

BIBLIOTECA  
INSTITUTO DE QUÍMICA  
Universidade de São Paulo  
18421

L116-1-1

23017

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE QUÍMICA

PROLIFERAÇÃO CELULAR INDUZIDA POR 8-OXOGUANOSINA E  
8-METILGUANOSINA, DOIS PRODUTOS DO ATAQUE DE RADICAIS LIVRES  
A RIBONUCLEOSÍDEOS E RNA.

JOLIE KIEMLIAN KWEE

TESE DE DOUTORADO

ORIENTADORA: PROF<sup>a</sup> DR<sup>a</sup> OHARA AUGUSTO

SÃO PAULO

1998

Arquivo

1998

1998

**“Proliferação Celular Induzida por 8-Oxoguanosina e 8-Metilguanossina, Dois Produtos do Ataque de Radicais Livres a Ribonucleosídeos e RNA”.**

## **JOLIE KIEMLIAN KWEE**

**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.**

**Aprovado por:**

---

**Prof. Dr. OHARA AUGUSTO  
IQ - USP  
(Orientadora e Presidente)**

---

**Prof. Dr. HUGO AGUIRRE ARMELIN  
IQ - USP**

---

**Profa. Dra. MARIA EDWIGES HOFFMANN  
IQ - UNICAMP**

---

**Profa. Dra. DULCINEIA SAES PARRA ABDALLA  
FCF - USP**

---

**Prof. Dr. PAULO LEE HO  
IB**

**SÃO PAULO  
07 DE MAIO DE 1998**

*"I've climbed the highest mountain....but I still haven't  
found what I'm looking for..."  
(Bono Vox, U2)*

*À Otília Rodrigues Affonso Mitidieri*

## AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À Dr<sup>a</sup> Ohara Augusto pela oportunidade de aprender com ela.

À Dr<sup>a</sup> Mari C. S. Armelin pela orientação nos estudos com cultura de células.

À Dr<sup>a</sup> Selma Giorgio pela paciência e disposição em ensinar e ajudar nos experimentos com camundongos.

Ao Dr. Hélio A. Stefani pela paciência inesgotável em ensinar-me os primeiros passos de síntese orgânica e por ter evitado que eu aprendesse na prática que sódio metálico faz “boom!”.

## AGRADECIMENTOS

São tantas pessoas que tenho que agradecer que muito provavelmente esquecerei de algumas. Mas, prefiro correr esse risco...

À Fernanda pelo apoio incondicional principalmente no meu período de adaptação.

À Paulletchinha e Willie pela amizade e pelo esforço em ensinar-me um pouco de química orgânica.

Ao Cassius pela paciência em ensinar-me a destilar e armazenar solventes orgânicos.

Ao Ivan pelas explicações iniciais dos espectros de NMR.

Ao Frank , Heleninha e Adriana pela amizade.

À Dr<sup>a</sup> Shirley pelos bate-papos descontraídos recheados de estórias e histórias.

À Jeannette (tequilita) super amiga que socorreu-me nos momentos em que eu estava mais “desemparelhada”.

Ao Luís pelos primeiros ensinamentos no HPLC.

Ao Maurício por sintetizar mais 8-MeGuo.

Aos amigos que são e que foram do laboratório, Sonia, Lia, Lígia, Edlaine, Célio, Tatiana e Marcelo.

À Bere (Berezinha) pela amizade, apoio técnico e pelos momentos de reflexão.

Aos amigos do clube da gastronomia e do inimigo oculto (ou secreto), Gyva, Verdinho, William, Noeli, Thelma, Alberto, Paula, Eneida e Ciça.

Ao Dr. Hugo Armelin e à Dr<sup>a</sup> Júlia por permitirem o uso das instalações de seus laboratórios.

À Dr<sup>a</sup> Karla Kovary pelos auxílios e discussões nos ensaios de cultura de células.

À Claudimara pela paciência em ensinar-me a técnica de BrdUrd.

À Kátia e Ana Paula pelas dicas em cultura de células.

Ao Bayardo pelos “pit stops” durante as várias idas e vindas ao longo do percurso B9Sup.↔B9Inf..

Ao Eric e Sérgio (japa) colegas de “sofrimentos celulares”.

Ao pessoal do laboratório da Dr<sup>a</sup> Mari especialmente à Lúcia Helena pela incrível paciência em ensinar-me Northern que ainda não deu certo mas a amizade deu, à Léo e à Fernanda.

À Mara e ao Zé pelo incentivo e pelas orações.

Ao pessoal da Biblioteca do IQ/Farmácia especialmente ao Angelo e à Moema.

Ao Rey por tudo.

À Dr<sup>a</sup> Vivian Rumjanek pelos esforços em permitir a minha ida para São Paulo junto com os esforços de Tereza Cristina, Joecy (Jo) e a antiga equipe do Recursos Humanos do Instituto Nacional de Câncer (INCa).

Ao pessoal da Pesquisa Básica (INCa) pela torcida especialmente à Maria José, ao Emílio, ao Zé Marques, à Dr<sup>a</sup> Regina, ao Dr. Abreu e a Rosinha.

Os resultados com as células de melanoma não teriam sido possíveis sem as ajudas inestimáveis de Danielle e Ana Paula e das análises por FACScan feitas pela Ramza.

Ao pessoal da Biblioteca do INCa sempre prontos em atender qualquer pedido.

Ao Dr. Marcos Moraes, diretor do INCa, por permitir a minha ida para São Paulo.

Aos meus pais, e minha irmã que torceram e me apoiaram nos momentos mais difíceis.

À Virgínia pela árdua tarefa de preservar o pouco que resta da harmonia de minha saúde mental.

## ABREVIATURAS

Ado	Adenosina
8-ArildGuo	8-Arildesoxiguanosina
BrdUrd	Bromodesoxiuridina
8-BrGua	8-Bromoguanina
8-BrGuo	8-Bromoguanosina
CDCl <sub>3</sub>	Clorofórmio deuterado
DMEM	“Dulbecco’s Modified Eagle Medium”, meio de cultura de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub>	Dimetilsulfóxido deuterado
DPMX	1,3-Dipropil-7-metilxantina
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EP	Erro Padrão
FACS	“Fluorescence-activated cell sorting”, citofluorimetria de fluxo
FGF	“Fibroblast growth factor”, fator de crescimento de fibroblasto
GDP	Guanosina difosfato
GMP	Guanosina monofosfato
GMPC	Guanosina monofosfato cíclico
GTP	Guanosina trifosfato
Gua	Guanina
Guo	Guanosina
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinoetanosulfônico
HGPRT	Hipoxantina-guanina fosforibosil transferase

HPLC	“High pressure liquid chromatography”, cromatografia líquida de alta pressão
[ <sup>3</sup> H] TdR	Timidina tritiada
LAK	“Lymphokine activated killer”, células assassinas ativadas por linfocinas
LPS	Lipopolisacarídeo
8-SHGuo	8-Mercaptoguanosina
8-MedGuo	8-Metildesoxiguanosina
8-MeGua	8-Metilguanina
8-MeGuo	8-Metilguanosina
7-MeGuo	7-Metilguanosina
7-Me-8-oxoguo	7-Metil-8-oxoguanosina
NF-κB	Fator de transcrição nuclear kappa B
NK	“Natural killer”, células assassinas naturais
8-OxodGuo	7,8-Di-hidro-8-oxo-2'-desoxiguanosina
8-OxoGua	7,8-Di-hidro-8-oxoguanina
8-OxoGuo	7,8-Di-hidro-8-oxoguanosina
PACPX	1,3-Dipropil-8-(2-amino-4-clorofenil)xantina
PBS	“Phosphate buffered saline”, solução salina de fosfato tamponada
PDA	“Photodiode array”, detector de fotodiodos
PDGF	“Platelets derived growth factor”, fator de crescimento derivado de plaquetas
PNP	Purina nucleosídeo fosforilase
POPOP	1,4-bis[5-fenil-2-oxazolil]benzeno;2,2'-p-fenileno-bis[5-feniloxazol]
PPM	Parte por milhão
PPO	2,5-difenil-oxazol

PRPP	5-Fosforibosil 1-pirofosfato
RMN	Ressonância magnética nuclear
RPMI 1640	“Roswell Park Memorial Institute 1640”, meio de cultura
SFB	Soro fetal bovino
TEAB	Tampão de bicarbonato de trietilamônio
TCA	Ácido tricloroacético
TLC	“Thin layer chromatography”, cromatografia de camada delgada

ÍNDICE

	pág.
RESUMO	1
SUMMARY	3
I - INTRODUÇÃO	5
I.1. Adutos de radicais livres com ácidos nucleicos	5
I.2. Análogos de guanosina como imunomoduladores	8
II - OBJETIVOS	12
III – MATERIAIS E MÉTODOS	14
III.1. Síntese dos ribonucleosídeos	14
Materiais	14
HPLC	14
Espectroscopia	15
Purificação de reagentes	15
III.2. Estudos de proliferação celular	16
Materiais	16
Soluções estoque dos ribonucleosídeos	17
Animais	17
Cultura de células de baço	17
Cultura de células de fibroblasto	18
Cultura de células de melanoma	18
Ensaio mitogênico de células de baço	18

Ensaio mitogênico de células de fibroblasto	19
Ensaio mitogênico de células de melanoma	20
Ensaio mitogênico por imunofluorescência com bromodesoxiuridina (BrdUrd)	21
Eficiência de plaqueamento	22
Contagem de células	22
Análise do ciclo celular por citometria de fluxo (FACScan)	23
<b>IV – RESULTADOS</b>	<b>24</b>
IV.1. Síntese dos ribonucleosídeos	24
IV.1.1. Síntese de 8 - metilguanossina (8 - MeGuo)	24
IV.1.2. Síntese de 7,8 - di - hidro - 8 - oxoguanossina (8 - OxoGuo)	27
IV.2. Estudos de proliferação celular	32
IV.3. Aspectos mecanísticos da indução de síntese de DNA pelos adutos de ribonucleosídeos na posição C-8.	41
<b>V - DISCUSSÃO</b>	<b>53</b>
V.1. Síntese dos ribonucleosídeos	53
V.2. Proliferação celular	56
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>64</b>
<b>CURRICULUM VITAE</b>	<b>77</b>

## RESUMO

Os efeitos de ribonucleosídeos de guanina substituídos na posição C-8 na proliferação de linfócitos B estão bem documentados na literatura. Esses compostos são análogos de adutos formados pela adição de radicais livres a ribonucleosídeos e a RNA. Neste trabalho, verificamos as propriedades proliferativas de dois desses adutos, 8-metilguanossina (8-MeGuo) e 8-oxo-7,8-di-hidroguanossina (8-OxoGuo) e comparamos com 8-bromoguanossina (8-BrGuo), o composto mais estudado como indutor da proliferação de linfócitos B. 8-MeGuo e 8-OxoGuo foram sintetizados em rendimentos de 28 e 55%, respectivamente, e foram caracterizados por UV, NMR e CG-massa. Seus efeitos sobre a incorporação de timidina radioativa ( $[^3\text{H}]$  TdR) no DNA de células de baço, fibroblasto 3T3(A31) e melanoma B16F10 foram examinados. Os dois adutos foram mitogênicos para células de baço mas foram seletivos quanto as células imortalizadas. 8-MeGuo atuou sobre células 3T3(A31) e 8-OxoGuo sobre as células de melanoma B16F10. O análogo não fisiológico 8-BrGuo foi efetivo em todas as células testadas. Experimentos de contagem de células, citotoxicidade e citometria de fluxo, indicaram que a síntese de DNA induzida pelas guanossinas substituídas na posição C-8 refletia crescimento celular. Foi proposto que os compostos agem de dentro da célula uma vez que seus efeitos são bloqueados em

presença de um inibidor de transporte de nucleosídeo, mas não foram inibidos por um antagonista de receptor purinérgico. Os resultados obtidos, junto com os descritos na literatura, sugerem que no caso dos fibroblastos 3T3(A31) e células de baço de camundongo os efeitos proliferativos dos compostos não são dependentes do metabolismo desses compostos via salvação das purinas. No caso das células de melanoma, entretanto, os compostos parecem fazer parte do “pool” de nucleosídeos. A demonstração de que adutos produzidos por ataques radicalares em ribonucleosídeos e RNA são capazes de induzir proliferação celular, abre novas perspectivas para a compreensão do papel de radicais livres em processos carcinogênicos.

## SUMMARY

The ability of C8-substituted guanine ribonucleosides to induce B cell proliferation has been well documented in the literature. These compounds are analogues of adducts formed from free radical attack on ribonucleosides and RNA. Here we examined the proliferative properties of two of these radical adducts, 8-methylguanosine (8-MeGuo) and 8-oxo-7,8-dihydroguanosine (8-OxoGuo) and compared them with those of the well studied B cell mitogen, 8-bromoguanosine (8-BrGuo). 8-MeGuo and 8-OxoGuo were synthesized in yields of 28 and 55 %, respectively, and were characterized by UV, NMR and CG-MS. Their effects upon [<sup>3</sup>H] thymidine uptake by Swiss mice splenocytes, mouse embryo 3T3 (A31) fibroblasts and mouse B16F10 melanocytes were examined. Both guanosine radical adducts were shown to increase [<sup>3</sup>H] thymidine uptake by mice splenocytes but displayed selectivity in regard to continuous cell lines. 8-MeGuo acted upon 3T3(A31) fibroblasts whereas 8-OxoGuo acted upon B16F10 melanocytes. The non physiological analogue 8-BrGuo acted upon all tested cells. Parallel experiments of cell counting, cytotoxicity, and cell sorting indicated that DNA synthesis induced by the C8-substituted guanosines reflected cell growth. It is proposed that the compounds act intracellularly because their proliferative effects were blocked in the presence of a nucleoside transport

inhibitor but were not inhibited by an antagonist of the A2 purine receptor. The obtained results, taken together with data from the literature suggest that in the case of 3T3(A31) fibroblasts and mice splenocytes the proliferative effects of the compounds are not dependent on metabolism through purine salvage pathways. In the case of melanocytes, however, the compounds are likely to become part of the purine nucleoside pool. The demonstration that adducts produced by free radical attack on ribonucleosides and RNA are able to induce cell proliferation opens new perspectives for the understanding of free radical mediated carcinogenesis.

## I - INTRODUÇÃO

### *1.1. Adutos de radicais livres com ácidos nucleicos*

A oxidação na posição C-8 de resíduos de guanina em DNA e RNA é um dos principais danos produzidos por estresse oxidativo tanto *in vitro* como *in vivo* (Park *et al.*, 1992, Jaruga & Dizdaroglu, 1996, Loechler, 1996). Danos oxidativos causados por radicais livres têm sido associados a diversas condições patológicas tais como carcinogênese (Farber, 1984, Ames *et al.*, 1993, Marnett & Burcham, 1993, Ames *et al.*, 1995, Toyokuni *et al.*, 1995). Carcinogênese é um processo de várias etapas direcionadas por eventos genotóxicos e epigenéticos resultando na ativação ou expressão alterada de protooncogenes e/ou na perda ou inativação de genes supressores de tumor (Loeb, 1989, Perchellet & Perchellet, 1989, Weinberg, 1989). Eventos genotóxicos são usualmente dependentes da formação de adutos de DNA pela interação covalente entre compostos carcinogênicos e/ou seus metabólitos com DNA. A conversão destas lesões em mutações hereditárias requer a replicação do DNA antes que o dano seja reparado. Conseqüentemente, o aumento da taxa de divisão celular pode ser considerado como sendo um fator de risco epigenético em carcinogênese.

As primeiras demonstrações de que o radical hidroxila se adiciona às bases do DNA surgiram de estudos da química de radiação (von Sonntag, 1987). A formação de 7,8-di-hidro-8-oxo-2'-desoxiguanosina (8-OxodGuo),

por ataque do radical hidroxila gerado em incubações de Fe(II)-EDTA/O<sub>2</sub>/ácido ascórbico, foi descrita em 1984 (Kasai & Nishimura, 1984). Mais recentemente, demonstrou-se que esse aduto também pode ser formado por outros oxidantes como o oxigênio singlete (Floyd, *et al.*, 1989, Devasagayam *et al.*, 1991), ação fotodinâmica direta (Kasai *et al.*, 1992) e peroxinitrito (Inoue & Kawanishi, 1995, Kennedy *et al.*, 1997). Bases de guanina oxidadas são as lesões mais abundantes encontradas em DNA de mamíferos e seus níveis aumentam conforme a intensidade de estresse oxidativo a que os animais estão submetidos (Shigenaga *et al.*, 1989, Park *et al.*, 1992). A importância desses adutos em processos carcinogênicos ficou mais evidenciada quando a existência de mecanismos para seus reparos foi demonstrada pela detecção de 7,8-di-hidro-8-oxoguanina (8-OxoGua), 8-OxodGuo e 7,8-di-hidro-8-oxoguanosina (8-OxoGuo) na urina de humanos (Shigenaga *et al.*, 1989). Paralelamente, foram descritas enzimas em *Escherichia coli* e em mamíferos que são capazes de remover 8-OxoGua de DNA (Chung *et al.*, 1991, Mo *et al.*, 1992, Bessho *et al.*, 1993, Taddei *et al.*, 1997). Foram demonstradas, também, as propriedades mutagênicas de 8-OxodGuo pelo pareamento quase que igualmente eficiente com desoxicitosina e desoxiadenosina durante a síntese de DNA (Maki & Sekiguchi, 1992, Tajiri *et al.*, 1995) levando a transversões G:C→T:A (Wood *et al.*, 1990, Moriya *et al.*, 1991, Shibutani *et al.*, 1991).

Recentemente, a presença do aduto 8-OxodGuo vem sendo demonstrada em vários tumores humanos (Akman *et al.*, 1992, Olinski *et al.*, 1992, Guyton & Kensler, 1993, Malins *et al.*, 1993, Chen *et al.*, 1996, Toyokuni *et al.*, 1997).

No caso da oxidação de RNA, o aduto resultante 8-OxoGuo, quando fosforilado, pode substituir uridina trifosfato durante a síntese de polinucleotídeos (Bruskov & Kuklins, 1988). Entretanto, seu papel no potencial mutagênico e carcinogênico de situações de estresse oxidativo foi pouco explorado.

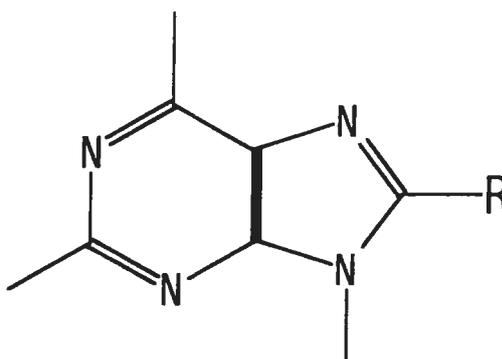
A formação de adutos de bases de DNA por ataque de radicais livres outros que não o radical hidroxila vem sendo descrita em sistemas químicos desde a década de 70 (para revisões ver, Steinmaus *et al.*, 1971, Augusto, 1993). Mais recentemente, a formação desses adutos em condições fisiológicas *in vivo* vem sendo demonstrada (Esquema 1). E dois desses adutos, 8-MedGuo e 8-aril desoxiguanosina (8-ArildGuo), mostraram-se mutagênicos *in vitro* (Kohda *et al.*, 1996, Kohda *et al.*, 1997) embora menos eficientemente que 8-OxodGuo.

Assim, fica claro que a formação de adutos de ácidos nucleicos substituídos na posição C-8 do anel purínico é uma propriedade geral dos radicais livres, embora a formação de adutos na posição C-8 por mecanismos iônicos também tenha sido demonstrada no caso de aminas aromáticas (Humphreys *et al.*, 1992). É conhecido também, que a substituição na

posição C-8 leva a que os correspondentes nucleosídeos assumam preferencialmente a conformação *syn* em torno da ligação entre a base e o açúcar (Bugg & Thewalt, 1969, Tougard *et al.*, 1973). Tal alteração conformacional pode influenciar as atividades biológicas desses nucleosídeos e nucleotídeos modificados (Cho *et al.*, 1990, Goodman, 1991, Kouchakdjian *et al.*, 1991, Oda *et al.*, 1991, Bonnet & Robins, 1993).

### *1.2. Análogos de guanosina como imunomoduladores*

Há vários nucleosídeos acíclicos derivados de guanina que são utilizados clinicamente. Dentre eles os mais conhecidos são o aciclovir (9-(2-hidroxi-etoximetil)guanina) (Schaeffer *et al.*, 1978), droga utilizada no tratamento de infecção por vírus do *herpes simplex* (HSV), e ganciclovir (9[(1,3-dihidroxi-2-propoxi)metil] guanina) que tem demonstrado eficácia contra infecções por citomegalovírus (CMV) (Martin *et al.*, 1983). A atividade biológica do aciclovir, por exemplo, depende da sua conversão a trifosfato catalisada pelas enzimas do hospedeiro. E é sob esta forma que a droga inibe a DNA polimerase do HSV prevenindo a replicação do vírus (Derse *et al.*, 1981).



