

**BC/12973**

**IB/80488**

80488

0



ACÇÃO TÓXICA DA ESTREPTOZOTOCINA EM CULTURAS  
CELULARES DE MAMÍFEROS

Este exemplar corresponde à redacção final da tese defendida pela candidata Maria Silvia Capucci e aprovada pela Comissão Julgadora.

*M. Hoffmann*  
17/05/90

MARIA SÍLVIA CAPUCCI

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. MARIA EDWIGES HOFFMANN

9100307

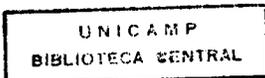
Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, Área de concentração: Genética.

CAMPINAS - SP

1990.

T/UNICAMP

C175<sub>a</sub>



CLASSIF.	T
AUTOR.	C. 175a
A.	EX
COMBO BCI	12973
	I.B. 963

CM-00010816-0

Aos meus pais,  
pelo meu reconhecimento,  
e à Alejandra,  
pela grande amizade e apoio.

## AGRADECIMENTOS

Quero expressar meus agradecimentos às pessoas e instituições que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho, em especial:

À Profª Drª. Maria Edwiges Hoffmann, pela amizade e orientação.

À Profª Drª. Yoko R. Bomura, Prof. Dr. Carlos F. Menck e Prof. Dr. Renato Bonatelli pela análise prévia deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Aquiles Piedrabuena, pela disponibilidade e auxílio na parte estatística.

À Profª. Drª. Marcela Haun e Profª. Denise V. Macedo, pela amizade e apoio.

Ao Prof. Dr. Aníbal E. Vercesi pela grande colaboração prestada nos estudos mitocondriais.

Aos colegas de laboratório pelos bons momentos compartilhados.

Aos funcionários do Departamento de Bíoquímica, pela colaboração.

À Dona Maria Alice, que, com sua atenção e dedicação ao laboratório, permitiu a realização deste e de todos os nossos trabalhos.

Aos amigos Cristina Cavallaro e Paulo Mazzafera, pelas colaborações prestadas.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de Mestrado como também à Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) pela concessão da bolsa de Incentivo Acadêmico.

## ÍNDICE

I.	INTRODUÇÃO .....	01
II.	OBJETIVOS .....	19
III.	MATERIAIS E MÉTODOS .....	21
1.	CÉLULAS: CULTIVOS E LINHAGENS .....	21
2.	TRATAMENTOS COM AGENTES ALQUILANTES .....	22
3.	MEDIDAS DE EFICIÊNCIA DE PLAQUEAMENTO E SOBREVIVÊNCIA CELULAR .....	22
4.	MEDIDAS DE TAXA DE SÍNTESE DE DNA .....	24
5.	MEDIDAS DE ADAPTAÇÃO DE CÉLULAS DE MAMÍFEROS AO TRATAMENTO COM STZ E MNU .....	25
5.1	MEDIDAS DE ADAPTAÇÃO À INIBIÇÃO DE SÍNTESE DE DNA .....	26
5.2	MEDIDAS DE ADAPTAÇÃO AO EFEITO LETAL .....	27
6.	ESTUDO DE FUNÇÕES MITOCONDRIAIS EM CÉLULAS V79 TRATADAS COM AGENTES ALQUILANTES .....	28
6.1	DETERMINAÇÃO DOS EFEITOS DE STZ E MNU SOBRE O TRANSPORTE DE Ca <sup>++</sup> POR MITOCÔNDRIAS "IN SITU" .....	29
6.2	DETERMINAÇÃO DOS EFEITOS DE STZ E MNU SOBRE O CONSUMO DE OXIGÊNIO POR MITOCÔNDRIAS "IN SITU" .....	30
7.	APARELHOS .....	30
8.	REAGENTES .....	31
IV.	RESULTADOS .....	33
1.	SOBREVIVÊNCIA DE CÉLULAS V79 TRATADAS COM STZ E MNU .....	33

2.	ACÇÃO DA STZ E MNU SOBRE A REPLICAÇÃO DO DNA DE CÉLULAS V79.....	33
3.	CINÉTICA DE RECUPERAÇÃO EM CÉLULAS V79 TRATADAS COM STZ.....	34
4.	INDUÇÃO DE ADAPTAÇÃO EM CÉLULAS V79 EXPOSTAS À STZ.....	34
5.	INDUÇÃO DE ADAPTAÇÃO EM CÉLULAS V79 EXPOSTAS À MNU.....	36
6.	EFEITO DE PRÉ-TRATAMENTOS NA SOBREVIVÊNCIA DE CÉLULAS V79 EXPOSTAS À STZ.....	38
7.	ESTUDOS DE FUNÇÕES MITOCONDRIAIS EM CÉLULAS V79 EXPOSTAS À STZ E MNU.....	42
V.	DISCUSSÃO.....	45
1.	ESTUDOS DE MECANISMOS DE TOLERÂNCIA E ADAPTAÇÃO EM CÉLULAS V79 TRATADAS COM STZ E MNU.....	45
2.	ESTUDOS DE MECANISMOS DA CITOTOXICIDADE DA STZ E MNU.....	53
VI.	RESUMO.....	63
VII.	SUMMARY.....	65
VIII.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67

## I. INTRODUÇÃO

A estreptozotocina (STZ) é um agente alquilante monofuncional amplamente utilizado na indução de diabete em animais de laboratório (RAKIETEN e col, 1963; DULIN & WYSE, 1969; WILSON e col, 1984 e TUCH e col. 1989).

Já há alguns anos nosso laboratório vem se dedicando ao estudo da ação de drogas diabetogênicas em modelos experimentais (EIZIRICK e col, 1986).

Resultados anteriores obtidos em nosso laboratório evidenciaram a ação tóxica da STZ em cultura celular humana (EIZIRIK e col, 1986). Experimentos paralelos realizados com animais e com células humanas apresentaram resultados semelhantes quanto à toxicidade do agente, evidenciando a validade da utilização de culturas celulares como modelo de estudo da ação tóxica de agentes diabetogênicos.

A elucidação dos mecanismos pelos quais a STZ exerce seus efeitos tóxicos não consiste em um mero interesse acadêmico. Este agente pertence ao grupo de compostos N-nitrosos, comumente encontrados em poluentes ambientais e cuja habilidade em alterar a

molécula de DNA tem sido bem documentada (MASIELLO e col, 1981; BENNET & PEGG, 1981; SINGER, 1982; TJALVE, 1983; Le DOUX e col, 1986 e WILSON e col, 1988).

Vários experimentos foram aqui realizados na busca de uma correlação entre os mecanismos através dos quais as células lidam com as lesões induzidas por STZ e aqueles responsáveis por sua ação tóxica e diabetogênica.

#### 1. ESTREPTOZOTOCINA: AÇÃO SOBRE A MOLÉCULA DE DNA

A STZ é o produto resultante da fermentação do fungo *Streptomyces achromogenes* e foi isolada por VAVRA e col em 1959, consistindo em uma nitrosouréia ligada ao C2 da glicose (HERR e col, 1967) (Figura 1A). Esse composto foi inicialmente desenvolvido como um antibiótico e mostrou boa atividade contra uma ampla gama de bactérias (LEWIS & BARBIERS, 1959). Estudos subsequentes mostraram uma atividade antitumoral da droga em tumores de roedores (EVANS e col, 1965). A STZ mostrou, então, ser uma potente toxina para células beta de pâncreas de roedores e animais superiores (RAKIETEN e col, 1963 e SCHEIN e col, 1967), apresentando também uma atividade oncogênica em rins (ARISON & FENDALE, 1967 e RAKIETEN e col, 1968) e ilhotas pancreáticas de ratos (RAKIETEN e col, 1971).

B



A

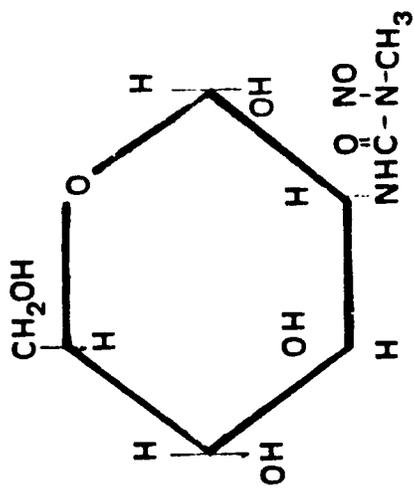


FIGURA 1: ESTRUTURA QUÍMICA DA ESTREPTOZOTOCINA (A) E SEU ANÁLOGO NÃO DIABETOGENICO, METILNITROSOUREIA (B).

Baseando-se nos fatos de que a STZ apresentava uma atividade antitumoral em roedores e uma toxicidade específica para ilhotas pancreáticas, o uso da substância para o tratamento de tumores pancreáticos no homem foi logo iniciado e persiste até hoje (BRODER e col, 1973; Du PRIEST e col, 1975 e BUKOWSKI e col, 1987).

Já na década de 70, RERUP (1970) apontou a STZ como agente de ação cancerígena e altamente diabetogênica. A ação da STZ é, portanto, marcadamente específica para células beta de pâncreas (JOHANSSON & TJALVE, 1978; TJALVE e col, 1976; TJALVE, 1983; MASIELLO e col, 1981 e ANDERSON e col, 1988). Seu forte acúmulo nas células pancreáticas pode ser verificado imediatamente após a administração do agente, indicando que a STZ captada apresenta-se metabolicamente inalterada (JOHANSSON & TJALVE, 1978).

O mecanismo pelo qual a STZ é captada seletivamente em ilhotas pancreáticas não é ainda conhecido em detalhes. O fato de análogos não metabolizáveis de glicose deprimirem os efeitos da STZ parece indicar que o anel de glicose presente em sua estrutura química está relacionado à sua alta afinidade com o tecido pancreático (DULIN & WYSE, 1969; ROSSINI e col, 1977 e Le DOUX e col, 1986).

Algumas observações têm demonstrado que, após a administração de MNU, análogo aglicônico da STZ, ocorrem danos em células beta de roedores, tanto "in vivo" (WILANDER & GUNNARSSON, 1975) como "in vitro" (GUNNARSSON e col, 1974). Portanto, conclue-se

que, embora o resíduo de glicose presente na estrutura química da STZ não seja absolutamente necessário na indução dos danos celulares, ele parece estar fortemente relacionado à especificidade da ação tóxica da STZ para células beta, atuando como um veículo de contato ou carreador do agente frente à membrana plasmática dessas células.

Apesar dos efeitos carcinogênico e diabetogênico da STZ serem conhecidos há bastante tempo (RAKIETEN e col, 1963) o mecanismo de ação dessa substância não está ainda esclarecido, sendo várias as hipóteses propostas: a) geração de espécies ativadas de oxigênio; b) inibição de enzimas do mecanismo de defesa contra espécies ativadas de oxigênio; c) ação alquilante direta da droga sobre o DNA. Alguns estudos têm mostrado que sequestradores de ânion superóxido, como a enzima superóxido dismutase (ROBBINS e col, 1980) e sequestradores de radical hidroxila, como 1-1 dimetiluréia (SANDLER & ANDERSON, 1982), diminuem os efeitos tóxicos da STZ.

Estudos de CROUSH e col (1981) mostraram diminuição dos níveis de superóxido dismutase em células beta expostas à STZ, possibilitando o acúmulo intracelular de radicais livres de oxigênio tóxicos para as células (ROBBINS e col, 1980). A possível ação da STZ através da geração de radicais livres tem sido questionada por vários autores (UCHIGATA e col, 1982; WILSON e col, 1984 e ELZIRIK e col, 1986).

Recentemente, entretanto, foi sugerido que a STZ espontaneamente se decompõe para formar íons carbônio que alquilam bases do DNA (BENNET & PEGG, 1981; TJALVE, 1983 e Le DOUX e col, 1986) (Figura 2).

É conhecido que a alquilação de bases do DNA leva à formação de quebra das ligações fosfodiester desta macromolécula (Le DOUX e col, 1986, 1988). Um dos modelos de mecanismos de ação tóxica da STZ mais aceito na atualidade propõe que o evento letal para as células é o esgotamento do NAD intracelular, o qual é utilizado como substrato da enzima poli-ADP-ribose sintetase, ativada pela formação das quebras de DNA (GUNNARSSON e col, 1974; OKAMOTO, 1981; UCHIGATA e col, 1982; WILSON e col, 1984; OKAMOTO, 1985; Le DOUX e col, 1986, 1988; ANDERSSON e col, 1988 e SANDLER & SWENNE, 1989).

De fato, alguns estudos têm demonstrado que inibidores de poli-ADP-ribosilação, como nicotinamida e seus derivados, minorizam o efeito tóxico da STZ em células beta "in vivo" (DULIN & WYSE, 1969) e "in vitro" (YAMAMOTO e col, 1981; SANDLER e col, 1983 e Le DOUX e col, 1988).

Por outro lado, foi proposto também que a nicotinamida, precursor da molécula de NAD, pode ser metilada e formar N-metilnicotinamida, que já não atua como precursor daquela molécula (SCHOENTHAL, 1976).

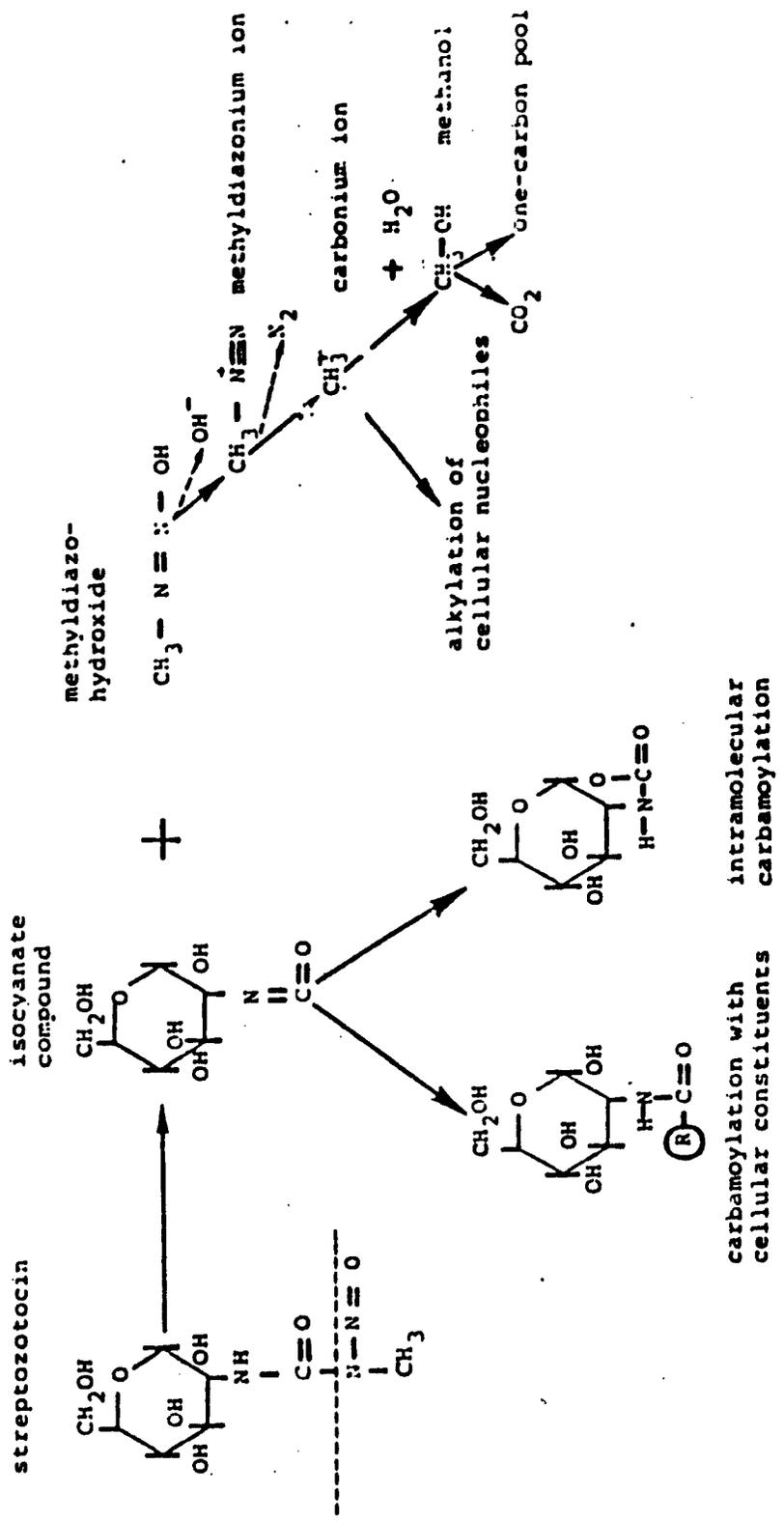


FIGURA 2: PROVÁVEL VIA METABÓLICA DA ESTREPTOZOTOCINA.  
 A linha pontilhada na molécula de estreptozotocina indica o sítio inicial de decomposição (TJALVE, 1983).

A possibilidade da molécula de nicotinamida funcionar como aceptor de grupo metil proveniente da STZ foi testada e um pequeno nível de metilação foi detectado (JOHANSSON-BRITTEBO & TJALVE, 1979). Tem sido considerado improvável, no entanto, que este seja o principal mecanismo pelo qual a STZ afeta o metabolismo do NAD.

## 2. LESÕES INTRODUZIDAS NO DNA POR AGENTES ALQUILANTES

Os agentes alquilantes são potentes mutagênicos e carcinogênicos, induzindo diversos efeitos biológicos que incluem aberrações cromossômicas, troca entre cromátides irmãs, mutações de ponto e morte celular (NATARAJAN e col, 1984). Estes agentes, muitos dos quais aparecem como mutagênicos ambientais, atuam através de interações com regiões nucleofílicas de macromoléculas orgânicas (ROBERTS, 1978; SINGER & KUSMIEREK, 1982; PATERSON & GENTNER, 1984; SAFFHILL e col, 1985 e THIELMANN, 1988).

A natureza química, a taxa relativa e as características metabólicas dos produtos de reação formados no DNA pela ação dos agentes alquilantes têm sido objeto de intensa investigação na última década (RAJALAKSHMI e col, 1982; LINDAHL, 1982; SAFFHILL e col, 1985 e THIELMANN, 1988).

A interação dos agentes alquilantes com a molécula de DNA produz bases alquiladas e fosfotriesteres. SINGER & GRUNBERGER (1983), apresentam uma revisão sobre os produtos de reação destes agentes. Em geral, os nitrogênios pertencentes ao anel das bases são mais nucleofílicos que os oxigênios, sendo o N<sup>7</sup> da guanina e o N<sup>3</sup> da adenina os mais reativos (ROBERTS, 1978). A alquilação do oxigênio pertencente à ligação fosfodiester resulta na formação de fosfotriesteres.

Os chamados agentes alquilantes monofuncionais, como a STZ, possuem um único grupo reativo em sua molécula, e, portanto, interagem covalentemente com um único sítio nucleofílico na molécula de DNA. Os agentes bifuncionais, que possuem dois grupos reativos, são potencialmente capazes de reagir com dois sítios na molécula de DNA (SINGER, 1975; ROBERTS, 1978 e SINGER & KUSMIEREK, 1982). Se estes sítios estão situados na mesma cadeia polinucleotídica o produto de reação é referido como um "cross-link" intracadeia. Se, entretanto, os dois sítios de ligação se encontram em cadeias opostas, formar-se-á o que chamamos de "cross-link" intercadeias. Estas lesões estão relacionadas com o potencial antitumoral de agentes alquilantes (KOHN, 1977), por bloquearem a síntese de DNA e o processo de transcrição.

A lesão N<sup>3</sup>-metiladenina está associada ao processo de morte celular, por bloqueio do processo de replicação do DNA (BOITEUX e col, 1984) enquanto resíduos de O<sup>6</sup>-metilguanina são frequentemente

associados ao processo mutagênico (EVENSEN & SEEBERG, 1982; LOECHLER e col, 1984; EADIE e col, 1984; MARIANI, 1988 e COUTO, 1989).

Na década de 60 LOVELESS (1969) sugeriu que a alquilação da guanina na posição O<sup>6</sup> alteraria o pareamento com sua base complementar e isso poderia explicar o efeito mutagênico e carcinogênico de agentes alquilantes em ratos. Hoje está bastante claro que o potencial carcinogênico dos agentes alquilantes está estritamente correlacionado com sua habilidade em alquilar átomos de oxigênio na molécula de DNA, particularmente o O<sup>6</sup> da guanina (NEWBOLD e col, 1980; EADIE e col, 1984 e MARIANI, 1988). A presença de O<sup>6</sup>-metilguanina pode ocasionar incorporação incorreta de timidina em oposição à guanina modificada, levando a transições G-C → A-T (ABBOTT & SAFFHILL, 1979; LOECHLER e col, 1984 e MURRAY, 1987).

Durante algum tempo acreditou-se que resíduos de N<sup>7</sup>-metilguanina não eram considerados letais ou mutagênicos por não interferirem com o processo de síntese de DNA "in vitro" ou "in vivo" (LAWLEY & ORR, 1970 e BOITEUX & LAVAL, 1983). Entretanto, recentemente, O'CONNOR e col (1988) mostraram que a metilação do N<sup>7</sup> da guanina leva à formação de sítios apurínicos ou à abertura do anel da guanina, lesões estas potencialmente capazes de induzir morte celular ou mutagênese.

Trabalhos recentes têm mostrado que a ação de vários agentes sobre a molécula de DNA é influenciada pela sequência nucleotídica

vizinha ao sítio lesado (MATTESS e col, 1988). A existência de sequências de DNA específicas (sequências ricas em G-C) que consistem em sítios preferenciais de ação de agentes alquilantes tem sido sugerida por vários autores (DOLAN e col, 1988; MATTESS e col, 1988 e MACK e col, 1988).

O conhecimento dos mecanismos de ação dos agentes alquilantes assim como as respostas celulares a estes mecanismos são de primordial importância por constituírem um dos mais promissores grupos de compostos utilizados em quimioterapia como drogas antitumorais.

### 3. MECANISMOS DE TOLERÂNCIA

Lesões no DNA induzem uma série de respostas fisiológicas. Além de uma imediata mobilização para eliminar a grande carga de lesões, as células exibem uma resposta mais lenta, cuja cinética é compatível com um processo indutível, e que consiste, em última análise, na aquisição de tolerância às lesões remanescentes.

Os chamados sistemas de reparo indutíveis conferem às células uma maior resistência aos efeitos deletérios de mutagênicos químicos e radiações. Em *Escherichia coli* estes sistemas incluem as respostas SOS (WALKER, 1984), a resposta adaptativa a agentes

alquilantes (TEO e col, 1986 e NAKABEPPU & SEKIGUCHI, 1986) e respostas indutivas a lesões por radicais livres no DNA (DEMPLE & HALBROOK, 1982).

