

A IMPORTÂNCIA DA DETERMINAÇÃO ANALÍTICA DE INTERMEDIÁRIOS REATIVOS E DE SEUS PRODUTOS DE REAÇÕES COM BIOMACROMOLÉCULAS: UMA MINI REVISÃO

Eline S. Gonçalves, Juliana M. Bastos da Silva, Thelma Pavesi e Josino C. Moreira

Fundação Oswaldo Cruz, Avenida Brasil, 4365, Manguinhos, 21040-360 Rio de Janeiro – RJ, Brasil

Recebido em 25/06/2013; aceito em 09/10/2013; publicado na web em 14/11/2013

IMPORTANCE OF ANALYTICAL DETERMINATION OF REACTIVE INTERMEDIATES AND THEIR REACTION PRODUCTS WITH BIOMACROMOLECULES: A MINI REVIEW. Metabolic reactive intermediates can react with biomolecules such as DNA and proteins to produce adducts. Recently, research has shown that such adducts can act as precursors of some chronic diseases (cancer, Parkinson's, immunologic system diseases, etc.), and their determination is important because they are biomarkers of undesirable health effects. These compounds are produced at very low concentrations, but the development and dissemination of sensitive new analytical tools, especially those based on chromatography coupled to other analytical instruments, make such determinations possible. This mini review is focused on the formation of reactive intermediates, their reaction with biomolecules, and the importance of their determination.

Keywords: DNA adduct determination; early biologic effects biomarkers; metabolic reactive intermediates.

INTRODUÇÃO

Algumas reações idiossincráticas e várias doenças têm sido relacionadas a produtos do metabolismo de xenobióticos pelo organismo. Os xenobióticos são substâncias químicas alheias ao sistema biológico com as quais o homem tem contato, tais como medicamentos, produtos industriais, alimentos, pesticidas, cosméticos, poluentes, etc. De fato, o homem tem sido exposto a um número continuamente crescente destas substâncias como resultado do desenvolvimento científico, tecnológico e industrial, seja a partir dos alimentos, do ambiente ou mesmo de procedimentos terapêuticos.¹

Por serem substâncias estranhas ao organismo e para prevenir qualquer tipo de dano que eventualmente podem causar, o organismo precisa transformá-las em formas atóxicas e/ou eliminá-las, e para isto, possuem uma série de sistemas enzimáticos capazes de metabolizá-las, por meio de reações bioquímicas. Este mecanismo é particularmente importante quando os xenobióticos apresentam características lipofílicas, já que tendem a se acumular nos tecidos gordurosos e são mais dificilmente excretados pelo organismo. Ou seja, ter-se-ia um processo de bioacumulação destas substâncias e os consequentes efeitos que pode trazer aos organismos.¹

Em geral, o metabolismo tende a produzir substâncias mais hidrossolúveis e menos reativas que as moléculas originais, facilitando sua eliminação e diminuindo o risco de agravos à saúde. Entretanto, nem sempre isto é verdade, como será discutido a seguir.

METABOLISMO DE XENOBIÓTICOS E A FORMAÇÃO DE INTERMEDIÁRIOS REATIVOS

Os processos metabólicos podem ser considerados como se ocorressem em duas fases: fases I e II (eventualmente considera-se uma fase adicional, a fase III que corresponderia a exclusão do xenobiótico não metabolizado para fora das células diminuindo sua concentração intracelular).²

Na fase I, sob a ação de cerca de 10 famílias enzimáticas oxidantes, redutoras (ação sobre grupos azo e nitro) ou hidrolíticas (hidrólise de ésteres e amidas), grupos funcionais como –OH, –NH₂, –SH ou –COOH são expostos ou introduzidos nas moléculas xenobióticas,

facilitando a excreção, mas geralmente aumentando a reatividade dos produtos resultantes.

Embora a função principal do metabolismo seja a de detoxificação, ou seja, de eliminação dos agentes tóxicos contaminantes, em algumas situações os xenobióticos podem ser bioativados, principalmente por enzimas da fase I. Nestas circunstâncias são formadas substâncias eletrofílicas capazes de sofrerem processos de redução que resultam na formação de radicais livres, além da reação com uma série de nucleófilos endógenos, dentre os quais proteínas, DNA e RNA, formando adutos. Inclusive, as próprias enzimas atuantes na fase I do metabolismo podem ser inativadas por reações de conjugação deste tipo.³ O Quadro 1 apresenta alguns exemplos de grupos funcionais comumente presentes nos xenobióticos, bem como os grupos reativos, resultantes de seus metabolismos enzimáticos.

