, 1984.
61. HERRON, D.C., SHANK, R.C. - DNA methylation during chronic administration of 1,2-dimethylhydrazine in a carcinogenic regimen. Carcinogenesis, London, v. 8, n. 8, p. 857-860, 1982.
62. HIX, S. MORAIS, M.S., AUGUSTO, O. - DNA methylation by tert-butyl hydroperoxide-iron (II). Free Radical Biol. Med., New York, v. 19, n. 3, p. 293-301, 1995.
63. HOLT, A., SHARMAN, D.F., CALLINGHAM, B.A. - Effects in-vitro of procarbazine metabolites on some amine oxidase activities in the rat. J. Pharm. Pharmacol., London, v. 44, p. 494-499, 1992.
64. HUGHES, H.M., GEORGE, I.M., EVANS, J.C., ROWLANDS, C.C., POWELL, G.M., CURTIS, C.G. - The role of the liver in the production of free radicals during halothane anaesthesia in the rat. Biochem. J., London, v. 277, p. 795-800, 1991.
65. JENNER, A.M., TIMBRELL, J.A. - Effect of acute and repeated exposure to low doses of hydrazine on hepatic microsomal enzymes and biochemical parameters in vivo. Arch. Toxicol., Berlin, v. 68, p. 240-245, 1994.

66. JENNER, A.M., TIMBRELL, J.A. - In vitro microsomal metabolism of hydrazine. Xenobiotica, London, v. 25, n. 6, p599-609, 1995.
67. JIA, F., MORRISON, D.C., SILVERSTEIN, R. - Hydrazine sulfate selectively modulates the TNF response to endotoxin in mouse macrophages. Circ. Shock., New York, v. 42, p. 111-114, 1994.
68. JONEN, H.G., WERRINGLOER, J., PROUGH, R.A., ESTABROOK, R.W. - The reaction of phenylhydrazine with microsomal cytochrome P-450: catalysis of heme modification. J. Biol. Chem., Baltimore, v. 257, n. 8, 4404-4411, 1982.
69. JUSTO, G.Z., LIVOTTO, P.R., DURÁN, N. - Chemical and photochemical generated carbon-centered radical intermediate and its reaction with deoxyribonucleic acid. Free Radical Biol. Med., New York, v. 19, n. 4, p. 431-440, 1995.
70. KADIISKA, M.B., HANNA, P.M., JORDAN, S.J., MASON, R.P. - Electron spin resonance evidence for free radical generation in copper-treated vitamin E and selenium-deficient rats: in vivo spin-trapping investigation. Mol. Pharmacol., New York, v. 44, p. 222-227, 1993.
71. KADLUBAR, F.F., ANSON, J.F., DOOLEY, K.L., BELAND, F.A. - Formation of urotelial and hepatic DNA adducts from the carcinogen 2-naphtylamine. Carcinogenesis, London, v. 2, p. 467-470, 1981.
72. KANG, J.O., SLATER, G., AUFSES, A.H., COHEN, G. - Production of ethane by rats treated with the colon carcinogen, 1,2-dimethylhydrazine. Biochem. Pharmacol., Oxford, v.37, n.15, p. 2967-2971, 1988.
73. KANG, J.O., COHEN, G. - Modification of RNA by methyl radicals. In: NOHL, H. ESTERBAUER, H., RICE-EVANS, C., eds. Free radicals in the environment, medicine and toxicology. London: Richillieu, 1994. p.579-598.
74. KALYANARAMAN, B. - Detection of toxic free radicals in biology and medicine. Rev. Biochem. Toxicol. New York, v. 4, p. 73-135, 1982.
75. KALYANARAMAN, B., SINHA, B.K. - Free radical-mediated activation of hydrazine derivatives. Environ. Health Perspect., Washington, v. 64, p. 179-184, 1985.
76. KAWANISHI, S., YAMAMOTO, K. - Mechanism of site-specific DNA damage induced by methylhydrazines in the presence of copper (II) and manganese (III). Biochemistry, Washington, v. 30, p. 3069-3075, 1991.
77. KNECHT, K.T., BRADFORD, B.U., MASON, R.P., THURMAN, R.G.- In vivo formation of a free radical metabolite of ethanol. Mol. Pharmacol., New York, v. 38, p. 26-30, 1990.