### 3.1 RESPOSTAS SOS

A exposição de *E. coli* a agentes que lesam o DNA ou interferem no seu processo de replicação resulta na indução de uma gama de respostas fisiológicas conhecidas como respostas SOS. Essas respostas incluem, dentre outras, um aumento na capacidade de reativação de bacteriófagos irradiados com luz ultravioleta (UV) (reativação Weigle), indução de lise no sistema *E. coli*-fago  $\lambda$ , mutagênese em fago ou mesmo em certos loci da bactéria (WITKIN, 1976) e são devidas à indução de mais de 17 genes conhecidos como *din* ("damage inducible genes") (KENYON & WALKER, 1980).

Aparentemente, o reparo SOS facilita o processo de replicação do DNA em detrimento de fidelidade de cópia, sendo, portanto, mutagênico. Um dos mecanismos das respostas SOS em *E. coli* envolve a chamada síntese translesão, onde há prosseguimento do processo replicativo através das lesões presentes na molécula molde, levando a altos índices mutacionais. O estudo deste sistema de reparo

tem sido alvo de interesse bastante amplo, sendo várias as revisões sobre o assunto (GOTTESMAN, 1981; ECHOLS, 1981; LITTLE & MOUNT, 1982 e WALKER, 1984).

A descoberta da resposta SOS em *E. coli* encorajou a pesquisa por fenômenos análogos em células de mamíferos. Vários trabalhos têm demonstrado a existência do fenômeno de reativação Weigle nessas células (RADMAN, 1980, Das GUPTA & SUMMERS, 1978; SARASIN & HANAWALT, 1978 e CORNELIS e col, 1980), assim como a indução do ciclo lítico de vírus cujo DNA está integrado no genoma celular (HIRSCH & BLACK, 1974). Este processo assemelha-se à indução de pró-fago em bactérias lisogênicas, uma das mais bem caracterizadas respostas SOS.

### 3.2 ESTUDOS DE DOSES PARCELADAS

Vários autores, visando o estudo de respostas indutivas em células de mamíferos têm utilizado experimentalmente protocolos de doses parceladas, nos quais a primeira dose do agente utilizado é relativamente baixa, e, supostamente, atua como estímulo indutor. Uma segunda dose, mais forte, é aplicada após um conveniente intervalo de tempo que permita a ocorrência do processo indutivo.

D'AMBROSIO & SETLOW (1976) observaram que duas doses de radiação UV, separadas por um intervalo de tempo, acarretou em um

menor efeito na taxa de alongação da molécula de DNA, em relação a uma dose única equivalente ao total das doses parceladas.

CHANG e col (1978) mostraram que células V79 expostas a doses fracionadas de radiação UV apresentavam um aumento na capacidade de formação de colônias. O tratamento com cicloheximida entre as duas doses de UV suprimia esse efeito, sugerindo a necessidade de síntese protéica "de novo" para ocorrência do processo indutivo.

FRIEDBERG e col (1980), medindo a incorporação de timidina tritiada, demonstraram um aumento na taxa de síntese de DNA em células tratadas com doses parceladas de radiação UV. Quando fibroblastos humanos em cultura são expostos a baixas doses de radiação UV, há uma inibição da taxa de síntese de DNA seguida de uma recuperação algumas horas depois (VENTURA & MENEHINI, 1984). Quando esta cinética de inibição e recuperação é comparada com a observada em células expostas a doses parceladas, observa-se um aumento significativo na taxa de recuperação (MOUSTACCHI e col, 1979).

MENEHINI e col (1981) sugerem que esse processo de recuperação pode estar relacionado a um mecanismo indutível que, de algum modo, permite à maquinaria de replicação superar bloqueios presentes na molécula de DNA.

Apesar das evidências citadas, a existência de um sistema de reparo indutível em células de mamíferos ainda é discutida, e o assunto constitui matéria de grande interesse na atualidade.

### 3.3 RESPOSTA ADAPTATIVA

O grande interesse no estudo do reparo das lesões de DNA introduzidas por agentes alquilantes deveu-se à descoberta, em *E. coli*, de um sistema de reparo indutível denominado resposta adaptativa, que protegia especificamente contra as lesões ocasionadas por estes agentes (SAMSON & CAIRNS, 1977).

Os estudos de resposta adaptativa são geralmente realizados utilizando-se protocolos de doses parceladas. Assim, o trabalho de JEGGO e col (1977) mostrou que, após trinta minutos de exposição a baixas doses de N-metil-N-nitro-N-nitrosoguanidina (MNNG), bactérias apresentavam resistência aos efeitos letal e mutagênico induzidos por doses altas do mesmo agente.

O fenótipo resistente não era devido a uma simples desintoxicação do agente químico, mas a uma via de reparo indutível que requeria síntese protéica "de novo" (SAMSON & CAIRNS, 1977).

Para remover as lesões 3-metiladenina e 7-metilguanina, as células bacterianas empregam a mesma estratégia usada para excisão de bases anômalas, como a uracila, da molécula de DNA. A ligação base-açúcar é clivada por uma DNA glicosilase, liberando a base alterada e gerando um sítio apurínico ou apirimidínico (HANAWALT e col, 1979; LINDAHL, 1979, 1982 e LEHMANN & KARRAN, 1981) o qual é substrato para a ação de AP endonucleases específicas, permitindo a ocorrência do reparo de excisão (FRIEDBERG e col, 1978; HANAWALT e col, 1979; LINDAHL, 1979; LINDAHL, 1982 e LEHMANN & KARRAN, 1981).

Células de *E. coli* contêm duas enzimas que liberam 3-metiladenina da molécula de DNA: 3-metiladenina glicosilases I e II. A atividade induzida, que torna as células resistentes aos efeitos tóxicos do agente alquilante deve-se à síntese da enzima 3-metiladenina-DNA glicosilase II (EVENSEN & SEEBERG, 1982; NAKABEPPU e col, 1984 e MCCARTHY e col, 1984). A atividade da glicosilase II é induzida a taxas vinte vezes maiores em células expostas a baixas concentrações de agentes alquilantes, enquanto a taxa de glicosilase I permanece inalterada (KARRAN e col, 1982).

Além do resíduo 3-metiladenina, a enzima DNA glicosilase II libera 3-metilguanina, O<sup>2</sup>-metiltimidina, O<sup>2</sup>-metilcitosina e, numa pequena extensão, 7-metilguanina (LINDAHL, 1982).

A lesão O<sup>6</sup>-metilguanina, diferentemente das outras bases metiladas, é corrigida por um processo específico de reversão direta,

com transferência do grupo metil para um resíduo de cisteína da própria enzima de reparo (OLSSON & LINDAHL, 1980).

A enzima responsável pela eliminação da lesão O<sup>6</sup>-metilguanina é chamada metiltransferase, que sofre inativação irreversível em sua reação (LINDAHL & KARRAN, 1983) e, em consequência, a capacidade de reparo é saturada quando há exposição a doses elevadas do agente metilante. A capacidade de reparo de lesões O<sup>6</sup>-metilguanina está, portanto, relacionada ao número de moléculas enzimáticas presentes nas células.

Em *E. coli* a adaptação aos efeitos mutagênicos de agentes alquilantes é devida à indução desta enzima que incrementa o reparo das lesões O<sup>6</sup>-metilguanina e O<sup>4</sup>-metiltimina (YAROSH, 1985; TEO e col, 1986 e SEDGWICK, 1987). O gene que codifica para a enzima metiltransferase foi clonado e sua estrutura e regulação elucidados em detalhe (Mc CARTHY & LINDAHL, 1985).

O processo adaptativo em bactérias é bastante conhecido, havendo completas revisões sobre o assunto (LINDAHL, 1982; LINDAHL & KARRAN, 1983 e LINDAHL e col, 1988).

A busca da existência de um sistema de reparo análogo em células de mamíferos despertou, obviamente, um grande interesse, e, sabe-se hoje, que as células de mamíferos são capazes de desenvolver uma resistência a tratamentos com agentes alquilantes sob condições

adaptativas, isto é, sob tratamentos crônicos com estes agentes (FRSINA & ABBONDANDOLO, 1985).

O fenômeno da adaptação tem sido observado numa variedade de linhagens celulares, com relação a diferentes parâmetros, dentre eles: citotoxicidade (SAMSON & SCHWARTZ, 1980; KAINA, 1982, 1983; LAVAL & LAVAL, 1984); mutagenicidade (KAINA, 1983) e troca entre cromátides irmãs (SAMSON & SCHWARTZ, 1980, e KAINA, 1983).

A enzima 3-metiladenina-DNA-glicosilase foi purificada a partir de vários tecidos de mamíferos (CATHCART & GOLDTHWAIT, 1981 e BRENT, 1979) e está relacionada também à remoção de lesões 7-metilguanina (LAVAL, 1985). Não está bem esclarecido, até o presente, se as células de mamíferos possuem duas DNA glicosilases diferentes, como em *E. coli*.

A atividade de O<sup>6</sup>-metilguanina-DNA-metiltransferase foi detectada numa diversidade de tecidos: extratos celulares de camundongos (BOGDEN e col, 1981) e ratos (PEGG & PERRY, 1981 e CRADDOCK e col, 1982), linhagens fibroblásticas de fígado humano (TEO & KARRAN, 1982), linfócitos humanos (WALDSTEIN e col, 1982a), células HeLa em cultura (WALDSTEIN e col, 1982b e FOOTE e col, 1983).

A enzima eucariótica, entretanto, não está tão bem caracterizada como a bacteriana. A enzima metiltransferase de mamíferos assemelha-se à enzima de *E. coli* no seu mecanismo de ação,

pelo fato de que o grupo metil é transferido a um resíduo de cisteína da própria enzima em um processo estequiométrico (BODGEN e col, 1981; HARRIS e col, 1983 e BOULDEN e col, 1987).

As propriedades da enzima de mamíferos como um mecanismo de defesa contra agentes carcinogênicos são detalhadas em revisão recente (DAY III e col, 1987 e D INCALCI e col, 1988).

As células podem ser classificadas de acordo com sua capacidade de reparar lesões O<sup>6</sup>-alquilguanina em seu DNA. Assim, células que não possuem atividade de alquiltransferase ou cuja atividade apresenta-se em taxas muito baixas são designadas Mer<sup>-</sup> (DAY III e col, 1980, e HARRIS e col, 1983) e apresentam grande sensibilidade aos efeitos citotóxicos de agentes metilantes (SCUDIERO e col, 1984). Células proficientes nesse sistema de reparo, portanto, são designadas Mer<sup>+</sup> e removem ativamente lesões O<sup>6</sup>-metilguanina.

Evidências de que a enzima de mamíferos é também induzida, como em bactérias, é ainda um fato controverso. Há duas linhas de evidências, uma baseada em medidas bioquímicas da capacidade de reparo e outra em estudos de mutação e sobrevivência celular.

Resultados bioquímicos sugerindo uma resposta adaptativa foram obtidos primeiramente em estudos "in vivo". O pré-tratamento crônico de ratos com dimetilnitrosoamina (DMN) (MARGINSON e col, 1976; MONTESAND e col, 1979, 1980; PEGG, 1980 e SWANN & MACE, 1980) e

dietilnitrosoamina (DEN) (MARGINSON e col, 1979) resultou em um aumento da capacidade de células de fígado em remover O<sup>6</sup>-metilguanina da molécula de DNA. MARGINSON (1981) confirmou a capacidade indutora de DMN, não encontrando, entretanto, indução com N-metil-N-nitrosourea (MNU) ou metilmetanosulfonato (MMS).

Em concordância com estes resultados "in vivo", PEGG & PERRY (1981) mostraram que o pré-tratamento de ratos com DMN ou DEN resultou num aumento da capacidade de extratos de fígado em remover O<sup>6</sup>-metilguanina do DNA "in vitro". Muitos trabalhos têm demonstrado este processo indutivo em sistemas de mamíferos "in vivo" assim como "in vitro" (FOX e col 1982; KAINA, 1983; LAVAL & LAVAL, 1984; BOYLE e col, 1986; FROSINA & LAVAL, 1987 e MORTEN & MARGINSON, 1988).

O mecanismo de indução da enzima alquiltransferase em mamíferos não foi ainda elucidado, mas parece ser bastante diferente do mecanismo bacteriano, cuja regulação genética está detalhadamente conhecida (TEO e col, 1984).

## II. OBJETIVOS

Como primeiro objetivo deste trabalho nos propusemos a estudar os efeitos citotóxicos da estreptozotocina em células de mamíferos em cultura. Além dos estudos preliminares feitos em nosso laboratório, várias outras observações despertaram o nosso interesse pelo estudo da ação da STZ "in vitro". A STZ constitui um agente diabetogênico largamente utilizado em animais experimentais por sua forte ação tóxica em células beta produtoras de insulina. O mecanismo molecular pelo qual este agente exerce sua ação tóxica, contudo, permanece controverso na literatura. Embora seu poder de alquilação tenha sido demonstrado em trabalhos recentes (Le DOUX e col, 1986 e WILSON e col, 1988) não existiam estudos publicados sobre a capacidade da STZ de induzir ou não resposta adaptativa em mamíferos. Só recentemente FRAM e col (1988) demonstraram que, tanto a STZ como a MNU induzem o gene *ada*, responsável pela síntese da enzima metiltransferase. Esse fato despertou o nosso interesse em evidenciar algum tipo de adaptação de células de mamíferos à STZ.

Nosso interesse voltou-se também para a realização de estudos comparativos com o agente MNU. Este composto é um potente mutagênico e carcinogênico (KAINA, 1982 e BOYLE e col, 1986) e, embora estruturalmente análogo à STZ não exerce ação diabetogênica (Le DOUX e col, 1986). A MNU, ao contrário da STZ, constitui um agente metilante intensivamente estudado em termos de reparo e adaptação

celular (WARREN e col, 1979; KAINA, 1982, 1983; FOX e col, 1982; FROSINA e col, 1984 e BOYLE e col, 1986).

BENNETT & PEGG (1981) evidenciaram que os potenciais de alquilação destes compostos "in vitro" são equivalentes. Le DOUX e col (1986) mostraram que, além de possuírem o mesmo potencial de alquilação, a STZ e a MNU causam comparáveis quantidades de quebras na molécula de DNA, "in vitro". Entretanto, estes agentes apresentam diferentes efeitos fisiológicos devidos, provavelmente, a outros fatores envolvidos em seus mecanismos de ação que não somente seu poder de alquilar a molécula de DNA. Recentemente surgiu uma evidência na literatura mostrando que proteínas poderiam constituir um alvo alternativo da ação tóxica da STZ.

Esse fato despertou nosso interesse pela busca de outros possíveis alvos da ação da STZ e MNU. Isso nos levou a pesquisar os efeitos destes dois agentes sobre mitocôndrias "in situ", uma organela cuja função é vital para a sobrevivência celular, por constituir o sítio principal de transdução de energia nas células de mamíferos. Realmente, está bem estabelecido que 95% da energia da célula é gerada nas mitocôndrias, através dos processos acoplados de respiração e fosforilação oxidativa. Assim, alterações de enzimas envolvidas nesses processos, e/ou de proteínas estruturais da membrana mitocondrial podem ter consequências severas para o metabolismo e a sobrevivência celular.

### III. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 1. CÉLULAS: CULTIVO E LINHAGENS

Os experimentos foram realizados utilizando-se um clone derivado da linhagem V79 de hamster chinês (V79/clone M8), cedido pelo Professor Dr. Rogério Meneghini da Universidade de São Paulo, e uma linhagem tumoral humana, Hela, fornecida pelo Instituto Adolfo Lutz, São Paulo. As células V79 são fibroblastos de pulmão de hamster chinês, transformados pelo vírus de câncer animal SV40 (Simian Virus 40). As células humanas Hela consistem em uma linhagem tumoral estabelecida obtida a partir de tumor de colo de útero, sendo originária da American Type Culture Collection (ATCC), clone CCL2.

As células foram rotineiramente cultivadas para estoque em garrafas de vidro, em meio de cultura completo, ou seja, meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), contendo 100 U/ml de penicilina e 100 ug/ml de sulfato de estreptomicina, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB). As células cresciam aderidas ao fundo da garrafa, até atingir a densidade de confluência, formando uma monocamada, sendo mantidas a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub>.

Os subcultivos foram feitos mediante repiques periódicos das células, lavando-se as mesmas com PBS (NaCl 37 mM, KCl 2,7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8 mM e KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 15mM) e tripsinizando-se com solução de tripsina 0,1% em PBS contendo 0,01% de EDTA. Aliquotas dessa suspensão foram então transferidas para novas garrafas de culturas.

## 2. TRATAMENTOS COM AGENTES ALQUILANTES

Tanto a STZ como a MNU foram dissolvidas em meio de cultura imediatamente antes de sua utilização. Para tratamentos prolongados (4-6 h) foi utilizado meio de cultura suplementado com 10% de SFB e, para tratamentos curtos (30-60 min), meio sem soro.

Todas as incubações foram feitas em atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub>, a 37°C.

## 3. MEDIDAS DE EFICIÊNCIA DE PLAQUEAMENTO E SOBREVIVÊNCIA CELULAR

Como parâmetro de sobrevivência celular mediu-se a capacidade de células individualizadas se reproduzirem e formarem colônias de pelo menos 50 células. Para isso, células de uma cultura em crescimento exponencial foram tripsinizadas, individualizadas por

pipetações sucessivas, contadas em câmara de Neubauer e então diluídas à uma densidade de 600 células/ml, para a linhagem V79 e 1000 células/ml para a linhagem Hela. À cada placa de Petri de 5 cm de diâmetro contendo 1,5 ml de DMEM suplementado com 20% de SFB era então adicionado 0,5 ml dessa suspensão celular, obtendo-se, assim, 300 células V79/placa e 500 células Hela/placa. Após um período de incubação de 6 horas, para fixação das células, procedeu-se ao tratamento com os agentes alquilantes, em concentrações crescentes, especificadas nas figuras 3 e 18.

Após a retirada dos agentes, as células foram lavadas com PBS e, então, as células Hela foram cultivadas em meio de cultura contendo 20% de SFB e 10% de meio condicionado (meio previamente utilizado para cultura de células da mesma linhagem) durante 10 a 15 dias, para o crescimento clonal. Era feita renovação do meio de cultura a cada dois dias. No caso das células V79 o cultivo era efetuado por 7 dias nas mesmas condições, sem, entretanto, o uso de meio condicionado e sem renovação do meio de cultura.

As colônias foram então fixadas com formol a 10% e coradas com violeta cristal a 1%. As colônias com mais de 50 células foram contadas com o auxílio de um estereomicroscópio.

A razão entre o número de colônias formadas e o número de células semeadas fornecia a eficiência de plaqueamento, que, nas condições controle era geralmente de 80 a 100% para células V79 e 50%

para células HeLa.

A sobrevivência foi expressa em termos da porcentagem de colônias sobreviventes ao tratamento, em relação às células controle.

#### 4. MEDIDAS DE TAXA DE SÍNTESE DE DNA

Células de uma cultura em crescimento exponencial foram processadas como descrito no item 3. Após contagem das células, estas foram semeadas numa densidade de  $10^5$  células/placa de 3,5 cm de diâmetro e incubadas por 48 horas em meio de cultura contendo 10% de SFB. Após esse período foi feito o tratamento com os agentes, por 30 minutos, nas concentrações especificadas nas figuras 4 e 17, após o qual as células foram lavadas com PBS e incubadas por 60 minutos em meio de cultura contendo 10% de SFB. A seguir procedia-se à marcação das células com timidina- $^3H$ , incubando-se as mesmas em meio de cultura contendo este isótopo, (5-10  $\mu Ci/ml$ ; 50  $Ci/mmol$ ) por 30 minutos. Ao final da marcação as células foram lavadas sucessivamente com PBS contendo 1mM de  $Ca^{++}$  (PBS- $Ca^{++}$ ), TCA 5% e etanol, gelados.

Após a secagem das placas à temperatura ambiente, procedia-se à lise das células adicionando-se 1 ml de NaOH 0,5 M/placa seguido de incubação a 37°C por 60 minutos.

A quantidade de timidina-<sup>3</sup>H incorporada no DNA foi determinada como a radioatividade do material celular ácido insolúvel. Para isso, alíquotas de 100 ul do lisado celular foram aplicadas sobre tiras de papel Whatman 17, em duplicatas, os quais foram lavados sucessivamente com TCA 5%, etanol 95% e acetona, gelados. As tiras do papel foram, então cortadas em pedaços correspondentes à cada alíquota do lisado e determinou-se a radioatividade dos mesmos em frascos de cintilação contendo 5 ml de PPO : POPOP : tolueno (4 g : 0,1 g : 1 l) em espectrômetro de cintilação líquida. O restante do lisado foi utilizado para leitura da absorbância a 260 nm, um parâmetro diretamente proporcional ao número de células. A razão entre a radioatividade incorporada por unidade de absorbância a 260 nm por minuto foi tomada como expressão da taxa de síntese de DNA. Os valores obtidos em culturas tratadas foram expressos como percentuais daqueles obtidos em culturas controle.

## 5. MEDIDAS DE ADAPTAÇÃO DE CÉLULAS DE MAMÍFEROS AO TRATAMENTO COM STZ OU MNU

A adaptação das células foi medida após exposição das mesmas a doses fracionadas dos agentes alquilantes, através de dois parâmetros diferentes, onde buscou-se evidenciar:

- a) um aumento da atividade de síntese de DNA pós-tratamento;

b) um aumento da resistência celular ao efeito letal do agente alquilante.

#### 5.1 MEDIDAS DE ADAPTAÇÃO À INIBIÇÃO DE SÍNTESE DE DNA

Células em crescimento exponencial foram processadas como descrito no item 3. Uma densidade de  $2 \times 10^5$  células/placa de 5 cm de diâmetro foram incubadas por 48 horas em meio de cultura contendo 10% de SFB. Após esse período de incubação as células foram expostas a duas doses do agente, uma indutora e uma dose tóxica, sem intervalo de tempo entre ambas. A tabela 1 apresenta os dados dos protocolos utilizados para os tratamentos. As células foram lavadas com PBS após o primeiro tratamento e tratadas, a seguir, com a dose tóxica do agente. Após este tratamento, as células foram lavadas com PBS e incubadas por 60 minutos em meio de cultura com 10% de SFB. Procedeu-se, a seguir, a medidas de taxa de síntese de DNA como descrito no item 4. As placas controle foram expostas a meio de cultura sem a presença do agente.