Eletrófilos e espécies oxigenadas reativas são também normalmente formados pelo metabolismo celular e, assim como os metabólitos reativos, podem danificar as células e, desta forma, suas concentrações devem ser rigidamente controladas para se evitar efeitos indesejados.⁴

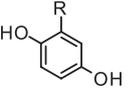
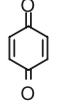
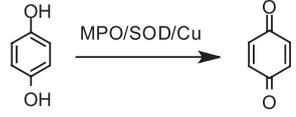
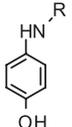
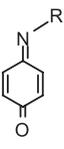
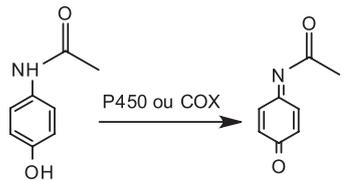
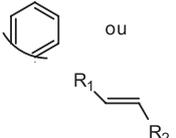
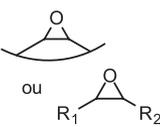
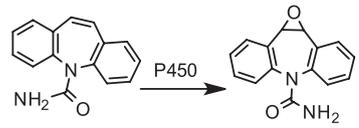
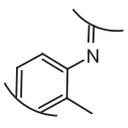
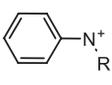
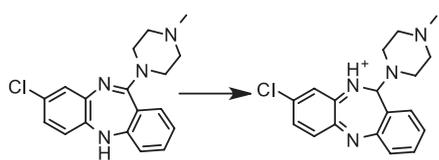
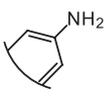
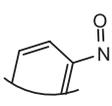
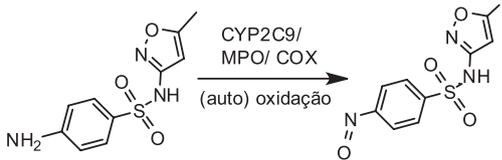
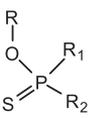
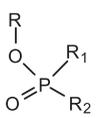
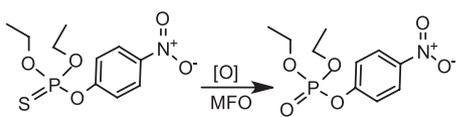
Vários exemplos de bioativação são bem conhecidos, como aquele responsável pela toxicidade de pesticidas organofosforados e carbamatos a partir do qual ocorre a formação de oxons-análogos resultantes da desulfuração oxidativa de suas moléculas e que são capazes de reagirem com as colinesterases; ou ainda, a formação de epóxidos durante o metabolismo de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos capazes de reagirem com DNA ou biomoléculas (vide Quadro 1).

Na fase II (fase de conjugação) outros sistemas enzimáticos catalisam a conjugação desses metabólitos reativos com moléculas mais polares inativando-os e facilitando suas excreções por meio da bile ou da urina. Entretanto, produtos bioativados podem ser também resultantes desta fase. Em geral, três tipos de reações na fase II podem ser capazes de originarem produtos tóxicos: a produção de um conjugado reativo, a ativação dos conjugados enzima-metabólito e a liberação do metabólito reativo original.⁵⁻⁹

As principais reações que acontecem nesta fase são a sulfatação (grupos hidroxila e amina ligados a aromáticos e alcoóis), a metilação (grupos hidroxila ligados a aromáticos, aminas primárias e secundárias, tiol), a glicuronização (grupos hidroxila, carboxila, carbonila, amina primária e secundária, tiol), a acetilação (aminas

*e-mail: elinesg@gmail.com

Quadro 1. Exemplos de grupos funcionais frequentemente encontrados em moléculas de xenobióticos e seus respectivos produtos de metabolismo (grupos reativos) envolvidos em formação de adutos

Grupo Funcional	Grupo Reativo	Exemplo	Ref.
 Hidroquinona	 Quinona		67
 Amina Aromática Secundária	 Imino-quinona		68
 Hidrocarbonetos monoaromáticos ou insaturados	 Epóxido		69 e 70
 Azaheterocíclicos fundidos	 Íon Nitrênio		71
 Amina Aromática	 Nitroso		70 e 72
 Tion	 Oxon		73

Siglas: **COX**: Ciclo Oxigenase; **GSH**: Glutaciona; **HRP**: Peroxidase de Raiz Forte; **MPO**: Mieloperoxidase; **SOD**: Superóxido Desmutase.

aromáticas e alifáticas, hidrazidas e sulfonamidas) e a conjugação com glutaciona (epóxidos e haletos orgânicos) ou aminoácidos, as quais ocorrem com a participação das enzimas sulfotransferases (SULT), metiltransferases (MT), N-acetiltransferases (NAT), glutaciona-S-transferase (GST), uridina-5-difosfo α -D-glucurônico transferases (UDP-transferases), respectivamente.¹

As duas fases dos processos metabólicos devem atuar de maneira sincronizada. Um excelente artigo de revisão destes processos foi elaborado por Liska e colaboradores (2006).¹⁰ Assim, quando a indução da atividade enzimática de uma das fases ocorre sem que haja co-indução da fase subsequente, os produtos intermediários do metabolismo podem se acumular no organismo e/ou reagirem com biomoléculas como o DNA, o RNA ou proteínas podendo causar impactos sobre o organismo. Estas reações ocorrem por mecanismos de substituição ou de adição, e envolvem a doação de um par de elétrons pelo nucleófilo e a consequente formação de ligação covalente.^{11,12}

O conceito de ácidos e bases duros e macios de Pearson tem sido bastante utilizado para a previsão qualitativa destes tipos de reações.^{11,12} Embora estes conceitos sejam de importância na previsão

reacional, a reatividade de um grupo é consequência não apenas de suas características de dureza/maciez, mas também é função de fatores estéricos e eletrônicos dependentes da estrutura terciária das proteínas (nucleófilos).^{11,13}

Os intermediários reativos reagem com sítios nucleofílicos das proteínas como os grupos amina terminal, tiol (cisteína), imidazol (histidina), amino e guanidino, grupos de lisina e arginina, carboxila de ácido aspártico e glutâmico e anel aromático da tirosina.¹¹ No caso do DNA, por exemplo, os principais sítios de alquilação são os átomos de N e O (N³ da adenina e N⁷ e O da guanina) sendo que o N¹ e N⁷ da adenina, os N³ da citosina e da guanina e O da timina podem ser igualmente utilizados.¹⁴ Ao todo existem 18 possibilidades de ataque à molécula do DNA.¹⁵ Um exemplo de um destes processos, representando esquematicamente a ativação metabólica da Aflatoxina B₁ pelo sistema CYP 450 e a subsequente reação de um de seus metabólitos reativos (AFB₁ 8,9-epóxido) com o sítio N⁷ da guanina da molécula de DNA, pode ser visto na Figura 1.