78. KNECHT, K.T., MASON, R.P. - In vivo spin trapping of xenobiotic free radical metabolites. Arch. Biochem. Biophys., Amsterdam, v. 303, n. 2, p. 185-194, 1993.
79. KNECHT, K.T., DeGRAY, J., MASON, R.P. - Free radical metabolism of halothane in vivo: radical adducts detected in bile. Mol. Pharmacol., New York, v. 41, p. 943-949, 1992.
80. KIMBALL, R.F. - The mutagenicity of hydrazine and some of its derivatives. Mutat. Res., Amsterdam, v. 39, p. 111-126, 1977.
81. KOSTY, M.P., FLEISHMAN, S.B., HERNDON II, J.E., COUGHLIN, K., KORNBLITH, A.B., SCALZO, A., MORRIS, J.C., MORTIMER, J., GREEN, M.R. - Cisplatin, vinblastine, and hydrazine sulfate in advanced, non-small-cell lung cancer: a randomized placebo-controlled, double-blind phase III study of the cancer and leukemia group B. J. Clin. Oncol., New York, v. 12, n. 6, p. 113-1120, 1994.
82. KOTAKE, Y., JANZEN, E.G. - Decay and fate of the hydroxyl radical adduct of  $\alpha$ -phenyl-N-tert-butyl nitron in aqueous media. J. Am. Chem. Soc., Washington, v. 113, p. 9503-9506, 1991.
83. LAMB, R.G., BANKS, W.L. - Effect of hydrazine exposure on hepatic triacylglycerol biosynthesis. Biochim. Biophys. Acta, Amsterdam, v. 574, p. 440-447, 1979.
84. LAMBERT, C.E., BOSAN, W.S., SHANK, R.C. - Tetraformyltriazine and hydrazine-induced methylation of liver DNA guanine. Carcinogenesis, London, v. 7, n. 3, p. 419-422, 1986.
85. LAMBERT, C.E., SHANK, R.C. - Role of formaldehyde hydrazone and catalase in hydrazine-induced methylation of DNA guanine. Carcinogenesis, London, v. 9, p. 65-70, 1988.
86. LEAKAKOS, T., SHANK, R.C. - Hydrazine genotoxicity in the neonatal rat. Toxicol. Appl. Pharmacol., New York, v. 126, p. 295-300, 1994.
87. LEITE, L.C.C., AUGUSTO, O. - DNA alterations induced by the carbon-centered radical derived from the oxidation of 2-phenylethylhydrazine. Arch. Biochem. Biophys., New York, v. 270, n. 2, p. 560-572, 1989.
88. LIM, P.K., ZHONG, Y. - The copper-catalyzed redox reaction between aqueous hydrogen peroxide and hydrazine. 2. reaction mechanism, model analysis, and a comparison of model and experimental results. J. Am. Chem. Soc., Washington, v. 111, p. 8404-8410, 1989.

89. LOPEZ-MENDOZA, D., VILLA-TREVINO, S. - Hydrazine-induced inhibition of amino acid incorporation into rat liver protein. Lab. Invest., Washington, v. 25, p. 68-72, 1971.
90. LUNN, G., SANSONE, E.B. - Oxidation of 1,1-dimethylhydrazine (UDMH) in aqueous solution with air and hydrogen peroxide. Chemosphere, Oxford, v. 29, n. 7, p. 1577-1590, 1994.
91. MAEDA, M., NUSHI, K., KAWAZOE, Y. - Studies on chemical alterations of nucleic acid and their components - VII C-alkylation of purine bases through free radical process catalyzed by ferrous ion. Tetrahedron, Oxford, v. 30, p. 2677-2682, 1974.
92. MacEWEN, J.D., VERNOT, E.H., HAUN, C.C., KINKEAD, E.R., HALL, A. - Chronic inhalation toxicity of hydrazine: Oncogenic Effects. Air Force Aerospace Medical Research Laboratory Technical Report AFAMRL-TR-81-56, Wright-Patterson Air Force Base, OH. 1981. Apud: LEAKATOS, T., SHANK, R.C. Hydrazine genotoxicity in the neonatal rat. Toxicol. Appl. Pharmacol., New York, v. 126, p. 295-300, 1994.
93. MAPLES, K.R., JORDAN, S.J., MASON, R.P. - In vivo rat hemoglobin thyl free radical formation following phenylhydrazine administration. Mol. Pharmacol., New York, v. 33, n. 3, p. 344-350, 1988.