**TABELA 1. Protocolos de adaptação ao efeito de inibição da síntese de DNA em células V79 tratadas com agentes alquilantes.**

PROTOCOLO	AGENTE	TRATAMENTO 1		INTERVALO	TRATAMENTO 2	
		CONCENTRAÇÃO	TEMPO		CONCENTRAÇÃO	TEMPO
1	STZ	0,38 mM	6	-	11,0 mM	0,5
2	STZ	0,38 mM	9	-	11,0 mM	0,5
3	STZ	0,60 mM	6	-	11,0 mM	0,5
4	STZ	0,80 mM	6	-	11,0 mM	0,5
5	MNU	25,00 $\mu$ M	6	-	1,0 mM	0,5
6	MNU	50,00 $\mu$ M	6	-	1,0 mM	0,5
7	MNU	100,00 $\mu$ M	6	-	1,0 mM	0,5

## 5.2 MEDIDAS DE ADAPTAÇÃO AO EFEITO LETAL

Células em crescimento exponencial foram processadas como descrito no item 3. Uma densidade de  $2 \times 10^5$  células/placa de 7 cm de diâmetro foram incubadas por 24 horas em meio de cultura com 10% de SFB. Após esse período de incubação as células foram submetidas a dois tipos de tratamentos indutores diferentes, descritos nos protocolos A e B, a seguir:

**Protocolo A:** As células foram submetidas a um tratamento indutor, que consistiu de uma exposição única à uma concentração subtóxica do agente, especificada na figura 13, por 6 horas, a 37°C. Após essa exposição as células foram lavadas com PBS e procedeu-se ao plaqueamento das mesmas para crescimento de colônias como descrito no item 3. Após 6 horas de incubação para fixação das células, estas foram tratadas com uma concentração tóxica do agente por 30 minutos, conforme especificado na figura. A seguir, as células foram lavadas e incubadas em meio fresco por 7 dias. Mediu-se, então, a sobrevivência celular ao tratamento como descrito no item 3.

**Protocolo B:** As células foram submetidas a um segundo tipo de tratamento indutor, consistindo de exposições múltiplas (4 vezes) a uma mesma concentração subtóxica do agente, especificada na figura 14, por intervalos de 4 horas, a 37°C. A cada período de 4 horas o meio de cultura contendo o agente foi retirado e substituído por novo meio já

contendo o agente na mesma concentração anterior. Após o último tratamento as células foram lavadas com PBS e plaqueadas para crescimento de colônias como descrito no item 3, incubadas por 6 horas e então submetidas a um segundo tratamento com diferentes doses do agente por 30 minutos (Figura 15). A seguir, as células foram lavadas e incubadas em meio fresco por 7 dias para medida do crescimento clonal como descrito no item 3.

#### 6. ESTUDO DE FUNÇÕES MITOCONDRIAIS EM CÉLULAS V79 TRATADAS COM AGENTES ALQUILANTES

O estudo das funções mitocondriais "in situ" foi realizado com suspensões de fibroblastos V79 permeabilizados com digitonina. A suspensão celular foi obtida por tripsinização de uma cultura confluenta, seguida de suspensão das células em meio completo. As células apresentaram viabilidade entre 90-95%, medida pela capacidade de exclusão do corante azul de tripan.

A ação de STZ e MNU sobre as funções mitocondriais de células V79 foi analisada determinando-se seus efeitos sobre dois processos: 1) o transporte de  $Ca^{++}$  através da membrana mitocondrial; 2) o consumo de oxigênio pelas mitocôndrias.

#### 6.1 DETERMINAÇÃO DOS EFEITOS DE STZ E MNU NO TRANSPORTE DE $\text{Ca}^{++}$ POR MITOCÔNDRIAS "IN SITU".

Para verificar uma possível interferência da STZ e MNU no transporte de  $\text{Ca}^{++}$  por fibroblastos V79, suspensões contendo  $2 \times 10^6$  células em meio de cultura com 10% de SFB foram expostas à STZ ou à MNU, por 30 minutos a  $37^\circ\text{C}$ , nas concentrações especificadas na figura 21. Após o tratamento as células foram centrifugadas e ressuspendidas em 0,2 ml de meio de reação que continha KCl 130 mM, Hepes 10 mM (pH 7,2), succinato 5 mM, fosfato de potássio 1 mM e  $\text{MgCl}_2$  2 mM. A temperatura foi mantida a  $33^\circ\text{C}$  durante o experimento. A amostra foi, então, transferida para a câmara de um eletrodo seletivo para  $\text{Ca}^{++}$  (MADEIRA, 1975) onde as células foram permeabilizadas por adição de digitonina (0,02%). Procedeu-se, então, às medidas das variações de concentração de  $\text{Ca}^{++}$  do meio extracelular em função do tempo de incubação. Os sinais do eletrodo de  $\text{Ca}^{++}$ , amplificados através de um acessório de alta impedância, foram registrados através de um registrador potenciométrico. A resposta do eletrodo de  $\text{Ca}^{++}$  foi calibrada por meio de adições de EGTA ao meio de reação.

## 6.2 DETERMINAÇÃO DOS EFEITOS DE STZ E MNU SOBRE O CONSUMO DE OXIGÊNIO POR MITOCÔNDRIAS "IN SITU".

A respiração mitocondrial de células V79 foi medida após o tratamento com STZ e MNU, e permeabilização com digitonina (1%). Uma suspensão contendo  $4 - 5 \times 10^6$  células em meio de cultura com 10% de SFB foi exposta à STZ (25 mM) ou à MNU (5 mM) por 30 minutos. Após o tratamento as células foram centrifugadas, lavadas e ressuspendidas em 1 ml de meio de reação de composição idêntica à descrita no item 6.1. A temperatura foi mantida a 33°C durante o experimento. O consumo de oxigênio foi determinado polarograficamente, com eletrodo específico ligado a um oxígrafo, após permeabilização das células com digitonina. Os efeitos dos agentes foram expressos em termos de alterações do controle respiratório (C.R.), definido como a razão entre as velocidades de consumo de oxigênio nos estados respiratórios 3 (respiração acoplada à fosforilação, após adição de ADP) e 4 (respiração de repouso subsequente ao término da fosforilação do ADP) (CHANCE & WILLIAMS, 1956).

## 7. APARELHOS

As leituras de absorvância foram efetuadas em espectrofotômetro UV-vísivel da Beckman, modelo DB, e as de

radioatividade em espectrômetro de cintilação líquida também da Beckman, modelo LS 100C. As colônias foram contadas com auxílio de um estereomicroscópio.

As variações na concentração de  $Ca^{++}$  foram acompanhadas por eletrodo seletivo Calcium Selectrode F2112, Radiometer (MADEIRA, 1975). Os sinais foram amplificados através de um acessório Sargent - Welch Scientific Co. O consumo de oxigênio foi determinado com eletrodo específico tipo Clark (Yellow Springs Instruments Co) ligado a um oxígrafo Gilson.

## 8. REAGENTES

O meio de cultura das células, meio Eagle modificado por Dulbecco, e a tripsina provinham da Interlab; o soro fetal bovino foi da Cultilab e os antibióticos, penicilina e estreptomicina, da Laborclin.

A timidina radioativa foi obtida da New England Nuclear (50 Ci/mmol).

Os componentes do líquido de cintilação foram PPO (2,5 - difenil oxazol) e POPOP (p-bis/2-(5-fenil oxazol/-benzeno) da New England Nuclear e tolueno da Merck.

O hidróxido de sódio foi proveniente da Reagen, o formaldeído da Merck, cristal violeta Carlo Erba e o TCA da Reagen.

Os agentes alquilantes utilizados, STZ e MNU, foram ambos provenientes da Sigma Company, assim como o succinato, EGTA, rotenona, antimicina A e ADP utilizados nos experimentos mitocondriais.

Os demais reagentes utilizados foram produtos do mais alto grau de pureza disponível.

#### IV. RESULTADOS

##### 1. SOBREVIVÊNCIA DE CÉLULAS V79 TRATADAS COM STZ E MNU

A taxa de sobrevivência, medida pela capacidade de células individualizadas formarem colônias de pelo menos 50 células, é um indicador preciso da capacidade reprodutiva das mesmas frente aos tratamentos com os agentes.

Na figura 3 pode-se notar a maior sensibilidade das células V79 à ação da MNU quando comparada à ação da STZ. As doses que causaram 50% de mortalidade foram 10,6 mM e 2,0 mM para STZ e MNU, respectivamente.

##### 2. AÇÃO DA STZ E MNU SOBRE A REPLICAÇÃO DO DNA DE CÉLULAS V79

Após detectar os efeitos letais da STZ e MNU na linhagem celular V79 procurou-se verificar se estes agentes eram capazes de inibir o processo de síntese de DNA nestas células. Para isso, as células foram tratadas com diferentes doses de STZ por 30 minutos e mediu-se seu efeito sobre a incorporação de timidina-<sup>3</sup>H.

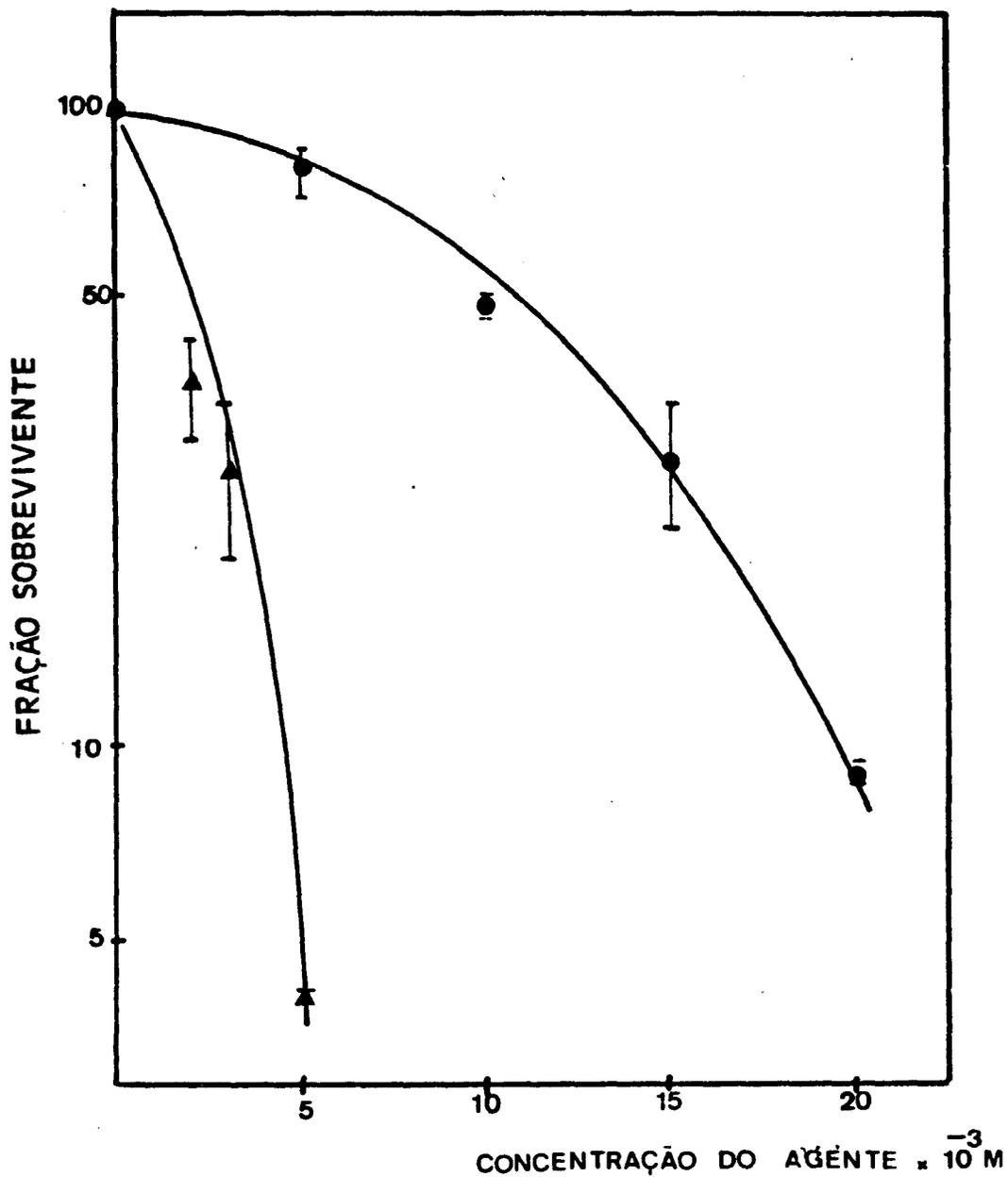


FIGURA 3: CURVAS DE SOBREVIVÊNCIA DE CÉLULAS U79 TRATADAS COM AGENTES ALQUILANTES.

As células foram tratadas com diferentes concentrações de STZ (●) e MNU (▲) por 30 minutos a 37°C e as colônias formadas contadas após 7 dias de crescimento como descrito em MATERIAIS E MÉTODOS (item 3). As barras correspondem aos valores médios com respectivos desvios da média de dados de 2 experimentos.

Os resultados mostram uma clara inibição da taxa de síntese de DNA, dependente de dose (Figura 4). Uma redução de 50% na taxa de síntese foi observada numa concentração de 14 mM de STZ e 6 mM de MNU.

As células V79, portanto, mostraram-se mais sensíveis à inibição de síntese de DNA pela ação da MNU.

### 3. CINÉTICA DE RECUPERAÇÃO EM CÉLULAS V79 TRATADAS COM STZ

Os experimentos anteriores mostraram que a replicação do DNA é inibida pelo tratamento com STZ: há uma redução na taxa de síntese de DNA medida imediatamente após o tratamento. A figura 5, entretanto, nos mostra que, após tratamento com uma dose de 11 mM de STZ por 60 min, observa-se, inicialmente, uma redução na taxa de síntese de DNA, atingindo um máximo de 43% 1 hora após o tratamento. Posteriormente, há uma recuperação, alcançando valores de 100% de síntese 4,5 horas após o tratamento.

### 4. INDUÇÃO DE ADAPTAÇÃO EM CÉLULAS V79 EXPOSTAS À STZ

A busca de uma resposta indutiva em células de mamíferos expostas a agentes alquilantes requer um tratamento prévio com uma

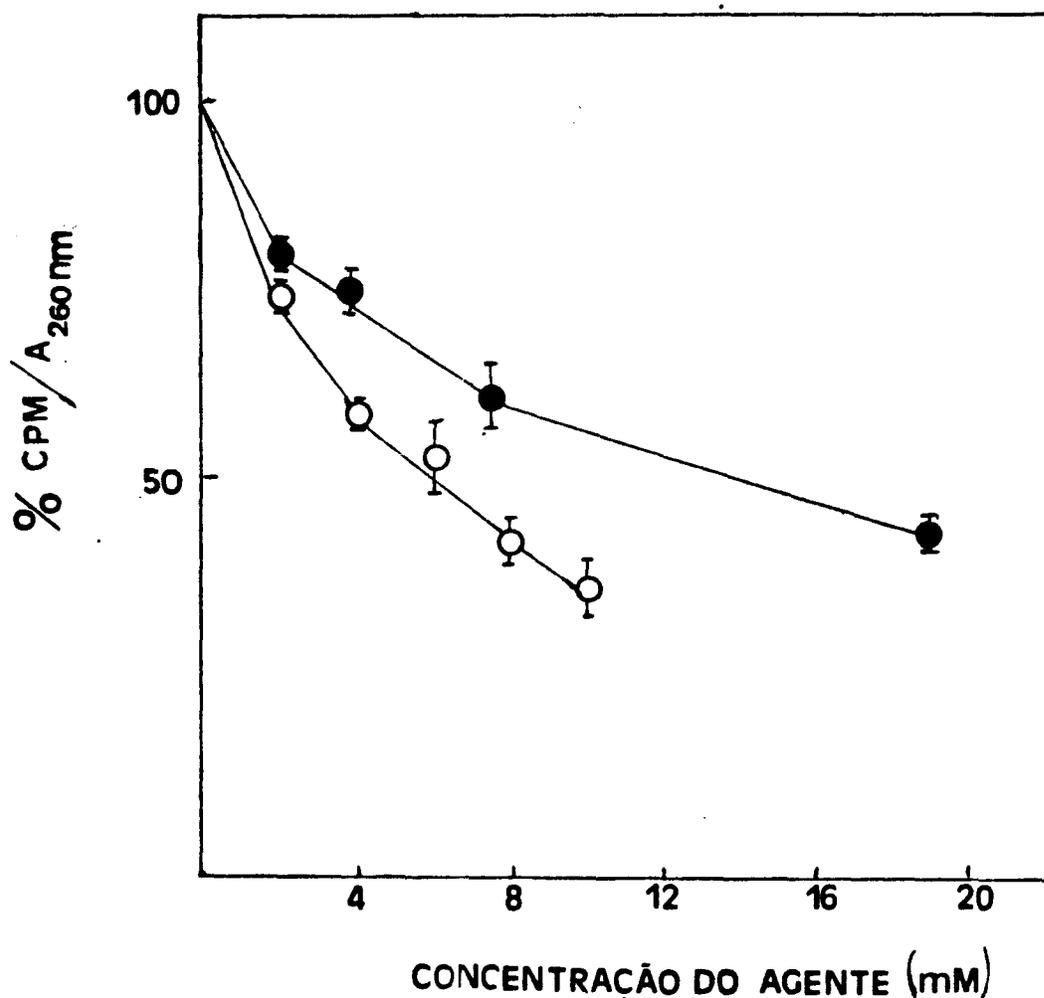


FIGURA 4: TAXA DE SÍNTESE DE DNA EM CÉLULAS V79 TRATADAS COM AGENTES ALQUILANTES.

Células em crescimento exponencial foram tratadas com diferentes concentrações de STZ (●) e MNU (○) por 60 minutos a 37°C e posteriormente pulsadas com timidina-<sup>3</sup>H (5μCi/ml; 1ml/placa) por 30 minutos a 37°C. A incorporação do isótopo é expressa em porcentagens em relação a células não tratadas e sua medida foi feita conforme descrito em MATERIAIS E MÉTODOS (item 4). As barras correspondem aos valores médios com respectivos desvios da média de dados de 2 experimentos.

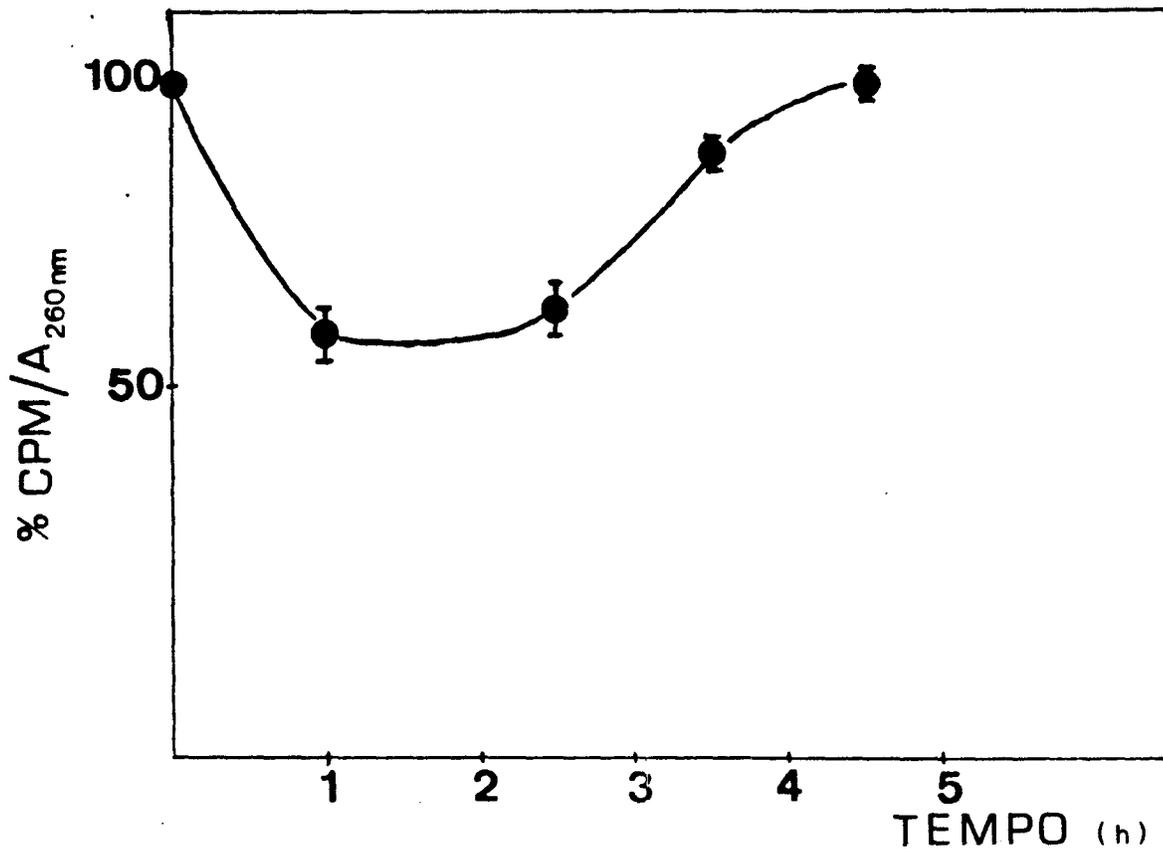


FIGURA 5: CINÉTICA DE RECUPERAÇÃO DE SÍNTESE DE DNA EM CÉLULAS V79 TRATADAS COM STZ.

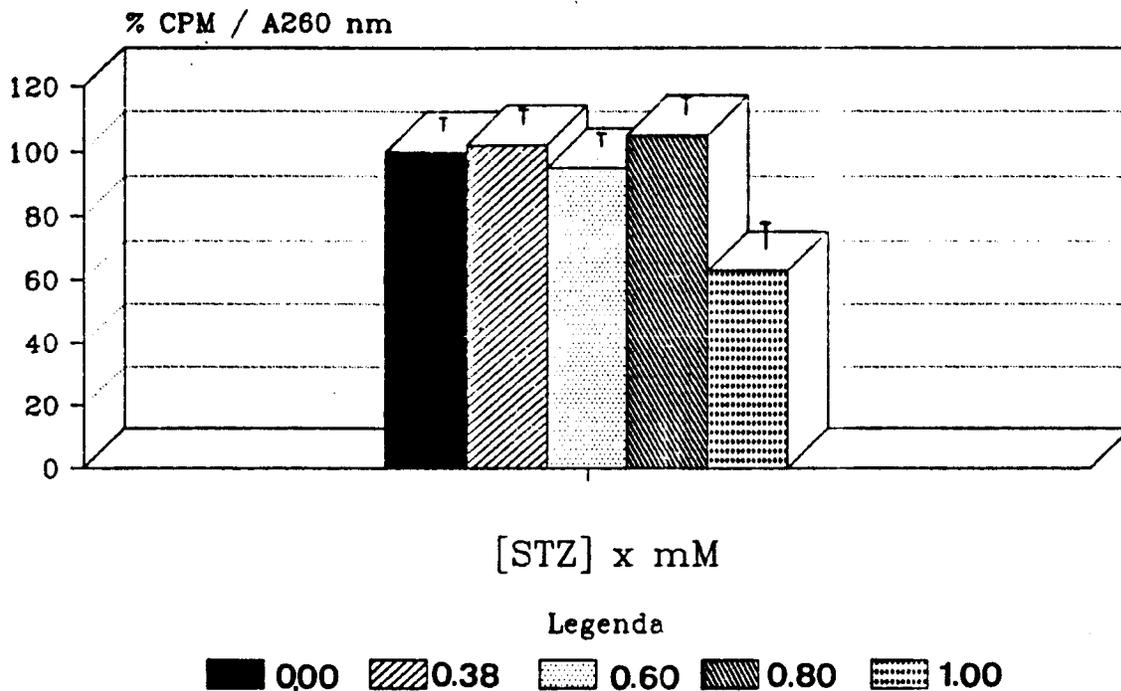
Células de uma cultura em crescimento exponencial foram processadas como descrito no item 4. Após o tratamento com STZ por 30 minutos as células foram pulsadas com timidina- $H^3$  (5 $\mu$ Ci/ml; ml/placa) por 15 minutos, decorridos intervalos crescentes de tempo de recuperação em meio normal. As barras correspondem aos valores médios com respectivos desvios da média de triplicatas.

concentração não tóxica do agente alquilante por um período de tempo relativamente longo (WALDSTEIN e col, 1982b). Segundo estes autores, um tempo de exposição de 6 horas ao agente mostrou-se adequado para a obtenção de uma resposta adaptativa, possibilitando a metilação de certos componentes essenciais para a desrepressão gênica.