Alvo	R <sup>•</sup>	Sistema	Referências
DNA	<sup>•</sup> CH <sub>3</sub>	MH/HRP/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> SDMH/ratos t-BuOOH/Fe <sup>2+</sup> t-BuOOH/ratos	(Augusto <i>et al.</i> , 1990) (Netto <i>et al.</i> , 1992) (Hix <i>et al.</i> , 1995) (Hix & Augusto, em preparação)
DNA	PAH <sup>•+</sup>	PAH/HRP/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> PAH/microsomas	(Cavaliere & Rogan, 1995)
DNA	<sup>•</sup> Ar	íons de aril diazonium/DNA de timo bovino íons de aril diazonium/ queratinócitos de murinos	(Gannett <i>et al.</i> , 1996)
RNA	<sup>•</sup> CH <sub>3</sub>	Fe <sup>2+</sup> /H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /DMSO	(Kang <i>et al.</i> , 1993)
Guo/Ado	<sup>•</sup> Ar	Diazoquinonas	(Kikugawa, 1992)
Ade	<sup>•</sup> Ar	3,4-estrona-o-O/e <sup>-</sup>	(Abul-Hajj <i>et al.</i> , 1995)

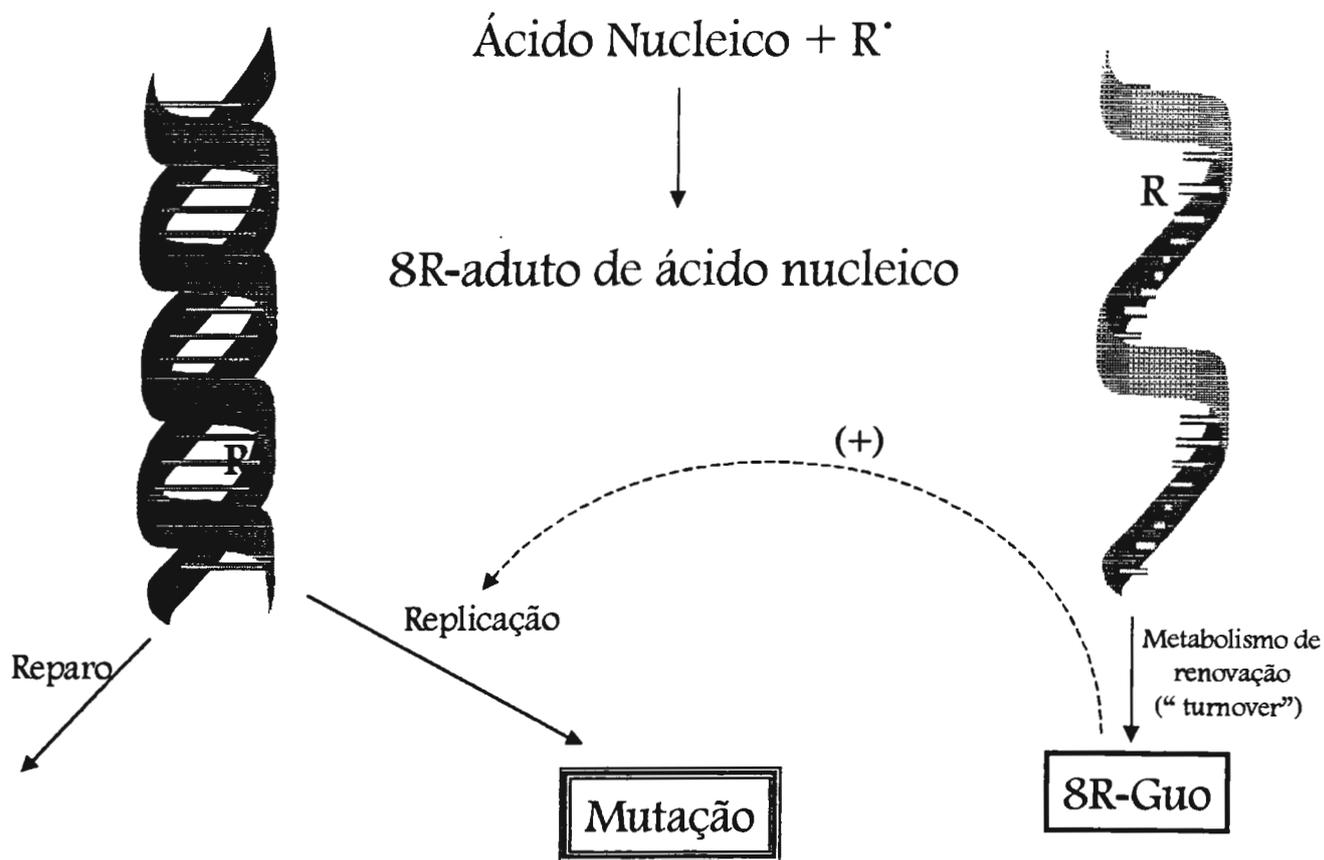
Esquema 1: Sumário de estudos recentes sobre a alquilação de ácidos nucleicos por mecanismos radiculares.

Análogos de guanosina com propriedades imunomoduladoras também foram descritos na literatura. Por exemplo, no curso de seus estudos sobre guanosina monofosfato cíclico (GMPc) como segundo mensageiro na ativação dos linfócitos B, Goodman verificou que análogos de guanosina substituídos na posição C-8 das bases purínicas possuem propriedades imunoestimulantes (Goodman & Weigle, 1981, Goodman, 1991). Desses estudos, concluiu-se que o fator determinante da atividade imunológica dos compostos estaria principalmente na eletronegatividade do átomo substituinte. Dentre essas atividades, está a proliferação e/ou diferenciação de linfócitos B. Em linfócitos B de camundongo, análogos como 8-bromoguanosina (8-BrGuo), 8-mercaptoguanosina (8-SHGuo) e 8-OxoGuo, estimulam a proliferação e diferenciação das células (Goodman & Weigle, 1982, 1983a, 1983b, 1983c, 1984a, 1984b, Ahmad & Mond, 1985, Goodman, 1991). Já a 8-metoxiguanosina estimula a diferenciação sem proliferação (Ahmad & Mond, 1985). Originalmente, foi verificado que esses compostos atuavam seletivamente em linfócitos B previamente ativados (Scheuer *et al.*, 1985, Wicker *et al.*, 1987). Também foi verificado que análogos, tais como 8-SHGuo, induzem a diferenciação de células T sem estimular a proliferação (Feldbush & Ballas, 1985) e que 8-BrGuo ativa células NK e macrófagos (Koo *et al.*, 1988). Em 1986 foi descrita pela primeira vez a atividade imunobiológica de 7-metil-8-oxoguanosina (7-Me-

8-OxoGuo), um composto com atividade mais eficiente que seu análogos monossubstituídos (Goodman & Hennen, 1986). Estudos de relações entre estrutura e atividade levaram ao desenvolvimento do análogo 7-alil-8-oxoguanosina (loxoribina) que foi patenteado (Chen *et al.*, 1994). Este composto vem sendo sugerido como útil na terapia contra tumores pois inibe a metástase de células de melanoma em camundongos (Pope *et al.*, 1994).

## II - OBJETIVOS

Ribonucleosídeos de guanina substituídos na posição C-8 são capazes de promover a proliferação celular de linfócitos B (Goodman, 1991), e são análogos de adutos formados pela adição de radicais livres ao RNA. Nesse contexto, consideramos que radicais livres possam participar em processos carcinogênicos não só pela formação de lesões primárias (adutos de DNA) mas, também, por contribuírem para tornar essa lesão mutagênica através de um aumento de proliferação celular (esquema 2). Para examinar essa hipótese nos propusemos a: (i) sintetizar 8-MeGuo e 8-OxoGuo, adutos que são produzidos pelo ataque de guanosina e RNA por radicais metila e hidroxila, respectivamente; (ii) estudar as propriedades proliferativas desses compostos em uma cultura primária (células de baço de camundongo), em uma linhagem estabelecida (fibroblasto 3T3(A31)) e em uma linhagem tumoral (melanoma B16F10), comparando-as com as de 8-BrGuo, o ribonucleosídeo mais bem estudado em linfócitos (Goodman, 1991, Bonnet & Robins, 1993).



*Esquema 2: Possível atuação de adutos de guanossina na proliferação celular.*

### III - MATERIAIS E MÉTODOS

#### *III.1. Síntese dos ribonucleosídeos*

*Materiais.* Guanosina, 8-bromoguanosina, formiato de amônio e hidroperóxido de *tercio*-butila, foram obtidos da Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo. USA. Trietilamina, sílica gel 60 GF<sub>254</sub> em folhas de alumínio, DMSO-*d*<sub>6</sub>, CDCl<sub>3</sub>, foram obtidos da Merck, Darmstadt. Sílica gel 200-400 mesh, 60Å para coluna de cromatografia, foi obtido da Aldrich Chemical Company, Milwaukee, USA. Amostra padrão de 8-OxoGuo foi gentilmente fornecida pelo Prof. Dr. H. Kasai do National Cancer Center Research Institute, Tokio, Japão. Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico, cromatográfico ou purificados como descrito abaixo. A água utilizada em todos os experimentos foi tratada com o sistema NANOpure (Barnstead).

*HPLC.* Dois tipos de equipamento foram utilizados. Um cromatógrafo Waters, constituído por uma bomba Waters modelo 625LC e injetor Rheodine modelo 9125-080, detector Waters de fotodiodos em série (PDA, modelo 991), acoplados a um sistema de aquisição de espectros NEC Power Mate Sx Plus. Também foi utilizado um cromatógrafo Waters, constituído por uma bomba Waters modelo 501 e injetor Rheodine modelo 7010 com

um detector de absorvância óptica pontual modelo 486 acoplados a um registrador modelo 746. Foram utilizadas as seguintes colunas: (i) analíticas  $\mu$ Bondapak C18 (3,9 mm de diâmetro x 300 mm de comprimento) da Waters ou de troca iônica (4,6 mm de diâmetro x 250 mm de comprimento) Partisil SCX 10 $\mu$  da Phenomenex; (ii) semi-preparativa  $\mu$ Bondapak C18 (7,8 mm de diâmetro x 300 mm de comprimento).

*Espectroscopia.* Os espectros de  $^1\text{H}$ - e  $^{13}\text{C}$ -RMN foram obtidos num espectrômetro Bruker AC-200 de 200 MHz. Os espectros de massa foram obtidos em espectrômetros da Finnigan - MAT ITD 800 de baixa resolução, empregando-se a técnica de ionização por impacto de elétrons a 70 eV. As amostras silanizadas pelo método descrito por Dizdaroglu (Dizdaroglu, 1984) foram injetadas em cromatógrafo a gás Varian modelo 3400. Estes aparelhos são da Central Analítica do Instituto de Química da USP.

*Purificação de reagentes.* Os reagentes utilizados para a síntese do 7,8-dihidro-2-*N*,2'-*O*,3'-*O*,5'-*O*-tetraacetil-8-oxoguanosina, a forma acetilada da 8-OxoGuo, foram purificados como descritos por Ferrin e Armarego (Ferrin & Armarego, 1988). Ácido acético glacial foi purificado pela adição de óxido de cromo (2 g%) e um pouco de anidrido acético (para reagir com a água); a mistura foi aquecida a 100°C por 1h. e depois submetida a uma destilação

fracionada. Piridina, trietilamina e 1,4-dioxano, foram purificados por destilação fracionada, em presença de pastilhas de hidróxido de potássio. Os dois primeiros foram armazenados com peneira molecular de 4Å e o dioxano com fio de sódio metálico. Tampão de bicarbonato de trietilamônio (TEAB) 2M foi preparado adicionando gelo seco a uma solução 2 M de trietilamina até atingir o pH em torno de 8. O tampão é diluído v/v e o pH novamente acertado entre 7,0-7,5, pela adição de gelo seco.

### *III.2. Estudos de proliferação celular*

*Materials.* Insulina, FGF, meio de cultura para células (DMEM e RPMI 1640), formiato de amônio, POPOP, PPO e solução estéril de aminoácidos não essenciais (100 vezes concentrado), guanina, 8-bromoguanina (8-BrGua), 7-metilguanosina (7-MeGuo), adenosina, bromodesoxiuridina (BrdUrd), anticorpo anti-BrdUrd e anticorpo de camundongo IgG de fluoresceína isotiocianato conjugado (FITC) foram obtidos da Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo. USA. 7,8-di-hidro-8-oxoguanina foi obtido da Aldrich Chemical Company, Milwaukee, USA. Soro fetal bovino (SFB) foi obtido da Cultilab, Campinas, São Paulo. Tripsina foi obtida da ICN Pharmaceuticals Inc., Cleveland, USA. <sup>3</sup>H-timidina (87 mCi/mmol) foi obtida da New England Nuclear, Boston, USA. Ovalbumina foi purificada e gentilmente cedida pelo Dr. Angelo G. Gambarini. Os demais reagentes

utilizados foram de grau analítico ou cromatográfico. A água utilizada em todos os experimentos foi tratada com o sistema NANOpure (Barnstead).

*Soluções estoque dos ribonucleosídeos.* Os ribonucleosídeos foram previamente dissolvidos em NaOH 0,5M e diluídos com PBS até a concentração final de 12,5 mM de cada composto contendo NaOH 12,5mM. Todos os controles dos ensaios de proliferação celular foram feitos com a adição de quantidades de NaOH equivalentes àquelas contidas nas soluções dos ribonucleosídeos.

*Animais.* Camundongos alogênicos Suíço machos com idades variando entre 8 e 12 semanas foram adquiridos do biotério do Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

*Cultura de células de baço.* Camundongos foram sacrificados por deslocamento cervical e os seus baços removidos. As células de baço foram dissociadas por esfregação do tecido entre duas lâminas de vidro esmerilhado em meio de cultura sem soro e suplementado com L-glutamina 2 mM, piruvato de sódio 1 mM e 1 ml de uma solução de aminoácidos não essenciais para cada 100 ml de meio de cultura (Goodman *et al.*, 1978). Após centrifugação, as células foram tratadas com água bidestilada para lisar os eritrócitos e foram lavadas duas vezes com meio de cultura.

*Cultura de células de fibroblasto.* Células de fibroblasto de embrião de camundongo Balb/c, Balb/c3T3 clone A31 (Todaro & Green, 1963) foram gentilmente cedidas pela Dra. Mari S. Armelin do Instituto de Química da Universidade de São Paulo. O cultivo das células 3T3(A31) foi feito rotineiramente a 37°C, em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de ar atmosférico. Para evitar transformação espontânea ao longo do período de cultivo, células com mais de quatro semanas em cultura foram descartadas. Como os análogos de guanosina testados são dissolvidos em solução alcalina e como aumento de pH no meio de cultura estimula a proliferação celular (Eagle, 1974), HEPES em uma concentração final de 7,5 mM foi suplementado durante o período de incubação das células com os ribonucleosídeos.

*Cultura de células de melanoma.* Células de melanoma de camundongo C57Bl/6J, B16F10 (Fidler, 1975) foram gentilmente cedidas por Silvio Zanata do Instituto Ludwig, São Paulo. O cultivo das células B16F10 foi feito rotineiramente a 37°C, em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de ar atmosférico.

*Ensaio mitogênico de células de baço.* Linfócitos com viabilidade maior ou igual a 95% foram cultivados em uma placa de 96 poços em uma densidade inicial de  $4 \times 10^5$  células em 0,1 ml por poço segundo procedimento descrito na literatura (Goodman, 1988). Em seguida, foram feitas adições dos compostos em um volume final de 0,2 ml por poço. Após 24 horas de cultivo

as células foram marcadas com timidina tritiada (1,0  $\mu\text{Ci}/\text{poço}$ ) e, ao final de 48 horas, coletadas em papéis de filtro por um aparelho “Nunc Cell Harvesting”. Os filtros secos foram mergulhados em um líquido de cintilação (4g de PPO e 0,1g de POPOP em 1 litro de tolueno) e a incorporação de timidina tritiada pelas células foi medida em um analisador de cintilação líquida modelo 1600 TR (Packard TRI-CARB).

*Ensaio mitogênico de células de fibroblasto (Armelin, 1973).* Atingindo o estágio de aproximadamente 90% de confluência, as células aderidas ao frasco de cultura foram removidas por uma breve exposição a uma solução de tripsina 0,1% em solução salina tamponada, pH 7,2, contendo NaCl (140 mM), KCl (2,7 mM),  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (8 mM),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (1,5 mM) e EDTA (1mM), na proporção de 0,5 ml da solução para cada garrafa de 25  $\text{cm}^2$ . Foram utilizadas placas de 24 poços com uma densidade inicial de  $10^4$  células por poço em 1 ml de meio DMEM contendo 10% de SFB. Após atingirem a subconfluência, foi feito o carenciamento (ou sincronização) das células plaqueadas substituindo o meio de cultura com 10% de SFB, por DMEM com 0,5% de SFB. Após 48 horas as células foram lavadas com salina estéril e as adições dos compostos foram feitas em DMEM contendo HEPES 7,5 mM em um volume final de 0,5 ml por poço. Após um período de 8 horas, timidina tritiada (0,5  $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ ), suplementada com timidina não radioativa ( $10^{-7}$  M), foi adicionada às células. Ao final de um período total de

20 horas de incubação, o meio de cultura foi desprezado e as células aderidas foram fixadas com uma solução gelada de ácido tricloroacético (TCA) a 10%, por um período de incubação de 5 a 10 minutos (procedimento repetido por duas vezes). Após a retirada do excesso de TCA, as células foram lisadas pela adição de uma alíquota de 150 µl por poço de uma solução de hidróxido de sódio 0,5 N a 37°C durante 1 hora. As células lisadas foram coletadas em um filtro de papel (1,5 x 1,0 cm), e em seguida os filtros foram lavados com uma solução gelada de TCA a 10%. Após a retirada do excesso de TCA os filtros foram lavados com etanol ou acetona. Os filtros secos foram mergulhados em um líquido de cintilação (4g de PPO e 0,1g de POPOP em 1 litro de tolueno) e a incorporação de timidina tritiada pelas células foi determinada por um analisador de cintilação líquida modelo 1600 TR (Packard TRI-CARB).

*Ensaio mitogênico de células de melanoma.* Atingindo o estágio de confluência, as células B16F10 aderidas ao frasco de cultura foram removidas por uma breve exposição a uma solução de EDTA a 0,2%. Foram utilizadas placas de 24 poços com uma densidade inicial de  $10^4$  células por poço em 1 ml de meio RPMI contendo 10% de SFB. Após atingirem a subconfluência, as células foram carenciadas por 24 horas em meio RPMI sem soro. Os procedimentos subsequentes são os mesmos descritos para as células A31, com exceção de HEPES que não é adicionado.

*Ensaio mitogênico por imunofluorescência com bromodesoxiuridina.* O ensaio de imunofluorescência foi realizado como descrito (Gratzner, 1982; Meyer *et al.*, 1989) com algumas modificações (Lofti *et al.*, 1997). Células A31 foram cultivadas em lamínulas em uma densidade inicial de  $10^3$  células por lamínula. Lamínulas com as células aderidas foram cultivadas por 48 horas em DMEM com 10% de SFB em placas de seis poços com no máximo três lamínulas por poço. Após carenciamento de 24 horas, as células subconfluentes foram tratadas por mais 24 horas em quatro diferentes condições: 8-MeGuo 500  $\mu\text{M}$ , 8-OxoGuo 500  $\mu\text{M}$ , DMEM sem SFB e DMEM com 10% de SFB. BrdUrd (100  $\mu\text{mol/litro}$ ) foi adicionado 12 horas antes do final do tratamento. Após o período de tratamento, as células foram fixadas com metanol frio ( $4^\circ\text{C}$ ) por 10 minutos e lavadas três vezes com salina tamponada (PBS). Células fixadas foram incubadas com agitação por 30 minutos em HCl 1,5 M em temperatura ambiente para desnaturar DNA. Após as etapas de lavagens com PBS para a remoção do excesso de HCl, cada lamínula foi invertida com a face contendo as células aderidas sobre 40  $\mu\text{l}$  de anticorpo monoclonal de camundongo anti BrdUrd (1:50 em PBS) e incubada por 30 minutos em temperatura ambiente. O excesso de BrdUrd foi removido após três etapas de lavagens com PBS com agitação de 5 minutos em cada etapa e as células foram coradas com conjugado anti-camundongo IgG FITC (1:50 em PBS). Núcleos marcados foram observados

em microscópio Nikon Fluorophot. Células em cinco campos diferentes contendo cerca de 100 células por campo foram contadas em cada lamínula.

*Eficiência de Plaqueamento (Wilson, 1986).* Células A31 previamente tratadas por 24 horas com cada composto foram plaqueadas em placas de 35 mm de diâmetro em uma densidade inicial de 200 células por placa e cultivadas normalmente em DMEM com 10% de SFB. A troca de meio foi realizada a cada quatro dias. Após dez dias, as células aderidas às placas foram lavadas com PBS, fixadas com metanol e coradas com uma solução de cristal violeta 1%. O excesso do corante foi removido com água corrente, água destilada e as placas foram deixadas em temperatura ambiente para secar. Colônias com aproximadamente 64 células foram contadas e expressas em porcentagem: (colônias formadas/Nº inicial de células plaqueadas) x 100.

*Contagem de Células.* Células de fibroblasto com aproximadamente 90% de confluência cultivadas em placas de Petri de 35 mm de diâmetro foram carenciadas para soro por 24 horas. Células quiescentes foram cultivadas por 24 horas com cada composto em uma concentração fixa de 0,5 mM em meio sem soro. Após o tratamento, as células foram removidas e ressuspensas em um volume final de 1 ml de PBS contendo 3,75% de formalina. Número de células foi determinado por um contador de células CELM modelo C530.

*Análise do ciclo celular por citometria de fluxo (FACScan).* A análise da distribuição da população de células ao longo do ciclo celular foi feita por citofluometria de fluxo (FACScan). Células B16F10 previamente cultivadas com meio de cultura sem SFB foram tratadas por 24 horas em triplicata para cada composto em garrafas de 25 cm<sup>2</sup>. Após este período, as células foram removidas das garrafas, separadas por centrifugação e incubadas por 15 minutos em temperatura ambiente com uma solução de iodeto de propídio (50 µg/ml em tampão citrato 4 mM contendo 0,3% de Triton X 100) na proporção de 500 µl para 1 x 10<sup>6</sup> células (Shapiro, 1995). Em seguida as células foram incubadas com 500 µl de uma solução de RNase (100 µg/ml em tampão citrato 40 mM) por 15 minutos a temperatura ambiente (Shapiro, 1995). O DNA contido em um volume final de 1 ml foi submetido a leitura no aparelho FACScan Flow Cytometer da Becton – Dickinson Immunocytometry Systems.

*Análise Estatística.* Os resultados foram expressos como média ± erro padrão (EP). O teste *t* de Student foi utilizado para análise do grau de significância da diferença:  $p < 0,05$  foi considerado significativo.