94. MAPLES, K.R., KENNEDY, C.H., JORDAN, S.J., MASON, R.P. - In vivo thyl free radical formation from hemoglobin following administration of hidroperoxides. Arch. Biochem. Biophys., New York, v. 277, n. 2, p. 402-409, 1990.
95. MARNETT, L.J., BURCHAM, P.C. - Endogenous DNA adducts: potential and paradox. Chem. Res. Toxicol., Washington, v. 6, p. 771-785, 1993.
96. MATHISON, B.H., SAID, B., SHANK, R.C. - Effect of 5-methylcytosine as a neighboring base on methylation of DNA guanine by N-methyl-N-nitrosourea. Carcinogenesis, London, v. 14, n. 2, p. 323-327, 1993.
97. MATHISON, B.H., MURPHY, S.E., SHANK, R.C. - Hydralazine and other hydrazine derivatives and the formation of DNA adducts. Toxicol. Appl. Pharmacol., New York, v. 127, p. 91-98, 1994.
98. MATTES, W.B., HARTLEY, J.A., KOHN, K.W., MATHESON, D.W. - GC-rich regions in genomes as targets for DNA alkylation. Carcinogenesis, London, v. 9, p. 2065-2072, 1988.
99. MATSUKI, Y., AKAZAWA, M., TSUCHIYA, K., SAKURAI, H., KIWADA, H., GOROMARU, T. - Effects of ascorbic acid on the free radical formations of isoniazid and its metabolites. Yakugaku Zasshi, Tokyo, v. 111, n. 10, p. 600-605, 1991.

100. McCAY, P.B. - Application of ESR spectroscopy in toxicology. Arch. Toxicol., Berlin, v. 60, p. 133-137, 1987.
101. McKINLEY, S., ANDERSON, C.D., JONES, M.E. - Studies on the action of hydrazine, hydroxylamine and other amines in the carbamyl phosphate synthetase reaction. J. Biol. Chem., Baltimore, v.242, p. 3381-3390, 1967.
102. MICHELOT, D., TOTH, B. - Poisoning by *Gyromitra esculenta* - a review. J. Appl. Toxicol., Philadelphia, v. 11, n. 4, p. 235-243, 1991.
103. MOLONEY, S.J., PROUGH, R.A. - Biochemical toxicology of hydrazines. Rev. Biochem. Toxicol., New York, v. 5, 313-348, 1983.
104. MOLONEY, S.J., SNIDER, B.J., PROUGH, R.A. - The interactions of hydrazine derivatives with rat-hepatic cytochrome P-450. Xenobiotica, London, v. 10, p. 803-814, 1984 .
105. MOLONEY, S.J., WIEBKIN, P., CUMMINGS, S.W., PROUGH, R.A. - Metabolic activation of the terminal N-methyl group of N-isopropyl- $\alpha$ -(2-methylhydrazino)-p-toluamide hydrochloride (procarbazine). Carcinogenesis, London, v. 6, n. 3, p. 397-401, 1985.
106. MOTTLEY, C., MASON, R.P. - Nitroxide radical adducts in biology: chemistry, applications and pitfalls. Biol. Mag. Reson, New York, Plenum, v. 8, p.489-546, 1989.
107. MOORE, D.R., REINKE, L.A., McCAY, P.B. - Metabolism of ethanol to 1-hydroxyethyl radicals in vivo: detection with intravenous administration of  $\alpha$ -(4-pyridyl-1-oxide)-N-t-butyl nitron. Mol. Pharmacol., New York, v.47, p.1224-1230, 1995.
108. MUDIPALLI, A., NADADUR, S.S., MACCUBBIN, A.E., GURTOO, H.L. - Mutations induced by dacarbazine activated with cytochrome P-450. Mutat. Res., Amsterdam, v. 327, p. 113-120, 1995.
109. NAGASAWA, H.T., SHIROTA, F.N., MATSUMOTO, H. - Decomposition of methylazoxymethanol, the aglycone of cycasin, in D<sub>2</sub>O. Nature, London, v.236, p. 234-235, 1972.