Estas reações envolvem também co-fatores adquiridos através da dieta e são influenciadas por fatores ambientais.^{2,17} Ou seja, a combinação de todos estes fatores faz com que exista uma grande variação

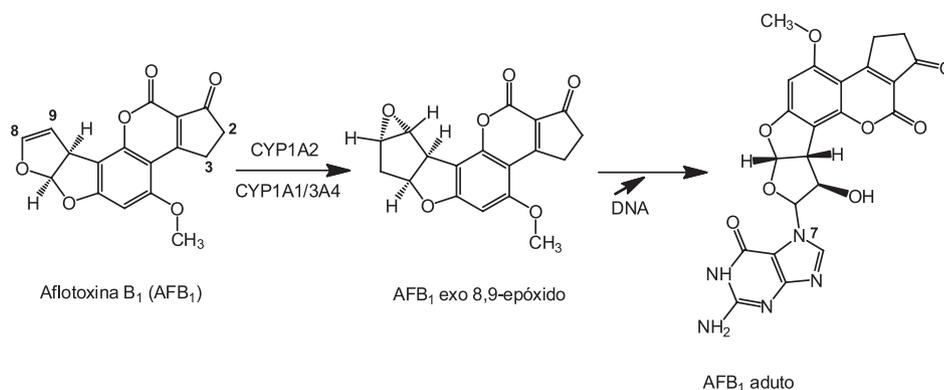


Figura 1. Representação esquemática da ativação metabólica da Aflotoxina B₁ pelo sistema CYP 450 e da reação de seu metabólito reativo (AFB₁, 8,9-epóxido) com o sítio N⁷ da guanina da molécula de DNA (adaptada da ref. 16)

inter-individual nas concentrações de adutos após a exposição a um dado xenobiótico.

Realmente, a literatura científica tem relatado várias associações epidemiológicas entre a eficiência dos sistemas enzimáticos de detoxificação e eliminação de vários xenobióticos e de seus produtos de metabolismo no organismo humano e o desenvolvimento de algumas doenças. Dentre essas doenças podemos citar alguns tipos de câncer, a doença de Parkinson, algumas disfunções do sistema imunológico, agranulocitose, etc.^{2,18}

A fase I do metabolismo tem papel preponderante na formação de metabólitos intermediários reativos, embora, como dito anteriormente, esta atividade não seja exclusiva desta fase. Dentre as enzimas que participam da fase I, os citocromos P450 constituem a superfamília mais importante. Esta superfamília está envolvida na oxidação de mais de cerca de 70% dos xenobióticos.¹⁹

Os CYP 450, que são proteínas contendo grupos heme-tiolato, têm em comum as seguintes propriedades químicas: *i*- habilidade de se ligar e ativar átomos de oxigênio; *ii*- capacidade de se ligar a peróxido de hidrogênio ou peróxidos com a participação da ligação heme-apoproteína e usar um dos oxigênios em monooxigenações.²⁰ A reação geral da catálise pelo CYP 450 é representada na Figura 2, embora exceções sejam conhecidas.²¹ Estudos mais detalhados destes mecanismos são encontrados na literatura.²¹⁻²⁶

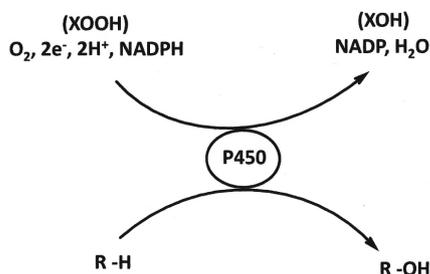


Figura 2. Representação da reação geral do metabolismo com a participação das enzimas do CYP 450 (adaptada da ref. 20)

O estudo do genoma humano revelou a presença de 107 genes P450 dos quais 59 são ativos e 58 pseudogenes, o que demonstra o amplo polimorfismo desta superfamília.^{27,28}

Polimorfos com atividades afins são agrupados em famílias. Dentro dos CYP 450 as famílias CYP 1–3 estão relacionadas ao metabolismo de drogas e outros xenobióticos, enquanto as famílias 4, 11, 17, 19 e 21 estão envolvidas no metabolismo de substâncias endógenas como ácidos graxos, esteróis, eicosanóides, ácidos biliares e vitaminas lipossolúveis.²⁸ Excelentes artigos de revisão sobre o polimorfismo da família CYP 450 estão disponíveis.^{19,26-28}

O polimorfismo do sistema citocromo P450 têm sido considerado

como um importante fator para as diferenças interindividuais observadas tanto na eliminação quanto nas respostas humanas e nos riscos de efeitos adversos em diferentes indivíduos.^{26,29}