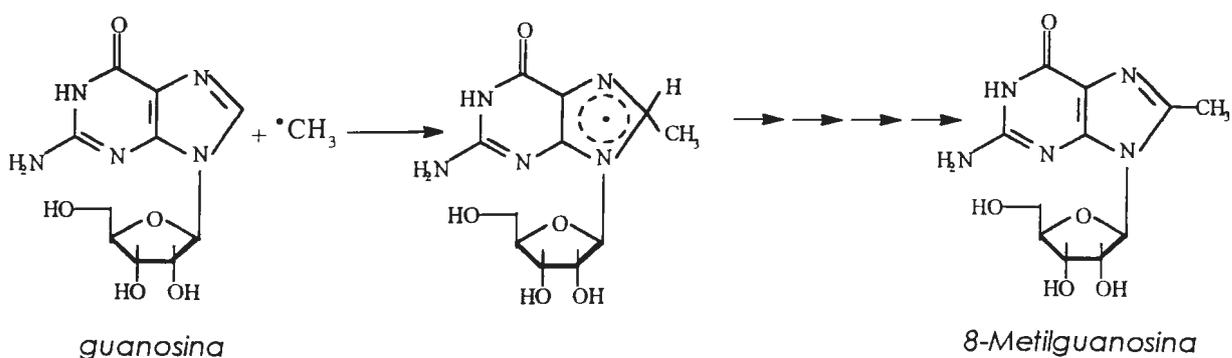
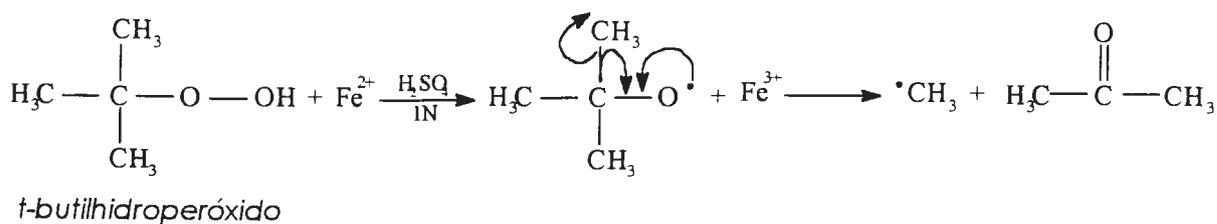
## IV – RESULTADOS

### *IV.1. Síntese dos ribonucleosídeos*

#### *IV.1.1. Síntese de 8-MeGuo*

A síntese de 8-MeGuo (Fig.1) foi realizada segundo Maeda *et al.* (Maeda *et al.*, 1974) com algumas modificações. A uma solução contendo 200 mg de guanosina e 800 mg de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  dissolvidos em 40 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1 N e mantida em agitação constante e em um fluxo de nitrogênio, foi adicionada uma solução de hidroperóxido de tercio - butila (200mg em 10ml) gota a gota. Em seguida, o excesso de íons  $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$  foi precipitado pela adição de  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  até  $\text{pH} > 7,0$ . O sobrenadante foi reservado e o sedimento lavado com água quente. O eluato foi adicionado ao sobrenadante reservado e essa mistura foi tratada com chelex para a retirada de íons  $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$  remanescentes, evaporada sob pressão reduzida e ressuspensa em água. A seguir a mistura final de reação foi analisada por HPLC revelando um rendimento de aproximadamente 50% de 8-MeGuo.

O composto foi purificado por HPLC com coluna semipreparativa. Utilizando-se da coluna semi-preparativa  $\mu\text{Bondapak C18}$  fase móvel metanol 10%, o composto elui a 7,4 minutos. Essas frações foram coletadas de várias injeções, misturadas e concentradas em um rotavapor. O produto assim obtido (60 mg, rendimento de 28%) mostrou-se 99% puro por HPLC.



*Fig. 1: Representação esquemática da síntese de 8-MeGuo.*

A caracterização do produto como 8-MeGuo foi obtida por espectroscopia de UV (pH 1,0)  $\lambda_{\text{max}}$  nm (log  $\epsilon$ ) 257 (11700) (Maeda *et al.*, 1974) e de massa (Fig. 2). O espectro de massa do composto sililado correspondeu ao padrão de fragmentação esperado para o derivado tetrametilsililado, com picos a:  $m/z$  585 ( $M^+$ ),  $m/z$  570 ( $M^+ - \text{CH}_3$ ),  $m/z$  309 (base dimetilsililada, +  $\text{H}^+$ ) e  $m/z$  294 (base dimetil sililada, +  $\text{H}^+ - \text{CH}_3$ ) (Fig. 2). O espectro de  $^1\text{H}$ -RMN em  $\text{DMSO-}d_6$  foi coincidente com aqueles descritos na literatura (Công-Danh *et al.*, 1979, Cho *et al.*, 1990, Morais, 1995).

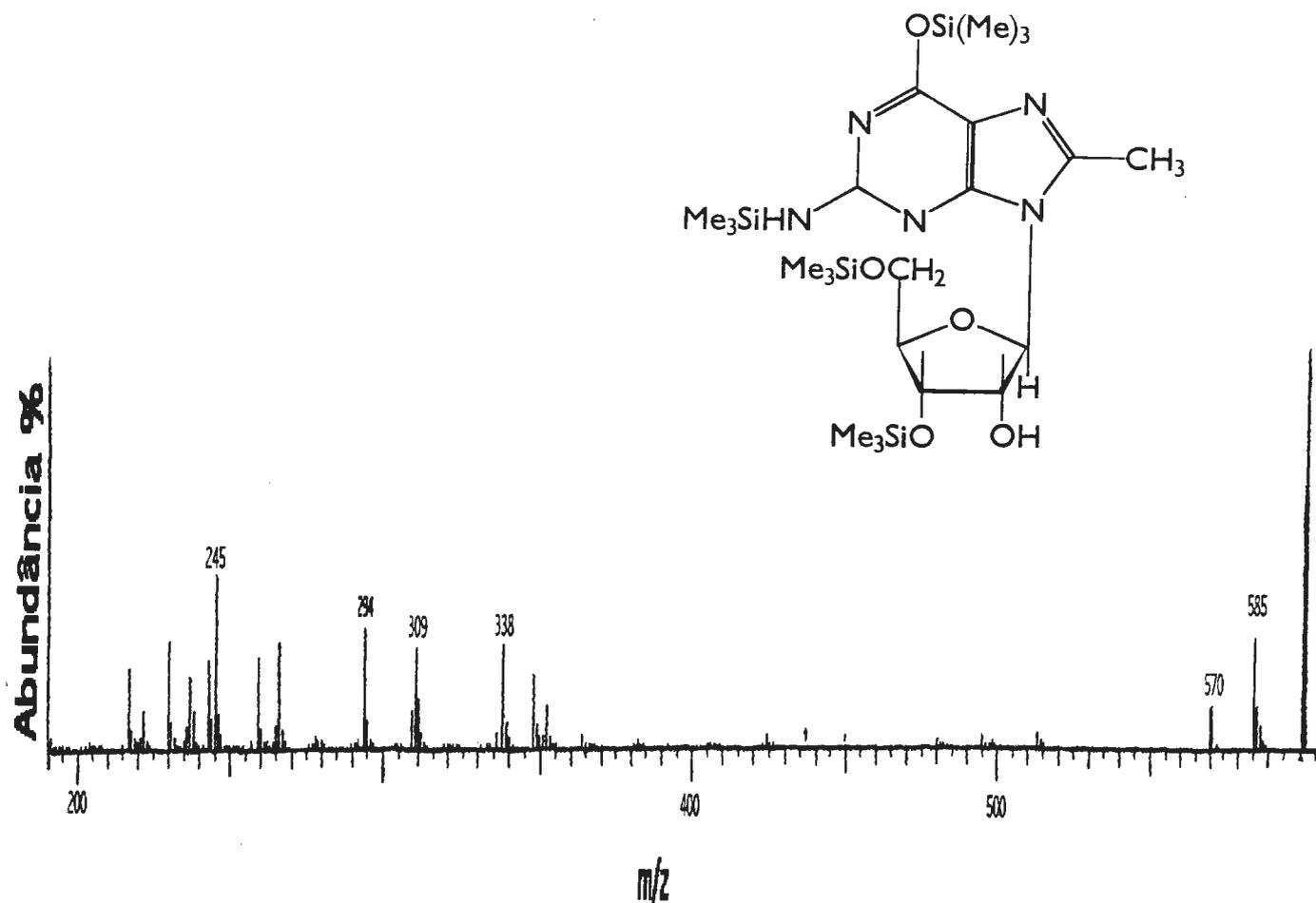


Fig.2: Espectro de massa do derivado tetrametilsililado de 8-MeGuo. A amostra foi injetada em um cromatógrafo a gás, conforme descrito em *Materiais e Métodos*.

#### IV.1.2. Síntese de 8-OxoGuo

Para a síntese de 8-OxoGuo tentou-se inicialmente o método descrito por Kasai & Nishimura (Kasai & Nishimura, 1984) que utilizaram  $\text{Fe}^{2+}/\text{O}_2/\text{ácido ascórbico}$  para oxidar a guanosina. Os baixos rendimentos obtidos de 8-OxoGuo (~1%) nos levaram a tentar o procedimento descrito por Ikehara *et al.* (Ikehara *et al.*, 1965) baseado na hidrólise de 8-BrGuo em ácido acético glacial/acetato de sódio por aquecimento a 90°C em refluxo por 16 horas. Com este procedimento foi possível obter o produto (<10%) mas seu isolamento por HPLC foi extremamente demorado por excessiva retenção nas colunas tentadas. Procuramos então, adaptar o procedimento recentemente descrito para a síntese de oligos contendo resíduos modificados de 7,8-di-hidro-8-oxo-2'-desoxiguanosina (Roelen *et al.*, 1991). Primeiramente foi sintetizada a 7-di-hidro-2-*N*,2'-*O*,3'-*O*,5'-*O*-tetraacetil-8-oxoguanosina (Fig. 3). Para isso, 8-BrGuo (1,81g, 6,0 mmol) foi previamente tratada com piridina e o solvente evaporado. Em seguida foram adicionados ao composto, piridina (37,5 ml), anidrido acético (12,5 ml) e acetato de sódio anidro (4,1g, 200 mmol). Esta mistura ficou em refluxo por 2 horas. Subseqüentemente, acetato de sódio anidro (1,64g, 80,0 mmol) e ácido acético (37,5 ml) foram adicionados à mistura acima e esta nova mistura foi submetida a um novo refluxo de 2 horas. A reação foi interrompida com etanol (25 ml) e a mistura concentrada sob pressão

reduzida (esta operação foi repetida várias vezes para remover o excesso de ácido acético). O resíduo foi dissolvido em acetato de etila (37,5 ml) e, a esta solução, foram adicionados TEAB 1 M (12,5 ml) e solução saturada de cloreto de sódio (12,5 ml). À camada orgânica foi adicionado um pouco de sulfato de magnésio e em seguida ela foi filtrada e concentrada. Éter de petróleo (37,5 ml, fração 40-60°C) foi adicionado ao volume concentrado e evaporado. O precipitado foi dissolvido em diclorometano (3,0 ml) e purificado por gradiente de metanol em diclorometano de 0 a 8% em coluna de cromatografia de sílica gel (1,8 mm de diâmetro x 300 mm de comprimento). As frações de coloração amarelada foram coletadas, evaporadas, analisadas. O rendimento do composto acetilado foi de 60% (1,42 g); o  $R_f$  de 0,84 em TLC foi obtido utilizando como solvente, diclorometano/metanol, 92/8, v/v. O espectro de UV (pH 3,0),  $\lambda_{\max} = 265$  e 298 nm.  $^1\text{H-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  10,41 (NH), 9,63 (NH), 6,05 (H1'), 5,90 (H2'), 5,63 (H3'), 4,59 (H4'), 4,32 (H5'- H5''), 2,27 ( $\text{CH}_3 - \text{NHAc}$ ), 2,19, 2,09, 2,02 (3x  $\text{CH}_3 - \text{OAc}$ ) e  $^{13}\text{C RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  172,33, 171,68, 169,93, 169,76 (4x  $\text{C}=\text{O}$ , Ac), 151,87 (C-6), 150,0 (C-2), 146,78 (C-4), 144,35 (C-8), 104,81 (C-5), 83,92 (C-1'), 78,96 (C-4'), 71,78 (C-3'), 71,0 (C-2'), 63,46 (C-5'), 24,07 ( $\text{CH}_3$ , NHAc), 20,85, 20,54, 20,41, (3x  $\text{CH}_3$ , OAc), estão de acordo com o descrito na literatura (Roelen *et al.* 1991).

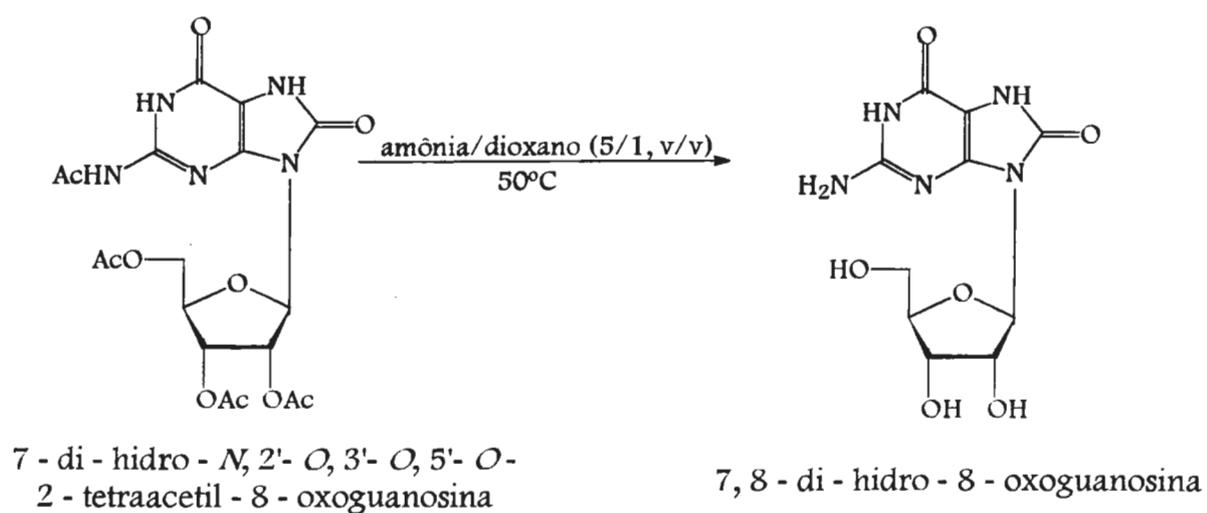
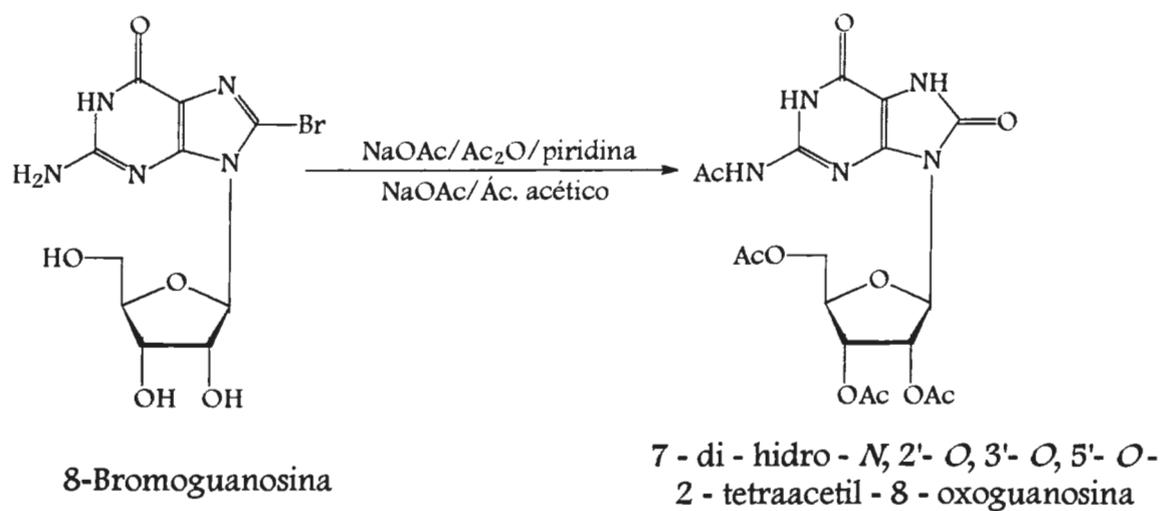


Fig.3: Representação esquemática da síntese da 8-OxoGuo.

A deacetilação de 7-di-hidro-2-*N*,2'-*O*,3'-*O*,5'-*O*-tetraacetil-8-oxoguanosina (Fig. 3) foi realizada em uma mistura de reação contendo amônia/dioxano (5/1, v/v) a 50°C e acompanhada por HPLC e U.V. Após 5 horas, o sedimento foi recristalizado de metanol (Geiger *et al.*, 1993) e o sólido recuperado foi tratado com metanol/diclorometano (8/92, v/v) para a remoção do composto acetilado remanescente. O sedimento branco analisado por HPLC apresentou um rendimento de 55% (0,79 g), um grau de pureza de 99% e co-eluiu com o padrão de 8-OxoGuo. O espectro de <sup>1</sup>H RMN (DMSO-*d*6): δ 6.44 (NH<sub>2</sub>), 5.56 (H1'), 4.83 (H2'), 4.07 (H3'), 3.77 (H4'), 3.57 (H5''), 3.43 (H5') está de acordo com o descrito na literatura (Cho *et al.*, 1990). O espectro de <sup>13</sup>C RMN (DMSO-*d*6): δ 62,64 (C5'), 70,23 (C3'), 71,15 (C2'), 85,29 (C4'), 85,84 (C1'), 98,94 (C5), 147,76 (C4), 152,13 (C8), 152,91 (C6), 154,30 (C2) confirma a estrutura do produto sintetizado (Fig. 4). As atribuições foram realizadas por simulação com o programa de simulação de espectros da Bruker e portanto devem ser consideradas tentativas.

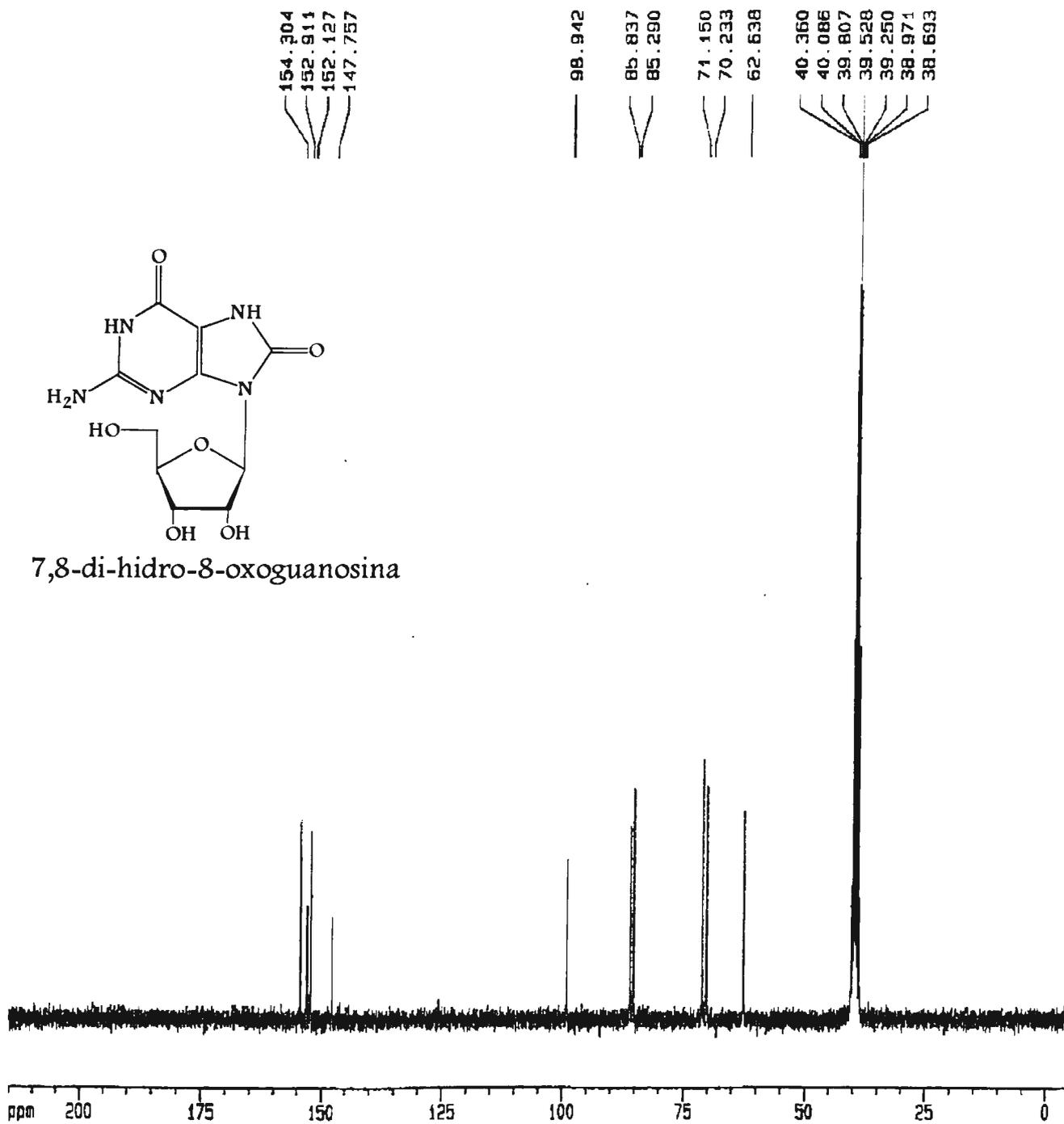


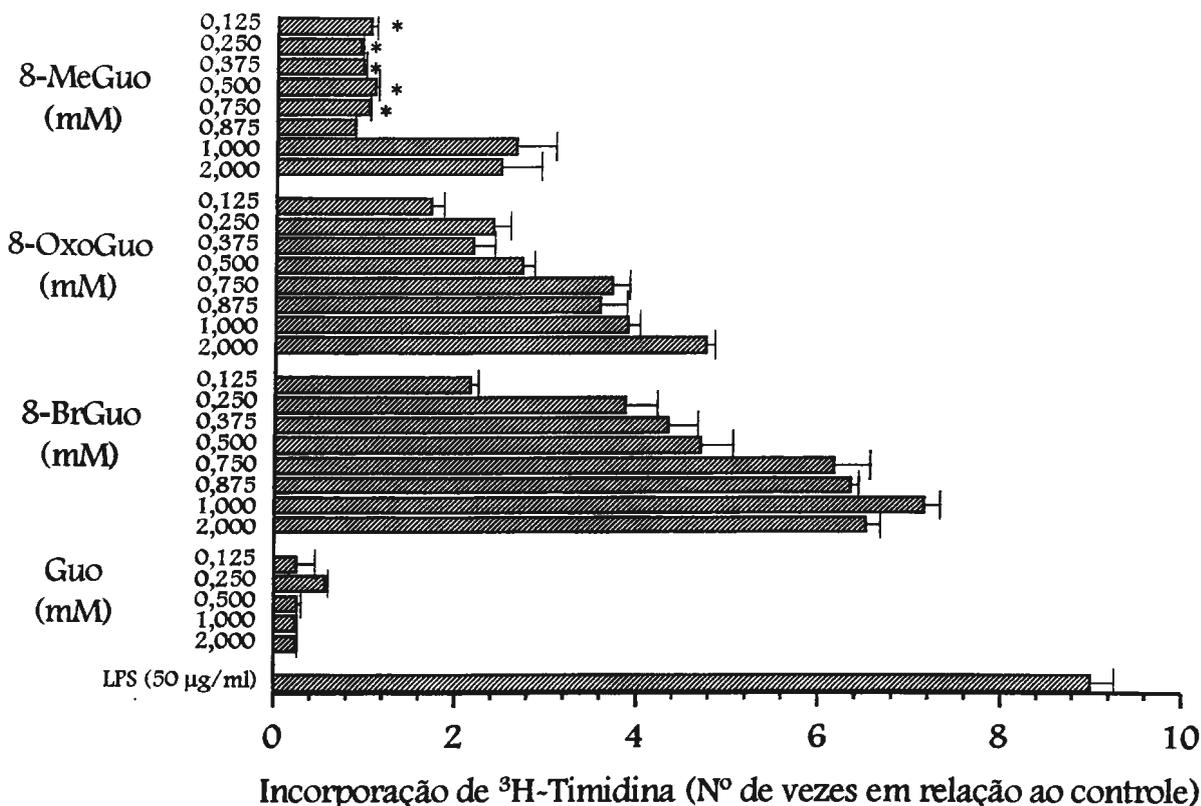
Fig. 4: Espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN em  $\text{DMSO-}d_6$  de 8-OxoGuo.