Procurou-se então, inicialmente, determinar a faixa de dose de STZ que, em exposição contínua por 6 horas, não interferisse no processo de síntese de DNA.

A figura 6 nos mostra que doses iguais ou inferiores a 0,8 mM de STZ não são tóxicas para as células V79 expostas às mesmas por 6 horas. A dose máxima de 1,0 mM causou uma inibição de 37% na atividade de síntese de DNA.

Após esse experimento piloto, elegemos um protocolo com a dose prévia de 0,38 mM e a dose tóxica de 11 mM (Figura 7). O tratamento das células com a dose mais baixa, isto é, 0,38 mM de STZ por 6 horas (Protocolo 1, Tabela 1), como esperado, não alterou o nível de síntese de DNA. Entretanto, esse pré-tratamento levou a um aumento da atividade de síntese do DNA após o segundo tratamento com 11mM de STZ. Esse aumento na taxa de síntese de DNA, embora pequeno (média de 10,3% em 5 experimentos), foi repetitivo e estatisticamente significativo, ao nível de 5% (teste de Kruskal- Wallis).



**FIGURA 6: EFEITO DE TRATAMENTO PROLONGADO COM STZ SOBRE A TAXA DE SÍNTESE DE DNA EM CÉLULAS V79.**

Células em crescimento exponencial foram tratadas por 6 horas com diferentes doses de STZ e pulsadas por 30 minutos com timidina-<sup>3</sup>H (5µCi/ml; 1ml/placa). As medidas da taxa de síntese de DNA foram feitas conforme descrito em MATERIAIS E MÉTODOS (item 4). As barras correspondem aos valores médios de um experimento modelo, onde cada tratamento foi feito em triplicatas.

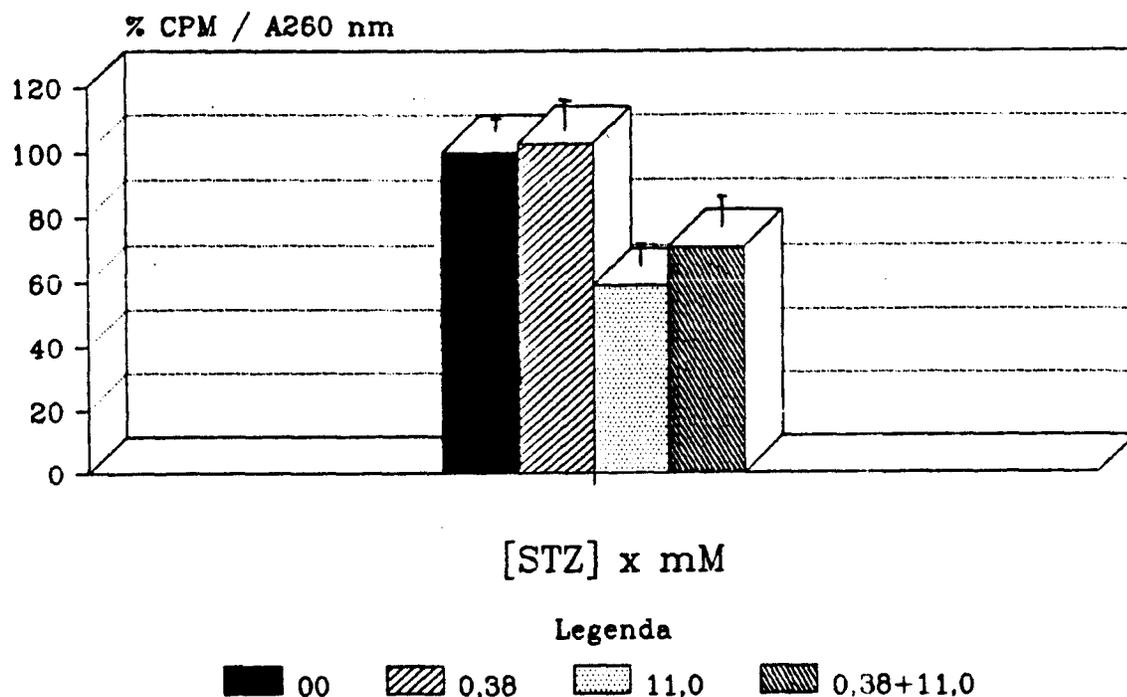


FIGURA 7: EFEITO DE PRÉ-TRATAMENTO COM STZ SOBRE A SÍNTESE DE DNA EM CÉLULAS V79 (Protocolo 1, Tabela 1)

A) nível da taxa de síntese de DNA após tratamento com uma dose de 0,38 mM de STZ por 6 horas.

B) níveis comparativos da taxa de síntese de DNA em células pré-tratadas, ou não, como em A, e submetidas a uma segunda exposição a uma dose de 11 mM de STZ por 30 minutos. As células foram pulsadas com timidina-<sup>3</sup>H (5μCI/ML; 1ML/PLACA) por 30 minutos, imediatamente após o pré-tratamento ou 1h após a retirada do segundo tratamento. As medidas da taxa de síntese de DNA foram feitas conforme descrito em MATERIAIS E MÉTODOS (item 4). As barras correspondem aos valores médios de cinco experimentos.

Em face do resultado obtido na figura 7, buscou-se verificar se um aumento do tempo de exposição à dose previa de STZ causaria uma indução maior da taxa de síntese de DNA após o segundo tratamento. Para isso foram testados intervalos crescentes de exposição (9, 12 e 18 h) cujos resultados estão apresentados na figura 8: Exposições de 12 e 18 horas ao agente reduziram os níveis de síntese de DNA em 27 e 47%, respectivamente. Somente a exposição de 9 horas a 0,38 mM de STZ não interferiu no processo de síntese de DNA e, por isso, foi selecionado como o tempo de indução. A figura 9 apresenta os resultados obtidos com este tratamento prévio, seguido de um segundo tratamento de 30 minutos com 11 mM de STZ (Protocolo 2, Tabela 1). Verificou-se que o pré-tratamento por 9 horas produziu um aumento da taxa de síntese de DNA de 12%, em relação à dose única, valor esse equivalente ao obtido com o pré-tratamento por 6 horas.

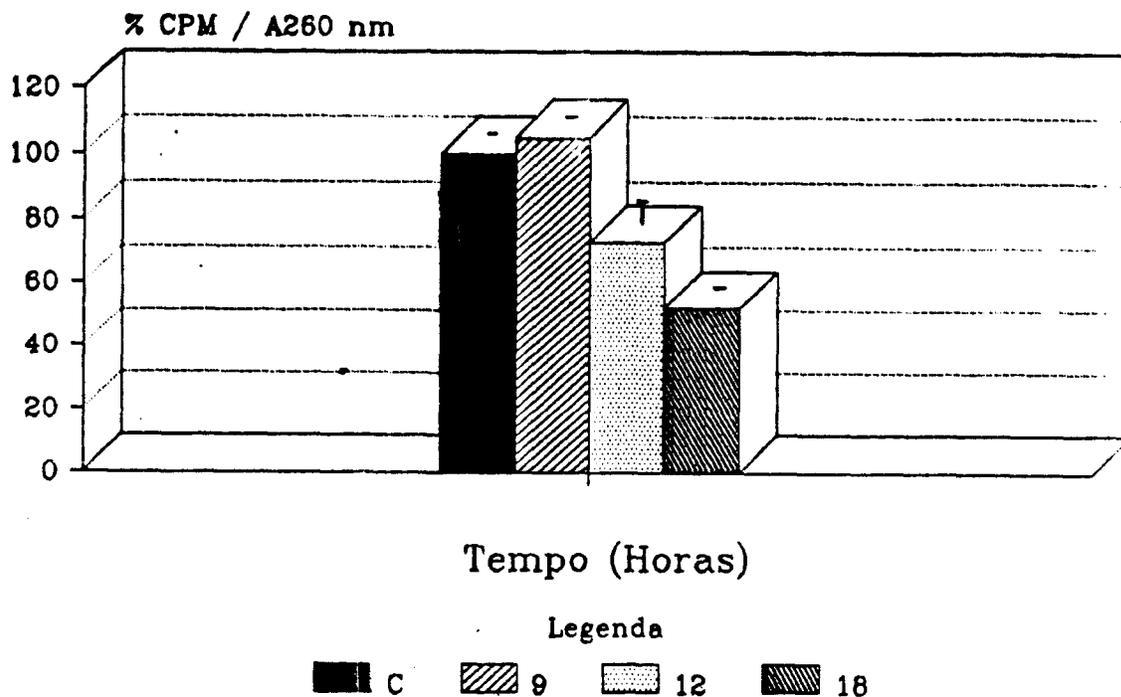
Tentou-se, então, outra variante do protocolo, mantendo-se o tempo de pré-exposição de 6 horas e elevando-se a dose de STZ ao máximo possível, sem que se produzisse efeito nos níveis de síntese de DNA.

A figura 10A nos mostra que o tratamento prévio com 0,6 mM de STZ por 6 horas não alterou a taxa de síntese de DNA. Os níveis de síntese foram reduzidos em 32% após tratamento com a dose única de 11 mM de STZ, enquanto as células pré-tratadas com 0,6 mM do agente apresentaram uma redução de 25% nos níveis de síntese após este tratamento. Este tratamento prévio, portanto, não foi mais eficaz em

induzir maiores níveis de síntese após o segundo tratamento (Protocolo 3, Tabela 1), em comparação ao protocolo anterior (Protocolo 1, Tabela 1). Resultados semelhantes foram obtidos com um tratamento prévio com uma dose de 0,8 mM de STZ (Figura 10B) (Protocolo 4, Tabela 1). Este tratamento prévio não alterou os níveis de síntese de DNA, como esperado. Novamente, as células pré-tratadas com 0,8 mM de STZ mantiveram um nível de síntese superior em 10% em relação às células tratadas com a dose única.

A dificuldade de obtenção de uma resposta adaptativa pronunciada em células V79 tratadas com STZ, nos levou a questionar os seguintes pontos:

- a) a capacidade da STZ de, realmente, induzir uma resposta mais acentuada;
- b) o parâmetro utilizado para determinação desta resposta;
- c) a competência do tipo de linhagem celular utilizada para responder adaptativamente.



**FIGURA 8: EFEITO DE DIFERENTES TEMPOS DE TRATAMENTO COM STZ SOBRE A TAXA DE SÍNTESE DE DNA EM CÉLULAS V79**

Células em crescimento exponencial foram tratadas com uma dose de 0,38 mM de STZ por diferentes períodos tempo e pulsadas por 30 minutos com timidina-<sup>3</sup>H (5µCi/ml; 1ml/placa). As medidas da taxa de síntese de DNA foram feitas conforme descrito em MATERIAIS E MÉTODOS (item 4). As barras correspondem aos valores médios de um experimento modelo, onde cada tratamento foi feito em triplicatas.

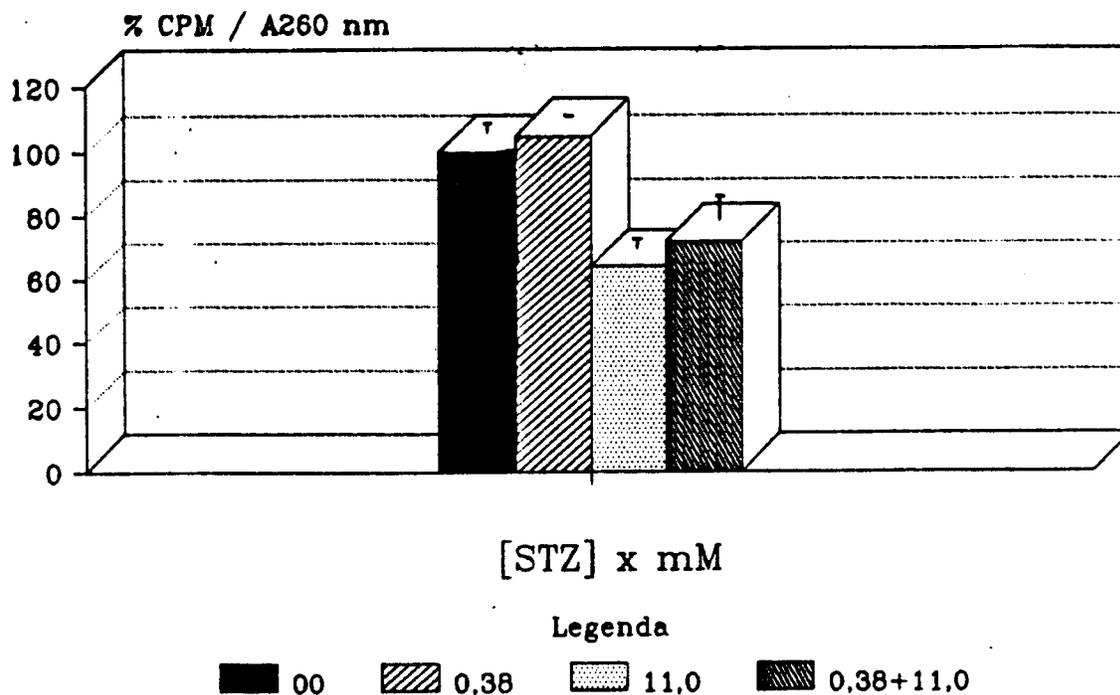


FIGURA 9: EFEITO DE PRÉ-TRATAMENTO COM STZ SOBRE A SÍNTESE DE DNA EM CÉLULAS V79 (Protocolo 2, Tabela 1)

- A) nível da taxa de síntese de DNA após tratamento com uma dose de 0,38 mM de STZ por 9 horas.
- B) níveis comparativos da taxa de síntese de DNA em células pré-tratadas, ou não, como em A, e submetidas a uma segunda exposição a uma dose de 11 mM de STZ por 30 minutos. 1 hora após a retirada do agente as células foram pulsadas com timidina-<sup>3</sup>H (5µCi/ml; 1ml/placa) por 30 minutos. As medidas da taxa de síntese de DNA foram feitas conforme descrito em MATERIAIS E MÉTODOS (item 4). As barras correspondem aos valores médios de um experimento modelo onde cada tratamento foi feito em triplicatas.

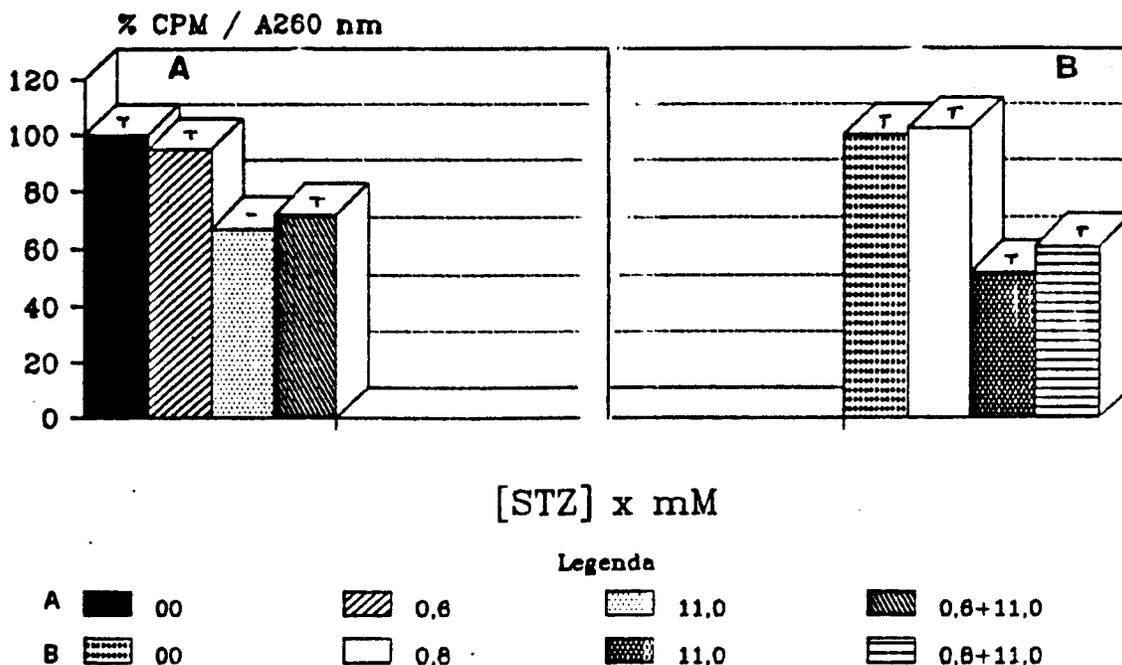


FIGURA 10: EFEITO DE PRÉ-TRATAMENTO COM STZ SOBRE A SÍNTESE DE DNA EM CÉLULAS V79 (Protocolos 3 e 4, Tabela 1)

- A) nível da taxa de síntese de DNA após tratamento prévio com uma dose de 0,6 mM (10A) e 0,8 mM (11A) de STZ por 6 horas.
- B) níveis comparativos da taxa de síntese de DNA em células pré-tratadas, ou não, como em A, e submetidas a uma segunda exposição a uma dose de 11 mM de STZ por 30 minutos. As células foram pulsadas com timidina-<sup>3</sup>H (5µCi/ml; 1ml/placa) por 30 minutos imediatamente após o pré-tratamento ou 1 hora após a retirada do segundo tratamento. As medidas da taxa de síntese de DNA foram feitas conforme descrito em MATERIAIS E MÉTODOS (item 4). As barras correspondem aos valores médios de dois experimentos.

## 5. INDUÇÃO DE ADAPTAÇÃO EM CÉLULAS V79 EXPOSTAS À MNU

Com o objetivo de verificar se um agente conhecidamente indutor de adaptação, como a MNU, seria capaz de induzir uma resposta positiva em células V79, submeteram-se as células ao mesmo tipo de tratamento com doses parceladas que levou a um resultado significativo em células tratadas com STZ (Protocolos 5, 6 e 7, Tabela 1).

A figura 11 nos mostra que tratamentos por 6 horas com doses de 25  $\mu$ M, 50  $\mu$ M e 100  $\mu$ M de MNU não interferem significativamente no processo de síntese do DNA. Submetendo-se agora as células ao tratamento prévio com estas doses crônicas de MNU por 6 horas se observou que após estes tratamentos prévios, as células apresentaram os mesmos níveis de síntese de DNA que as células tratadas com a dose única de 1 mM de MNU (43% de inibição). Portanto, nenhum aumento significativo da atividade de síntese de DNA foi detectado após o segundo tratamento. (Figura 12).

## 6. EFEITO DE PRÉ-TRATAMENTOS NA SOBREVIVÊNCIA DE CÉLULAS V79 EXPOSTAS À STZ

O outro ponto sob questionamento era se a abordagem experimental utilizada seria realmente a mais adequada para se

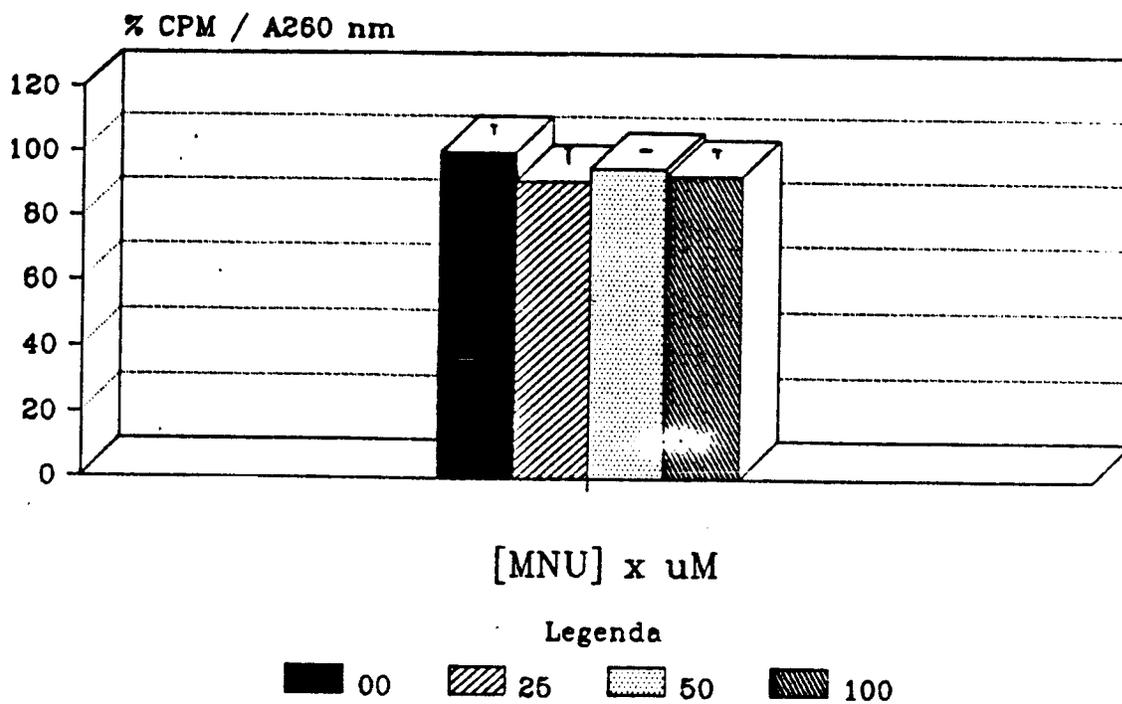
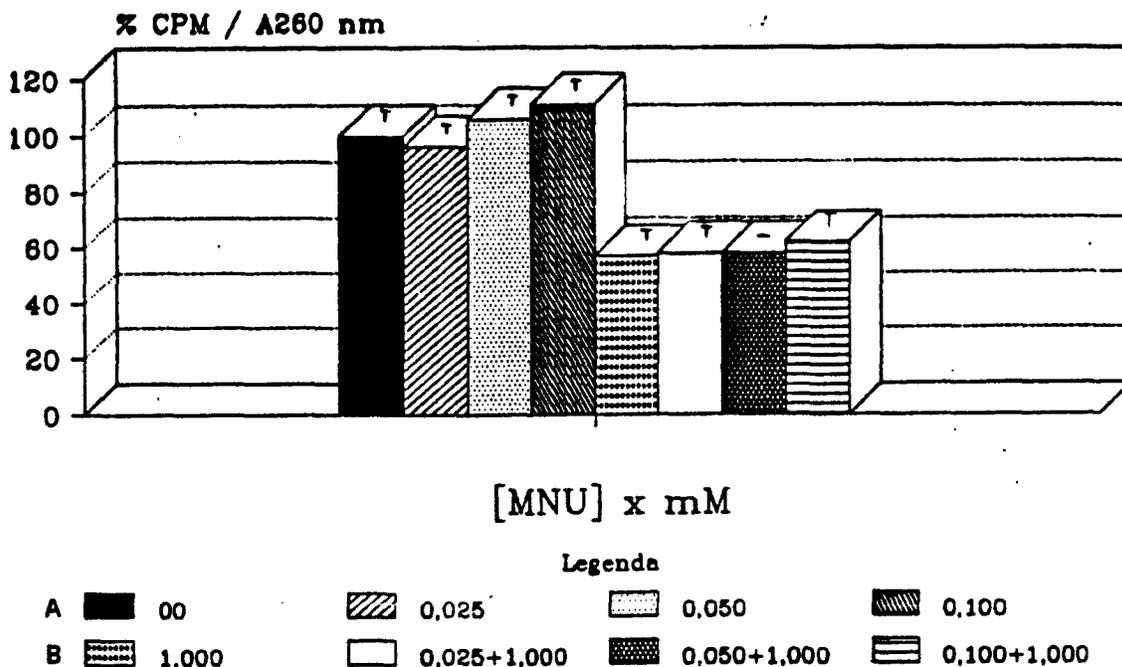


FIGURA 11: EFEITO DE TRATAMENTO PROLONGADO COM MNU SOBRE A TAXA DE SÍNTESE DE DNA EM CÉLULAS V79.