O metabolismo exibe significativa variabilidade individual e é afetado por aspectos genéticos (polimorfismos), ambientais, idade e gênero, estilo de vida, dieta e estado de saúde (presença de alguma doença).³⁰ Estes fatores podem afetar a toxicidade de um xenobiótico alterando o processo metabólico com um todo, sua taxa de eliminação ou taxa de ativação.¹ Consequentemente, a formação dos intermediários reativos bem como de suas reações com biomoléculas, considerada etapa essencial para efeitos adversos, são igualmente influenciadas por estas variáveis, além da natureza do eletrófilo, sua disponibilidade e o impedimento estérico eventualmente causado pela estrutura terciária das proteínas.³¹

Por outro lado, como as enzimas são codificadas por genes, variações genéticas nestes genes codificadores produzem alterações na expressão, atividade e estabilidade das enzimas por eles codificadas. Dentre estas alterações destacam-se a especificidade pelos substratos e a cinética enzimática. Ou seja, podem existir diferenças individuais nas atividades de uma determinada enzima dentro de um mesmo grupo populacional, como resultado de terem sido expressas por diferentes alelos. A estas diferentes constituições enzimáticas dá-se o nome de polimorfismo.

Sendo assim, considerando-se as possíveis variações individuais no metabolismo, alguns indivíduos podem apresentar maior susceptibilidade a sofrerem efeitos indesejados quando expostos a uma substância, sob as mesmas condições, que outros.

Por exemplo, alguns estudos reportam a relação entre o câncer de próstata e o polimorfismo do citocromo 4501A1, importante enzima de detoxificação da fase I, responsável pela atividade aril-hidroxilase e envolvida no metabolismo de um grande número de substâncias carcinogênicas. Neste caso, dois polimorfos têm sido associados ao câncer: o 3801T>C e o 2455A>G. Entretanto, uma meta-análise dos diversos dados reportados para este estudo encontrou uma correlação positiva (risco aumentado) somente entre os portadores do polimorfo 2455A>G e nenhuma correlação entre aqueles que possuíam o polimorfo 3801T>C, o que demonstra a influência do polimorfismo gênico sobre os efeitos tóxicos de xenobióticos.³²

DETERMINAÇÃO DE METABÓLITOS INTERMEDIÁRIOS REATIVOS COMO BIOINDICADORES

O interesse em se conhecer as relações existentes entre a exposição à xenobióticos, a contaminação humana, seus efeitos sobre a saúde e, particularmente, o porquê de certos organismos serem mais susceptíveis que outros a estes efeitos é bastante antigo, e para isto dispomos de uma série de biomarcadores ou bioindicadores

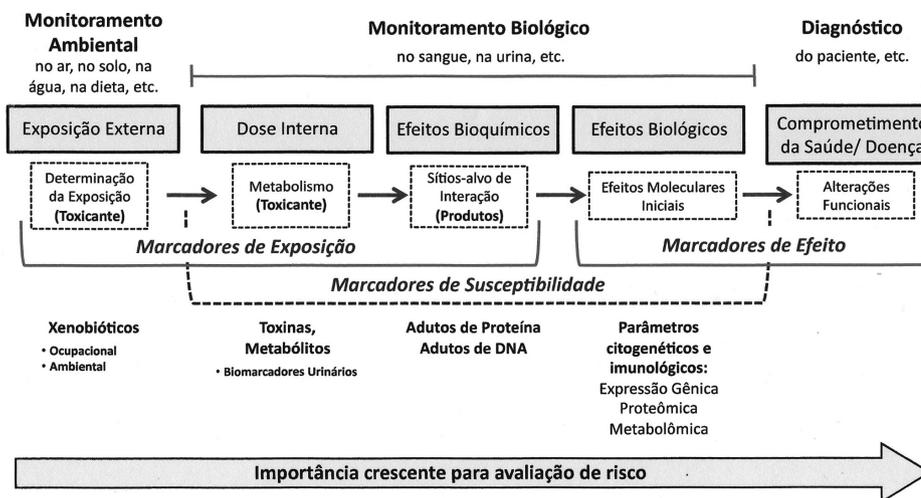


Figura 3. Representação esquemática dos tipos de biomarcadores utilizados no monitoramento biológico (adaptada das refs. 33 e 34)

utilizados para a avaliação de riscos.^{33,34} As principais categorias destes biomarcadores e suas importâncias biológicas relativas são apresentadas na Figura 3.

Até pouco tempo, as avaliações de risco à saúde se baseavam em medidas da concentração do agente tóxico em amostras ambientais coletadas nos locais onde havia exposição humana (indicadores externos) e na determinação das concentrações em fluidos biológicos, principalmente em sangue e urina (indicadores de dose interna). Na urina pode ser determinada tanto a substância não metabolizada quanto os produtos metabolizados. Como por exemplo, a determinação de fenol no caso de exposição a benzeno.

Estas determinações, embora sejam importantes, não mostram com exatidão qual a dose biológica realmente efetiva, ou seja, aquela capaz de atingir os sítios de toxicidade e, conseqüentemente, trazer riscos à saúde.