#### *IV.2. Estudos de proliferação celular*

Para explorar os possíveis papéis de adutos de RNA formados por ataques de radicais livres na proliferação celular, estudamos inicialmente os efeitos mitogênicos de 8-MeGuo, 8-OxoGuo e 8-BrGuo em células de baço de camundongo.

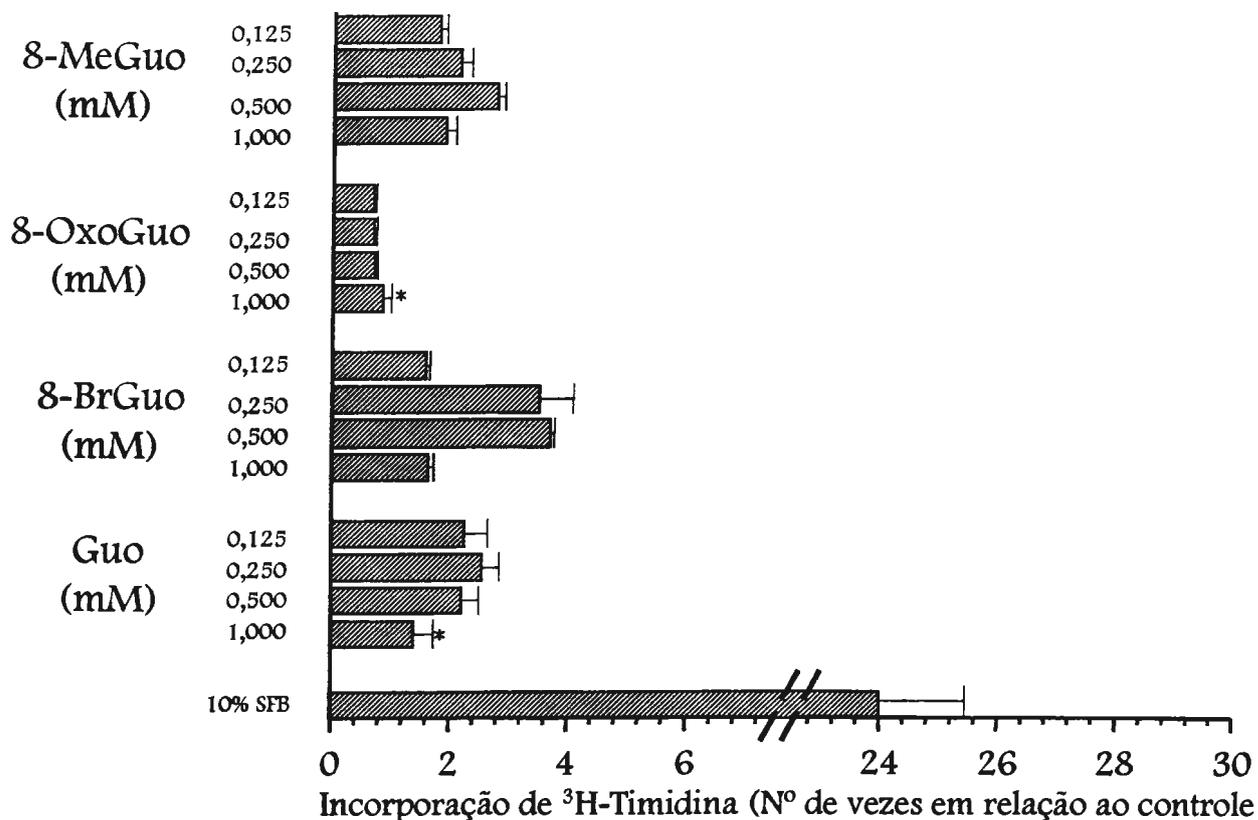
O composto 8-BrGuo foi utilizado em nossos estudos para efeitos de comparação porque foi o análogo de guanosina mais estudado como imunomodulador de linfócitos de camundongos (Goodman & Weigle, 1981, 1982, 1983b, 1983c, 1984a, Scheuer *et al.*, 1985, Wicker *et al.*, 1987, Koo *et al.*, 1988). Também já foi demonstrado ser a 8-OxoGuo mitogênica para linfócitos B (Ahmad & Mond, 1985, Goodman & Hennen, 1986). Demonstramos aqui que 8-MeGuo também estimula a incorporação de <sup>3</sup>H-timidina por células de baço de camundongo em cultura embora seja menos efetiva que os compostos 8-BrGuo e 8-OxoGuo (Fig. 5). O efeito mitogênico depende das concentrações dos ribonucleosídeos (Fig. 5) e a dose efetiva foi da mesma magnitude das doses anteriormente descritas para culturas de células de baço de camundongo CBA/CaJ (Goodman & Weigle, 1981, 1983b, 1983c, 1984a, Goodman & Hennen, 1986, Goodman, 1988).

Na concentração de 1 mM, 8-BrGuo foi quase tão efetiva quanto lipopolisacarídeo (LPS), um mitógeno característico de linfócito B, enquanto que o seu composto parental, a guanosina, tem um pequeno efeito inibitório sobre a proliferação de células de baço (Fig. 5). Foi sugerido que as propriedades proliferativas dos ribonucleosídeos modificados eram específicas para linfócitos B e dependentes da eletronegatividade do substituinte na posição C-8 (Goodman, 1991). Entretanto, a demonstração de que 8-MeGuo é capaz de estimular a incorporação de <sup>3</sup>H-timidina por células de baço de camundongo (Fig. 5) sugere que esses efeitos proliferativos podem não possuir especificidade. De fato, os ribonucleosídeos substituídos na posição C-8 mostraram efeitos diversos sobre a incorporação de <sup>3</sup>H-timidina por diferentes tipos de linhagens celulares.



*Fig.5: Efeito de ribonucleosídeos sobre a incorporação de  $^3\text{H}$ -timidina por células de baço de camundongo Suíço. Células viáveis foram cultivadas em meio de cultura com 10% de SFB por 48 horas, como descrito em Materiais e Métodos, em presença de concentrações crescentes de 8-MeGuo, 8-OxoGuo, 8-BrGuo e Guo. Após 24 horas de marcação por timidina tritiada, as células foram coletadas e a incorporação monitorada. Resultados de incorporação estão expressos em número de vezes em relação ao controle (de valor igual a 1,0) e representam a média aritmética de nove determinações de três ensaios independentes  $\pm$  EP. Todos os valores, exceto os assinalados com asterisco (\*), foram significativamente diferentes do controle ( $p < 0,05$ ).*

No caso de fibroblasto de camundongo Balb/c 3T3 A31, os efeitos dos ribonucleosídeos sobre células tratadas por 24 hrs em meio de cultura livre de SFB dependeram da natureza química do composto. No ensaio de incorporação de  $^3\text{H}$ -timidina, 8-MeGuo, 8-BrGuo e Guo estimularam a síntese de DNA de maneira dose-dependente até a concentração de 0,5 mM para cada composto enquanto que 8-OxoGuo foi um pouco inibitório (Fig. 6). A indução de síntese de DNA em células tratadas por 24 hrs com 0,5 mM de 8-MeGuo foi confirmada por experimentos de marcação nuclear de células A31 por imunofluorescência com BrdUrd. Foram feitos dois ensaios independentes em triplicata para cada condição. As porcentagens de núcleo marcado foram 24, 39 e 17% para células quiescentes sem tratamento (controle), tratadas com 8-MeGuo 0,5 mM e com 8-OxoGuo 0,5 mM, respectivamente. O aumento de síntese de DNA pode ser resultado de reparo, recuperação de estresse citotóxico, ou aumento na ploidia da célula. Para comprovar que o aumento de incorporação de timidina radioativa refletia um aumento no número de células, efetuou-se a contagem das células. Tanto 8-MeGuo como Guo aumentaram significativamente o número de células, enquanto a 8-BrGuo não foi significativamente efetiva (Tabela I).



*Fig. 6: Efeito de ribonucleosídeos sobre a incorporação de <sup>3</sup>H-timidina por células A31. Células quiescentes foram cultivadas em meio DMEM contendo HEPES 6mM e concentrações crescentes (0,125 - 1 mM) de cada ribonucleosídeo. Controle consiste de células tratadas apenas com DMEM/HEPES/NaOH 1mM. Após 12 horas de marcação, as células foram coletadas e a incorporação monitorada. Os resultados estão expressos em número de vezes em relação ao controle (de valor igual a 1,0) e representam a média aritmética de dezoito determinações de seis ensaios independentes  $\pm$  EP. Todos os valores, exceto os assinalados com asterisco (\*), foram significativamente diferentes do controle ( $p < 0,05$ ).*

Tabela I. Efeito dos compostos no número de células de fibroblasto A31

Adições	Nº de células (x 10 <sup>3</sup> /cm <sup>2</sup> )	Nº de vezes em relação ao controle
DMEM/HEPES (controle)	9,793 ± 0,903	-
8-MeGuo (0,5 mM)	16,365 ± 0,850*	1,67
8-OxoGuo (0,5 mM)	9,772 ± 0,475	0,99
8-BrGuo (0,5 mM)	10,549 ± 1,018	1,08
Guo (0,5 mM)	17,562 ± 1,280*	1,79

Células de fibroblasto A31 quiescentes foram cultivadas em DMEM com HEPES 6mM em uma concentração fixa de cada composto. Após 24 hs as células tratadas foram retiradas por uma breve exposição com tripsina, e contadas em um contador de células como descrito em Materiais e Métodos. Os resultados representam a média de nove determinações de três experimentos independentes ± EP . Apenas os valores assinalados com asterisco (\*) foram significativamente diferentes do controle (p < 0,05).

De qualquer forma, observou-se uma relação entre o aumento de incorporação de  $^3\text{H}$ -timidina (Fig. 6) e o aumento de número de células (Tabela I), confirmando as propriedades mitogênicas de 8-MeGuo e Guo. Em contraste com o efeito inibitório sobre linfócitos (Fig. 5), Guo foi mitogênica para células A31 (Fig. 6, Tabela I). Os efeitos estimulatórios dos ribonucleosídeos ficam estáveis até 36 horas de incubação (Fig. 7). Não houve estímulo de incorporação de  $^3\text{H}$ -timidina de células tratadas com 8-OxoGuo durante todo o período da cinética (Fig. 7).

É sabido que Guo é citotóxica para linfócitos (Parker, 1976, Spaapen *et al.*, 1984). No caso do fibroblasto 3T3 A31, Guo e 8-MeGuo foram pouco citotóxicas e 8-BrGuo não foi citotóxica pelo ensaio de eficiência de plaqueamento até concentrações de 0,5 mM (Fig. 8). Já a 8-OxoGuo foi citotóxica (Fig. 8). Na concentração de 1 mM todos os ribonucleosídeos, com exceção de 8-BrGuo, foram citotóxicos reduzindo consideravelmente a eficiência de plaqueamento (Fig. 8). Também, nessa concentração, foram menos efetivos no estímulo de incorporação de  $^3\text{H}$ -timidina pelas células A31 (Fig. 6).

A demonstração de efeitos mitogênicos dos ribonucleosídeos em linhagens primárias (Fig. 5) e imortalizadas (Fig. 6) levou-nos a examinar os efeitos dos compostos em uma linhagem tumorigênica.

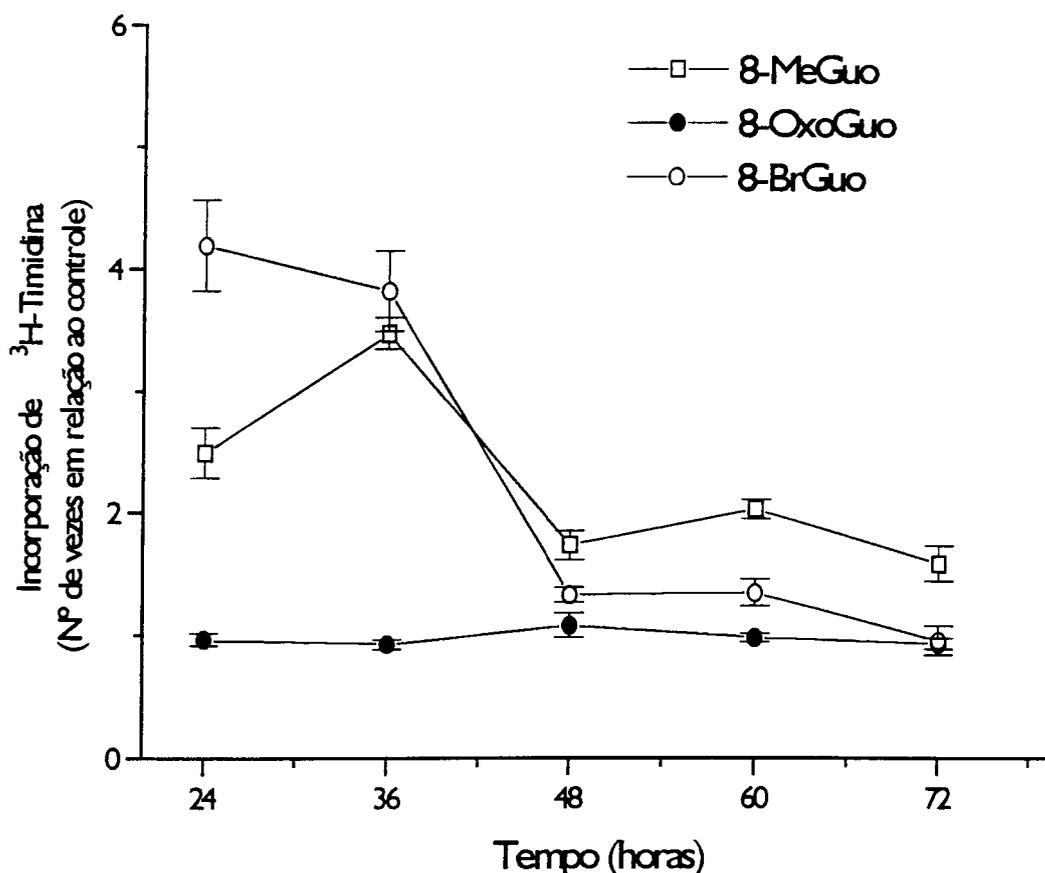
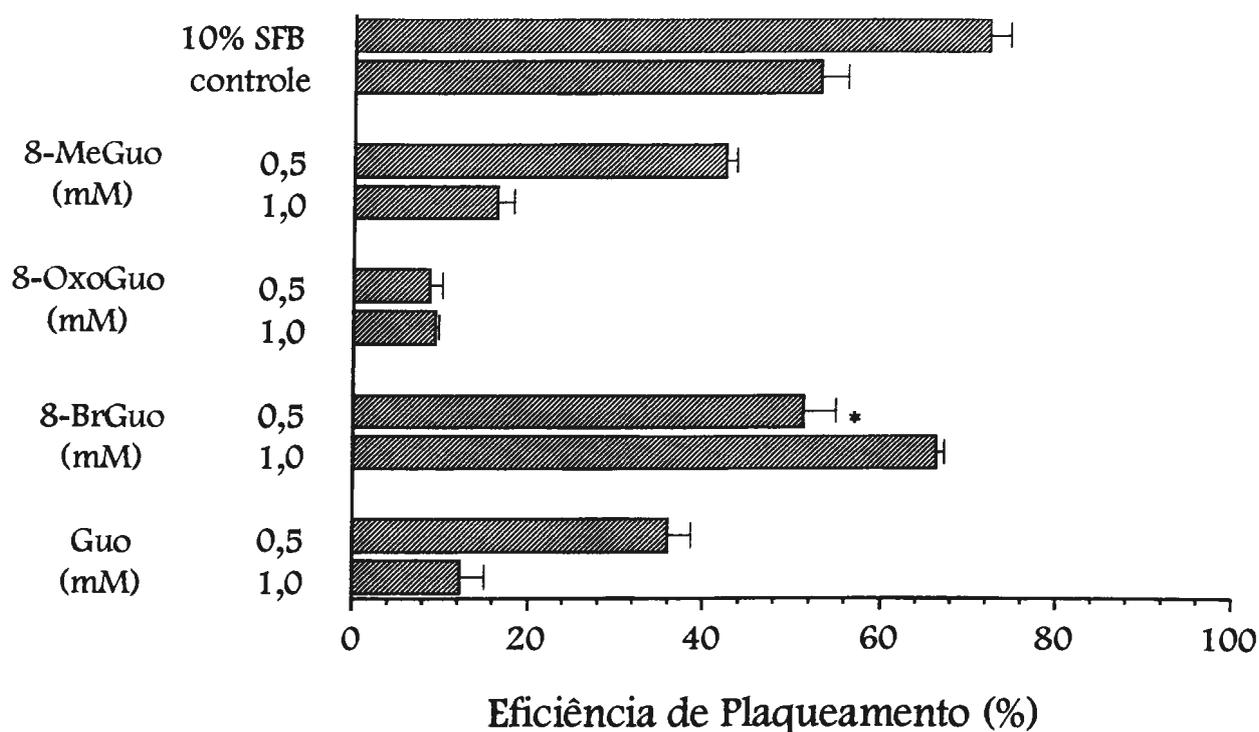


Fig. 7: Cinética de incorporação de timidina de células incubadas com análogos de guanosina. Células quiescentes de fibroblasto A31 foram incubadas em tempos diferentes com cada um dos ribonucleosídeos na concentração de 0,5 mM em meio DMEM/HEPES suplementado com 0,2 % de SFB. Pulsos de timidina foram dados nas últimas 12 hs do período de incubação. Ao final de cada período de incubação, células foram coletadas conforme descrito em Materiais e Métodos. Como controle foram utilizadas células cultivadas em DMEM/HEPES com 0,2 % de SFB. Os resultados estão expressos em número de vezes em relação ao controle (de valor igual a 1,0) e representam a média de nove determinações de três ensaios independentes  $\pm$  EP.

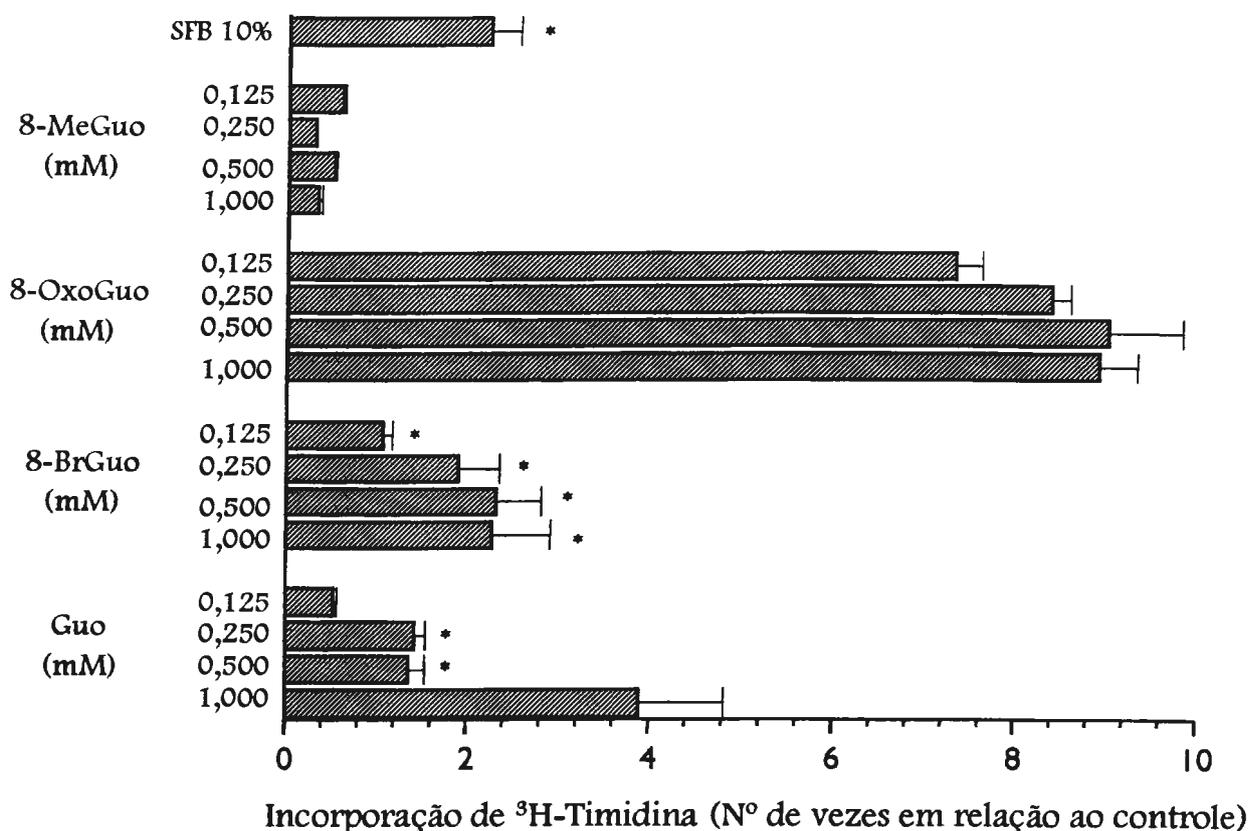


*Fig.8: Eficiência de plaqueamento de células A31 previamente tratadas com os ribonucleosídeos. Células quiescentes foram cultivadas em DMEM com HEPES 6 mM e tratadas nas seguintes condições: (i) 10% de SFB, (ii) NaOH a 1 mM (controle), (iii) 0,5 e 1 mM de cada ribonucleosídeo substituído. Os resultados são a média aritmética de nove determinações de três ensaios independentes  $\pm$  EP. Todos os valores, exceto os assinalados com asterisco (\*), foram significativamente diferentes do controle ( $p < 0,05$ ).*

Em células de melanoma de camundongo C57Bl/6J, B16F10, os ribonucleosídeos também estimularam a incorporação de  $^3\text{H}$ -timidina (Fig. 9). Neste caso, 8-MeGuo não foi efetiva enquanto que 8-BrGuo foi e, em particular, a 8-OxoGuo (Fig. 9). De novo, Guo também foi estimulante sugerindo que em células previamente tratadas com meio de cultura sem SFB, os ribonucleosídeos podem atuar como nutrientes (precursor de nucleotídeos) e/ou mitógenos purinérgicos no estímulo da síntese de DNA (Rathbone *et al.*, 1992a, 1992b).