110. NELSON, S.D., GORDON, W.P. - Metabolic activation of hydrazines. In: SNYDER, R., PARKE, D.V., KOCSIS, J.J., JOLLOW, D.T, GIBSON, G.G. WITMER, C.M., eds., Biological reactive intermediates. New York: Plenum, 1982. v. 2, part. B., p. 971-981.
111. NELSON, S.D., MITCHELL, J.R., TIMBRELL, J.A., SNODGRASS, W.R., CORCORAN III, G.B. - Isoniazid and iproniazid: activation of metabolites to toxic intermediates in man and rat. Science, Washington, v. 193, p. 901-903, 1976.

112. NETTO, L.E.S., FERREIRA, A.M.C., AUGUSTO, O. - Iron (III) binding in DNA solutions: complex formation and catalytic activity in the oxidation of hydrazine derivatives. Chem. Biol. Interact., Shannon, v. 79, p. 1-14, 1991.
113. NETTO, L.E.S., RAMAKRISHNA, N.V.S., KOLAR, C., CAVALIERI, E.L., ROGAN, E.G., LAWSON, T.A., AUGUSTO, O. - Identification of 8-methylguanine in the hydrolysates of DNA from rats administered 1,2-methylhydrazine: evidence for in vivo DNA alkylation by methyl radicals. J. Biol. Chem., Baltimore, v. 267, p. 21524-21527, 1992.
114. NODA, A., NODA, H., MISAKA, A., SUMIMOTO, H., TATSUMI, K. - Hydrazine radical formation catalyzed by rat microsomal NADPH-cytochrome P-450 reductase. Biochem. Biophys. Res. Commun., New York, v. 153, n. 1, p. 256-260, 1988.
115. NODA, A., NODA, H., OHNO, K., SENDO, T., MISAKA, A., KANASAWA, Y., ISOBE, R., HIRATA, M. - Spin trapping of a free radical intermediate formed during microsomal metabolism of hydrazine. Biochem. Biophys. Res. Commun., New York, v. 133, n. 3, p. 1086-1091, 1985.
116. OHKUMA, T., KIRINO, Y., KWAN, T. - Some physicochemical properties of 2-methyl-2-nitrosopropane, phenyl N-tert-butyl nitron, 5,5-dimethylpyrroline-N-oxide and the feasibility of their use as spin traps in aqueous solutions. Chem. Pharm. Bull., Tokyo, v. 29, n. 1, p. 25-28, 1981.
117. ORTIZ DE MONTELLANO, P.R., AUGUSTO, O., VIOLA, F., KUNZE, K.L. - Carbon radicals in the metabolism of alkylhydrazines. J. Biol. Chem., Baltimore, v. 258, p. 8623-8629, 1983.
118. ORTIZ DE MONTELLANO, P.R., WATANABE, M.D. - Free radical pathways in the in vitro hepatic metabolism of phenelzine. Mol. Pharmacol., New York, v. 31, p. 213-219, 1987.
119. OSTERMAN-GOLKAR, S., BERGMARK, E. - Alkylation of haemoglobin, plasma proteins and DNA in the mouse by diethylnitrosamine. Carcinogenesis, London, v. 9, n. 11, p. 1915-1917, 1988.
120. PARK, J.W., AMES, B. - 7-Methylguanine adducts in DNA are normally present at high levels and increase on aging: analysis by HPLC with electrochemical detection. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Washington, v. 85, p. 7467-7470, 1988.
121. PARK, J.W., CUNDY, K.C., AMES, B. - Detection of DNA adducts by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. Carcinogenesis, London, v. 10, p. 827-832, 1989.

122. PARODI, S., DeFLORA, S., CAVANA, M., PINO, A., ROBBIANO, L., BENNICELLI, C., BRAMBILLA, G. - DNA-damaging activity in vivo and bacterial mutagenicity of sixteen hydrazine derivatives as related quantitatively to their carcinogenicity. Cancer Res., Philadelphia, v. 41, p. 1469-1482, 1981.
123. PEDRO, M.A., GATTY, R.M., AUGUSTO, O. - In vivo free radical formation monitored by the ascorbyl radical. Quím. Nova, São Paulo, v. 16, n. 4, p. 370-372, 1993.
124. PICHORNER, H., JESSNER, G., EBERMANN, R. - tBOOH acts as a suicide substrate for catalase. Arch. Biochem. Biophys., New York, v. 300, n. 1, p. 258-264, 1993.