Células em crescimento exponencial foram tratadas por 6 horas com diferentes doses de MNU e pulsadas por 30 minutos com timidina-<sup>3</sup>H (5uCi/ml; 1ml/placa). As medidas da taxa de síntese de DNA foram feitas conforme descrito em MATERIAIS E MÉTODOS (item 4). As barras correspondem aos valores médios de um experimento modelo, onde cada tratamento foi feito em triplicatas.



**FIGURA 12: EFEITO DE PRÉ-TRATAMENTO COM MNU SOBRE A SÍNTESE DE DNA EM CÉLULAS V79 (Protocolos 5, 6 e 7, Tabela 1)**

A) nível da taxa de síntese de DNA após tratamento com diferentes doses de MNU por 6 horas.

B) níveis comparativos da taxa de síntese de DNA em células pré-tratadas, ou não, como em A, e submetidas a uma segunda exposição a uma dose de 1,0 mM de MNU por 30 minutos. As células foram pulsadas com timidina-<sup>3</sup>H (5uCi/ml; 1ml/placa) por 30 minutos imediatamente após o pré-tratamento ou 1 hora após a retirada do segundo tratamento. As medidas da taxa de síntese de DNA foram feitas conforme descrito em MATERIAIS E MÉTODOS (item 4). As barras correspondem aos valores médios de um experimento modelo onde cada tratamento foi feito em triplicatas.

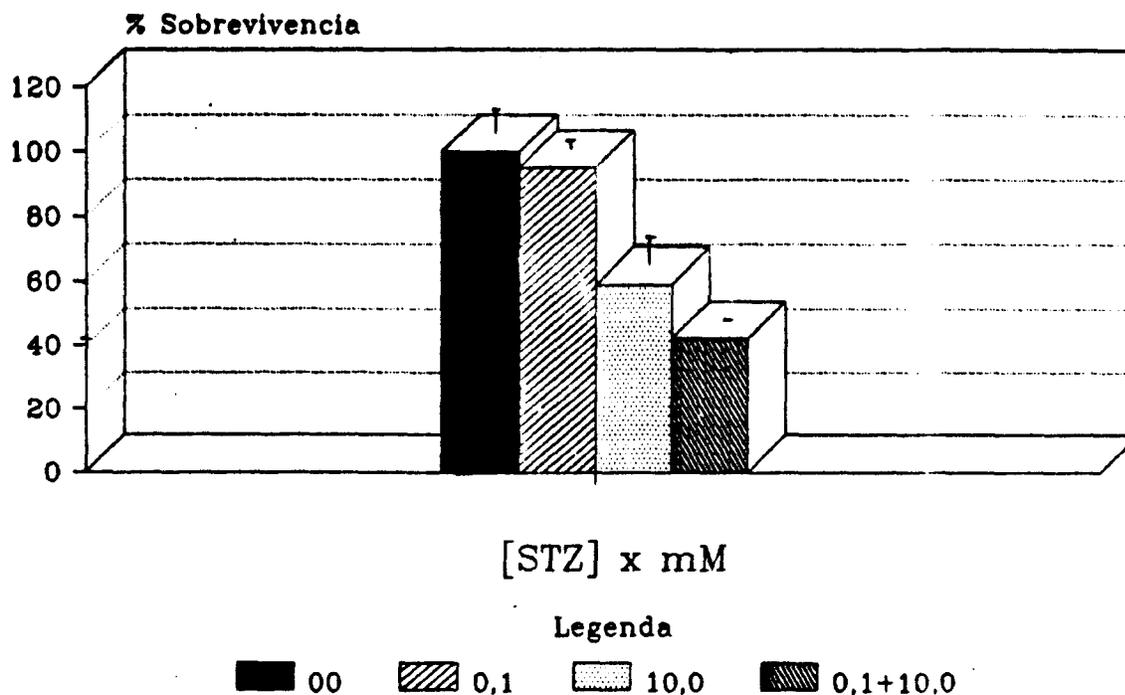
detectar a adaptação. Procurou-se, alternativamente, a indução de uma resposta positiva em termos de sobrevivência ao efeito letal de STZ.

Dois protocolos experimentais foram desenvolvidos com o objetivo de verificar se tratamentos prévios das células V79 confeririam a elas uma maior resistência à morte celular após um segundo tratamento tóxico com STZ.

Em um primeiro experimento as células foram expostas a 0,38 mM de STZ por 6 horas (Protocolo A, item 5.2) e posteriormente plaqueadas para o crescimento de colônias. Verificou-se, entretanto, que este tratamento prévio foi bastante tóxico para as células, reduzindo o crescimento clonal em 86%. Seguindo este mesmo protocolo, as células foram tratadas com uma dose prévia de 0,1 mM de STZ, que não mostrou-se tóxica para as células (Figura 13).

Entretanto, não se obteve nenhum aumento da fração de sobreviventes a uma dose tóxica de 10 mM de STZ que pudesse evidenciar a indução de alguma resposta adaptativa. Ao contrário, observou-se que o pré-tratamento diminuiu a porcentagem de sobreviventes em 20% em relação ao tratamento com 10 mM.

Num outro protocolo experimental foram feitos pré-tratamentos múltiplos com a mesma dose de 0,1 mM de STZ (Protocolo B, item 5.2), seguidos de uma posterior exposição das células a doses tóxicas do mesmo agente. Os tratamentos prévios não se mostraram



**FIGURA 13: EFEITO DE PRÉ-TRATAMENTO COM STZ NA TAXA DE SOBREVIVÊNCIA DE CÉLULAS V79.**

- A) Taxa de sobrevivência celular após exposição a uma dose de 0,1 mM de STZ por 30 minutos.
- B) Taxas comparativas de sobrevivência celular em células pré-tratadas, ou não, como em A, e submetidas a uma segunda exposição a uma dose de 10 mM de STZ por 30 minutos. Em A e B, após os tratamentos, foi feito plaqueamento para medidas de sobrevivência celular como descrito em MATERIAIS E MÉTODOS (Item 3). As barras correspondem aos valores médios de um experimento modelo, onde cada tratamento foi feito em triplicatas.

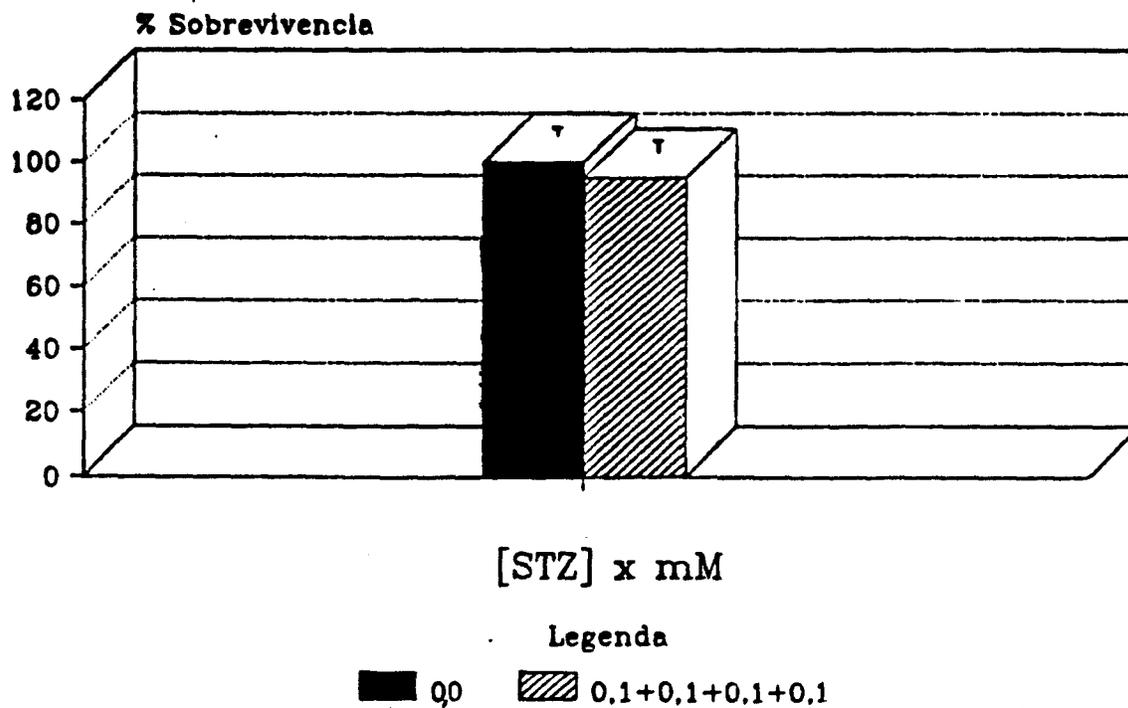
tóxicos para as células V79 como mostra a figura 14.

Entretanto, a pré-exposição a doses múltiplas de STZ não levou a diferenças significativas nas taxas de sobrevivência celular em relação às células não tratadas previamente (Figura 15). Portanto, também a exposição a várias doses subtóxicas sucessivas de STZ não induz adaptação das células V79 ao efeito letal de STZ.

O terceiro ponto sob questionamento era se as células V79 seriam competentes para a indução de alguma resposta do tipo adaptativa.

Para tentar responder à questão acima, procurou-se trabalhar com uma linhagem sabidamente capaz de responder à adaptação com alquilantes clássicos, as células humanas estabelecidas Hela. Trabalhou-se, inicialmente, nas mesmas condições experimentais que levaram a um aumento da atividade de síntese de DNA em células V79 (Figura 16).

Entretanto, observamos que a dose tóxica para V79, ou seja, 11 mM de STZ inibiu a taxa de síntese de DNA nas células Hela somente em 7%. Tornou-se necessário, portanto, a determinação da curva dose-resposta para a linhagem Hela, apresentada na figura 17: há uma nítida inibição da taxa de síntese de DNA dependente de dose, havendo uma redução de 50% numa concentração de 34 mM de STZ. Essa mesma taxa de inibição foi induzida por uma dose de 8 mM de MNU. Portanto, as



**FIGURA 14: EFEITO DE PRÉ-TRATAMENTO COM STZ NA TAXA DE SOBREVIVÊNCIA DE CÉLULAS V79.**

Células em crescimento exponencial foram expostas a uma dose de 0,1 mM de STZ por 4 horas em 4 tratamentos sucessivos e posteriormente plaqueadas para medidas de sobrevivência celular como descrito em MATERIAIS E MÉTODOS (item 3).

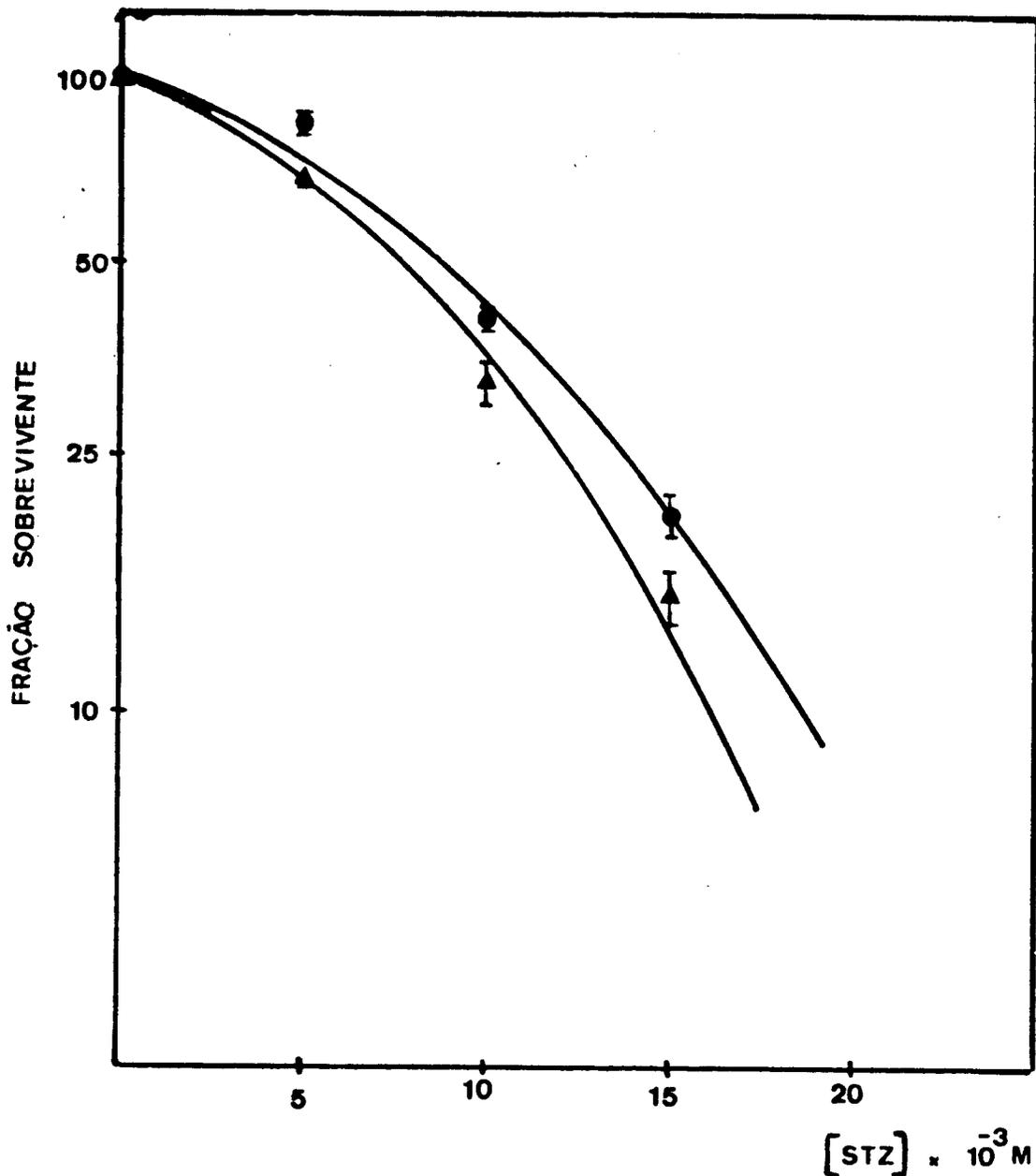


FIGURA 15: EFEITO DE PRÉ-TRATAMENTOS COM STZ NA TAXA DE SOBREVIVÊNCIA DE CÉLULAS V79.

Células em crescimento exponencial foram previamente expostas (▲) ou não (●) a exposições múltiplas de 0,1 mM de STZ por 4 horas em 4 tratamentos sucessivos (Protocolo B, item 5.2). A seguir as células foram plaqueadas para crescimento clonal e tratadas com diferentes doses de STZ por 30 minutos. Após o tratamento as células foram incubadas por 7 dias em meio fresco, para medida da sobrevivência celular, conforme descrito em MATERIAIS E MÉTODOS (item 3). As barras correspondem aos valores médios de um experimento modelo, onde cada tratamento foi feito em triplicatas.



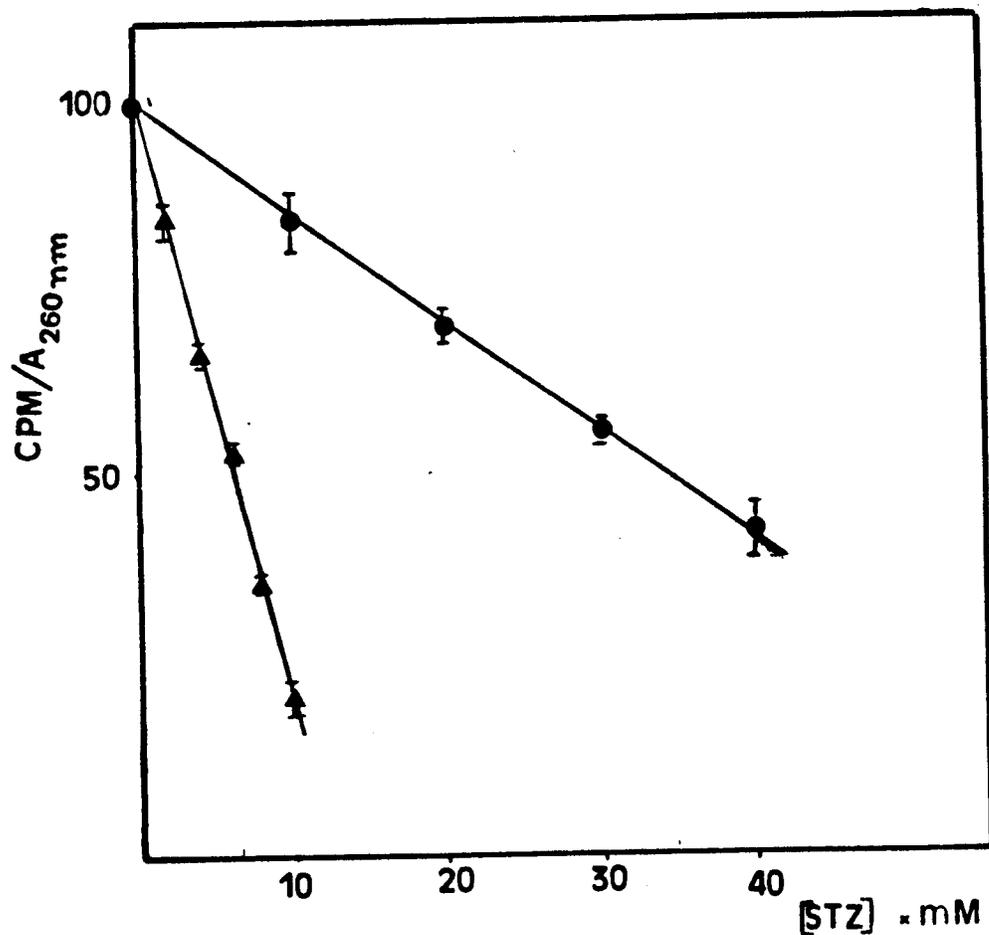


FIGURA 17: TAXA DE SÍNTESE DE DNA EM CÉLULAS HELA TRATADAS COM AGENTES ALQUILANTES

Células em crescimento exponencial foram tratadas com diferentes concentrações de STZ (●) e MNU (▲) por 60 minutos a 37°C e posteriormente pulsadas com timidina-<sup>3</sup>H (5µCi/ml; 1ml/placa) por 30 minutos a 37°C. A incorporação do isótopo é expressa em porcentagens em relação a células não tratadas e sua medida foi feita conforme descrito em MATERIAIS E MÉTODOS (item 4). As barras correspondem aos valores médios com respectivos desvios da média de dados de 2 experimentos.

células Hela também mostraram-se mais sensíveis à inibição de síntese de DNA pela ação da MNU. A figura 18 apresenta os resultados de sobrevivência celular desta linhagem após exposição aos agentes, onde as doses de 4,6 mM e 1,6 mM levaram à 37% de mortalidade, para STZ e MNU, respectivamente.

Procurou-se, então, determinar a faixa de dose de STZ que, em exposição contínua por 6 horas não interferisse no processo de síntese de DNA. A figura 19 evidencia que doses iguais ou inferiores a 1 mM de STZ não são tóxicas para as células Hela expostas às mesmas por 6 horas. As doses de 2, 3 e 4 mM de STZ reduziram os níveis de síntese em 23, 42 e 54%, respectivamente.

O tratamento prévio das células com a dose de 1 mM por 6 horas, como esperado, não alterou o nível de síntese de DNA (Figura 19A). Após o segundo tratamento com 30 mM de STZ, células pré-tratadas ou não, mostraram uma mesma inibição de síntese de DNA, não havendo, portanto, a indução de um aumento dessa atividade de síntese (Figura 20).