#### *IV.3. Aspectos mecanísticos da indução de síntese de DNA pelos adutos de ribonucleosídeos substituídos na posição C-8.*

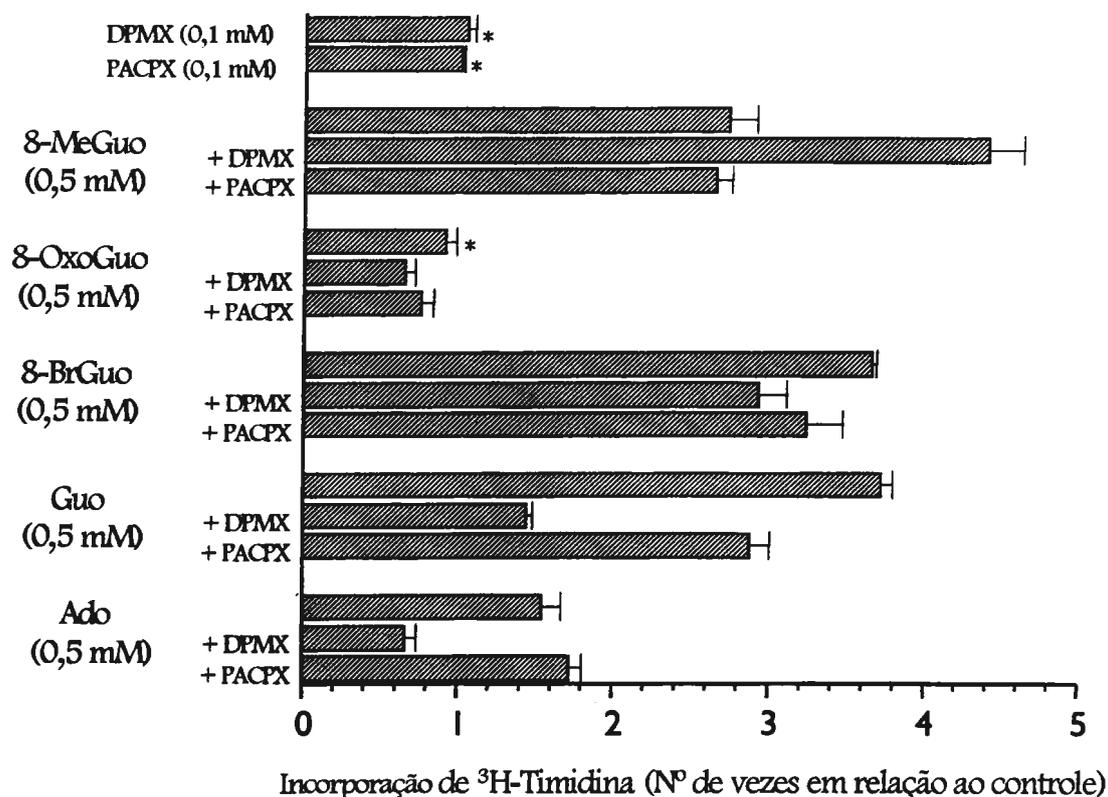
Deve-se notar que concomitantemente ao início deste projeto foi descrito na literatura que adenosina (Ado) e Guo, principalmente esta, eram capazes de estimular a proliferação de várias linhagens de células, inclusive 3T3 (Kim *et al.*, 1991). Assim, os efeitos estimulatórios do ribonucleosídeo fisiológico, Guo, levaram-nos a examinar se os efeitos dos ribonucleosídeos substituídos ocorriam por mecanismos similares aos descritos para Guo e Ado (Meininger *et al.*, 1990, Rathbone *et al.*, 1992a), isto é, através de um dos receptores de membrana de Ado, aquele denominado de  $\text{P}_1$  (Stiles, 1992). O receptor  $\text{P}_1$  é subdividido em duas subunidades,  $\text{A}_1$  e  $\text{A}_2$ , que são responsáveis, respectivamente, pela inibição e ativação da adenilato ciclase.



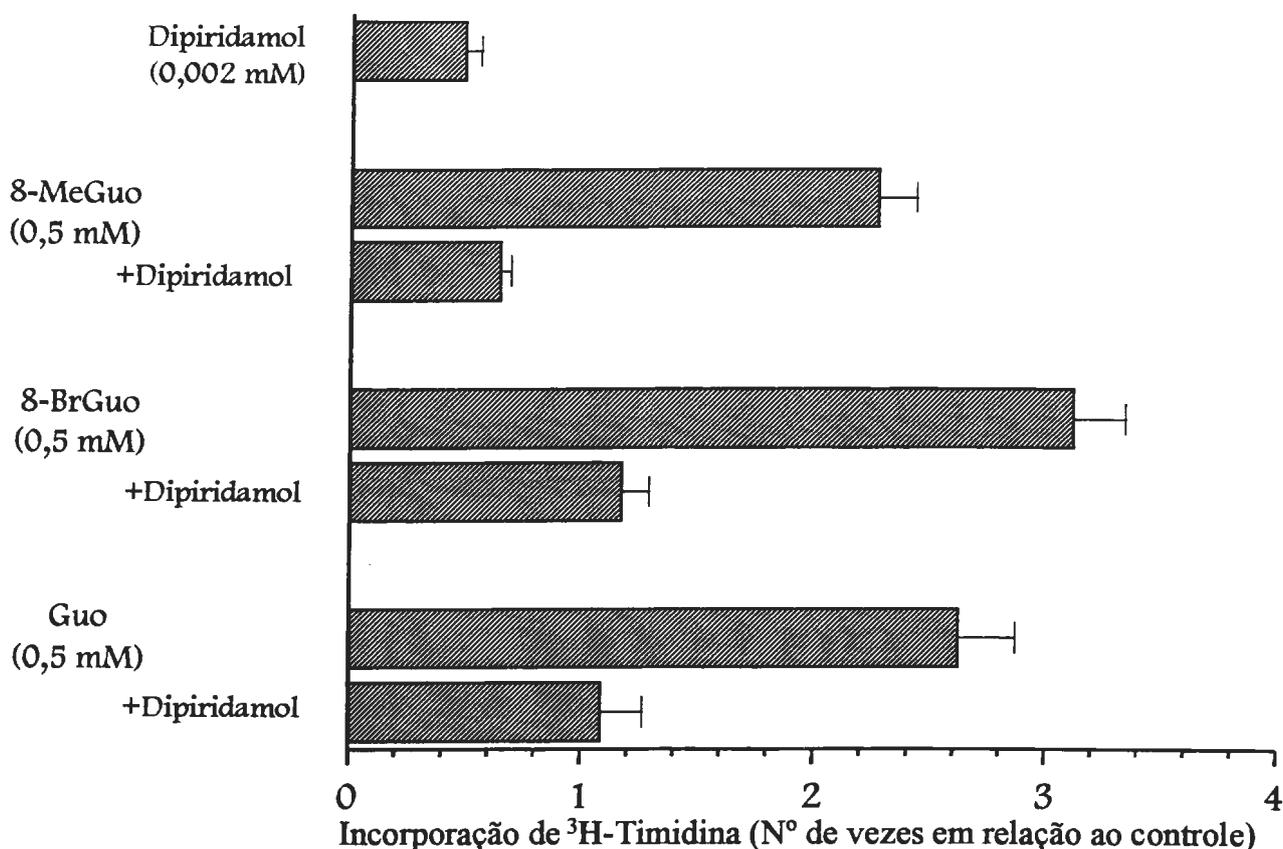
*Fig. 9: Efeito de ribonucleosídeos sobre a incorporação de  $^3\text{H}$ -timidina por células B16F10. Células previamente tratadas com meio de cultura sem SFB foram cultivadas em meio RPMI e concentrações crescentes (0,125 - 1 mM) de cada ribonucleosídeo. Controle consiste de células tratadas apenas com RPMI/ NaOH 1mM. Após 12 horas de marcação, as células foram coletadas e a incorporação monitorada. Os resultados estão expressos em número de vezes em relação ao controle (de valor igual a 1,0) e representam a média aritmética de dezoito determinações de seis ensaios independentes  $\pm$  EP. Todos os valores, exceto os assinalados com asterisco (\*), foram significativamente diferentes do controle ( $p < 0,05$ ).*

Os estímulos de Guo e de Ado em células A31 foram abolidos em presença do antagonista de A<sub>2</sub>, o DPMX, mas não foram abolidos pelo antagonista de A<sub>1</sub>, o PACPX (Rathbone *et al.*, 1991). Como esperado, DPMX inibiu o efeito mitogênico de Guo em cerca de 50%. Os efeitos mitogênicos de 8-BrGuo não sofreram alterações e os efeitos de 8-MeGuo, pelo contrário, foram potencializados em presença de DPMX em cerca de 1,5 vezes (Fig. 10).

Para examinar se os ribonucleosídeos são internalizados para exercerem seus efeitos estimulatórios, cultivamos as células de fibroblasto em presença de um inibidor do transporte de nucleosídeos, o dipiridamol (Gysbers & Rathbone, 1996). De fato, os efeitos estimulatórios de 8-MeGuo e 8-BrGuo foram abolidos em presença do dipiridamol (Fig. 11). Em presença de 0,2% de SFB, os efeitos estimulatórios dos ribonucleosídeos sobre as células A31 foram potencializados em cerca de 1,7, 2 e 2,6 vezes para 8-MeGuo, 8-BrGuo e Guo respectivamente (Fig. 12). Em presença de fatores de crescimento em separado, FGF inibiu e insulina, como SFB, potencializou os efeitos estimulatórios dos compostos (Fig. 12).



*Fig. 10: Comparação dos efeitos mitogênicos dos ribonucleosídeos com e sem adição de DPMX (0,1 mM) e PACPX (0,1 mM), antagonistas de receptores de adenosina (Ado). Células A31 quiescentes foram cultivadas em meio DMEM contendo HEPES 6mM em uma concentração fixa (0,5 mM) de guanosina (Guo) e seus análogos e com 0,5 mM de Ado. Controle consiste em apenas DMEM/HEPES e NaOH 0,5 mM. Após 12 horas de marcação por timidina tritiada, as células foram coletadas e a incorporação monitorada. Os resultados estão expressos em número de vezes em relação ao controle (de valor igual a 1,0) e representam a média de dezoito determinações de seis ensaios independentes  $\pm$  EP. Todos os valores, exceto os assinalados com asterisco (\*), foram significativamente diferentes do controle ( $p < 0,05$ ).*



*Fig. 11: Inibição dos efeitos estimulatórios da Guo e de seus análogos pelo dipiridamol, um inibidor de transporte de nucleosídeos. Células A31 quiescentes foram cultivadas em meio DMEM contendo HEPES 6mM em uma concentração fixa (0,5 mM) de guanosina (Guo) e seus análogos. Controle consiste em apenas DMEM/HEPES e NaOH 1 mM. Após 12 horas de marcação por timidina tritiada, as células foram coletadas e a incorporação monitorada. Os resultados estão expressos em número de vezes em relação ao controle (de valor igual a 1,0) e representam a média de nove determinações de três ensaios independentes  $\pm$  EP. Todos os valores, exceto os assinalados com asterisco (\*), foram significativamente diferentes do controle ( $p < 0,05$ ).*

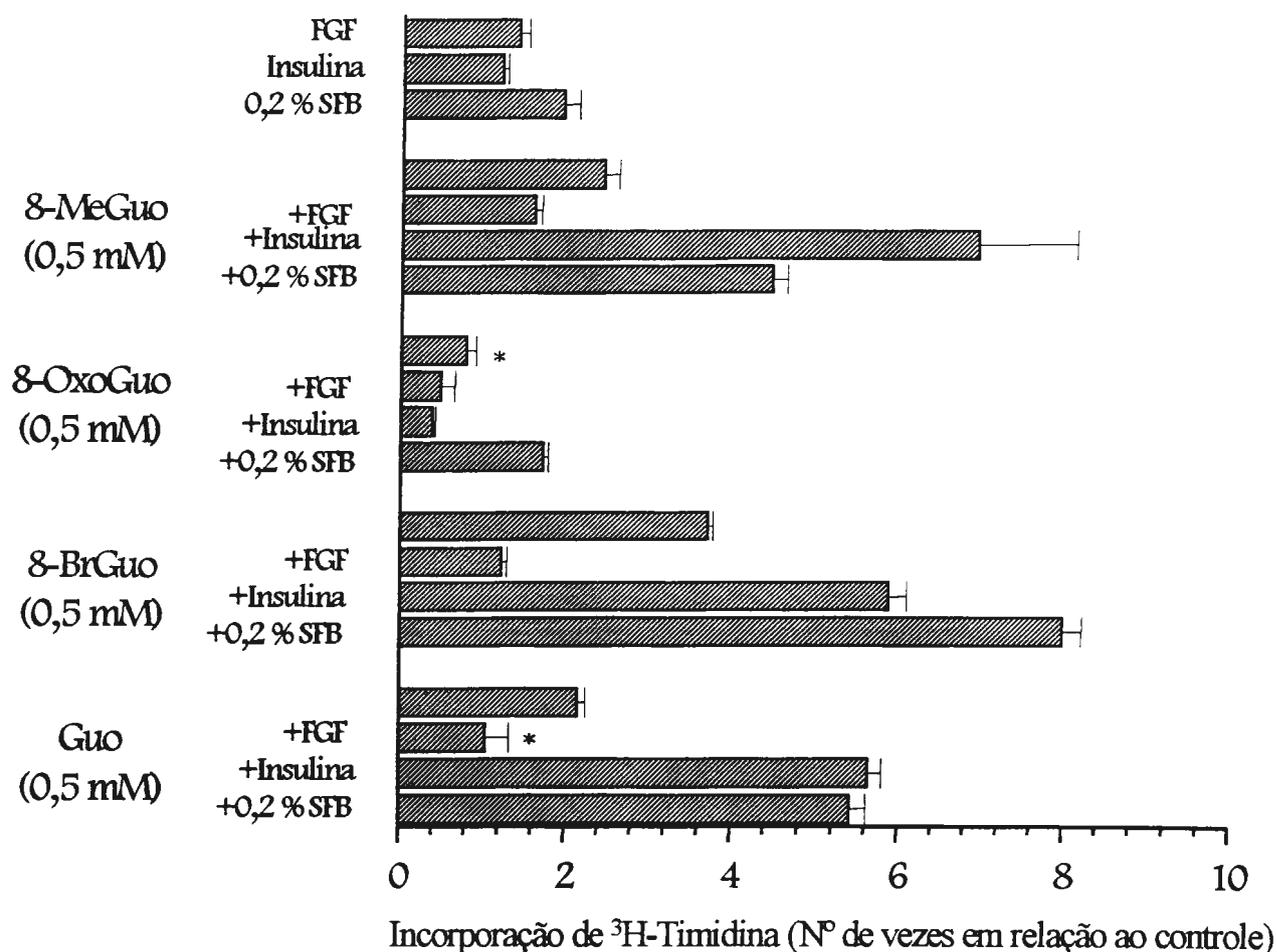
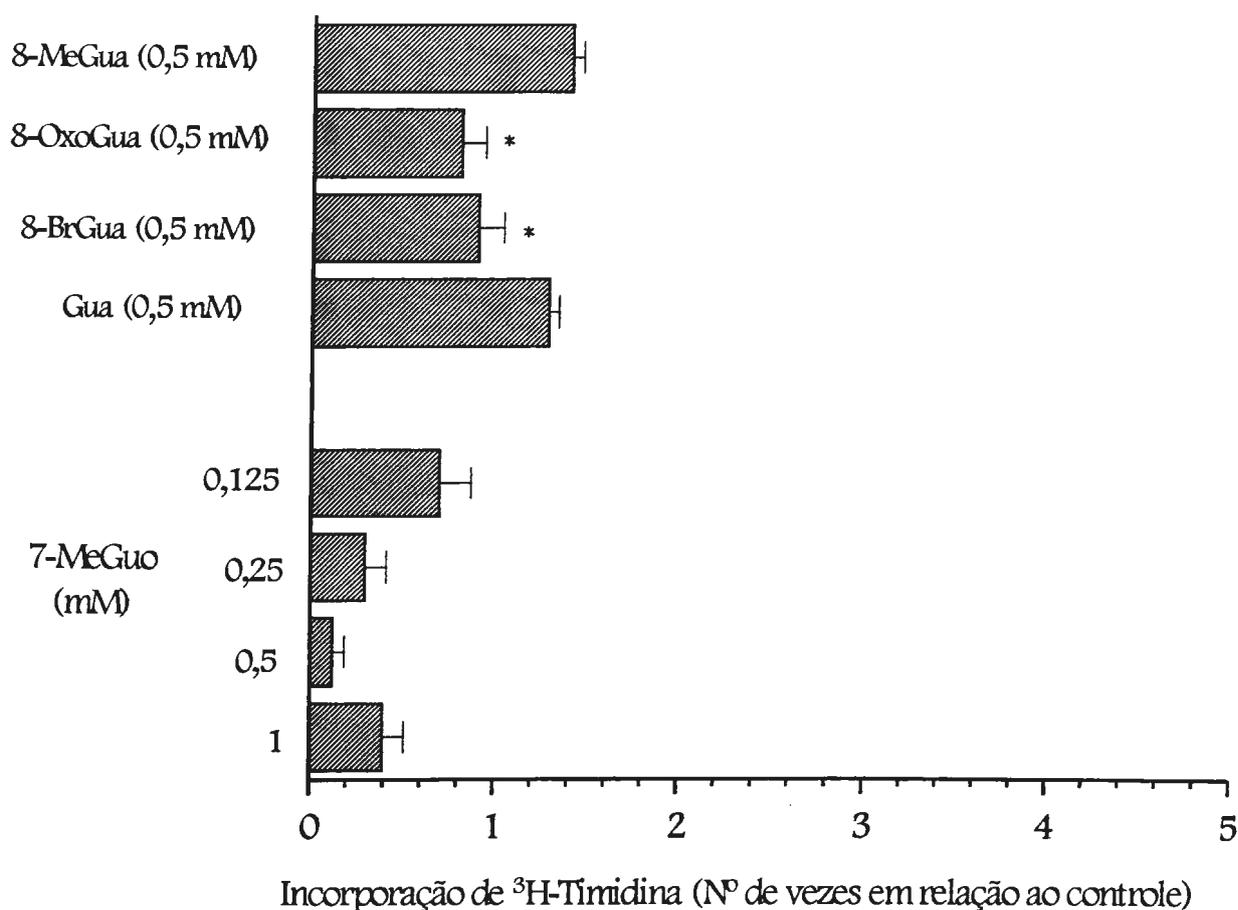


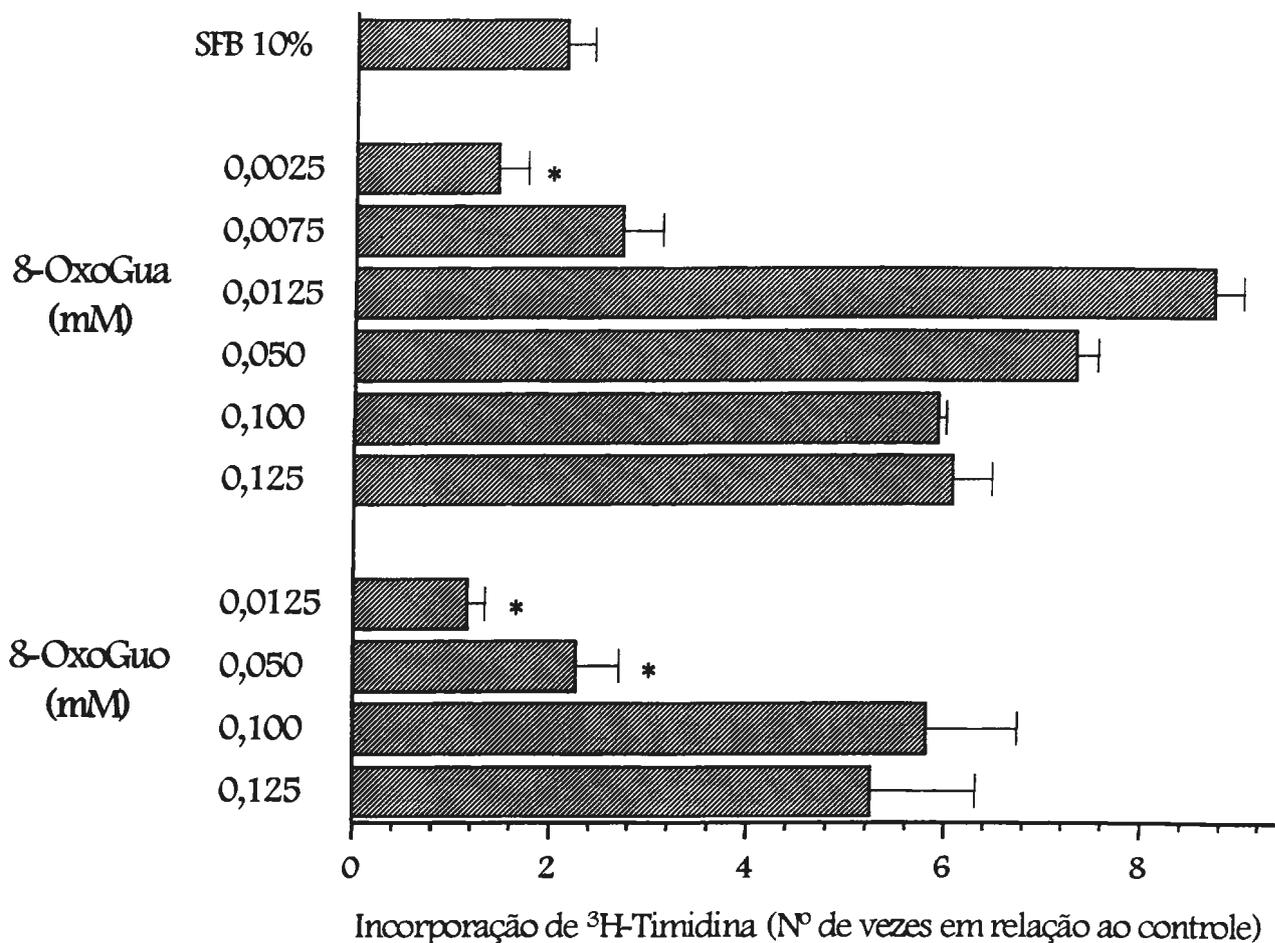
Fig. 12: Comparação dos efeitos mitogênicos dos compostos com e sem adição de fatores de crescimento em células A31. As concentrações finais de FGF e insulina foram de 10 ng/ml e 5 µg/ml, respectivamente. Células quiescentes foram cultivadas em meio DMEM contendo HEPES 6mM e uma concentração fixa (0,5 mM) de cada ribonucleosídeo. Controle consiste em apenas DMEM/HEPES/NaOH a 1 mM. Após 12 horas de marcação, as células foram coletadas e a incorporação monitorada. Os resultados estão expressos em número de vezes em relação ao controle (de valor igual a 1,0) e representam a média aritmética de dezoito determinações de seis ensaios independentes  $\pm$  EP. Todos os valores, exceto os assinalados com asterisco (\*), foram significativamente diferentes do controle ( $p < 0,05$ ).