Considerando-se que para exercer seus efeitos tóxicos, uma determinada substância deve ter acesso às estruturas biológicas sensíveis, pode-se depreender da Figura 3 que existe uma hierarquia entre estes indicadores e, à medida que estes ficam hierarquicamente mais importantes, suas determinações tornam-se mais complexas devido ao aumento da complexidade das amostras e às baixas concentrações relativas presentes concentrações da ordem de pico ou fentogramas.

O desenvolvimento de novas ferramentas analíticas com capacidade de determinarem concentrações compatíveis com aquelas observadas no organismo, associado ao advento das tecnologias resultantes do desenvolvimento da biologia molecular como, por exemplo, a genômica, a proteômica, a transcriptômica e a metabólica (denominadas tecnologias “ômicas”) possibilitaram hoje a realização de análises de material biológico de grande complexidade para a detecção de compostos-alvo nos níveis de concentrações adequados e exatidão aceitável.³⁵

Sendo assim, tornou-se possível a determinação de uma série de metabólitos intermediários reativos, geralmente realizada a partir de seus produtos de reação com biomoléculas, o que tem facilitado o entendimento dos processos toxicológicos, possibilitando, inclusive, um maior entendimento dos fatores determinantes da susceptibilidade individual. Neste contexto, adutos de DNA e de proteínas têm sido utilizados como biomarcadores importantes para estes estudos.

Inúmeros métodos têm sido propostos para a determinação quantitativa de adutos.³⁶⁻⁴³

Sob o ponto de vista analítico, adutos de albumina e de hemoglobina são os mais investigados, pois quimicamente são mais estáveis, já que não sofrem a ação de mecanismos de reparo característicos das moléculas de DNA e acessíveis em quantidades superiores aos

adutos de DNA. Ademais, tem sido observada uma relação de proporcionalidade entre os adutos de hemoglobina e de DNA. A Figura 4 apresenta as concentrações e as estabilidades relativas de metabólitos urinários, adutos de hemoglobina e DNA.

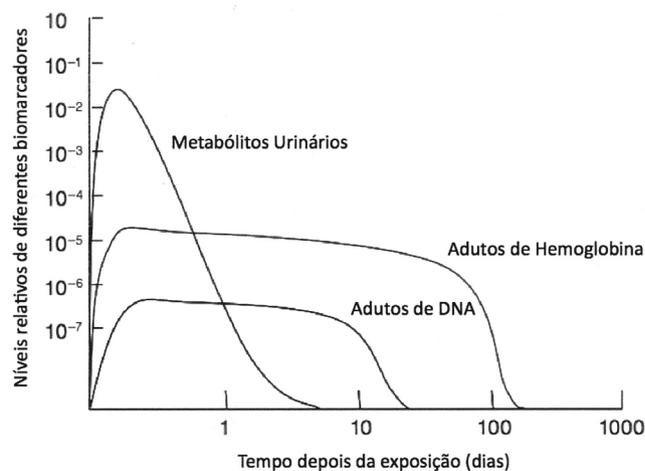


Figura 4. Variação temporal das concentrações relativas de diversos metabólitos e adutos após uma exposição única (adaptada da ref. 17)

Dentre as metodologias analíticas atualmente disponíveis para a determinação quantitativa de adutos três grupos de técnicas se sobressaem: a pós marcação com P32, os imunoenaios e as cromatografias gasosa e líquida (CG e CL), particularmente aquelas associadas à Espectrometria de Massa (EM). A técnica de pós marcação com P32 requer pequena quantidade de DNA (1 - 10 µg) e tem excelente sensibilidade (1 aduto/10¹⁰ nucleotídeos) e versatilidade, mas tem limitações quanto a identificação dos adutos e pode fornecer resultados subestimados. Os imunoenaios (ELISA e RIA) tem boa sensibilidade (1 aduto/10⁸ nucleotídeos), são baratos e facilmente aplicados, mas exigem quantidade de DNA entre 1 – 200 µg e anticorpos produzidos contra adutos específicos. Estas técnicas ainda apresentam problemas de reações-cruzadas com outros adutos. Já as técnicas cromatográficas apresentam excelente sensibilidade (1 aduto por 10⁹ – 10¹¹ nucleotídeos), requerem amostras de 10 a 100 µg de DNA, exigem equipamentos e pessoal especializado e muitas vezes requerem padrões analíticos, mas tem a vantagem de possibilitar a identificação do aduto, de acordo com o método de detecção utilizado. Uma discussão mais aprofundada destas metodologias pode ser encontrada na literatura.^{34,36-38,42}

Dentre as metodologias cromatográficas, aquelas que se baseiam no uso de sistemas de detecção por espectrometria de massa-massa (EM/EM) têm sido recomendadas para a determinação de adutos, notadamente aquelas em que esse sistema esteja acoplado à cromatografia líquida (CL-EM/EM), devido à elevada especificidade, versatilidade e sensibilidade que tem sido obtidas com equipamentos cada vez mais modernos.^{39,42-44} De fato, a CL-EM/EM é uma ferramenta que somente há poucos anos começou a ser empregada por um número representativo de laboratórios bioanalíticos, de modo que estudos relacionados à determinação de adutos e suas correlações com a suscetibilidade individual e doenças humanas ainda são relativamente poucos e devem ser incentivados.^{13,34,36-39,45-65}