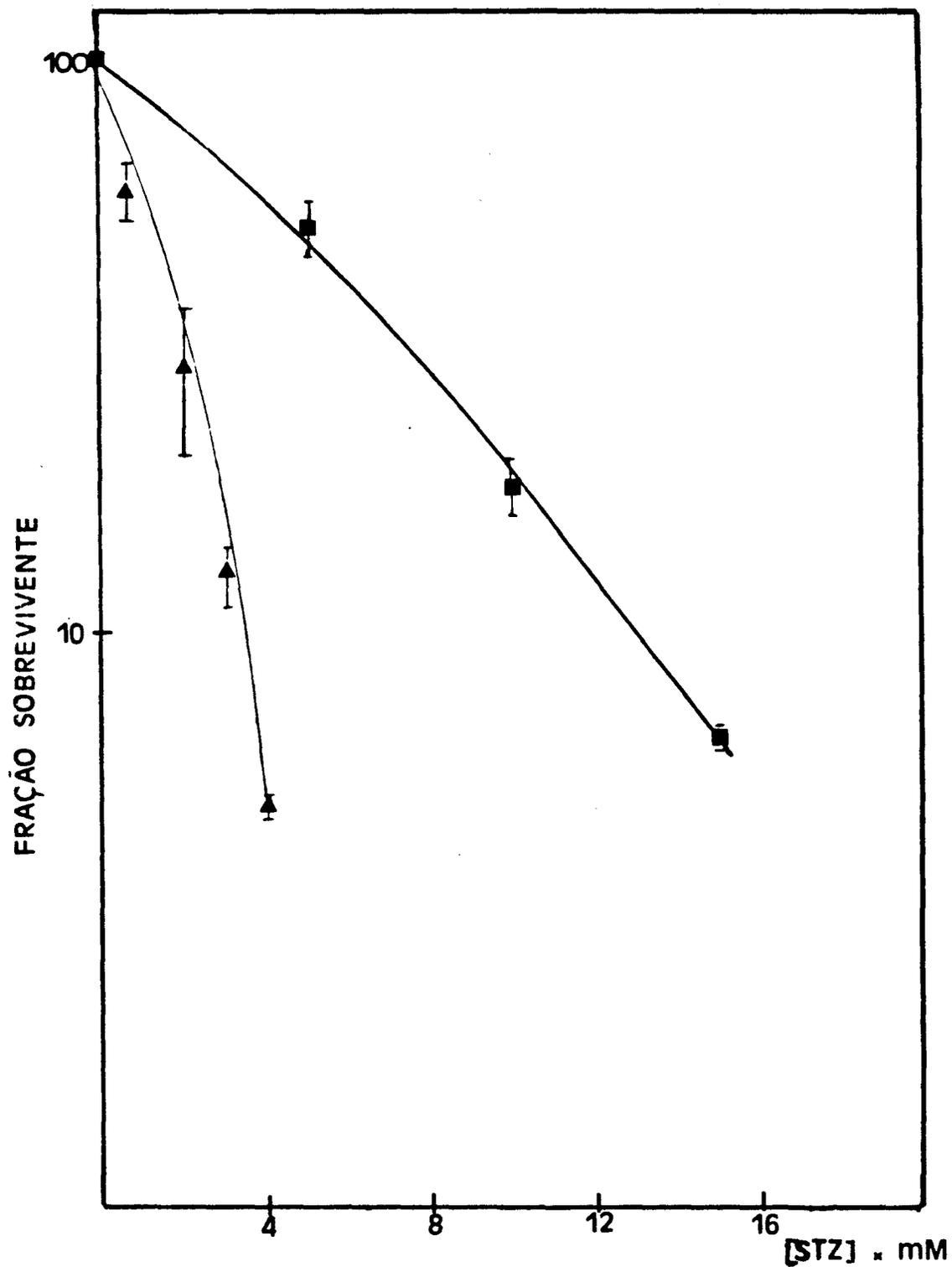
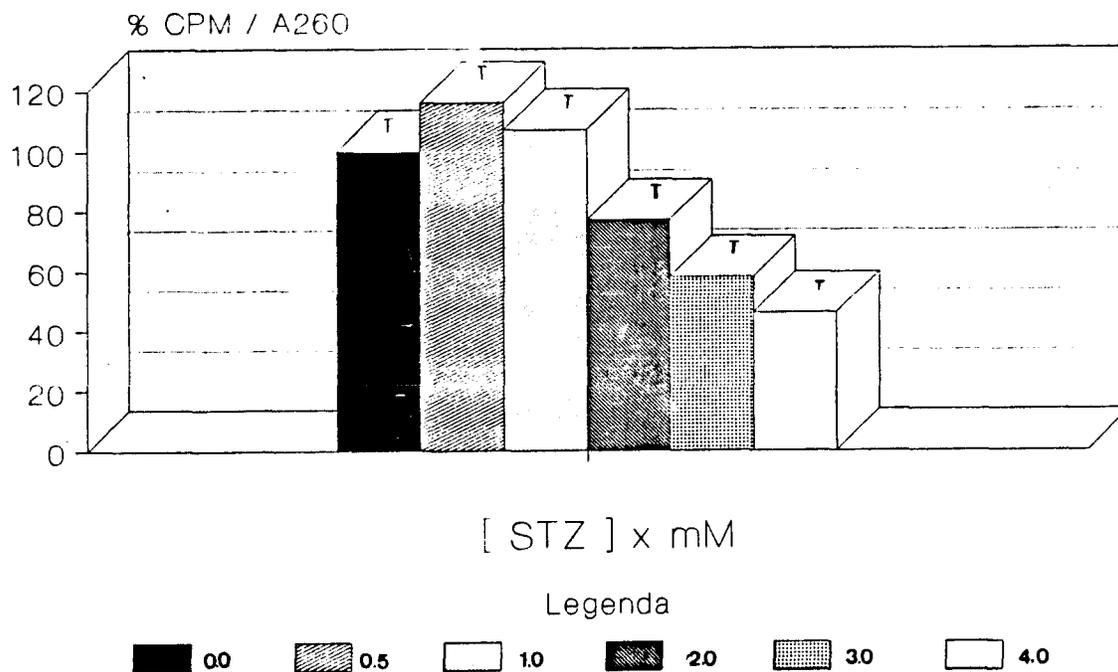


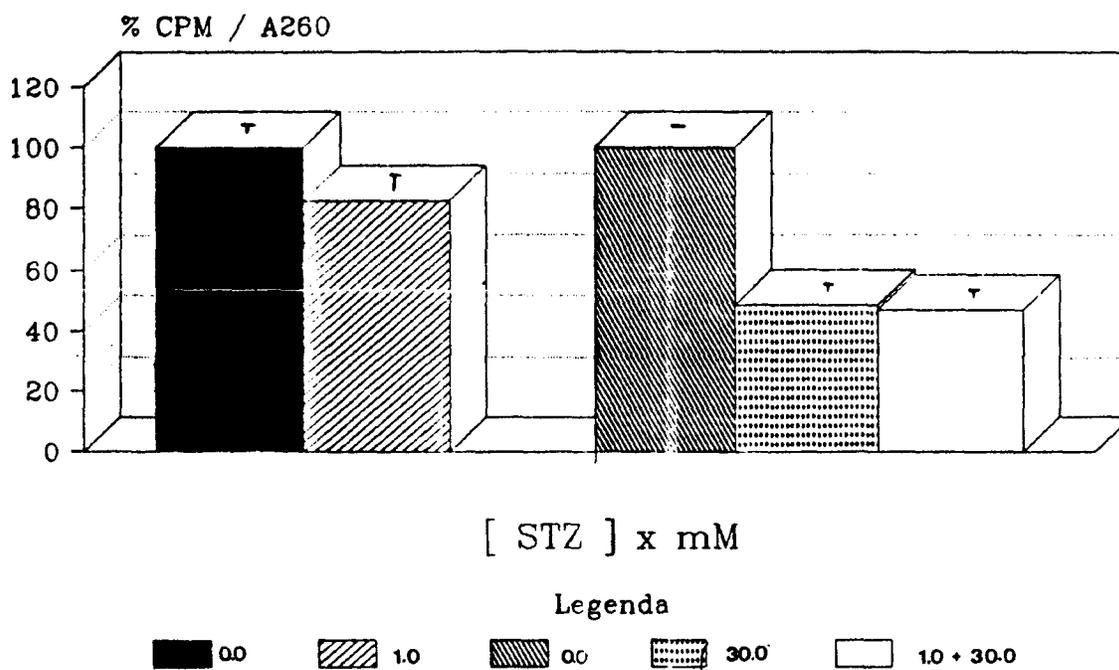
FIGURA 18: CURVA DE SOBREVIVÊNCIA DE CÉLULAS MELA TRATADAS COM AGENTES ALQUILANTES

As células foram tratadas com diferentes concentrações de STZ (■) e MNU (▲) por 30 minutos a 37°C e as colônias formadas contadas após 7 dias de crescimento como descrito em MATERIAIS E MÉTODOS (item 3). As barras correspondem aos valores médios com respectivos desvios da média de dados de 2



**FIGURA 19: EFEITO DE TRATAMENTO PROLONGADO COM STZ SOBRE A TAXA DE SÍNTESE DE DNA EM CÉLULAS HELA.**

Células em crescimento exponencial foram tratadas por 6 horas com diferentes doses de STZ e pulsadas por 30 minutos com timidina-<sup>3</sup>H (5uCi/ml; 1ml/placa). As medidas da taxa de síntese de DNA foram feitas conforme descrito em MATERIAIS E MÉTODOS (item 4). As barras correspondem aos valores médios de um experimento modelo, onde cada tratamento foi feito em triplicatas



**FIGURA 20: EFEITO DE PRÉ-TRATAMENTO COM STZ SOBRE A SÍNTESE DE DNA EM CÉLULAS HELA**

- A) nível da taxa de síntese de DNA após tratamento com uma dose de 1,0 mM de STZ por 6 horas.
- B) níveis comparativos da taxa de síntese de DNA em células pré-tratadas, ou não, como em A, e submetidas a uma segunda exposição a uma dose de 30 mM de STZ por 30 minutos. As células foram pulsadas com timidina-<sup>3</sup>H (5µCi/ml; 1ml/placa) por 30 minutos imediatamente após a retirada do pré-tratamento ou 1 hora após a retirada do segundo tratamento. As medidas da taxa de síntese de DNA foram feitas conforme descrito em MATERIAIS E MÉTODOS (item 4). As barras correspondem aos valores médios de um experimento modelo onde cada tratamento foi feito em triplicata.

## 7. ESTUDOS DE FUNÇÕES MITOCONDRIAIS EM CÉLULAS V79 EXPOSTAS À STZ E MNU

Em comparação à STZ, seu análogo MNU mostrou ser um toxina mais potente para células V79 (Figura 2). Entretanto, podemos observar que os padrões de inibição de síntese de DNA não são tão distintos para confirmar a idéia de que a molécula de DNA seja o único alvo de ação desses agentes. (Figura 3). WILSON e col (1988), observando o poder da STZ e MNU em alquilar moléculas protéicas concluem que, sem dúvida, há necessidade de estudos que identifiquem sítios não nucleares de alquilação destes agentes.

Para verificar se as mitocôndrias poderiam constituir num outro alvo de ação da STZ e MNU, foram analisados os seus efeitos sobre o transporte de  $Ca^{++}$  e consumo de oxigênio por mitocôndrias "in situ", permeabilizando as células com digitonina. Esta saponina permeabiliza a membrana plasmática das células sem afetar a estrutura e função de organelas intracelulares (GRANGER & LEHNINGER, 1982 e VERCESI e col, 1989).

Com base nos resultados apresentados na figura 2i pode-se verificar que mitocôndrias de células V79 não expostas aos agentes captam o  $Ca^{++}$  exógeno e retêm-no por um período de tempo longo (Figura 2iA). Células tratadas por 30 minutos com 25 mM de STZ, entretanto, captam e estocam este cátion por um período de tempo menor

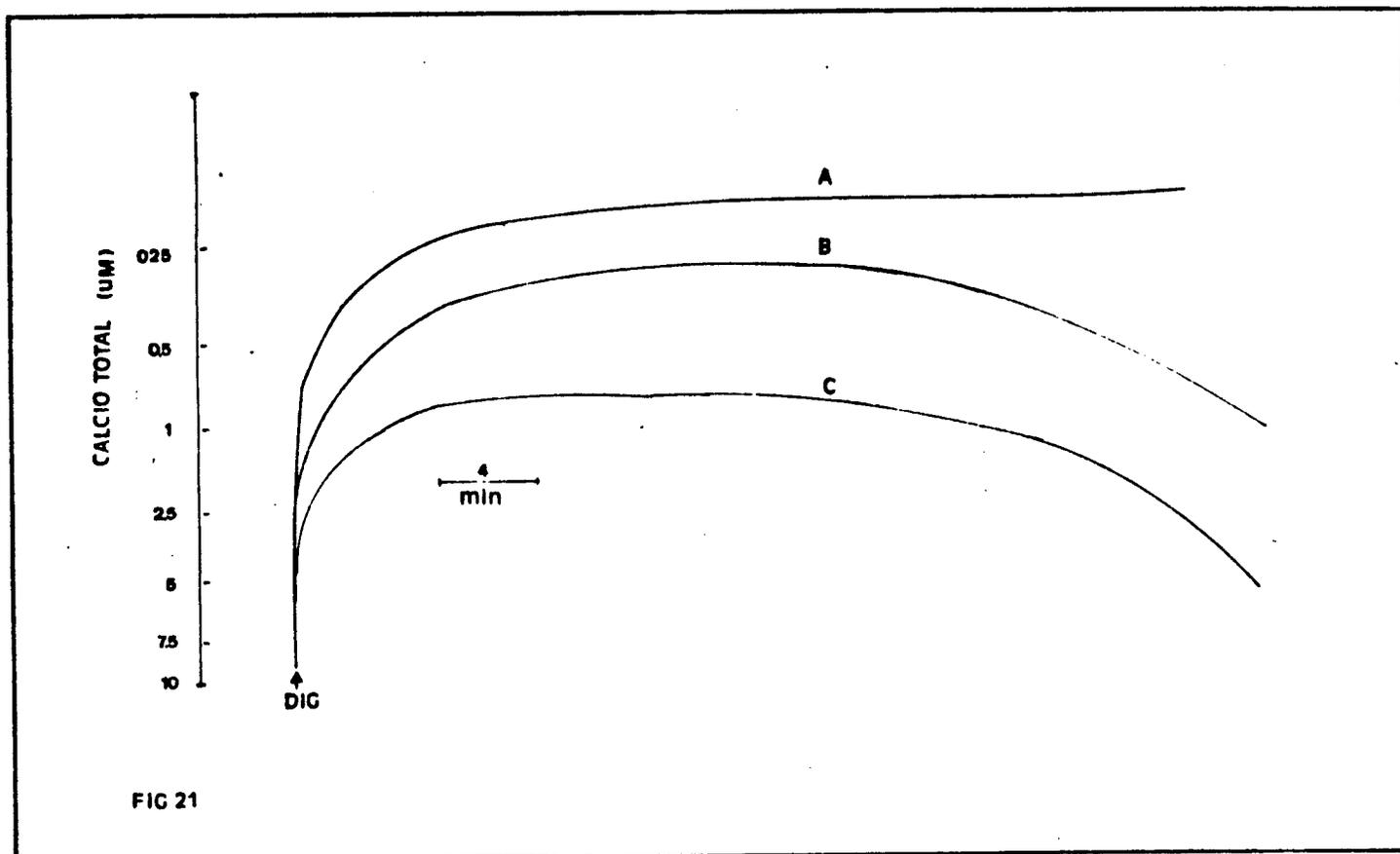


FIGURA 21: EFEITO DE AGENTES ALQUILANTES SOBRE O TRANSPORTE DE  $\text{Ca}^{++}$  POR CÉLULAS V79 PERMEABILIZADAS COM DIGITONINA.

As células foram incubadas a  $33^{\circ}\text{C}$  em  $0,2$  ml de meio de reação contendo SUC  $5\text{mM}$ ,  $\text{CaCl}_2$   $2\text{mM}$ , Pi  $1\text{mM}$ , KCl  $130$  mM, e HEPES  $10$  mM, pH  $7,2$ .

- A) Células controle.
- B) Células previamente expostas a  $25$  mM de STZ por  $30$  minutos.
- C) Células previamente expostas a  $5$  mM de MNU por  $30$  minutos

em relação ao controle, liberando-o a seguir (Figura 21B). O tratamento das células com 5 mM de MNU, nas mesmas condições, produziu um efeito similar ao obtido com 25 mM de STZ, o que evidencia uma maior potência de ação desta droga (Figura 21C).

Na figura 22 apresentam-se os resultados da velocidade de consumo de oxigênio por células V79 permeabilizadas com digitonina, utilizando succinato como substrato oxidável.

Verificou-se, inicialmente, que o tratamento dos fibroblastos V79 com tripsina, para obtenção da suspensão celular, não torna as células permeáveis para o succinato, mantendo-se a respiração em um nível basal. Somente após a adição de baixas quantidades de digitonina as células passaram a consumir oxigênio rapidamente (Figura 22C).

Utilizou-se como parâmetro comparativo o controle respiratório das células, definido como a razão entre as velocidades de consumo de oxigênio nos estados 3 (respiração acoplada à fosforilação, após adição de ADF) e 4 (respiração de repouso, subsequente ao término da fosforilação do ADF). Nas células controle permeabilizadas com digitonina, tendo succinato como substrato oxidável, obteve-se um controle respiratório de 2,44 (Figura 22C). O tratamento prévio das células com 25 mM de STZ produziu um aumento da velocidade de consumo de oxigênio, acentuadamente no estado 4, causando uma diminuição significativa do controle respiratório, para o

valor de 1,85 (Figura 22B). Nas mesmas condições, a exposição das células a 5 mM de MNU causou um aumento ainda maior da respiração no estado 4, diminuindo o valor do controle respiratório para 1,17. Portanto, o efeito da MNU sobre a respiração celular é mais intenso que aquele produzido pela STZ.

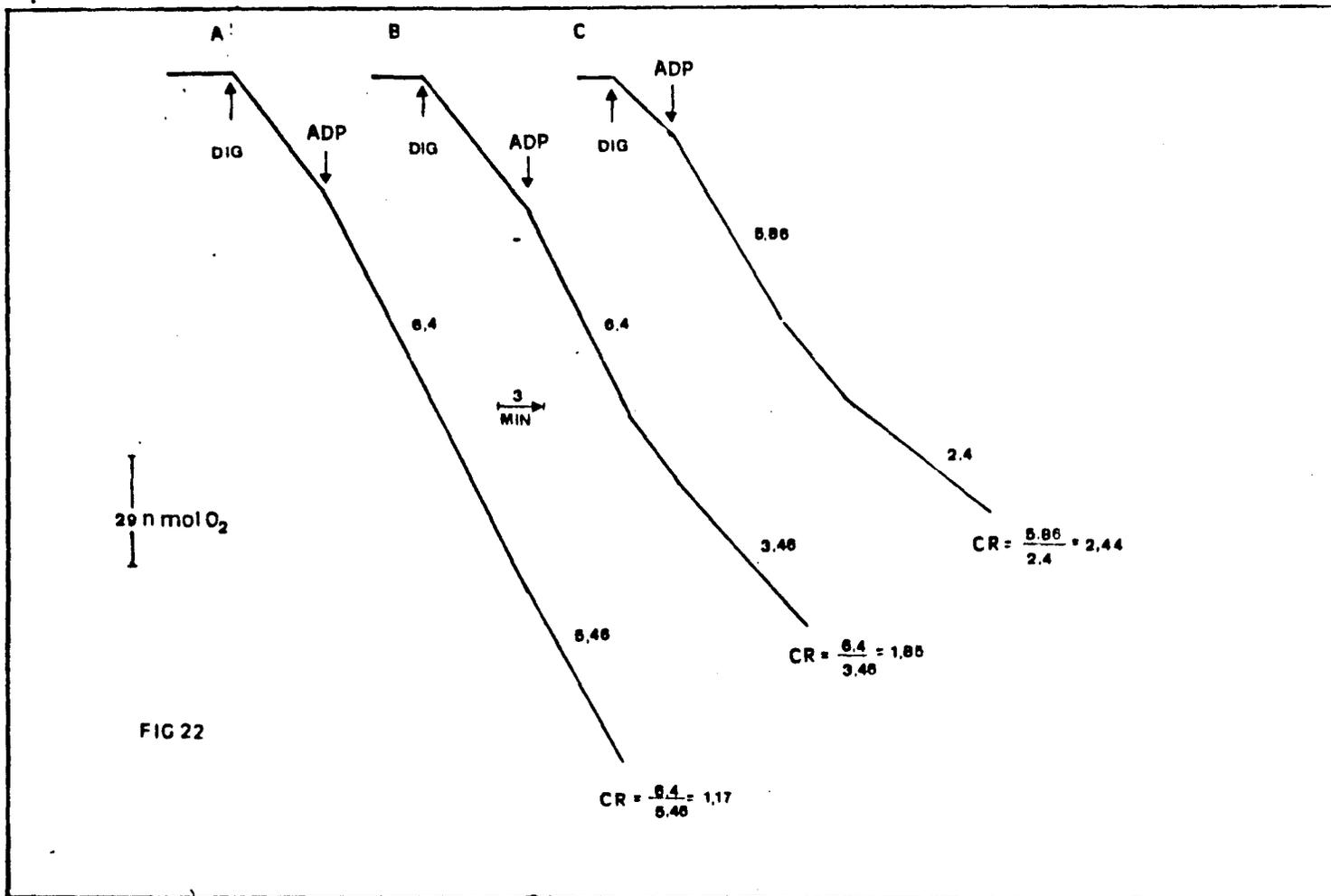


FIGURA 22: EFEITO DE AGENTES ALQUILANTES SOBRE A VELOCIDADE DE CONSUMO DE OXIGÊNIO POR CÉLULAS V79 PERMEABILIZADAS COM DIGITONINA.

As células foram incubadas a 33°C em 1 ml de meio de reação contendo SUC 5mM, CaCl<sub>2</sub> 2mM, Pi 1mM, KCl 130 mM, e HEPES 10 mM, pH 7,2. A medida do consumo de oxigênio foi iniciada após a adição de digitonina (1%). ADP foi adicionado em pulsos de 100 nmoles. Estão representados os valores de controle respiratório (C.R.).

- A) Células previamente expostas a 5 mM de MNU por 30 minutos.
- B) Células previamente expostas a 25 mM de STZ por 30 minutos.
- C) Células controle.

## V. DISCUSSÃO

### 1. ESTUDOS DE MECANISMOS DE TOLERÂNCIA E ADAPTAÇÃO EM CÉLULAS V79 TRATADAS COM STZ OU MNU.

A inibição do processo de replicação do DNA consiste numa resposta celular genérica e imediata à presença de lesões nessa molécula, induzidas pela ação de diversos agentes, químicos ou físicos (PAINTER, 1977, 1978). Essa inibição do processo de síntese, entretanto, é geralmente revertida algum tempo após a remoção do agente, como pode ser observada na figura 5. As células V79 foram capazes de recuperar os níveis normais de síntese após uma inibição inicial de 40%. Este resultado nos levou a concluir que:

1) as células V79 mostraram-se capazes de se recuperar da inibição do processo de síntese induzida pela STZ. A cinética de recuperação nos indica que a inibição do processo de síntese de DNA induzida pela ação deste composto é provavelmente devida à presença de lesões nessa molécula. Estas lesões, portanto, constituiriam bloqueios à maquinaria de duplicação, impedindo a continuidade do processo de replicação do DNA.

Do ponto de vista molecular, este processo de recuperação de síntese de DNA é bastante interessante, pois pode revelar a ocorrência de mecanismos de tolerância em células eucarióticas (VENTURA e col, 1987)

Com o objetivo de averiguar se as células V79 possuem um mecanismo de tolerância às lesões introduzidas no seu DNA pela ação da STZ e MNU foram desenvolvidos alguns protocolos experimentais de doses parceladas.

Após experimentação repetitiva com diferentes combinações de doses parceladas, obtivemos um efeito significativo. Este efeito foi obtido após um tratamento prévio das células com a dose de 0,38 mM de STZ por 6 horas e posterior tratamento com uma segunda dose de 11 mM (Figura 7).