Experimentos controles demonstraram que as bases correspondentes aos ribonucleosídeos testados, ou seja, 8-MeGua, 8-OxoGua, 8-BrGua e Gua não estimularam a incorporação de [<sup>3</sup>H] TdR por 3T3 (Fig. 13). Da mesma forma, 7-MeGuo, um aduto de RNA produzido por mecanismos não radicalares (Augusto, 1993) mostrou-se sem efeito estimulatório sobre as células A31 (Fig. 13).

Como a resposta mitogênica de 8-OxoGuo foi relativamente alta e atingiu níveis saturantes nas concentrações testadas para as células tumorigênicas B16F10 (Fig. 9), considerou-se importante testar seus efeitos a menores concentrações e compará-los com aqueles da base correspondente (Fig. 14). Os resultados obtidos demonstram que os efeitos estimulatórios de 8-OxoGuo são evidentes a partir de 50  $\mu$ M. Inesperadamente, a 8-OxoGua foi também efetiva e seu efeito parece já saturado na concentração de 12,5  $\mu$ M (Fig. 14).

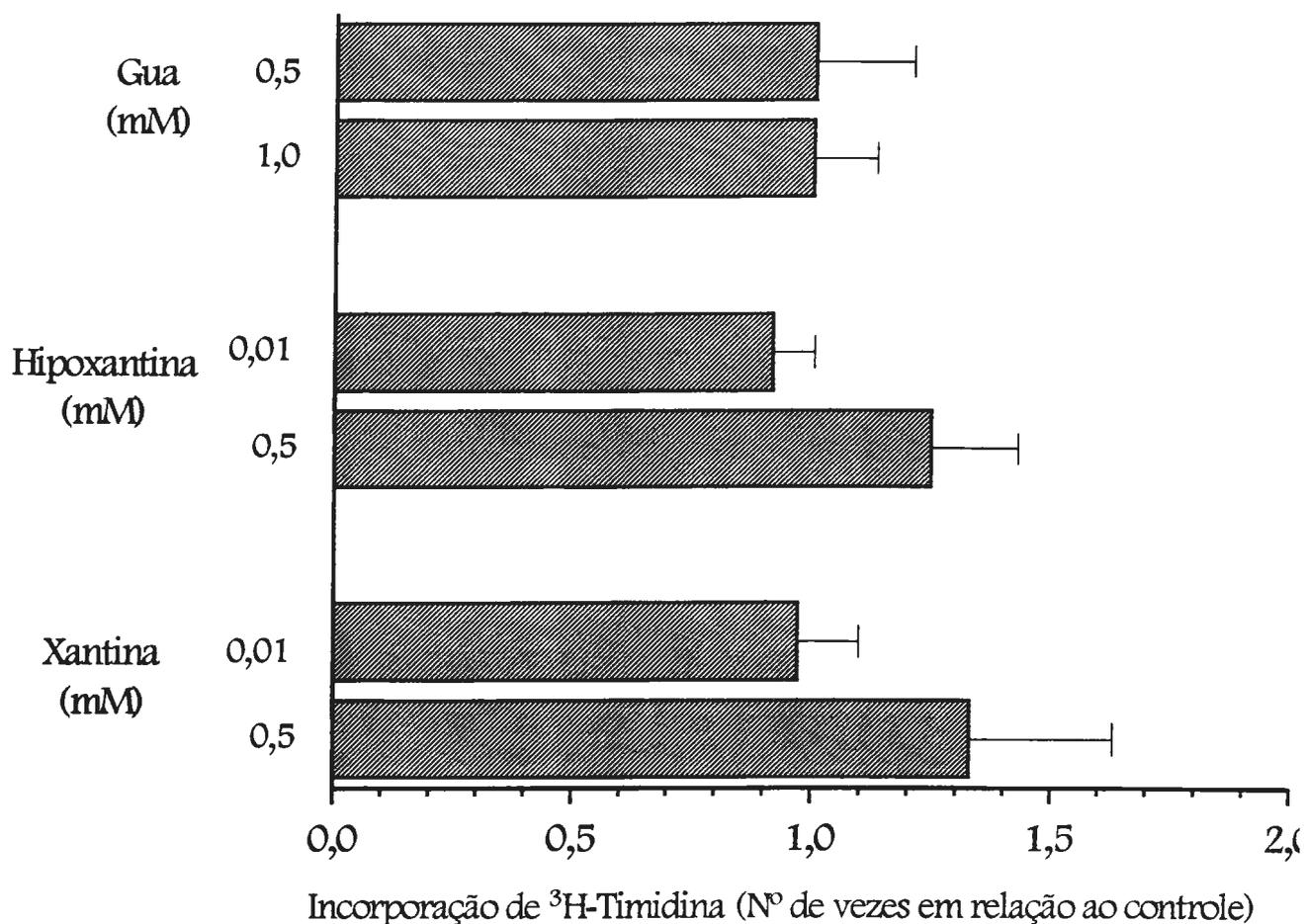


*Fig. 13: Efeito de guanina e seus análogos e 7-metilguanossina (7-MeGuo) em células A31. Células quiescentes foram cultivadas em meio DMEM contendo HEPES 6mM em uma concentração fixa (0,5 mM) de guanina (Gua) e seus análogos e concentrações crescentes de 7-MeGuo (0,125 – 1 mM). Controle consiste em apenas DMEM/HEPES com NaOH 1 mM. Após 12 horas de marcação, as células foram coletadas e a incorporação monitorada. Os resultados representam a média de dezoito determinações de seis ensaios independentes  $\pm$  EP. Todos os valores, exceto os assinalados com asterisco (\*), foram significativamente diferentes do controle ( $p < 0,05$ ).*



*Fig. 14: Curva dose-resposta de células B16F10 tratadas com concentrações crescentes de 8-OxoGua e 8-OxoGuo. Células carenciadas de SFB foram cultivadas em meio RPMI e concentrações crescentes de 8-OxoGua (2,5 - 125  $\mu$ M) e 8-OxoGuo (12,5  $\mu$ M - 125  $\mu$ M). Controle consiste em apenas meio de cultura com NaOH 250  $\mu$ M. Após 12 horas de marcação, as células foram coletadas e a incorporação monitorada. Os resultados representam a média aritmética de dezoito determinações de seis ensaios independentes  $\pm$  EP. Todos os valores, exceto os assinalados com asterisco (\*), foram significativamente diferentes do controle ( $p < 0,05$ ).*

Outras purinas tais como hipoxantina, xantina e guanina, não tiveram efeitos estimulatórios (Fig. 15). Para analisarmos a distribuição da população de células de melanoma tratadas com os compostos analisamos as mesmas por FACScan (Tabela II). 8-OxoGuo, 8-BrGuo, Guo e 8-OxoGua aumentaram a proporção das células em S+G2/M. O efeito de 8-MeGuo foi aproximadamente metade daquele de 10% de SFB, enquanto hipoxantina e xantina não tiveram efeito (Tabela II).



*Fig. 15: Efeito estimulatório de purinas sobre células B16F10. Células previamente cultivadas com meio de cultura sem SFB foram incubadas em meio RPMI e duas concentrações de guanina (0,5 e 1 mM), hipoxantina (0,01 e 0,5 mM) e xantina (0,01 e 0,5 mM). Controle consiste em apenas meio de cultura com NaOH 2 mM. Após 12 horas de marcação, as células foram coletadas e a incorporação monitorada. Os resultados representam a média aritmética de nove determinações de três ensaios independentes  $\pm$  EP. Todos os valores não foram significativamente diferentes do controle ( $p > 0,05$ ).*

*TABELA II. Efeito dos compostos sobre a população de células B16F10 nas fases do ciclo celular.*

Tratamento	Porcentagem de células em fases do ciclo celular	
	G0/G1	S+G2/M
Meio	89,90 ± 0,47	10,11 ± 0,88
10% SFB	70,55 ± 1,34	29,09 ± 2,07
8-MeGuo (0,5 mM)	83,00 ± 3,09	17,01 ± 4,87
8-OxoGuo (0,5 mM)	68,52 ± 1,25	31,47 ± 1,88
8-BrGuo (0,5 mM)	74,83 ± 4,78	25,14 ± 6,27
Guo (0,5 mM)	68,26 ± 1,55	31,64 ± 2,58
8-OxoGua (0,5 mM)	70,90 ± 1,87	29,10 ± 2,32
Hipoxantina (0,5 mM)	88,98 ± 0,52*	11,03 ± 1,01*
Xantina (0,5 mM)	90,11 ± 0,79*	9,87 ± 2,03*

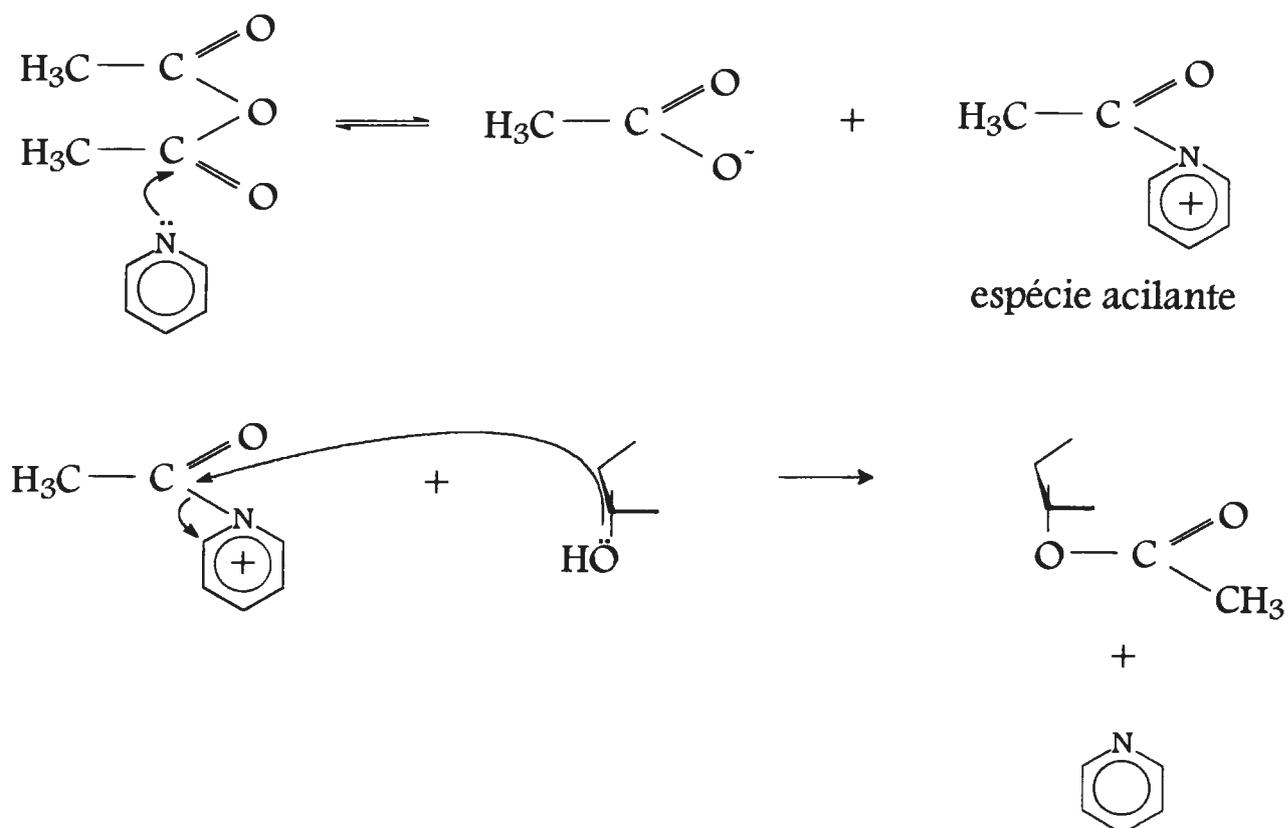
Células carenciadas de SFB de B16F10 foram tratadas por 24 horas com meio sem SFB, meio com 10% de SFB e meio sem SFB suplementado com cada composto descrito acima. Após o período de incubação, as células foram preparadas para análise por FACS conforme descrito em Materiais e Métodos. Resultados são a média de oito determinações de três ensaios independentes ± EP. Todos os valores, exceto os assinalados com asterisco (\*), foram significativamente diferentes do controle ( $p < 0,05$ ).

## V - DISCUSSÃO

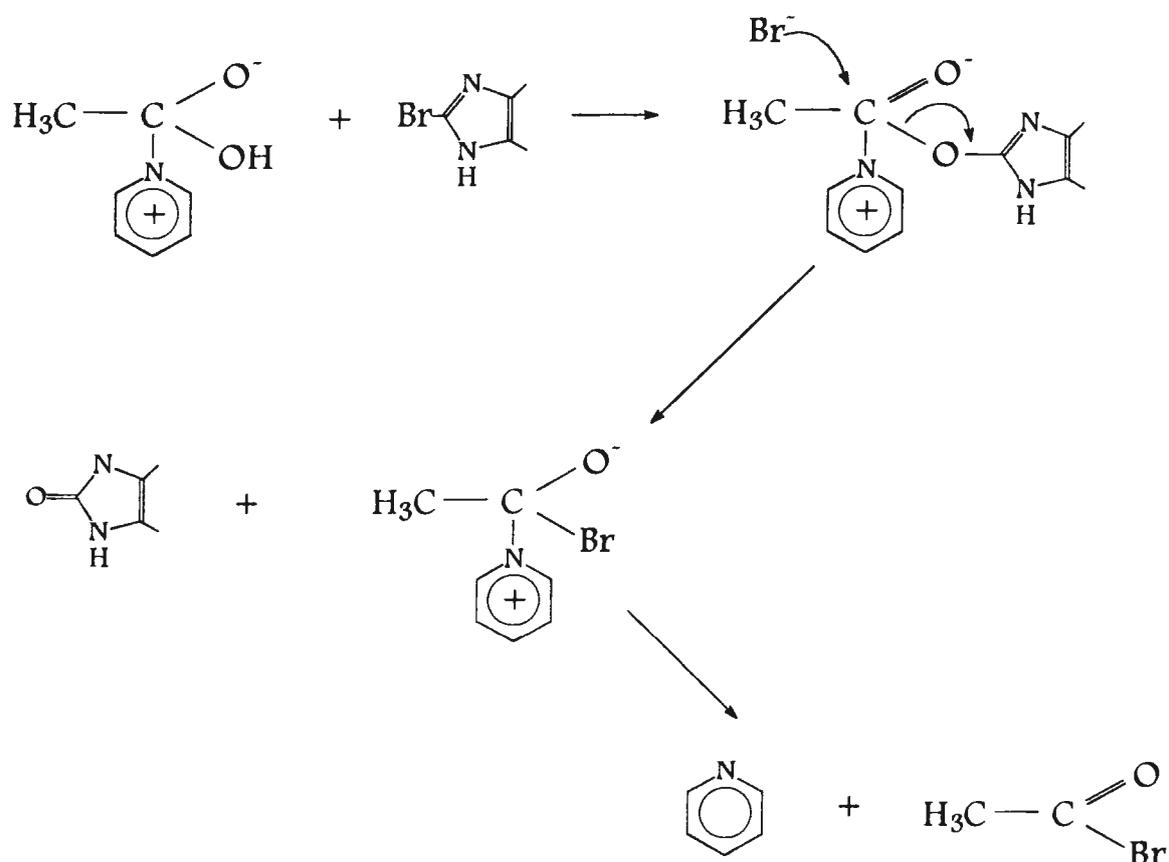
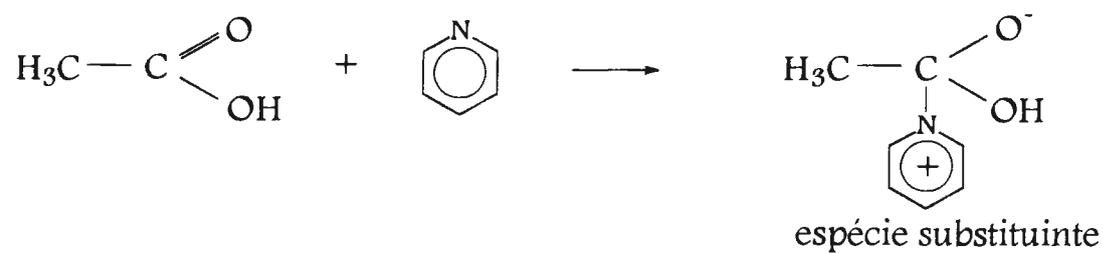
### V.1. Síntese dos ribonucleosídeos

A síntese da 8-MeGuo por radical metila, um agente nucleofílico, gerado por hidroperóxido de tercio-butila em presença de ferro foi realizada com sucesso (Fig. 1). O mecanismo de reação do tipo  $S_EAr$  com formação do complexo intermediário  $\sigma$  foi inicialmente proposto por Maeda *et al.* (Maeda *et al.*, 1974) e confirmado por Zady & Wong (Zady & Wong, 1977).

As reações de proteção da ribose por acetilação (esquema 3) e de substituição nucleofílica do bromo por oxigênio na posição C-8 do composto acetilado (esquema 4) asseguraram um rendimento maior da 8-OxoGuo (55%) do que as sínteses descritas por Ikehara *et al.* (Ikehara *et al.*, 1965) e Kasai & Nishimura (Kasai & Nishimura, 1984) cujos rendimentos obtidos por nós foram <10 e ~ 1% respectivamente. Essa proteção da ligação glicosídica possivelmente evita reações secundárias do radical hidroxila cuja reatividade (k de velocidade na ordem de  $10^8 - 10^9 \text{ M s}^{-1}$ ) é muito mais alta do que a do radical metila (k de velocidade na ordem de  $10^4 - 10^5 \text{ M s}^{-1}$ ) com diferentes moléculas orgânicas (Augusto *et al.*, 1995).



*Esquema 3: Mecanismo de catálise da acetilação de 8-BrGuo por piridina.*



*Esquema 4: Mecanismo de catálise da substituição do bromo da 7-di-hidro-2-N,2'-O,3'-O5'-O-tetraacetil-8-oxoguanosina por piridina.*

## V.2. Proliferação Celular

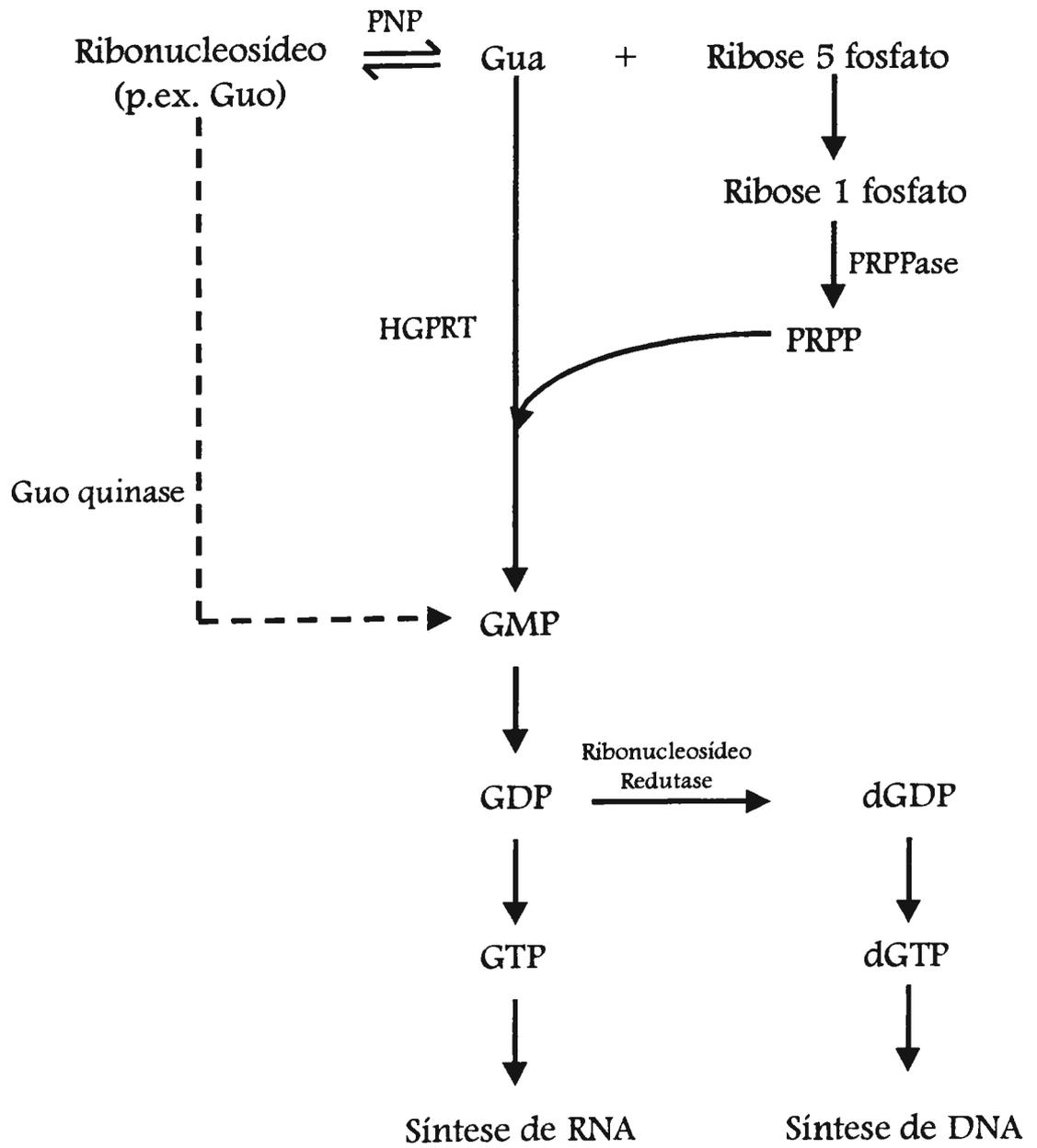
Ataques radicalares a ribonucleosídeos e RNA produzem adutos de guanósina substituídos na posição C-8 (Fiala *et al.*, 1989, Park *et al.*, 1992, Augusto, 1993, Kang *et al.*, 1993). Condições de estresse oxidativo, devido à rápida renovação (“turnover”) do RNA, devem levar a um aumento intracelular nas concentrações desses adutos. Neste trabalho, demonstramos que dois desses adutos de guanósina, 8-MeGuo e 8-OxoGuo, estimulam a proliferação celular dependendo do tipo de célula com as quais interagem (Fig. 5, Fig. 6, Fig. 9, Tabela I, Tabela II). Em nossos experimentos, os adutos sintetizados (cf, Materiais e Métodos) foram adicionados ao meio de cultura. Os efeitos destes análogos em células de fibroblasto 3T3 devem ser intracelulares uma vez que em presença de dipiridamol, um inibidor de transporte de nucleosídeos, esses efeitos foram bloqueados (Fig. 11) mas não foram inibidos pelo antagonista do receptor purinérgico A<sub>2</sub>, o DPMX (Fig. 10). Estes resultados estão de acordo com os descritos por Goodman que demonstrou que os efeitos mitogênicos de 8-BrGuo em linfócitos são intracelulares (Goodman & Weigle, 1984a, Goodman & Hennen, 1986, Goodman, 1988, Goodman, 1991).