Adutos de DNA estão presentes em amostras teciduais em concentrações tão baixas quanto <100 fmol/µgDNA ou <3 adutos/10⁵ nucleotídeos, enquanto os de proteínas são mais abundantes situando-se na faixa de pmol/ml de plasma ou de fmol/mg de proteína.⁶⁶ No caso de adutos de DNA, a maioria dos métodos consegue determinar 1 aduto em 10⁹ nucleotídeos. Entretanto, alguns métodos baseados em detecção por espectrometria de massa associado à cromatografia líquida conseguem medir 1 aduto para cada 10¹² nucleotídeos ou ainda 500 fg (aproximadamente 1 fmol).^{36,39}

Atualmente, é possível determinar adutos de 4-aminobifenil-DNA na bexiga de pacientes cancerosos por CL-EM/EM com limite de detecção de 1 aduto por 10⁹ bases nitrogenadas.⁴⁵

Nos exemplos reportados a seguir é possível observar a versatilidade e a potencialidade desta técnica.

Os adutos de DNA N-(deoxiguanosin-8-il), 2-amino-1-metil-6-fenilimidazol[4,5-b]piridina, 2-amino-9H-pirido[2,3-b]indol, 2-amino-3,8-dimetilimidazo[4,5-f]quinoxalina e 4-aminobifenila, presentes na saliva de fumantes e consumidores de produtos cárneos, foram determinados por CL-EM/EM.⁶¹ O método proposto foi considerado eficiente para a determinação destas moléculas em concentrações de 1-9 adutos a cada 10⁸ bases nitrogenadas. Além disso, a saliva mostrou-se uma matriz útil para este tipo de análise, principalmente, por apresentar uma coleta pouco invasiva.

Os adutos formados entre o DNA e o ácido 8-metoxi-6-nitrofenantro-[3,4-d]-1,3-dioxolo-5-carboxílico, substância potencialmente carcinogênica da família dos nitrofenantrenos e encontrada em preparações a base de *Aristolochia sp.*, foram determinados em tecidos renais em residentes de Taiwan, por CL-EM/EM. Em pacientes humanos foram encontrados valores que se situaram entre 9 e 338 adutos a cada 10⁸ de bases nitrogenadas.⁵⁹

Intermediários reativos de monômeros de vinila (N²,3-Etenoguanina) e DNA foram analisados por CL-EM/EM como base para o entendimento de seu potencial mutagênico e os resultados sugerem que estes adutos contribuem para a carcinogênese desta substância.⁶³

A formação de adutos de DNA por meio de sua reação com acetaldéido em células humanas é reportado.⁶⁵ De acordo com os autores, há formação inequívoca de aduto, o que pode facilitar o entendimento dos processos de carcinogênese por exposição à esta substância.

Substâncias capazes de formarem eteno-adutos com DNA foram determinadas em urina de trabalhadores não expostos para a determinação dos níveis basais destes adutos.⁶⁵

CONCLUSÕES

O entendimento do papel dos adutos na bioquímica dos sistemas biológicos é inegavelmente complexo, mas esta complexidade deve ser encarada como um incentivo ao seu estudo. Isto perpassa a necessidade de se desenvolver metodologias eficientes e para isto, novas ferramentas analíticas já se encontram disponíveis, dentre as quais sobressaem os sistemas EM/EM. Embora o número de

estudos que utilizam a CL-EM/EM esteja crescendo nos últimos anos, ainda há grande necessidade de pesquisas e nota-se que resultados discrepantes têm sido encontrados em estudos relacionando adutos como precursores de efeitos biológicos precoces ou mesmo de doenças tais como os diversos tipos de câncer, arteriosclerose, Alzheimer, diabetes, etc. Entretanto, qualquer que seja o seu papel, o conhecimento do mesmo faz-se necessário para o entendimento dos processos bioquímicos vitais, o que torna esta área altamente atual e atraente. De fato, este conhecimento é necessário e essencial para o entendimento de doenças relacionadas ao seu desenvolvimento, assim como suas prevenções.