Esses resultados nos mostram que o tratamento prévio das células causou um aumento de 11,6% na taxa de síntese de DNA após o segundo tratamento, em relação às células não tratadas previamente. Este aumento na taxa de replicação do DNA, embora pequeno, foi repetitivo e estatisticamente significativo ao nível de 5% (Teste de Kruskal-Wallis).

Com o objetivo de amplificar o efeito acima obtido, procurou-se averiguar se um aumento no tempo de exposição ou nas concentrações das doses prévias seriam mais eficazes em induzir um aumento na taxa

de síntese de DNA após o tratamento com uma segunda dose.

A figura 8 nos mostra que, dentre os intervalos de tempo testados, somente uma exposição de 9 horas à dose de 0,38 mM de STZ não interferiu na taxa de síntese de DNA. Utilizando este protocolo de indução, entretanto, podemos observar que as células tratadas com doses parceladas mostraram um aumento de 12% na taxa de síntese de DNA, em relação às células tratadas com a dose única de 11 mM de STZ (Figura 9). Este resultado é, portanto, similar àqueles anteriormente obtidos.

Os resultados da figura 10, onde as células foram tratadas com doses prévias mais elevadas, nos mostra que os aumentos na taxa de síntese de DNA obtidos em células pré-tratadas com doses de 0,6 e 0,8 mM foram de 10 e 12%, respectivamente, em relação às células tratadas com dose única de 11 mM. O aumento da concentração de STZ no pré-tratamento, portanto, também não produziu uma elevação da taxa de síntese de DNA, após o segundo tratamento, para níveis maiores que aqueles obtidos com 0,38 mM.

A taxa de síntese de DNA em células pré-tratadas, medida no momento do segundo tratamento, foi sempre semelhante ao de células controle não pré-tratadas. Este fato indica que o pré-tratamento não sincronizou a população celular a um grau mensurável, o que poderia justificar o resultado positivo obtido.

Os resultados obtidos, portanto, nos levaram a formular a seguinte hipótese explicativa: funções de reparo induzidas em células pré-tratadas seriam responsáveis pela remoção das lesões ou confeririam às mesmas a capacidade de superá-las através de um mecanismo de tolerância.

É importante enfatizar que, embora as células V79 venham sendo extensivamente utilizadas em estudos de mecanismos de ação de diversos agentes citotóxicos, a sua capacidade de reparar lesões induzidas por agentes alquilantes não foi ainda esclarecida em detalhes (KAINA, 1982, 1983; NATARAJAN e col, 1984; FROSINA e col, 1984; BOYLE e col, 1986 e MORTEN e col, 1988).

Já na década de 70, WARREN e col, (1979) observaram que as células V79 eliminavam lesões 3-metil-adenina e 7-metil-guanina de seu DNA através de um processo enzimaticamente mediado. Sabe-se hoje que a eliminação destas lesões em células de mamíferos deve-se à ação de DNA glicosilases específicas (LAVAL, 1985).

O resultado por nós obtido poderia dever-se, em princípio, à uma maior atividade de DNA-glicosilases. Esta maior atividade seria induzida pelo tratamento prévio, como observado por LAVAL (1985). Esta autora, entretanto, observou um aumento da taxa de sobrevivência em células pré-tratadas, o que não foi por nós detectado (Figuras 13 e 15).

Vários autores têm demonstrado que a resistência celular aos efeitos citotóxicos de agentes alquilantes não pode ser explicado pela remoção de N-alkil-purinas da molécula de DNA (KAINA e col, 1987 e AQUILINA e col, 1988).

O mecanismo indutivo de remoção das lesões introduzidas por agentes alquilantes no DNA envolve também, como se sabe, a síntese da enzima metiltransferase. Sabe-se, entretanto, que linhagens celulares transformadas pelo vírus SV40, como as células V79, são deficientes em remover lesões O<sup>6</sup>-metilguanina de seu DNA (fenótipo Mer<sup>-</sup>) (DAY III e col, 1980). Musk e col (1989) demonstraram que a alta sensibilidade de linhagens transformadas por SV40 à ação de agentes alquilantes deve-se à perda da atividade da enzima O<sup>6</sup>-alquiltransferase. Embora os efeitos tóxicos e mutagênicos de agentes alquilantes venham sendo estudados extensivamente, ainda não estão claramente compreendidos os mecanismos envolvidos nesses fenômenos. Embora as lesões O<sup>6</sup>-alquilguanina não constituam um bloqueio para a atividade de DNA polimerases (SAFFHILL e col, 1985), a presença no DNA dessas lesões não reparadas é altamente tóxica para as células (GOLDMACHER e col, 1986; DAS GUPTA e col, 1987 e HALL, 1988).

Resultados por nós obtidos, entretanto, nos mostram que 37% das células V79 ainda sobrevivem a uma concentração de 13 mM de STZ (Figura 3), dose letal para 90% das células Hela (Figura 18), fenotipicamente Mer<sup>+</sup> (DAY III e col, 1980).

Seguindo um protocolo de indução semelhante ao utilizado em células V79, pode-se observar na que células Hela tratadas com doses parceladas mostraram um nível de inibição similar àquele apresentado pelas células tratadas com a dose única de 1 mM de STZ. As células Hela, portanto, não mostraram a mesma adaptação verificada em células V79.

Estes resultados parecem indicar que as células V79 possuem um mecanismo que as auxilia a tolerar essas lesões induzidas pela STZ em seu DNA, sugerindo que esta lesão não é particularmente tóxica a estas células. DURRANT e col, (1981) observaram que uma maior resistência à morte celular ocorre em células V79 expostas a doses não tóxicas de MNU antes mesmo de um segundo tratamento com uma dose alta do mesmo agente. Entretanto, nem a frequência de mutação nem a perda de lesões O<sup>6</sup>-metilguanina da molécula de DNA é afetada nestas células.

Similarmente, FOX e col (1982) verificaram que o pré-tratamento das células V79 com doses sub-tóxicas de MNU aumentava a taxa de sobrevivência destas células após tratamento com uma segunda dose tóxica. Estes autores, entretanto, não verificaram nenhum decréscimo na taxa de mutação induzido pelo pré-tratamento. Sua conclusão é a de que as células V79 possuem um mecanismo de tolerância que ultrapassa as lesões O<sup>6</sup>-metilguanina presentes no DNA.

GOTH-GOLDSTEIN & HUGHES, (1987) identificaram uma linhagem celular resistente aos efeitos citotóxicos de agentes alquilantes,

derivada da conhecida linhagem CHO (células de ovário de hamster). Estes autores verificaram que essa maior resistência não era devida a diferenças na eficiência de reparo das bases metiladas e sim a um mecanismo de tolerância desconhecido, que altera os efeitos citotóxicos de agentes alquilantes.

Nossa hipótese parece concordar também com os resultados de TOKUDA & BODELL, (1988). Estes autores, estudando os efeitos citotóxicos de agentes alquilantes em células humanas e de roedores, observaram que estas apresentam-se 5-15 vezes mais resistentes à ação tóxica da STZ e MNU em comparação às células humanas. Isto levou-os a sugerir que a sobrevivência de células humanas parece ser dependente do reparo de lesões O<sup>6</sup>-metilguanina, ao passo que células de roedores possuem um mecanismo adicional de tolerância em resposta a agentes metilantes.

Resultados obtidos por BIGNAMI e col, (1989), demonstraram que um clone de células CHO toleram uma significativa concentração de lesões O<sup>6</sup>-alquil-guanina em seu DNA, sugerindo a não toxicidade desta lesão e a presença de algum mecanismo de tolerância nessas células.

Como uma possível explicação para o mecanismo acima citado, uma alteração no processo de reconhecimento de pareamento errôneo com a base O<sup>6</sup>-metilguanina e outros, tem sido sugerido em células de mamíferos (ISHIDA & TAKAHASHI, 1988), semelhante ao sistema ativo em E. coli (KARRAN & MARINUS, 1982).

A existência ou não de um mecanismo adaptativo em células V79, entretanto, ainda permanece controverso na literatura. Os mecanismos de tolerância, em princípio, podem ser devidos a uma capacidade adquirida da maquinaria de duplicação de superar os bloqueios presentes na molécula de DNA e/ou também à capacidade de ativar origens de duplicação normalmente não utilizadas (PARK & CLEAVER, 1979).

Embora as células V79 por nós estudadas tenham mostrado uma adaptação aos efeitos induzidos pela STZ, o mesmo não ocorreu após tratamentos parcelados com seu análogo MNU. Os resultados da figura 12 nos mostram que as células tratadas com doses parceladas mostraram um nível de inibição de aproximadamente 40%, similar àquele apresentado pelas células tratadas com a dose única de 1 mM de MNU.

Pode-se aqui argumentar que esse resultado negativo se deve ao uso restrito de protocolos experimentais. De fato, nós nos concentramos somente no tipo de protocolo que nos levou a um resultado positivo com seu análogo STZ, não explorando outras combinações de doses parceladas.

Um outro fator a ser considerado é o de que, embora sendo análogos estruturais, a STZ e a MNU parecem diferir, pelo menos em parte, quanto aos seus mecanismos de toxicidade. Este fato será, entretanto, discutido mais adiante.

Finalmente, um problema significativo associado a esses estudos de respostas celulares a lesões de DNA em células eucarióticas refere-se à tendência em extrapolar-se mecanismos moleculares e vias bioquímicas diretamente de bactérias e outros sistemas procarióticos para células eucarióticas. Embora a procura de paralelos entre bactéria e o homem seja, até certo ponto apropriada, é importante lembrar que fenômenos biologicamente relacionados em organismos tão diferentes podem diferir profundamente. Nesse sentido, estudos relativos aos processos de replicação e reparo de DNA mostram a existência de mecanismos diferentes em sistemas eucarióticos e procarióticos. Especificamente, em relação aos mecanismos de adaptação e tolerância às lesões de DNA em mamíferos, o problema, está ainda hoje, inconclusivo, devido à própria complexidade do assunto, e à divergência de informações e hipóteses encontradas na literatura.

## 2. ESTUDOS DE MECANISMOS DA CITOTOXICIDADE DA STZ E MNU

Neste trabalho foram verificados os efeitos tóxicos da STZ e MNU sobre os processos de viabilidade celular e replicação do DNA em duas linhagens celulares distintas. A faixa de dose de STZ utilizada é relativamente elevada em comparação à concentração tóxica para as células beta do tecido pancreático. De fato, a STZ constitui um composto altamente seletivo para células beta de pâncreas, onde numa

concentração de 1 mM mostra-se extremamente tóxica (RERUP, 1970; TJALVE e col, 1976 e JOHANSSON & TJALVE, 1978).

Os dados a seguir sumarizam os resultados obtidos após as medidas de sobrevivência celular (Figuras 3 e 18) e inibição da replicação do DNA (Figuras 4 e 17) em células V79 e HeLa, respectivamente.

	STZ	MNU
	(mM)	(mM)
V79	ID <sub>50</sub> 14,0	ID <sub>50</sub> 6,2
	D <sub>37</sub> 12,8	D <sub>37</sub> 2,3
HeLa	ID <sub>50</sub> 34,0	ID <sub>50</sub> 8,0
	D <sub>37</sub> 6,2	D <sub>37</sub> 2,0

Várias observações importantes podem ser extraídas dos dados da tabela acima:

1) a MNU mostrou-se mais efetiva que a STZ, tanto ao nível de síntese de DNA, como ao nível da toxicidade, em ambas as linhagens celulares.

2) a linhagem celular Hela mostrou-se mais resistente à inibição de síntese de DNA pela ação da STZ e MNU, em comparação às células V79.

3) a linhagem celular Hela mostrou-se mais sensível à ação letal da STZ, em comparação às células V79.

4) a MNU mostrou-se igualmente tóxica para ambas as linhagens celulares.

Os diferentes efeitos tóxicos dos dois agentes estudados podem dever-se a diferentes fatores, dentre eles:

- a) uma captação diferencial de STZ e MNU.
- b) à diferente reatividade dos compostos.
- c) à operância de mecanismos distintos de ação da STZ e MNU.
- d) à uma alquilação diferencial de outros componentes celulares diferentes do DNA.

Realmente, uma captação diferencial de STZ foi observada em células beta de pâncreas (ANDERSON e col, 1988), onde ocorre um maior acúmulo de STZ. Parece provável que essa maior captação de STZ se deva à presença do anel de glicose em sua molécula, o que a diferencia de

seu análogo MNU. As células beta, então, através de receptores específicos de membrana, reconheceriam e transportariam a STZ de maneira mais eficiente. Entretanto, para explicar a maior atividade da MNU por uma captação diferencial deveríamos admitir que a MNU seria captada mais facilmente pelas células estudadas. Isto seria o mesmo que supor que a molécula de glicose presente na estrutura molecular da STZ dificultaria seu acesso ao meio intracelular, ou seja, as células seriam pouco permeáveis à STZ. Não há nenhum trabalho, entretanto, que corrobore essa idéia.

De acordo com a segunda hipótese, poderíamos supor a formação de diferentes produtos de metilação do DNA pela ação da STZ e MNU. Entretanto, BENETT & PEGG (1981), observando os diferentes efeitos fisiológicos causados pela STZ e MNU, mostraram que, em concentrações equimolares dos agentes, a reatividade e concentração dos produtos formados na molécula de DNA "in vitro" eram idênticas. Além de produzirem alquilação na mesma extensão, ambas as toxinas produzem a mesma quantidade de quebras no DNA de células beta, em consequência da atividade de reparo de excisão (Le DOUX e col, 1986).

A suposição de que mecanismos distintos de ação poderiam ser responsáveis pelos diferentes efeitos tóxicos dos dois agentes, também parece improvável. A reatividade da STZ é devida a um processo de decomposição para uma estrutura análoga à MNU com formação de íons carbônio capazes de alquilar macromoléculas intracelulares (TJALVE, 1983) (Figura 2).

Os resultados obtidos em células V79 mostram que a toxicidade da MNU é bastante maior que a da STZ, enquanto a sua atividade inibitória ao nível da síntese do DNA não mostra-se tão diferente como para explicar tal mortalidade elevada. Além disso, a MNU mostrou-se igualmente tóxica para ambas as linhagens celulares, a despeito de seus diferentes efeitos na inibição do processo de síntese de DNA. Isso parece indicar que o bloqueio da replicação, por si só, não explicaria os diferentes efeitos letais dos agentes estudados.

A resistência das células V79 ao efeito letal da STZ pode sugerir que esta linhagem celular possui um mecanismo para tolerar altas taxas de lesões no DNA ou também que as lesões letais induzidas por agentes alquilantes tenham um outro alvo de ação. Parece razoável, portanto, admitir a existência de outras moléculas-alvo, diferentes do DNA, susceptíveis à alquilação por MNU e STZ, como por exemplo, as proteínas. Uma maior reatividade da MNU por certas enzimas centrais no metabolismo celular, poderia resultar na maior taxa de morte celular observada nas células V79.

De fato, WILSON e col, (1986), mostraram que a STZ produz alquilação de proteínas em maior extensão em células beta do que em células resistentes à STZ. Este fato corrobora a idéia da existência de outros alvos de ação tóxica para os agentes estudados.

A hipótese da existência de outros alvos celulares de alquilação admite a atuação preferencial da MNU, em células V79, na

metilação de outras moléculas-chave, diferentes do DNA, causando a inibição de outros processos metabólicos essenciais para a sobrevivência celular.

A busca de um outro alvo celular crítico, diferente do núcleo, nos levou a investigar a ação da STZ e MNU em mitocôndrias "in situ" em células V79.

Procuramos então estudar os efeitos da STZ e MNU nos processos de respiração e transporte de  $\text{Ca}^{++}$  em mitocôndrias de células V79.

O estudo das funções mitocondriais em células sempre foi difícil devido à dificuldade de obtenção de mitocôndrias isoladas destas células no estado acoplado. Recentemente, entretanto, demonstrou-se que o uso de digitonina permite o estudo da fosforilação oxidativa e transporte de  $\text{Ca}^{++}$  em mitocôndrias "in situ" (DO CAMPO & VERCESI, 1989). A digitonina foi usada inicialmente para permeabilizar seletivamente a membrana plasmática de uma ampla variedade de células, sem afetar a estrutura e função de organelas intracelulares (GRANGER & LEHNINGER, 1982 e VERCESI e col, 1989). Desta técnica, a observação mais importante é a de que as organelas localizadas dentro das células permeabilizadas com digitonina estão presentes em um ambiente estruturalmente mais fisiológico do que aquele presente em suspensões mitocondriais isoladas. A utilização de baixas concentrações de digitonina tornou possível a medida do consumo de oxigênio e da captação de cálcio por células V79 em suspensão.

A figura 21A nos mostra que fibroblastos V79 permeabilizados com digitonina têm a capacidade de captar o  $\text{Ca}^{++}$  do meio externo e retê-lo por um longo período de tempo, tamponando o  $\text{Ca}^{++}$  exógeno livre na concentração de 0,25  $\mu\text{M}$ . Esse padrão de resposta celular é análogo ao obtido com mitocôndrias isoladas, mostrando que a captação das células reflete, principalmente, a captação pelas mitocôndrias "in situ".

Células previamente tratadas por 30 minutos com 25 mM de STZ, entretanto, captam menores quantidades de  $\text{Ca}^{++}$ , e estocam este cátion por um período de tempo menor que as células controle, liberando-o a seguir (Figura 21B). O tratamento das células com 5 mM de MNU, nas mesmas condições, produziu um efeito similar ao obtido com 25 mM de STZ, o que evidencia uma maior potência de ação desta droga (Figura 21C).

A homeostase do  $\text{Ca}^{++}$  reflete um estado dinâmico de fluxo desse íon através das membranas plasmática, do retículo endoplasmático e mitocondrial. Alguns estudos recentes mostram que a ação tóxica de vários agentes está associada à produção de alterações no transporte de cálcio mitocondrial, com conseqüente desequilíbrio da homeostase desse íon no meio intracelular (NICOTERA e col, 1989).

Nossos resultados mostram, pela primeira vez, que os agentes alquilantes MNU e STZ alteram a homeostase do cálcio em células V79, e que a MNU é mais efetiva que a STZ.

As medidas da velocidade de consumo de oxigênio por células V79 permeabilizadas, tendo succinato como substrato oxidável, mostram um efeito diferencial destas toxinas sobre esse processo (Figura 22). O pré-tratamento das células com 25 mM de STZ levou a um aumento da velocidade de consumo de oxigênio no estado 4 (Figura 22B), indicando um desacoplamento dos processos de respiração e fosforilação oxidativa. O tratamento com 5 mM de MNU produziu uma ativação mais intensa do consumo de oxigênio (Figura 22A), indicando que este agente alquilante é um desacoplador mais potente que a STZ.

O fato da MNU mostrar-se mais efetiva ao nível das funções mitocondriais das células V79 está em concordância com sua maior eficácia na indução de mortalidade nestas células.

Nossos resultados sugerem, portanto, que alterações das funções mitocondriais induzidas por STZ e MNU parecem estar relacionadas com os efeitos tóxicos destes alquilantes em células V79. Tais alterações poderiam resultar de uma ação destas toxinas ao nível da membrana interna mitocondrial, causando alterações estruturais, que por sua vez, produziriam alterações ao nível do transporte de cálcio. Modificações do potencial de membrana, resultantes da desestruturação da membrana interna, poderiam causar alterações do transporte de elétrons e da fosforilação oxidativa.

Essa hipótese encontra apoio nos trabalhos de HOLKE e col, (1988) que, estudando os efeitos tóxicos de um novo agente

quimioterápico, um complexo de coordenação com ouro, mostraram a indução de alterações de funções mitocondriais, decorrentes de um colapso do potencial da membrana interna, com conseqüente desacoplamento da fosforilação oxidativa. Em relação à STZ, já há muito tempo se havia demonstrado que sua ação em ilhotas pancreáticas estava associada à uma queda nas concentrações de ATP (GUNNARSSON e col, 1974). Entretanto, somente recentemente, (WILSON e col, 1988) se levantou uma hipótese explicando a relação entre a queda dos níveis de ATP e o efeito tóxico da STZ em células beta. Esses autores demonstraram que a STZ tem a propriedade de produzir metilação de proteínas com grande eficiência em células beta, tal que a razão de metilação proteínas/DNA nestas células é bem maior que em células resistentes à STZ.

Com base nos resultados acima, foi proposto que os efeitos tóxicos da STZ em células beta resultariam da sua capacidade de produzir alquilações não só no DNA, mas também em certas proteínas-chave, como por exemplo, enzimas ativas na síntese do ATP. A queda nos níveis intracelulares de ATP, associada à inibição de síntese de NAD, seria crítica para a sobrevivência celular.

Essa hipótese nos levou a pensar que, sendo as células Hela particularmente sensíveis aos efeitos tóxicos da STZ, também poderiam ser susceptíveis a uma taxa de metilação elevada de proteínas. Essa idéia nos abre perspectivas interessantes de continuidade do trabalho.

na busca de uma explicação das diferenças observadas nas células humanas e de roedores.

É importante lembrar que a proposta de WILSON e col, (1988) não foi ainda comprovada experimentalmente. Uma possibilidade interessante de abordá-la seria através da análise das funções mitocondriais de células beta expostas à STZ.

Acreditamos que esses estudos possam contribuir para o esclarecimento do mecanismo molecular de indução de diabetes por estreptozotocina.

## VI. RESUMO

A estreptozotocina é uma nitrosoamida de ocorrência natural que tem sido largamente utilizada como indutora de diabetes em animais experimentais.

Estudos sobre o mecanismo de ação da STZ apontam o DNA como alvo molecular de seus efeitos, pela sua reatividade como agente alquilante. Agentes alquilantes são capazes de induzir uma resposta adaptativa em bactérias e em alguns tipos de células de mamíferos. Isso nos levou a pesquisar os efeitos da STZ na taxa de síntese do DNA de células de mamíferos (fibroblastos de hamster chinês, linhagem V79). A STZ inibiu a taxa de incorporação de timidina-<sup>3</sup>H em células V79 de maneira dependente de dose.

Realizando-se um tratamento com doses parceladas (0,38 mM e 11,0 mM) observou-se um aumento estatisticamente significativo (teste de Kruskal-Wallis) da incorporação de timidina-<sup>3</sup>H em relação aos valores obtidos para a dose tóxica de 11,0 mM. Estes resultados indicam que a STZ, similarmente a outros agentes alquilantes, é capaz de induzir uma resposta adaptativa em fibroblastos V79.