Em células de baço de camundongo, 8-MeGuo e 8-OxoGuo estimularam a incorporação de [<sup>3</sup>H] TdR (Fig. 5) mas foram seletivos em células imortalizadas. O aduto 8-MeGuo foi efetivo em células de fibroblasto

3T3(A31) (Fig. 6) enquanto que 8-OxoGuo estimulou células de melanoma B16F10 (Fig. 9). O análogo 8-BrGuo que foi bastante estudado na proliferação de linfócitos B (Goodman & Weigle, 1983c, 1984a, Goodman & Hennen, 1986, Goodman, 1988, Goodman, 1991), e não é formado em condições fisiológicas, foi efetivo em todas as células testadas (Fig. 5, Fig. 6, Fig.9). À medida que 8-BrGuo compartilha propriedades estruturais com ambos, 8-MeGuo e 8-OxoGuo, não se pode estabelecer nenhuma correlação entre estrutura e atividade proliferativa. De fato, todos os três ribonucleosídeos substituídos assumem preferencialmente a conformação *syn* ao redor da ligação base-açúcar, em contraste com o nucleosídeo parental, Guo, que assume preferencialmente a conformação *anti* (Katze, 1985, Maki & Sekiguchi, 1992, Wood *et al.*, 1990, Shibutani *et al.*, 1991, Augusto, 1993, Gannet *et al.*, 1996, Kohda *et al.*, 1996). Tanto 8-BrGuo como 8-OxoGuo possuem um átomo eletronegativo na posição C-8 (Goodman, 1991), enquanto que 8-BrGuo e 8-MeGuo possuem a mesma topologia (Kubinyi, 1993). Conseqüentemente, nenhuma dessas propriedades por si só confere atividade mitogênica aos ribonucleosídeos nas células testadas.

Isto é esperado pois foi demonstrado que proliferação celular induzida por mitógenos ou estresse oxidativo (Nicotera, *et al.*, 1994, Sen, & Packer, 1996, Lander, 1997) varia muito entre os diferentes tipos de células. No caso

dos derivados substituídos na posição C8, as diferenças observadas podem estar relacionadas às variações das vias metabólicas em que os compostos podem participar, uma vez que eles podem interferir no “pool” celular de nucleosídeos. Embora as sínteses *de novo* de purinas e de pirimidinas, quando presentes, sejam virtualmente as mesmas em todas as células, as vias de salvação (esquema 5) são bem mais diversas quanto à natureza e distribuição (Peters *et al.*, 1983, Saunders & Lai, 1983, Usuda *et al.*, 1997a, Usuda *et al.*, 1997b). Não há ainda um consenso na literatura, especialmente em células de mamíferos, quanto às enzimas que participam na via de salvação (Kornberg & Baker, 1992). No caso de células de baço, foi demonstrado que 8-BrGuo não é fosforilada e, portanto, não é incorporada em ácidos nucleicos (Goodman, 1988). Em outras células, entretanto, nada se sabe ainda sobre o possível metabolismo de 8-BrGuo. Também, pouco se sabe sobre o metabolismo de bases e nucleosídeos modificados por radicais livres e se são ou não incorporados nos nucleosídeos e ácidos nucleicos. A excreção de 8-OxodGuo, 8-OxoGuo e 8-OxoGua em urina humana tem sido considerada uma evidência de que estes derivados oxidados de guanina não são extensivamente metabolizados *in vivo* (Shigenaga *et al.*, 1989, Park *et al.*, 1992). No entanto, a possibilidade de ocorrer uma alteração metabólica não pode ser totalmente excluída (Uppu *et al.*, 1996).



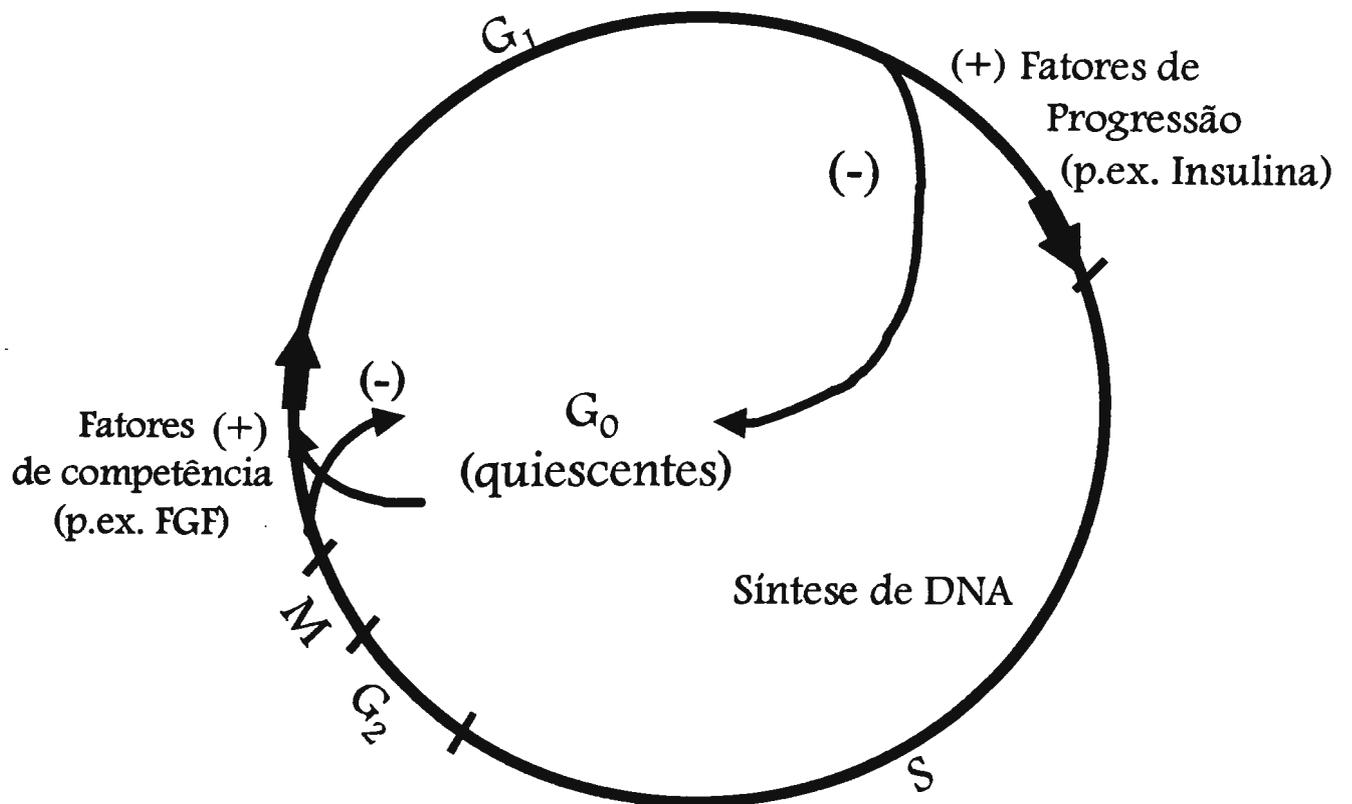
*Esquema 5: Via de Salvação das Purinas*

A incorporação de derivados oxidados de guanina no DNA parece ser minimizada pela ação de enzimas que defosforilam 8-OxodGTP e 8-OxodGMP mais eficientemente que outros nucleosídeos fosforilados (Hayakawa *et al.*, 1995). O metabolismo de 8-MeGuo deve ser examinado uma vez que foi demonstrado que este composto é substrato da PNP de eritrócitos (Stoeckler *et al.*, 1982). Os trabalhos descritos para as células de baço (Goodman & Weigle, 1983c, 1984a, Goodman & Hennen, 1986, Goodman, 1988, Goodman, 1991) e os nossos resultados com as células 3T3(A31) (Fig. 6, Fig. 8, Fig. 10, Tabela I) sugerem que os efeitos proliferativos dos ribonucleosídeos substituídos na posição C-8 nos dois tipos celulares independem de metabolização pela via de salvação das purinas (esquema 5). No caso das células de melanoma B16F10, entretanto, os compostos parecem entrar no “pool” de nucleosídeos pois houve um aumento na população de células nas fases S+G2/M com todos os tratamentos, incluindo 8-OxoGua (Fig. 14, Tabela II). Este dado é consistente com o aumento das vias biossintéticas em relação às catabólicas em células tumorigênicas (Elion, 1989). A demonstração de que a proliferação de células tumorigênicas pode ser aumentada por baixas concentrações de 8-OxoGuo e 8-OxoGua é particularmente relevante pois a formação destes adutos é uma consequência inevitável do consumo de oxigênio por organismos aeróbicos (Marnett & Burcham, 1993, Halliwell & Aruoma,

1991, Dizdaroglu *et al.*, 1991, Cadet, 1994). A possibilidade desses derivados oxidados de guanina transformarem células tumorigênicas em uma variante mais agressiva deve ser explorada e pode ter conseqüências importantes para o uso clínico de derivados de 8-OxoGuo.

O fato de compostos como 8-BrGuo e 8-SHGuo atuarem em linfócitos B previamente ativados (Wicker *et al.*, 1987), indica que eles não são mitógenos completos para estas células, ou seja, as células já devem estar no início da fase G1 para serem estimuladas pelos análogos de guanosina a completarem o ciclo celular (esquema 6). Já nas células imortalizadas, os compostos foram efetivos em células previamente cultivadas em meio de cultura sem soro fetal bovino (Fig. 6, Fig. 9). É sabido que a adição de fatores de crescimento em células quiescentes aumenta o efeito mitogênico de nucleosídeos como uridina, guanosina e adenosina (Rozengurt *et al.*, 1978, Rozengurt, 1986, Becker *et al.*, 1983). Em nossos ensaios, a adição de soro fetal bovino ou de insulina ao meio de cultura de células de fibroblasto 3T3 (A31) potencializou os efeitos estimulatórios de 8-MeGuo, 8-BrGuo e Guo (Fig. 12). FGF, no entanto, demonstrou uma influência oposta e inibiu os efeitos estimulatórios dos compostos (Fig. 12).

Apesar dos vários trabalhos publicados, o mecanismo imunoestimulatório pelo qual os análogos substituídos na posição C8 atuam em linfócitos B ainda não foi estabelecido (Goodman & Weigle, 1983c, 1984a, Goodman & Hennen, 1986, Goodman, 1988, Goodman, 1991).



*Esquema 6: Ciclo celular.* A ausência (-) de fatores de crescimento, por exemplo, pode fazer com que a célula volte a fase G<sub>0</sub>.

O envolvimento da proteína translocadora numatrina B23 foi sugerido (Feuerstein & Mond, 1987, Feuerstein *et al.*, 1988a, Feuerstein *et al.*, 1988b) mas o seu papel no controle do ciclo celular permanece obscuro (Kondo *et al.*, 1997). Em nossos estudos, os aspectos mecanísticos não foram estudados. Entretanto, a demonstração de que dois adutos de Guo são capazes de induzir proliferação celular é particularmente relevante no contexto da carcinogênese mediada por radicais livres. De fato, além do ataque radicalar ao DNA de mamíferos produzir lesões mutagênicas (Marnett & Burcham, 1993, Halliwell & Aruoma, 1991, Dizdaroglu *et al.*, 1991, Cadet, 1994), o aumento da replicação do DNA induzido por adutos de RNA pode ser uma outra forma de radicais livres contribuírem na conversão de lesões primárias em mutações hereditárias. O mecanismo pelo qual esses adutos podem sinalizar a proliferação celular merece maiores estudos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abul-Hajj, Y., Tabakovic, K. & Tabakovic, I. (1995) An estrogen-nucleic acid adduct. Electroreductive intermolecular coupling of 3,4-estrone-o-quinone and adenine. *J. Am. Chem. Soc.* 117: 6144 - 6145.

Ahmad, A. & Mond, J.J. (1985) 8-Hydroxyguanosine and 8-methoxyguanosine possess immunostimulating activity for B lymphocytes. *Cell. Immunol.*, 94: 276 - 280.

Akman, S.A., Doroshov, J.H., Burke, T.G. & Dizdaroglu, M. (1992) DNA base modifications induced in isolated human chromatin by NADH dehydrogenase-catalyzed reduction of doxorubicin. *Biochemistry*, 31: 3500 - 3506.

Albert, D.A. & Rozengurt, E. (1992) Synergistic and coordinate expression of genes encoding ribonucleotide reductase subunits in Swiss 3T3 cells: Effect of multiple signal-transduction pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 1597 - 1601.

Ames, B.N., Shigenaga, M.K. & Hagen, T.M. (1993) Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 7915 - 7922.

Ames, B.N., Gold, L.S. & Willett, W.C. (1995) The causes and prevention of cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92: 5258 - 5265.

Armelin, H.A. (1973) Pituitary extracts and steroid hormones in the control of 3T3 cell growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 70: 2702 - 2706.

Augusto, O., Cavalieri, E.L., Rogan, E.G., Ramakrishna, N.V.S. & Kolar, C. (1990) Formation of 8-methylguanine as a result of DNA alkylation by methyl radicals generated during horseradish peroxidase-catalyzed oxidation of methylhydrazine. *J. Biol. Chem.*, 265: 22093 - 22096.

Augusto, O. (1993) Alkylation and cleavage of DNA by carbon-centered radical metabolites. *Free Rad. Biol. Med.*, 15: 329 - 336.

Augusto, O., Hix, S., Morais, M.S. & Vasquez-Vivar, J. (1995) Free radical reactions: Formation of adducts with biomolecules and their biological significance. *Ciência e Cultura* 47: 280 - 287.

Becker, M.A., Dicker, P. & Rozengurt, E. (1983) Mitogenic enhancement of purine base phosphoribosylation in Swiss mouse 3T3 cells. *Am. J. Physiol. (Cell Physiol. 13)*, 244: C288 - C296.

Bessho, T., Roy, R., Yamamoto, K., Kasai, H., Nishimura, S., Tano, K. & Mitra, S. (1993) Repair of 8-hydroxyguanine in DNA by mammalian N-methylpurine-DNA glycosylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 8901 - 8904.

Bonnet, P.A. & Robins, R.K. (1993) Modulation of leukocyte genetic expression by novel purine nucleoside analogues. A new approach to antitumor and antiviral agents. *J. Med. Chem.*, 36: 635 - 653.

Bruskov, V.I. & Kuklins, O.V. (1988) Manifestation by 8-hydroxy-GTP of the substrate properties of UTP in the reaction of polynucleotide synthesis by *Escherichia coli* RNA polymerase on a poly [d(AT) • d(AT)] template. *Mol. Biol.*, 22: 580 - 584.

Bugg, C.E. & Thewalt, U. (1969) Effects of halogen substituents on base stacking in nucleic acid components: The crystal structure of 8-bromoguanosine. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 37: 623 - 629.

Cadet, J. (1994) DNA damage caused by oxidation, deamination, ultraviolet radiation and photoexcited psoralens, in K. Hemminki, A. Dipple, D. E. G. Shuker, F. F. Kadlubar, D. Segerbäck, and H. Bartsch, (Eds.) DNA adducts: Identification and biological significance, IARC Scientific Publications, Lyon., pp 245 - 276.

Cavalieri, E.L. & Rogan, E.G. (1995) Central role of radical cations in metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Xenobiotica* 25: 677 - 688.

Chen, R., Goodman, M.G., Argentieri, D., Bell, S.C., Burr, L.E., Come, J., Goodman, J.H., Klaubert, D.H., Maryanoff, B.E., Pope, B.L., Rampulla, M.S., Schott, M.R. & Reitz, A.B. (1994) Guanosine derivatives as immunostimulants. Discovery of loxoribine. *Nucleosides Nucleotides*, 13: 551 - 562.

Chen, Q., Marsh, J., Ames, B. & Mossman, B. (1996) Detection of 8-oxo-2'-deoxyguanosine, a marker of oxidative DNA damage, in culture medium from human mesothelial cells exposed to crocidolite asbestos. *Carcinogenesis*, 17: 2525 - 2527.

Cho, B.P., Kadlubar, F.F., Culp, S.J. & Evans, F.E. (1990)  $^{15}\text{N}$  Nuclear magnetic resonance studies on the tautomerism of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, 8-hydroxyguanosine, and other C8-substituted guanine nucleosides. *Chem.Res.Toxicol.*, 3: 445 - 452.

Chung, M.H., Kasai, H., Jones, D.S., Inoue, N., Ishikawa, H., Ohtsuka, E. & Nishimura, S. (1991) An activity of *Escherichia coli* that specifically removes 8-hydroxyguanine residues from DNA. *Mutat. Res.*, 254: 1 - 12.

Công-Danh, N., Beaucourt, J.P. & Pichat, L. (1979) Modification de la position 8 des purines nucleosides et de l'adenosine monophosphate cyclique-3', 5'. Reactions de couplage catalytique des organomagnesiens avec les bromo-8 purines ribosides et bromo-8 adenosine monophosphate cyclique-3', 5'silyles en presence de dichloro-bis-triphenylphosphine palladium. *Tetrahedron Letters*, 34: 3159 - 3162.

Derse, D., Cheng, Y.C., Furman, P.A., St. Clair, M.H. & Elion, G.B. (1981) Inhibition of purified human and herpes simplex virus-induced DNA polymerase by 9-(2-hydroxyethoxymethyl)guanine triphosphate. *J. Biol. Chem.*, 256: 11447 - 11451.

Devasagayam, T.P.A., Steenken, S., Obendorf, M.S.W., Schultz, W.A. & Sies, H. (1991) Formation of 8-hydroxy(deoxy)-guanosine and generation of strand breaks at guanine residues in DNA by singlet oxygen. *Biochemistry*, 30: 6283 - 6289.

Dizdaroglu, M. (1984) The use of capillary gas chromatography mass spectrometry for identification of radiation-induced DNA base damage and DNA base-amino acid cross-links. *J.Chromatogr.*, 295: 103 - 121.

Dizdaroglu, M., Rao, G., Halliwell, B. & Gajewski, E. (1991) Damaged to the DNA bases in mammalian chromatin by hydrogen peroxide in the presence of ferric and cupric ions. *Arch. Biochem. Biophys.* 285: 317 - 324.

Eagle, H. (1974) Some effects of environmental pH on cellular metabolism and function. *Cold Spring Harbour Laboratory Conferences on Cell Proliferation*, 1: 1 - 11.

Elion, G.B. (1989) The purine path to chemotherapy. *Science* 244: 41 - 47.

Farber, E. (1984). Cellular biochemistry of the stepwise development of cancer with chemicals: GHA Clowes Memorial Lecture. *Cancer Res.* 44:

5463 - 5474.

Feldbush, T. & Ballas, Z.K. (1985) Lymphokine-like activity of 8-mercaptoguanosine induction of T and B cell differentiation. *J. Immunol.*, 134: 3204 - 3211.

Feuerstein, N. & Mond, J. (1987) "Numatrin", a nuclear matrix protein associated with induction of proliferation in B lymphocytes. *J. Biol. Chem.* 262: 11389 - 11397.

Feuerstein, N., Chan, P. K. & Mond, J. (1988a) Identification of numatrin, the nuclear matrix protein associated with induction of mitogenesis, as the nucleolar protein B23. *J. Biol. Chem.* 263: 10608 - 10612.

Feuerstein, N., Spiegel, S. & Mond, J. (1988b) The nuclear matrix protein, numatrin (B23), is associated with growth factor-induced mitogenesis in Swiss 3T3 fibroblasts and with T lymphocyte proliferation stimulated by lectins and anti-T cell antigen receptor antibody. *J. Cell Biol.* 107: 1629 - 1642.

Fiala, E. S., Conaway, C. C. & Mathis, J. E. (1989) Oxidative DNA and RNA damage in the livers of Sprague-Dawley rats treated with the hepatocarcinogen 2-nitropropane. *Cancer Res.* 49: 5518 - 5522

Fidler, I. (1975) Biological behavior of malignant melanoma cells correlated to their survival *in vivo*. *Cancer Res.* 35: 218 - 224.