125. PLUMMER, J.L., SMITH, B.R., SIES, H., BEND, J.R. - Chemical depletion of glutathione in vivo. Methods Enzymol., New York, v.77, p.50-59, 1981.
126. POHL, L.R., BRANCHFLOWER, R.V. - Covalent binding of electrophilic metabolites to macromolecules. Methods Enzymol., New York, v.77, p.43-50, 1981.
127. PREECE, N.E., NICHOLSON, J.K., TIMBRELL, J.A. - Identification of novel hydrazine metabolites by <sup>15</sup>N-NMR. Biochem. Pharmacol., Oxford, v. 41, n. 9, p. 1319-1324, 1991.
128. PREECE, N.E., SIMIN, G., TIMBRELL, J.A. - Course of ATP depletion in hydrazine hepatotoxicity. Arch. Toxicol., Berlin, v. 64, p. 49-53, 1990.
129. PREECE, N.E., TIMBRELL, J.A. - Investigation of lipid peroxidation induced by hydrazine compounds in vivo in the rat. Pharmacol. Toxicol., Copenhagen, v. 64, p. 282-285, 1989.
130. PROUGH, R.A., COOMES, M.L., DUNN, D.L. - The microsomal metabolism of carcinogenic and/or therapeutic hydrazines. In: ULRICH, V., ROOTS, I., HILDEBRANDT, A., ESTABROOK, R.W., CONNEY, A.H., eds. Microsomes and drug oxidation. Oxford: Pergamon, 1977. p. 500-507.
131. PROUGH, R.A., WITTKOP, J.A., REED, D.J. - Evidence for the hepatic metabolism of some monoalkylhydrazines. Arch. Biochem. Biophys., New York, v. 131, p. 369-373, 1979.
132. PROUGH, R.A., FREEMAN, P.C., HINES, R.N. - The oxidation of hydrazine derivatives catalyzed by the purified liver microsomal FAD-containing monooxygenase. J. Biol. Chem., Baltimore, v.256, p. 4178-4184, 1981.



133. PRYOR, W.A. - Why is the hydroxyl radical the only radical that commonly adds to DNA? hypothesis: it has a rare combination of high electrophilicity, high thermochemical reactivity and a mode of production that occur near DNA. Free Radical Biol. Med., New York, v. 4, p. 219-223, 1988.
134. QUINTERO-RUIZ, A., PAZ-NERI, L.L., VILLA-TREVIÑO, S. - Indirect alkylation of CBA mouse liver DNA and RNA by hydrazine in vivo. a possible mechanism of action as a carcinogen. J. Natl. Cancer Inst., Bethesda, v. 67, n. 3, p. 613-618, 1981.
135. RAY, P.D., HANSON, R.L., LARDY, H.A. - Inhibition by hydrazine of gluconeogenesis in the rat. J. Biol. Chem., Baltimore, v. 245, p. 690-696, 1970.
136. RUNGE-MORRIS, M.A., WU, N., NOVAK, R.F. - Hydrazine-mediated DNA damage: role of hemoprotein, electron transport, and organic free radicals. Toxicol. Appl. Pharmacol., New York, v. 125, p. 123-132, 1994.
137. SAFFHILL, R., MARGISON, G.P., O'CONNOR, P. J. - Mechanisms of carcinogenesis induced by alkylating agents. Biochim. Biophys. Acta, Amsterdam, v. 823, p. 111-145, 1985.
138. SAID, B., SHANK, R.C. - Nearest neighbor effects on carcinogen binding to guanine runs in DNA. Nucleic Acids Res., London, v. 19, p. 1311-1316, 1991.
139. SAKAMI, M. - The conversion of formate and glycine to serine and glycogen in the intact rat. J. Biol. Chem., Baltimore, v. 176, p. 995-996, 1946.
140. SAKAMI, M., WELCH, A.D. - Synthesis of labile methyl groups by the rat in vivo and in vitro. J. Biol. Chem., Baltimore, v. 187, p. 379-383, 1950.
141. SAMUNI, A., CARMICHAEL, A.J., RUSSO, A., MITCHELL, J.B., RIEZ, P. - On the spin trapping and ESR detection of oxygen-driven radicals generated inside cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Washington, v. 83, p. 7593-7597, 1986.