REFERÊNCIAS

- Marrs, T. C.; Rimbell, J. A. Em *General and Applied Toxicology*; Ballantyne, B.; Marrs, T. C.; Syversen, T., eds.; Wiley: New York, 2009, ed. 3, vol. 1, p. 89-126.
- Lyska, D.-A. J.; *Altern. Med. Rev.* **1998**, *3*, 187.
- Fontana, E.; Dansette, P. M.; Poli, S. M.; *Curr. Drug Metab.* **2005**, *6*, 413.
- Zhang, Q.; Jingbo, P.; Woods, C. G.; Andersen, M. E.; *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2009**, *237*, 345.
- Glatt, H.; *Chem. Biol. Interact.* **2000**, *129*, 141.
- Huber, P. C.; Almeida, W. P.; Fatima, A.; *Quim. Nova* **2008**, *31*, 1170.
- Jancova, P.; Anzenbacher, P.; Anzenbacherova, E.; *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech Repub.* **2010**, *154*, 103.
- van Bladeren, P. J.; *Chem. Biol. Interact.* **2000**, *129*, 61.
- Hinson, J. A.; Forket, P. G.; *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **1995**, *73*, 1407.
- Liska, D.; Lyon, M.; Jones, D. S.; *Explore* **2006**, *2*, 122.
- LoPachin, R. M.; DiCaprio, A. P.; *Toxicol. Sci.* **2005**, *86*, 214.
- Ho, T.-S.; Ho, H. C.; Hamilton, L. D.; *Chem. Biol. Interact.* **1978**, *23*, 65.
- Rubino, F. M.; Pitton, M.; Di-Fabio, D.; Colombi, A.; *Mass Spectrom. Rev.* **2009**, *28*, 725.
- Tarun, M.; Rusling, J. F.; *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* **2005**, *15*, 295.
- Dipple, A.; *Carcinogenesis* **1995**, *16*, 437.
- Zhou, S.-F.; Wang, B.; Yang, L.-P.; Liu, J.-P.; *Drug Metabolism Reviews* **2010**, *42*, 268.
- Henderson, R. F.; Bechtold, W. E.; Bond, J. A.; Sun, J. D.; *Crit. Rev. Toxicol.* **1989**, *20*, 65.
- Kaddurah-Daouk, R.; Kristal B.S.; Weinshilboum, R. M.; *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2008**, *48*, 653.
- Zhou, S.-F.; Liu, J.-P.; Chowbay, B.; *Drug Metabolism Reviews* **2009**, *41*, 89.
- Anzenbacher, P.; Anzenbacherová, E.; *Cell. Mol. Life Sci.* **2001**, *58*, 737.
- Guengerich, F. P.; *Chem. Res. Toxicol.* **2001**, *14*, 611.
- Masubuchi, Y.; Horie, T.; *Crit. Rev. Toxicol.* **2007**, *37*, 389.
- Masic, L. P.; *Curr. Drug Metab.* **2011**, *12*, 35.
- Hollenberg, P. F.; Kent, U. M.; Bumpus, N. N.; *Chem. Res. Toxicol.* **2008**, *21*, 189.
- Cooper, H. L.; Groves, J. T.; *Arch. Biochem. Biophys.* **2011**, *507*, 111.
- Ingelman-Sundberg, M.; *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **2004**, *369*, 89.
- Singh, D.; Kashyap, A.; Pandey, R. V.; Saini, K.S.; *Drug Discovery Today* **2011**, *16*, 93.
- Guengerich, F. P.; *Chem. Res. Toxicol.* **2008**, *21*, 70.
- Olden, K.; White, S.; *Med. Clin. North Am.* **2005**, *89*, 721.
- Zhang, Z. Y.; Wong, Y. N.; *Curr. Drug Metab.* **2005**, *6*, 241.
- Kalgutkar, A. S.; Gardner, I.; Obach, R. S.; Shaffer, C. L.; Callegari, E.; Henne, K. R.; Mutlib, A. E.; Dalvie, D. K.; Lee, J. S.; Nakai, Y.; O'Donnell, J. P.; Boer, J.; Harriman, S. P.; *Curr. Drug Metab.* **2005**, *6*, 161.