Floyd, R.A., West, M.S., Eneff, K.L. & Schneider, J.E. (1989) Methylene blue plus light mediates 8-hydroxyguanine formation in DNA. *Arch. Biochem. Biophys.*, 273: 106 - 111.

Gannett, P.M., Lawson, T., Miller, M., Thakkar, D.D., Lord, J.W., Yau, W.M. & Toth, B. (1996) 8-Arylguanine adducts from arenediazonium ions and DNA. *Chem. Biol. Interact.*, 101: 149 - 164.

Geiger, A., Seliger, H. & Nehls, P. (1993) A new approach for the efficient synthesis of oligodeoxyribonucleotides containing the mutagenic DNA modification 7,8-dihydro-8-oxo-2'-deoxyguanosine at predefined positions. *Nucleosides & Nucleotides*, 12: 463 - 477.

Goodman. M.G., Fidler, J.M. & Weigle, W.O. (1978) Nonspecific activation of murine lymphocytes. *J. Immunol.*, 121: 1905 - 1913.

Goodman. M.G. & Weigle, W.O. (1981) Activation of lymphocytes by brominated nucleoside and cyclic nucleotide analogues: Implications for the "second messenger" function of cyclic GMP. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78: 7604 - 7608.

Goodman, M.G. & Weigle, W.O. (1982) Induction of immunoglobulin secretion by a simple nucleoside derivative. *J. Immunol.*, 128: 2399 - 2404.

Goodman. M.G. & Weigle, W.O. (1983a) Activation of lymphocytes by a thiol-derivatized nucleoside: Characterization of cellular parameters and responsive subpopulations. *J. Immunol.*, 130: 551 - 557.

Goodman. M.G. & Weigle, W.O. (1983b) Derivatized guanine nucleosides: A new class of adjuvant for in vitro antibody responses. *J. Immunol.*, 130: 2580 - 2585.

Goodman. M.G. & Weigle, W.O. (1983c) Manifold amplification of *in vivo* immunity in normal and immunodeficient mice by ribonucleosides derivatized at C8 of guanine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80: 3452 - 3455.

Goodman. M.G. & Weigle, W.O. (1984a) Intracellular lymphocyte activation and carrier-mediated transport of C8-substituted guanine ribonucleosides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 862 - 866.

Goodman. M.G. & Weigle, W.O. (1984b) Mechanism of 8-mercaptoguanosine-mediated adjuvant activity: Roles of clonal expansion and cellular recruitment. *J. Immunol.*, 133: 2910 - 2914.

Goodman. M.G. & Hennen, W.J. (1986) Distinct effects of dual substitution on inductive and differentiative activities of C8-substituted guanine ribonucleosides. *Cell. Immunol.*, 102: 395 - 402.

Goodman. M.G. (1988) Role of salvage and phosphorylation in the immunostimulatory activity of C8-substituted guanine ribonucleosides. *J. Immunol.*, 141: 2394 - 2399.

Goodman, M.G. (1991) Cellular and biochemical studies of substituted guanine ribonucleoside immunostimulants. *Immunopharmacology*, 21: 51 - 68.

Gower Jr, W., Carr, M.C. & Ivest, D.H. (1979) Deoxyguanosine kinase. *J.*

*Biol. Chem.* 254: 2180 - 2183.

Gratzner, H.G. (1982) Monoclonal antibody to 5-bromo- and 5-iododeoxyuridine: A new reagent for detection of DNA replication. *Science*, 218: 474 - 475.

Guyton, K.Z. & Kensler, T.W. (1993) Oxidative mechanisms in carcinogenesis. *Brit. Med. Bull.*, 49: 523 - 544.

Gysbers, J.W. & Rathbone, M.P. (1996) GTP and guanosine synergistically enhance NGF-induced neurite outgrowth from PC12 cells. *Int. J. Devl. Neuroscience* 14: 19 - 34.

Halliwell, B. & Aruoma, O. (1991) DNA damage by oxygen-derived species: Its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS Lett.* 281: 9 - 19.

Harlow, K.W., Nygaard, P. & Hove-Jensen, B. (1995) Cloning and characterization of the gsk gene encoding guanosine kinase of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 177: 2236 - 2240.

Hayakawa, H., Taketomi, A., Sakumi, K., Kuwano, M. & Sekiguchi, M. (1995) Generation and elimination of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine 5'-triphosphate, a mutagenic substrate for DNA synthesis, in human cells. *Biochemistry* 34: 89 - 95.

Hirai, S., Hayashi, Y., Koizumi, T., Nakanishi, N., Fukui, T. & Ichikawa, A. (1993) Fibroblast growth factor-dependent metabolism of hypoxanthine via the salvage pathway for purine synthesis in porcine aortic endothelial cells. *Biochem. Pharmacol.*, 45: 1695 - 1701.

Hix, S., Morais, M.S. & Augusto, O. (1995) DNA methylation by *tert-butylhydroperoxide-iron* (II). *Free Rad. Biol. Med.*, 19: 293 - 301.

Humphreys, W.G., Kadlubar, F.F. & Guenrich, F.P. (1992) Mechanism of C<sup>8</sup> alkylation of guanine residues by activated arylamines: evidence for initial adduct formation at the N<sup>7</sup> position. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 8278 - 8282.

Ikehara, M., Tada, H. & Muneyama, K. (1965) Synthesis of 8-hydroxypurine nucleosides. *Chem.Pharm.Bull.*, 13: 1140 - 1142.

Inoue, S. & Kawanishi, S. (1995) Oxidative DNA damage induced by simultaneous generation of nitric oxide and superoxide. *FEBS Lett.* 341: 59 - 64.

Jaruga, P. & Dizdaroglu, M. (1996) Repair of products of oxidative DNA base damage in human cells. *Nucleic Acids Res.*, 24: 1389 - 1394.

Kang, J.O., Gallagher, K.S. & Cohen, G. (1993) Methylation of RNA purine bases by methyl radicals. *Arch. Biochem. Biophys.*, 306: 178 - 182.

Kasai, H. & Nishimura, S. (1984) Hydroxylation of deoxyguanosine at the C-8 position by ascorbic acid and other reducing agents. *Nucleic Acids Res.*, 12: 2137 - 2145.

Kasai, H., Yamaizumi, Z., Berger, M. & Cadet, J. (1992) Photosensitized formation of 7,8-dihydro-8-oxo-2'-deoxyguanosine (8-hydroxy-2'-deoxyguanosine) in DNA by riboflavin: A non singlet oxygen mediated reaction. *J. Am. Chem. Soc.*, 114: 9692 - 9694.

Katze, J. R. (1985) Queosine metabolism: Possible relation to B-cell activation by C8 derivatives of guanosine. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 179: 492 - 496.

Kennedy, L.J., Moore Jr., K., Canifield, J.L., Tannenbaum, S.R. & Dedon, P.C. (1997) Quantitation of 8-oxoguanine and strand breaks produced by four oxidizing agents. *Chem. Res. Toxicol.* 10: 386 - 392.

Kikugawa, K., Kato, T. & Kojima, K. (1992) Substitution of p- and o-hydroxyphenyl radicals at the 8 position of purine nucleosides by reaction with mutagenic p- and o-diazoquinones. *Mutation Res.* 268: 65 - 75.

Kohda, K., Tsunomoto, H., Minoura, Y., Tanabe, K. & Shibutani, S. (1996) Synthesis, miscoding specificity, and thermodynamic stability of oligodeoxynucleotide containing 8-methyl-2'-deoxyguanosine. *Chem. Res. Toxicol.*, 9: 1278 - 1284.

Kohda, K., Tsunomoto, H., Kasamatsu, T., Sawamura, F., Terashima, I. & Shibutani, S. (1997) Synthesis and miscoding specificity of oligodeoxynucleotide containing 8-phenyl-2'-deoxyguanosine. *Chem. Res. Toxicol.* 10: 1351 - 1358.

Kondo, T., Minamino, N., Nagamura-Inoue, T., Matsumoto, M., Taniguchi, T. & Tanaka, N. (1997) Identification and characterization of

nucleophosmin/B23/numatrin which binds the anti-oncogenic transcription factor IRF-1 and manifests oncogenic activity. *Oncogene* 15: 1275 - 1281.

Kornberg, A. & Baker, T. A. (1992) Salvage pathways of nucleotide synthesis in DNA replication, W.H. Freeman and Company, N. Y., pp 79 - 80.

Koo, G.C., Jewell, M.E., Manyak, C.L., Sigal, N.H. & Wicker, L.S. (1988) Activation of murine natural killer cells and macrophages by 8-bromoguanosine. *J. Immunol.*, 140: 3249 - 3252.

Kouchakdjian, M., Bodepudi, V., Shibutani, S., Eisenberg, M., Johnson, F., Grollman, A.P. & Patel, D.J. (1991) NMR structural studies of the ionizing radiation adduct 7-hydro-8-oxodeoxyadenosine in a DNA duplex. 8-Oxo-7H-dG(syn) • dA(anti) alignment at lesion site. *Biochemistry*, 30: 1403 - 1412.

Kubinyi, H. (1993) QSAR: Hansch analysis and related approaches. Em Manhold, R., Laren, P.K. & Timmerman, H. Eds. *Methods and Principles in Medicinal*, vol. 1, VHC, Weinheim.

Lander, H. M. (1997) An essential role for free radicals and derived species in signal transduction. *FASEB J.* 11: 118 - 124.

Loeb, L.A. (1989) Endogenous carcinogenesis: Molecular oncology into the twenty-first century – Presidential address. *Cancer Res.*, 49: 5489 - 5496.

Loechler, E.L. (1996) The role of adducts site-specific mutagenesis in understanding how carcinogen-DNA adducts cause mutations: perspective, prospects and problems. *Carcinogenesis*, 17: 895 - 902.

Lofti, C.F.P., Todorovic, Z., Armelin, H.A. & Schimmer, B.P. (1997) Unmasking a growth-promoting effect of the adrenocorticotrophic hormone in Y1 mouse adrenocortical tumor cells. *J.Biol.Chem.* 272: 29886 - 29891.

Maeda, M., Nushi, K. & Kawazoe, Y. (1974) Studies on chemical alterations of nucleic acids and their components. *Tetrahedron*, 30: 2677 - 2682.

Maki, H. & Sekiguchi, M. (1992) MuT protein specifically hydrolyses a potent mutagenic substrate for DNA synthesis. *Nature*, 355: 273 - 275

Malins, D.C., Holmes, E.H., Polissar, N.L. & Gunselman, S.J. (1993) The

etiology of breast cancer. *Cancer*, 71: 3036 - 3043.

Marnett, L.J. & Burcham, P.C. (1993) Endogenous DNA adducts: Potential and Paradox. *Chem. Res. Toxicol.*, 6: 771 - 785.

Martin, J.C., Dvorak, C.A., Smee, D.F., Matthews, T.R. & Verheyden, J.P.H. (1983) 9[(1,3-dihydroxy-2-propoxy)methyl]guanine. A new potent and selective antiherpes agent. *J. Med. Chem.*, 26: 759 - 761.

Meininger, C.J. & Granger, H. (1990) Mechanisms leading to adenosine stimulated proliferation of microvascular endothelial cells. *Am. J. Physiol. (Heart Circ. Physiol. 27)*, 258: H198 - H206.

Meyer, J.S., Nauert, J., Koehm, S. & Hughes, J. (1989) Cell kinetics of human tumors by in vitro bromodeoxyuridine labeling. *J. Histochem. Cytochem.*, 37: 1449 - 1454.

Mo, J.Y., Maki, H. & Sekiguchi, M. (1992) Hydrolytic elimination of mutagenic nucleotide, 8-oxodGTP, by human 18-kilodalton protein: Sanitization of nucleotide pool. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 11021 - 11025.

Morais, M. S. (1995) Síntese e caracterização da 8-metil-2'-desoxiguanosina, um produto de ataque de radicais metila ao DNA. Tese de Mestrado, Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

Moriya, M., Ou, C., Bodepudi, V., Johnson, F., Takeshita, M. & Grollman, A.P. (1991) Site-specific mutagenesis using a gapped duplex vector: A study of transversion synthesis past 8-oxodeoxyguanosine in *E. coli*. *Mutation Res.*, 254: 281 - 288.

Netto, L.E.S., Ramakrishna, N.V.S., Kolar, C., Cavalieri, E.L., Rogan, E.G., Lawson, T.A. & Augusto, O. (1992) Identification of C8-methylguanine in the hydrolysates of DNA from rats administered 1,2-dimethylhydrazine: Evidence for *in vivo* DNA alkylation by methyl radicals. *J. Biol. Chem.*, 267: 21524 - 21527.

Nicotera, T. M., Privalle, C., Wang, T. C., Oshimura, M. and Barrett, J. C. (1994) Differential proliferative responses of syrian hamster embryo fibroblasts to paraquat-generated superoxide radicals depending on tumor suppressor gene function. *Cancer Res.* 54: 3884 - 3888.

Oda, Y., Uesugi, S., Ikehara, M., Nishimura, S., Kawase, Y., Ishikawa, H., Inoue, H. & Ohtsu, E. (1991) NMR studies of DNA containing 8-hydroxydeoxyguanosine. *Nucleic Acids Res.*, 19: 1407 - 1412.

Olinski, R., Zastawny, T., Budzbon, J., Skokowski, J., Zegarski, W. & Dizdaroglu, M. (1992) DNA base modification in chromatin of human cancerous tissues. *FEBS Lett.*, 309: 193 - 198.

Park, E.M., Shigenaga, M.K., Degan, P., Korn, T.S., Kitzler, J.W., Wehr, C.M., Kolachana, P. & Ames, B.N. (1992) Assay of excised oxidative DNA lesions: Isolation of 8-oxoguanine and its nucleoside derivatives from biological fluids with a monoclonal antibody column. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 3375 - 3379.

Parker, C.W. (1976) Control of lymphocyte function. *New Engl. J. Med.*, 295: 1180 - 1186.

Perchellet, J.P. & Perchellet, E.M. (1989) Antioxidants and multistage carcinogenesis in mouse skin. *Free Rad. Biol. Med.*, 7: 377 - 408.

Perrin, D.D. & Armarego, W.L.F. (1988) *Purification of Laboratory Chemicals* 3ª edição, Pergamon Press.

Peters, G.J., Oosterhof, A. & Veerkamp, J.H. (1983) Metabolism of purine nucleosides in human and ovine lymphocytes and rat thymocytes and their influence on mitogenic stimulation. *Biochim. Biophys. Acta* 755: 127 - 136.

Pope, B.L., Sigindere, J., Chourmouzis, E., MacIntyre, P. & Goodman, M.G. (1994) 7-Allyl-8-oxoguanosine (loxoribine) inhibits the metastasis of B16 melanoma cells and has adjuvant activity in mice immunized with a B16 tumor vaccine. *Cancer Immunol. Immunother.*, 38: 83 - 91.

Quinlan, D. & Hochstadt, J. (1977) The regulation by fibroblast growth factor of early transport changes in quiescent 3T3 cells. *J. Cell. Physiol.*, 93: 237 - 246.

Rathbone, M.P., Middlemiss, P.J., DeLuca, B. & Jovetich, M. (1991) Extracellular guanosine increases astrocyte cAMP: inhibition by adenosine A<sub>2</sub> antagonists. *NeuroReport*, 2: 661 - 664.

Rathbone, M.P., Middlemiss, P.J., Gysberg, J.W., DeForge, S., Costello, P. & Maestro, R.F.D. (1992a) Purine nucleosides and nucleotides stimulate

proliferation of wide range of cell types. *In Vitro Cell. Dev. Biol.*, 28A: 529 - 536.

Rathbone, M.P., Deforge, S., Deluca, B., Gabel, B., Laurensen, C., Middlemiss, P. & Parkinson, S. (1992b) Purinergic stimulation of cell division and differentiation: Mechanisms and pharmacological implications. *Medical Hypotheses*, 37: 213 - 219.

Roelen, H.C.P.F., Saris, C.P., Brugghe, H.F., Elst, H.van den, Westra, J.G., Marel, G.A.van der & Boom, J.H.van. (1991) Solid-phase synthesis of DNA fragments containing the modified base 7-hydro-8-oxo-2'-deoxyguanosine. *Nucleic Acids Res.*, 19: 4361 - 4369.

Rozengurt, E., Mierzejewski, K. & Wigglesworth, N. (1978) Uridine transport and phosphorylation in mouse cells in culture: Effect of growth-promoting factors, cell cycle transit and oncogenic transformation. *J. Cell. Physiol.* 97: 241 - 252.

Rozengurt, E. (1986) Early signals in the mitogenic response. *Science*, 234: 161 - 166.

Saunders, P.P. & Lai, M.M. (1983) Nucleoside kinase activities of chinese hamster ovary cells. *Biochim. Biophys. Acta*, 761: 135 - 141

Schaeffer, H.J., Beauchamp, L., de Miranda, P., Elion, G.B., Bauer, D.J. & Collins, P. (1978) 9-(2-Hydroxyethoxymethyl)guanine against viruses of herpes group. *Nature*, 272 : 583 - 585.

Scheuer, W.V., Goodman, M.G., Parks, D.E. & Weigle, W.O. (1985) Enhancement of the in vivo antibody response by an 8-derivatized guanine nucleoside. *Cell. Immunol.*, 91: 294 - 300.

Sen, C. K. & Packer, L. (1996) Antioxidant and redox regulation of gene transcription. *FASEB J.* 10: 709 - 720.

Shapiro, H.M. (1995) Parameters and Probes em Practical Flow Cytometry, John Wiley & Sons, INC, N.Y., pp 229 - 347.

Shibutani, S., Takeshita, M. & Grollman, A.P. (1991) Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxodG. *Nature*, 349: 431 - 434.

Shigenaga, M.K., Gimeno, C.J. & Ames, B.N. (1989) Urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine as a biological marker of *in vivo* oxidative DNA damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86: 9697 - 9701.

Spaapen, L.J.M., Rijkers, G.T., Staal, G.E.J., Rijkssen, G., Wadman, S.K., Stoop, J.W. & Zegers, B.J.M. (1984) The effect of deoxyguanosine on human lymphocyte function. I. Analysis of the interference with lymphocyte proliferation *in vitro*. *J. Immunol.*, 132: 2311 - 2317.

Steinmaus, H., Rosenthal, I. & Elad, D. (1971) Light – and  $\gamma$ -Ray-induced reactions of purines and purine nucleosides with alcohols. *J. Org. Chem.*, 36: 3594 - 3598.

Stiles, G.L. (1992) Adenosine receptors. *J. Biol. Chem.*, 267: 6451 - 6454.

Stoeckler, J. D., Cambor, C., Kuhns, V., Chu, S. H. & Parks Jr, R. E. (1982) Inhibitors of purine nucleoside phosphorylase C(8) and C(5') substitutions. *Biochem. Pharmacol.* 31: 163 - 171.

Taddei, F., Hayakawa, H., Bouton, M.F., Cirinesi, A.M., Matic, I., Sekiguchi, M. & Radman, M. (1997) Counteraction by MutT protein of transcriptional errors caused by oxidative damage. *Science*, 278: 128 - 130.

Taijiri, T., Maki, H. & Sekiguchi, M. (1995) Functional cooperation of MutT, MutM and MutY proteins in preventing mutations caused by spontaneous oxidation of guanine nucleotide in *Escherichia coli*. *Mutat. Res.*, 336: 257 - 267.

Todaro, G.J. & Green, H. (1963) Quantitative studies of the growth in mouse embryo cells in culture and their development into established lines. *J. Cell. Physiol.* 17: 299 - 313.

Tougaard, P., Chantot, J.F. & Guschlbauer, W. (1973) Nucleoside conformations: X. An X-Ray fiber diffraction study of the gels of guanine nucleosides. *Biochim. Biophys. Acta*, 308: 9 - 16.

Toyokuni, S., Okamoto, K., Yodoi, J. & Hiai, H. (1995) Persistent oxidative stress in cancer. *FEBS Lett.*, 358: 1 - 3.

Toyokuni, S., Tanaka, T., Hattori, Y., Nishiyama, Y., Yoshida, A., Uchida, K., Hiai, H., Ochi, H. & Osawa, T. (1997) Quantitative immunohistochemical determination of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine by a monoclonal antibody

N45.1: Its application to ferric nitrilotriacetate-induced renal carcinogenesis model. *Lab. Invest.* 76: 365 - 374.

Uppu, R. M., Cueto, R., Squadrito, G. L. , Salgo, M. G. & Pryor, W. A. (1996) Competitive reactions of peroxyxynitrite with 2'-deoxyguanosine and 7,8-dihydro-8-oxo-2'-deoxyguanosine (8-oxodG): relevance to the formation of 8-oxodG in DNA exposed to peroxyxynitrite. *Free Rad. Biol. Med.* 21: 407 - 411.

Usuda, Y., Kawasaki, H., Shimaoka, M. & Utagawa, T. (1997a) Characterization of guanosine kinase from *Brevibacterium acetylicum* ATCC 953. *Biochim. Biophys. Acta* 1341: 200 - 206.

Usuda, Y., Kawasaki, H., Shimaoka, M. & Utagawa, T. (1997b) Molecular cloning and transcriptional analysis of a guanosine kinase gene of *Brevibacterium acetylicum* ATCC 953. *J. Bacteriol.* 179: 6959 - 6964.

Von Sonntag, C. (1987) The chemical basis of radiation biology. London: Taylor & Francis.

Weinberg, R.A. (1989) Oncogenes, antioncogenes, and the molecular bases of multistep carcinogenesis. *Cancer Res.*, 49: 3713 - 3721.

Wicker, L., Boltz Jr, R.C., Nichols, E.A., Miller, B.J., Sigal, N.H. & Peterson, L.B. (1987) Large, activated B cells are the primary B-cell target of 8-bromoguanosine and 8-mercaptoguanosine. *Cell. Immunol.*, 106: 318 - 329.

Wilson, A.P. (1986) Cytotoxicity and viability assays em R.I. Freshney (Ed.) Animal cell culture - a practical approach. IRL Press, Washington DC, pp 183 - 216.

Wood, M.L., Dizdaroglu, M. Gajewski, E. & Essigmann, J.M. (1990) Mechanistic studies of ionizing radiation and oxidative mutagenesis: Genetic effects of a single 8-hydroxyguanine (7-hydro-8-oxoguanine) residue inserted at a unique site in a viral genome. *Biochemistry*, 29: 7024 - 7032.

Zady, M.F. & Wong, J.L. (1977) Kinetics and mechanism of carbon-8 methylation of purine bases and nucleosides by methyl radical. *J. Am. Chem. Soc.* 99: 5096 - 6002.