142. SAMUNI, A., KRISHNA, M., RIESZ, P., FINKELSTEIN, E., RUSSO, A. - Superoxide reaction with nitroxide spin-adducts. Free Radical Biol. Med., New York, v. 6, p. 141-148, 1989.
143. SAMUNI, A., SAMUNI, A., SWARTZ, H.M. - The cellular-induced decay of DMPO spin adducts of  $\cdot\text{OH}$  and  $\cdot\text{O}_2^-$ . Free Radical Biol. Med., New York, v. 6, p. 179-183, 1989.

144. SANINS, S.M., TIMBRELL, J.A., ELCOMBE, C., NICHOLSON, J.K. - Proton NMR spectroscopic studies on the metabolism and biochemical effects of hydrazine in vivo. Arch. Toxicol., Berlin, v. 66, p. 489-495, 1992.
145. SAPRIN, A.N., PIETTE, L.H. - Spin trapping and its application in the study of lipid peroxidation and free radical production with liver microsomes. Arch. Biochem. Biophys., New York, v. 180, p 480-492, 1977.
146. SCHWARTZ, D.E. - Comparative metabolic studies with Natulan, methylhydrazine and methylamine in rats. Experientia, Basel, v. 22, p. 212-213, 1966.
147. SEDGWICK, B. - Oxidation of methylhydrazines to mutagenic methylating derivatives and inducers of the adaptive response of Escherichia coli to alkylation damage. Cancer Res., Philadelphia, v.52, p. 3693-3697, 1992.
148. SEVERI, L., BIANCIFIORI, C. - Hepatic carcinogenesis in CBA/Cb/Se mice and Cb/Se rats by isonicotinic acid hydrazide and hydrazine sulfate. J. Natl. Cancer Inst., Bethesda, v. 41, p. 331-349, 1968.
149. SHANK, R.C. - Evidence for indirect genetic damage as methylation of DNA guanine in response to cytotoxicity. In: HAYES, A.W., SCHNELL, R.C., MIYA, T.S., eds. Developments in the science and practice of toxicology. Amsterdam: Elsevier, 1983. p. 145-152.
150. SHANK, R.C. - Comparative study on the indirect methylation of liver DNA guanine by the 1-carbon pool in hepatotoxicity. Arch. Toxicol.Suppl., Berlin, v. 10, p. 204-216, 1987.
151. SHANK, R.C., MAGEE, P.N. - Similarities between the biochemical actions of cycasin and dimethylnitrosamine. Biochem. J., London, v.105, p. 521-527, 1967.
152. SHIBA, D.A., WEINKAM,R.J. - Quantitative analysis of procarbazine, procarbazine metabolites and chemical degradation products with application to pharmacokinetic studies. J. Chromatogr., Amsterdam, v. 229, p. 397-407, 1982.
153. SHIGENAGA, M.K., PARK, J.W., CUNDY, K.C., GIMENO, C.J., AMES, B.N. - In vivo oxidative DNA damage: measurement of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in DNA and urine by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. Methods Enzymol., New York, v.186, p.521-530, 1990.
154. SINHA, B.K. - Enzymatic activation of hydrazine derivatives: a spin trapping study. J. Biol. Chem., Baltimore, v. 258, n. 2, p. 796-801, 1983.

155. SINHA, B.K. - Metabolic activation of procarbazine: evidence for carbon-centered free-radical intermediates. Biochem. Pharmacol. Oxford, v. 33, n. 17, p. 2777-2781, 1984.
156. SINHA, B.K. - Cytochrome P-450 and peroxidase-dependent activation of procarbazine and iproniazid in mammalian cells. Free Rad. Res. Commun., London, v. 15, n. 4, p. 189-195, 1991.
157. SINHA, B.K., MOTTEN, A.G. - Oxidative metabolism of hydralazine. evidence for nitrogen centered radicals formation. Biochem. Biophys. Res. Commun., New York, v. 105, n. 3, p. 1044-1051, 1982.
158. SONH, O.S., FIALA, E.S. - Effects of dietary restriction and fasting on selected rat liver enzymes of xenobiotic metabolism and on AOM-induced DNA guanine methylation in rat liver and colon. Nutr. Cancer., Philadelphia, v. 23, p.13-22, 1995.
159. SPECK, J.F. - The enzymatic synthesis of glutamine, a reaction utilizing adenosine triphosphate. J. Biol. Chem., Baltimore, v. 179, p. 1405-1426, 1949.