32. Li, H.; Xiao, D.; Hu, L.; He, T.; *Mol. Biol. Rep.* **2012**, *39*, 10273.
33. Gyorfy, E.; Anna, L.; Kovacs, K.; Rudnai, P.; Schoket, B.; *Mutagenesis* **2008**, *23*, 1.
34. Farmer, P. B.; Singh, R.; *Mutat. Res., Rev. Mutat. Res.* **2008**, *659*, 68.
35. Aardema, M.J.; MacGregor, J.T.; *Mutat. Res.* **2002**, *499*, 13.
36. Poirier, M. C.; Santella, R. M.; Weston, A.; *Carcinogenesis* **2000**, *21*, 353.
37. Himmelstein, M. W.; Boogaard, P. J.; Cadet, J.; Farmer, P. B.; Kim, J. H.; Martin, E. A.; Persaud, R.; Shuker, D. E.; *Crit. Rev. Toxicol.* **2009**, *39*, 679.
38. Tarun, M.; Rusling, J. F.; *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* **2005**, *15*, 295.
39. Koivisto, P.; Peltonen, K.; *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, *398*, 2563.
40. Netto, A. D. P.; Moreira, J. C.; Arbilla, G.; Ferreira, L. F. V.; Oliveira, A.S.; Barek, J.; *Quim. Nova* **2000**, *23*, 765; Jarabek, A. M.; Pottenger, L. H.; Andrews, L. S.; Casciano, D.; Embry, M. R.; Kim, J. H.; Julian Preston, R.; Vijayaraj Reddy, M.; Schoeny, R.; Shuker, D.; Skare, J.; Swenberg, J.; Williams, G. M.; Zeiger, E.; *Crit. Rev. Toxicol.* **2009**, *39*, 659.
41. Schmeiser, H. H.; Stiborova, M.; Arlt, V. M.; *Methods Mol. Biol.* **2013**, *1044*, 389; Klaene, J.J.; Sharma, V.K.; Glick, J.; Vouros, P.; *Cancer Letters* **2013**, *334*, 10.
42. Watson, W. P.; Mutti, A.; *Biomarkers* **2004**, *9*, 211.
43. Theodoridis, G.; Gika, H. G.; Wilson, I. D.; *Mass Spectrom. Rev.* **2011**, *30*, 884.
44. Cadet, J.; Douki, T.; Frelon, S.; Sauvaigo, S.; Pouget, J. P.; Ravanat, J. L.; *Free Radical Biol. Med.* **2002**, *33*, 441.
45. Zayas, B.; Stillwell, S. W.; Wishnok, J. S.; Trudel, L. J.; Skipper, P.; Yu, M. C.; Tannenbaum, S. R.; Wogan, G. N.; *Carcinogenesis* **2007**, *28*, 342.
46. Sorensen, M.; Autrup, H.; Moller, P.; Hertel, O.; Jensen, S. S.; Vinzents, P.; Knudsen, L. E.; Loft, S.; *Mutat. Res., Rev. Mutat. Res.* **2003**, *544*, 255.
47. Metz, T. O.; Zhang, Q.; Page, J. S.; Shen, Y.; Callister, S. J.; Jacobs, J. M.; Smith, R. D.; *Biomark. Med.* **2007**, *1*, 159.
48. Liebler, D. C.; *Chem. Res. Toxicol.* **2006**, *19*, 610.
49. Bonassi, S.; Neri, M.; Puntoni, R.; *Mutat. Res., Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* **2001**, *480*, 349.
50. McHale, C. M.; Zhang, L.; Smith, M. T.; *Carcinogenesis* **2012**, *33*, 240.
51. Blair, I. A.; *Biomed. Chromatogr.* **2010**, *24*, 29.
52. Angerer, J.; Ewers, U.; Wilhelm, M.; *Int. J. Hyg. Environ. Health* **2007**, *210*, 201.
53. Yoon, S.; Han, S. S.; Rana, S. V.; *J. Environ. Biol.* **2008**, *29*, 1.
54. Zhu, M.; Ma, L.; Zhang, H.; Humphreys, W. G.; *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 8333.
55. Baillie, T. A.; Pearson, P. G.; Rashed, M. S.; Howald, W. N.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1989**, *7*, 1351.
56. Hoos, J. S.; Damsten, M. C.; de Vlieger, J. S.; Commandeur, J. N.; Vermeulen, N. P.; Niessen, W. M.; Lingeman, H.; Irth, H.; *J. Chromatogr. B* **2007**, *859*, 147.
57. Ma, S.; Subramanian, R.; *J. Mass Spectrom.* **2006**, *41*, 1121.
58. Tang, W.; Abbott, F. S.; *Chem. Res. Toxicol.* **1996**, *9*, 517.
59. Person, M. D.; Monks, T. J.; Lau, S. S.; *Chem. Res. Toxicol.* **2003**, *16*, 598.
60. Fisher, A. A.; Labenski, M. T.; Malladi, S.; Gokhale, V.; Bowen, M. E.; Milleron, R. S.; Bratton, S. B.; Monks, T. J.; Lau, S. S.; *Biochemistry* **2007**, *46*, 11090.
61. Bessette, E. E.; Spivack, S. D.; Goodenough, A. K.; Wang, T.; Pinto, S.; Kadlubar, F. F.; Turesky, R. J.; *Chem. Res. Toxicol.* **2010**, *23*, 1234.
62. Yun, B. H.; Rosenquist, T. A.; Sidorenko, V.; Iden, C. R.; Chen, C. H.; Pu, Y. S.; Bonala, R.; Johnson, F.; Dickman, K. G.; Grollman, A. P.; Turesky, R. J.; *Chem. Res. Toxicol.* **2012**, *25*, 1119.
63. Mutlu, E.; Collins, L. B.; Stout, M. D.; Upton, P. B.; Daye, L. R.; Winsett, D.; Hatch, G.; Evansky, P.; Swenberg, J. A.; *Chem. Res. Toxicol.* **2010**, *23*, 1485.
64. Garcia, C. C.; Angeli, J. P.; Freitas, F. P.; Gomes, O. F.; de Oliveira, T. F.; Loureiro, A. P.; Di Mascio, P.; Medeiro, M. H.; *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 9140.
65. Gonzalez-Reche, L. M.; Koch, H. M.; Weiss, T.; Müller, J.; Drexler, H.; Angerer, J.; *Toxicol. Lett.* **2002**, *134*, 71.
66. Peng, T.; Li, L. Q.; Peng, M. H.; Liu, Z. M.; Liu, T. W.; Yan, L. N.; Shen, H. M.; Wang, Q.; Wang, K. B.; Liang, R. X.; Wei, Z. L.; Ong, C. N.; Santella, R. M.; *Cancer Sci.* **2007**, *98*, 140.
67. Smith, M. T.; *Environ. Health Perspect.* **1996**, *104*, 1219.
68. Bessems, J. G.; Vermeulen, N. P.; *Crit. Rev. Toxicol.* **2001**, *31*, 55.
69. Bu, H. Z.; Zhao, P.; Dalvie, D. K.; Pool, W. R.; *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2007**, *21*, 3317.
70. Park, B. K.; Pirmohamed, M.; Tingle, M. D.; Madden, S.; Kitteringham, N. R.; *Toxicol. In Vitro* **1994**, *8*, 613.
71. Gardner, I.; Leeder, J. S.; Chin, T.; Zahid, N.; Utrecht, J. P.; *Mol. Pharmacol.* **1998**, *53*, 999.
72. Sanderson, J.P.; Naisbitt, D.J.; Farrell, J.; Ashby, C.A.; Tucker, M. J.; Rieder, M. J.; Pirmohamed, M.; Clarke, S.E.; Park, K.; *J. Immunol.* **2007**, *178*, 5533.
73. Fukuto, T. R.; *Environ. Health Perspect.* **1990**, *87*, 245.