160. STILLWELL, W.G., GLOGOWSKI, J., XU, H.X., WISHNOK, J.S., ZAVALA, D., MONTES, G, CORREA, P., TANNENBAUM, S.R. - Urinary excretion of nitrate, N-nitrosoproline, 3-methyladenine, and 7-methylguanine in a Columbian population at risk for stomach cancer. Cancer Res., Philadelphia, v. 51, p. 190-194, 1991.
161. TOMASI, A., ALBANO, E., BOTTI, B., VANNINI, V. - Detection of free radical intermediates in the oxidative metabolism of carcinogenic hydrazine derivatives. Toxicol. Pathol., Newark, v. 15, n. 2, p. 178-183, 1987.
162. TOTH, B. - A review of cancer risk associated with human exposure to hydrazine. Int. J. Oncol., Athens, v. 4, p. 231-239, 1994.
163. THORNALLEY, P.J. - The haemolytic reactions of 1-acetyl-2-phenylhydrazine and hydrazine: a spin trapping study. Chem. Biol. Interact., Shannon, v. 50, p. 339-349, 1984.
164. VOIGT, J.M., TOPAL, M.D. - O<sup>6</sup>-methylguanine in place of guanine causes assymmetric single-strand cleavage of DNA by some restriction enzymes. Biochemistry, Washington, v. 29, p. 1632-1637, 1990.
165. VonWRIGHT, A., TIKKANEN, L. - The comparative mutagenicities of hydrazine and its mono- and di-methyl derivatives in bacterial test systems. Mutat. Res., Amsterdam, v.78, p. 17-23, 1980.

166. WANG, P., BENNET, A.O., POVIRK, L.F. - Melphalan induced mutagenesis in an SV-40 based shuttle vector: predominance of A.T.→T.A. transversions. Cancer Res., Philadelphia, v.50, p. 7527-7531, 1990.
167. WEINKAM, R.J., SHIBA, D.A. - Metabolic activation of procarbazine. Life Sci., Oxford, v. 22, n. 11, p. 937-946, 1978.
168. WIEBKIN, R.J., PROUGH, R.A. - Oxidative metabolism of N-isopropyl- $\alpha$ -(2-methylazo)-p-toluamide (azoprocabazine) by rodent liver microsomes. Cancer Res., Philadelphia, v.40, p. 3524-3529, 1980.
169. WITKIN, L.B. - Acute toxicity of hydrazine and some of its methylated derivatives. AMA Arch. Ind. Health, Chicago, v. 13, p. 34-36, 1956.
170. WIESTLER, O.D., KLEIHUES, P., RICE, J.M., IVANKOVIC, S. - DNA methylation in maternal, fetal and neonatal rat tissues following perinatal administration of procarbazine. J. Cancer Res. Clin. Oncol., Berlin, v. 108, p. 56-59, 1984.
171. WILLIAMS, G.M. - Methods for evaluating chemical genotoxicity. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol., Palo Alto, v. 29, p. 189-211, 1989.
172. WITTKOP, J.A., PROUGH, R.A., REED, D.J. - Oxidative demethylation of N-methylhydrazines by rat liver microsomes. Arch. Biochem. Biophys., New York, v. 40, p. 308-315, 1969.
173. WONG, P.K., POYER, J.L., DuBOSE, C.M., FLOYD, R.A. - Hydralazine-dependent carbon dioxide free radical formation by metabolizing mitochondria. J. Biol. Chem., Baltimore, v. 263, p. 11296-11301, 1988.
174. WORLD HEALTH ORGANIZATION International Programme on Chemical Safety (IPCS) - Hydrazine. Geneve, 1987. p.1-29, 57-65. [Environmental Health Criteria, n. 68].
175. YAMAMOTO, K., KAWANISHI, S. - Site-specific DNA damage induced by hydrazine in the presence of manganese and copper ions. J. Biol. Chem., Baltimore, v. 266, n. 3, p. 1509-1515, 1991.
176. ZHONG, Y., LIM, P.K. - The copper-catalyzed redox reaction between aqueous hydrogen peroxide and hydrazine. 1. new experimental results and observations. J. Am. Chem. Soc., Washington, v. 111, p. 8398-8404, 1989.

16664