Analisando também os efeitos da STZ sobre a taxa de síntese de DNA na linhagem celular humana Hela, observamos um padrão diferente de inibição quando comparado à linhagem V79. As curvas de

sobrevivência celular ao tratamento com STZ mostraram, entretanto, uma atividade citotóxica aparentemente paradoxal com os resultados de inibição de síntese de DNA: a linhagem humana mostrou-se mais sensível ao efeito letal da STZ. Estes resultados sugerem que a toxicidade da droga não está relacionada exclusivamente com mecanismos de lesão do DNA, podendo sua ação alquilante ser também exercida sobre outros alvos celulares. Além disso, observamos que em comparação com a STZ, o análogo não diabetogênico MNU, mostrou ser uma toxina mais potente para células V79. Entretanto, o padrão de inibição de síntese de DNA de ambos os compostos não são suficientemente diferentes para corroborar a idéia de que o DNA é o único alvo de ação da STZ.

Para determinar se as mitocôndrias poderiam consistir num outro alvo de ação da STZ e MNU, analisamos os efeitos dos dois agentes em mitocôndrias "in situ" de células V79 permeabilizadas com digitonina. A determinação do fluxo de  $Ca^{++}$  e consumo de oxigênio indicaram que estes dois agentes aumentam a permeabilidade da membrana mitocondrial. A MNU mostrou-se mais tóxica para mitocôndrias que a STZ, o que concorda com seu maior efeito letal.

Os resultados citados indicam uma possível explicação alternativa para a ação tóxica da STZ e MNU, sugerindo que, além de danos ao DNA, injúrias às mitocôndrias exercem um papel crítico na citotoxicidade destes compostos nitrogenados e na ação diabetogênica da STZ.

## VII. SUMMARY

Streptozotocin is a naturally occurring nitrosoamide that has been extensively used as diabetes inducer in experimental animal models. Studies at the molecular level indicated the DNA as the major target of STZ, because of its alkylation properties.

It's known that alkylating agents induces an adaptive response in bacterias and in some mammalian cell lines. This led us to investigate the effects of STZ on DNA synthesis rate in V79 fibroblasts. STZ inhibited thymidine-<sup>3</sup>H uptake in this cell line in a dose dependent manner. In a split-dose protocol (0,38 mM and 11,0 mM) we observed an increase in DNA synthesis rate when compared to that for the higher dose treatment only. Although this increase in DNA synthesis rate is small it was reproducibly found and statistically significant (Kruskall-Wallis test). These results show that STZ, similarly to other alkylating agents, induces an adaptive response in V79 cells.

In comparison to V79 cells, Hela human cell line showed a different DNA synthesis inhibition pattern: at the same concentration, STZ showed to be a much more potent toxin to V79 cells.

Determinations of cellular survival capacity to STZ treatment showed, however, an absence of parallelism between both

effects, the Hela cells being more susceptible to the STZ lethal effect than V79 one. These results indicate that STZ toxicity isn't exclusively related with DNA and, therefore, alkylation in targets other than DNA may be involved on the STZ toxicity mechanism.

Besides, we observed that, in comparison to STZ, the non-diabetogenic analogue MNU, showed to be a more potent toxin to V79 cells. However, the DNA synthesis inhibition patterns of both drugs were not much different to support the view that the DNA is the unique target for their toxic action.

With the aim to determine whether the mitochondria could be another target for STZ or MNU inducing cell killing, we analysed the effects of both drugs in mitochondria "in situ" of digitonin-permeabilized V79 cells. Determination of  $Ca^{++}$  flux and oxygen consumption have indicated that these drugs increase the permeability of the inner membrane of mitochondria. The order of mitochondria susceptibility to MNU was markedly higher than to STZ, in accordance to their killing effects.

The results of the present studies provide an alternative for the toxic action of STZ and MNU, suggesting that besides DNA damage, injuries to mitochondria could exert a critical role in the cytotoxicity of these nitroso compounds and in the diabetogenic action of STZ.

## VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBOTT, P.J. & SAFFHILL, R. DNA synthesis with methylated poly (dC-dG) templates. Evidence for a competitive nature to miscoding by O<sup>6</sup>-methylguanine. *Biochem. Biophys. Acta*, 562: 51. 1979.
- ANDERSSON, T.; SCHEIN, P.S.; McMENAMIN, M.G. & COONEY, D.A. Streptozotocin diabetes: correlation with extent of depression of pancreatic islet nicotinamide adenine dinucleotide. *J. Clin. Invest.*, 54: 672. 1988.
- AQUILINA, G.; FROSINA, G.; ZIJNO, A.; DI MUCCIO, A.; DOGLIOTTI, E.; ABBONDANDOLO, A. & BIGNAMI, M. Isolation of clones displaying enhanced resistance to methylating agents in O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA-methyltransferase proficient CHO cells. *Carcinogenesis*, 9: 1217. 1988.
- ARISON, R.N. & FENDALE, E.L. Induction of renal tumours by streptozotocin in rats. *Nature*, 214: 1254. 1967.
- BENNETT, R.A. & PEGG, A.E. Alkylation of DNA in rat tissues following administration of streptozotocin. *Cancer Res*, 41: 2786. 1981.
- BIGNAMI, M.; DOGLIOTTI, E.; AQUILINA, G.; ZIJNO, A.; WILD, C.P. & MONTESANO, R. O<sup>6</sup>-methyltransferase-deficient and proficient CHO

- cells differ in their responses to ethyl and methyl-nitrosourea-induced DNA alkylation. *Carcinogenesis*, 10(7): 1329. 1989.
- BOGDEN, V.M.; EASTMAN, A. & BRESNIK, A. A system in mouse liver for the repair of O<sup>6</sup>-methylguanine lesions in methylated DNA. *Nucleic Acids Res.*, 9: 3089. 1981.
- BOITEUX, S.; HUISMAN, O. & LAVAL, J. 3-methyladenine residues in DNA induce the SOS function in *E. coli*. *EMBO J.*, 3: 2560. 1984.
- BOITEUX, S. & LAVAL, J. Imidazole open ring 7-methylguanine: An inhibition of DNA synthesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 110: 552. 1983.
- BRENT, T.P. Partial purification and characterization of a human 3-methyladenine and methylguanine by a rat liver nuclear fraction. *Biochemistry*, 18: 911. 1979.
- BRODER, L.E.; CARTER, S.K. Pancreatic islet cell carcinoma II. Results of therapy with streptozotocin in 52 patients. *Ann. Intern. Med.*, 79: 108. 1973.
- BOULDEN, A.M.; FOOTE, R.S.; FLEMING, G.S.; MITRA, S. Purification and some properties of human DNA O<sup>6</sup>-methylguanine methyltransferase. *J. Biosci.*, 11: 215. 1987.

- BOYLE, J.M.; SAFFHILL, R.; MARGINSON, G.P. & FOX, M. A comparison of cell survival, mutation and persistence of putative promutagenic lesions in chinese hamster cells exposed to BNU or MNU. *Carcinogenesis*, 7(12): 1981. 1986.
- BUKOWSKI, R.M.; JOHNSON, K.G.; PETERSON, R.F.; STEPHENS, R.L.; RUKIN, S.E.; NEILAN, B. & COSTANZI, J.H. A phase II trial of combination chemotherapy in patients with metastatic carcinoid tumours: A Southwest Oncology Group study. *Cancer*, 60(12): 2891. 1987.
- CATHCART, R. & GOLDTHWAIT, D.A. Enzymatic excision of 3-methyladenine and 7-methylguanine by a rat liver nuclear fraction. *Biochemistry*, 20: 273. 1981.
- CHANCE, B. & WILLIAMS, G.R. The respiratory chain and oxidative phosphorylation. *Adv. Enzymol.*, 17: 65. 1956.
- CHANG, C.C.; D'AMBROSIO, S.M.; SCHULTZ, R.A.; TROSKO, J.E. & SETLOW, R.B. Modification of UV induced mutation frequencies in Chinese hamster cells by dose fractionation, cyclohexamide and caffeine treatments. *Mut. Res.*, 52: 231. 1978.
- CORNELIS, J.J.; LUPKER, J.H. & VAN DER EB, A.J. UV-reactivation, virus production and mutagenesis of SV40 in UV irradiated monkey kidney cells. *Mut. Res.*, 71: 139. 1980.

- COUTO, L.B.; CHAUDHURI, I.; DONAHUE, B.A.; DEMPSE, B. & ESSIGNANN, J.M. Separation of the SOS-dependent and SOS-independent components of alkylating-agent mutagenesis. *J. Bacteriol.*, 171(8): 4170. 1989.
- CRADDOCK, V.M.; HENDERSON, A.R. & GASH, S. Nature of the constitutive and induced mammalian O<sup>6</sup>-methylguanine DNA repair enzyme. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 197: 546. 1982.
- CROUSH, R.K.; GANDY, S.E.; KIMSEY, G.; GALBRAITH, R.A.; GALBRAITH, G.M.P.; BUSE, M.G. The inhibition of islet superoxide dismutase by diabetogenic drugs. *Diabetes*, 30: 235. 1981.
- D'AMBROSIO, S.M. & SETLOW, R.B. Enhanced of postreplication repair in Chinese hamster cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 73: 2396. 1976.
- Das GUPTA, U.B. & SUMMERS, W.C. Ultraviolet reactivation of herpes simplex virus is mutagenic and inducible in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 75: 2378. 1978.
- DAS GUPTA, U.B.; BABICH, M.A.; & SCUDIERO, B.D.A. The role of O<sup>6</sup>-methylguanine in human cell killing, sister chromatid exchange induction and mutagenesis: A review. *J. Cell. Sci. Suppl.*, 6: 333. 1987.

- DAY III, R.S.; ZIDLKOWSKI, C.H.J.; SCUDIERO, D.A.; MEYER, S.A.; LUBINIECKI, A.S.; GIRARDI, A.J.; GALLOWAY, S.M. and BYNUM, G.D. Defective repair of alkylated DNA by human tumour and SV-40 transformed human cells strains. *Nature*, 288: 18. 1980.
- DAY III, R.S. BABICH, M.A.; YAROSH, D.B.; SCUDIERO, B.D.A. The role of O<sup>6</sup>-methylguanine in human cell killing, sister chromatid exchange induction and mutagenesis: A review. *J. cell. Sci Suppl.*, 6: 333. 1987.
- DEMPLE, B. & HALBROOK, J. Inducible repair of oxidative DNA damage in *Escherichia coli*. *Nature*, 304: 466. 1982.
- D'INCALCI, M.; CITTI, L.; TAVERNA, P. & CATAPANO, C.V. Importance of the DNA repair enzyme O<sup>6</sup>-alkyltransferase (AT) in cancer chemoterapy. *Cancer Treat. Rev.*, 15: 1988.
- DO CAMPO, R. & VERCESI, A.E. Ca<sup>++</sup> transport by coupled *Trypanosoma cruzi* mitochondria "in situ". *J. Biol. Chem.*, 264(1): 108. 1989.
- DOLAN, M.E.; OPLINGER, M. & PEGG, A.E. Sequence specificity of guanine alkylation and repair. *Carcinogenesis*, 9(11): 2139. 1988.
- DULIN, W.E. & WISE, B.M. Studies on the ability of compounds to block the diabetogenic activity of streptozotocin. *Diabetes*, 18: 459. 1969.

- DU PRIEST, R.W.; JUNIOR, M.D.; HUNTINGTON, M.C.; MASSEY, W.H.; WEISS, A.J. WILSON, W.L. & FLETCHER, W.S. Streptozotocin therapy in 22 cancer patients. *Cancer*, 35: 258.1975.
- EADIE, J.S.; CONRAD, M.; LOERCHEN, D. & TOPAL, M.D. Mechanism of mutagenesis by O<sup>6</sup>-methylguanine. *Nature*, 308: 201. 1984.
- ECHOLS, H. SOS Functions, Cancer: An Inducible Evolution. *Cell*, 23: 1. 1981.
- EIZIRIK, D.L.; DE LUCID, M.A.; BOSCHERO, A.C. & HOFFMANN, M.E. 1,10 phenantroline, a metal chelator, protects against alloxan-but not streptozotocin-induced diabetes. *J. Free Rad. Biol. Med.*, 2: 189. 1986.
- EVANS, J.S.; GERRITSEN, G.G.; MANN, K.M. Antitumour and hyperglycemic activity of streptozotocin. *Cancer Treat. Rep.*, 48: 1. 1965.
- EVENSEN, G. & SEEBERG, E. Adaptation to alkylation resistance involves the induction of DNA glycosylase. *Nature*, 296: 773. 1982.
- FOOTE, R.S.; PAL, B.C. & MITRA, S. Quantitation of O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA-methyltransferase in Hela cells. *Mut. Res.*, 119: 221. 1983.

- FOX, M; SULTANI-MAKZOUNI, C.M. & BOYLE, J.M. A search for adaptative or inducible responses to DNA damage in V79 Chinese hamster cells. *Biochimie*, 64: 687. 1982.
- FRAM, R.J.; MARINUS, M.G. & VOLKERT, M.R. Gene expression in *E. coli* after treatment with streptozotocin. *Mut. Res.*, 198: 45. 1988.
- FRIEDBERG, E.C.; BONURA, T.; CONE, R.; SIMMONS, R. & ANDERSON, C. Base excision repair of DNA. In: *DNA repair mechanism*. P.C. Hanawalt, E.C. Friedberg & C.F. Fose, eds., pp163. New York: Academic. 1978.
- FRIEDBERG, E.C.; MOUSTACCHI, E.; PAUL, B.R. & LEHMANN, U.K. Possible evidence for inducible repair in human cells in culture. *Proc. Conferenced on Structural Pathology in DNA and the Biology of Ageing*, 80. Bonn. Deutsche Farschungsgemeinschaft. 1980.
- FROSINA, G.; BONATTI, S. & ABBONDANDOLO, A. Negative evidence for an adaptative response to lethal and mutagenic effects of alkylating agents in V79 Chinese hamster cells. *Mut. Res.*, 129: 243. 1984.
- FROSINA, G. & ABBONDANDOLO, A. The current evidence for an adaptive response to alkylating agents in mammalian cells with special reference to experiments with in vitro cell cultures. *Mut. Res.*, 154: 85. 1985.

FROSINA, G. & LAVAL, F. The O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA-methyltransferase activity of rat hepatoma cells is increased after a single exposure to alkylating agents. *Carcinogenesis*, 8: 91. 1987.

GOLDMACHER, V.S.; CUZICK, R.A. & THILLY, W.G. Isolation and partial characterization of human cell mutants differing in sensitivity to killing and mutation by methylnitrosourea and N-methyl-N-nitro-nitrosoguanidine. *J. Biol. Chem.*, 261(27): 12462. 1986.

GOTH-GOLDSTEIN & HUGHES, M. Characterization of a CHO variant in respect to alkylating agent-induced biological effects and DNA repair. *Mut. Res.*, 184: 139. 1987.

GOTTESMAN, S. Genetic control of SOS system in *Escherichia coli*. *Cell*, 23: 1. 1981.

GRANGER, D.L. & LEHNINGER, A.L. Sites of inhibition of mitochondrial electron transport in macrophage-injured neoplastic cells. *J. Cell Biol.*, 95: 1982.

GUNNARSSON, R.; BERNE, C. & HELLESTROM, C. Citotoxicity effects of streptozotocin and n-nitrosomethylurea on the pancreatic beta cells with special regard to the role of nicotinamide adenine dinucleotide. *Biochem. J.*, 140: 487. 1974.

- HALL, J.; KATAOKA, H.; STEPHENSON, C. & KARRAN, P. The contribution of O<sup>6</sup>-methylguanine and methylphosphotriesters to the cytotoxicity of alkylating agents in mammalian cells. *Carcinogenesis*, 9: 1587. 1988.
- HANAWALT, P.C.; COOPER, P.K.; GANESAN, A.K. & SMITH, C.A. DNA repair in bacteria and mammalian cells. *Ann. Rev. Biochem.*, 48: 783. 1979.
- HARRIS, A.L.; KARRAN, P. & LINDAHL, T. O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA-methyltransferase of human lymphoid cells: structural and kinetic properties and absence in repair-deficient cells. *Cancer Res.*, 43: 3257. 1983.
- HERR, R.R.; JAHNKE, H.K. & ARGOUDELIS, A.D. The structure of streptozotocin. *J. Am. Chem. Soc.*, 89: 4808. 1967.
- HIRSCH, M.S. & BLACK, P.H. Activation of mammalian leukemia viruses. *Adv. Virus Res.*, 19: 265. 1974.
- ISHIDA, R. & TAKAHASHI, T. Increased O<sup>6</sup>-methylguanine DNA methyltransferase activity and reduced mutability in 1-(4-amino-2-methyl-5-pyrimidinyl)methyl-3-(2-chloroethyl)-3-nitrosourea-resistant HeLa S3 cells. *Carcinogenesis*, 9: 1079. 1988.
- JEGGO, P.; DEFAIS, M.; SAMSON, I. & SCHENDEL, P. An adaptative response of *Escherichia coli* to low levels of alkylating agent:

Comparison with previously characterized DNA repair pathways. *Mol. Gen. Genet.*, 157: 1. 1977.

JOHANSSON, E.B. & TJALVE, H. Studies on the tissue-disposition and fate of  $^{14}\text{C}$ -streptozotocin with special reference to the pancreatic islets. *Acta Endocrinol.*, 89: 339. 1978.

JOHANSSON-BRITTEBO, E. & TJALVE, H. The fate of  $^{14}\text{C}$ -streptozotocin in nicotinamide pretreated mice observations on pancreatic islet radioactivity and urinary N-methyl- $^{14}\text{C}$  nicotinamide excretion. *Cancer Lett.*, 8: 169;. 1979.

KAINA, B. Enhanced survival and reduced mutation and aberration frequencies induced in V79 Chinese hamster cells pre-exposed to low levels of methylating agents. *Mut. Res.*, 93: 195. 1982.

KAINA, B. Studies on adaptation of V79 chinese hamster cells to low doses of methylating agents. *Carcinogenesis* 4(11): 1437. 1983.

KAINA, B.; VAN ZEELAND, A.A.; BACKENDORF, C.; THIELMAN, H.W. & VAN DE PUTTE, P. Transfer of human genes conferring resistance to methylating mutagens, but not to UV irradiation and cross-linking agents into Chinese hamster ovary cells. *Mol. Cell Biol.*, 7: 2024. 1987.

- KARRAN, P. & MARINUS, M.G. Mismatch correction at O<sup>6</sup>-methylguanine residues in E. coli DNA. *Nature*, 296: 868. 1982.
- KENYON, C.J. & WALKER, G.C. DNA-damaging agents stimulate gene expression at specific loci in Escherichia coli. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 77: 2819. 1980.
- KOHN, K.W. Interstrand crosslinking of DNA by 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea and other 1-(2-chloroethyl)-1-nitrosoureas. *Cancer Res.*, 37: 1450. 1977.
- LAVAL, F. & LAVAL, J. Adaptative response in mammalian cells: crossreactivity of different pretreatments on cytotoxicity as contrasted to mutagenicity. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 81: 1062. 1984.
- LAVAL, F. Repair of methylated bases in mammalian cells during adaptative response to alkylating agents. *Biochimie*, 67: 361. 1985.
- LAWLEY, P.D. & ORR, D.J. Specific excision of methylation products from DNA of E. coli treated with N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine. *Chem. Biol. Interact.*, 2: 154. 1970.
- Le DOUX, S.P.; WOODLEY, S.E.; PATTON, N.J. & WILSON, G.L. Mechanisms of nitrosourea-induced beta-cell damage. Alterations in DNA. *Diabetes*, 35: 866. 1986.

- Le DOUX, S.P.; HALL, C.R.; FORBES, P.M.; PATTON, N.J. & WILSON, G.L.  
Mechanisms of nicotinamide and thymidine protection from alloxan  
and streptozotocin toxicity. *Diabetes*, 37(8): 1015. 1988.
- LEHMANN, A.R. & KARRAN, P. DNA repair. *Int. Rev. Cytol.*, 72: 101.  
1981.
- LEWIS, C.; BARBIERS, A.R. Streptozotocin, a new antibiotic: in vitro  
and in vivo evaluation. *Antibiotics Annual.*, 123. 1959.
- LINDAHL, T. DNA repair enzymes. *Ann. Rev. Bioch.*, 51: 61. 1982.
- LINDAHL, T. & KARRAN, P. Enzymatic removal of mutagenesis and lethal  
lesions from alkylated DNA. 13th Int. Cancer Congress. Part B.  
*Biology of Cancer (1)*. Liss. New York. 241. 1983.
- LINDAHL, T.; SEDGWICH, B.; SEKIGUCHI, M. & NAKABEPPU, Y. Regulation  
and expression of the adaptative response to alkylating agents.  
*Ann. Rev. Biochem.*, 57: 133. 1988.
- LITTLE, J.W. & MOUNT, D.W. The SOS regulatory system of *Escherichia*  
*coli*. *Cell*, 29: 11. 1982.
- LOECHLER, E.L.; GREEN, C.L. & ESSIGNAN, J. In vivo mutagenesis by O<sup>6</sup>-  
methylguanine built into a unique site in a viral genome. *Proc.*  
*Natl. Acad. Sci.*, 81: 6271. 1984.

- LOVELESS, A. Possible relevance of O<sup>6</sup>-alkylation of deoxyguanosine to the mutagenicity and carcinogenicity of nitrosoamines and nitrosoamides. *Nature*, 223: 206. 1969.
- MACK, S.L.; FRAM, R.J. & MARINUS, M.G. Sequence specificity of streptozotocin- induced mutations. *Nucl. Acids Res.*, 16: 9811. 1988.
- Mc CARTHY, T.V. & LINDAHL, T. Methylphosphotriesters in alkylated DNA are repaired by the ada regulatory protein of E. coli. *Nucleic Acids Res.*, 13: 2683. 1985.
- MADEIRA, V.M.C. A rapid and ultrasensitive method to measure Ca<sup>++</sup> movements across biological membranes. *Arch. Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 64: 870. 1975.
- MARGINSON, G.P.; BRESIL, H. MARGINSON, J.M. & MONTESANO, R. Effect of chronic administration of dimethylnitrosoamine on the excision of O<sup>6</sup>-methylguanine from rat liver DNA. *Cancer Lett.*, 2: 79. 1976.
- MARGINSON, G.P.; CURTIN, N.J.; SNELL, K. & CRAIG, A.W. Effect of chronic N, N-diethyl-nitrosoamine on the excision of O<sup>6</sup>-ethyl-guanine from rat liver DNA. *Br. J. Cancer*, 40: 809. 1979.
- MARGINSON, G.P. Effect of pretreatment of rats with N-methyl-N-nitrosourea on the repair of O<sup>6</sup>-methylguanine in liver DNA. *Carcinogenesis*, 2: 431. 1981.

MARIANI, L.; BERTINI, R.; FIORIO, R.; GERVASI, P. & CITTI, L. The influence of chronic N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine pre-treatments on mutagenic response and O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA-methyltransferase activity in V79 Chinese hamster cells. *Mut. Res.*, **208(2)**: 73. 1988.

MASIELLO, P.; KARUNANAYAKE, E.H.; BERGAMINI, E. & MELLOWS, G. <sup>14</sup>C-streptozotocin: its distribution and interaction with nucleic acids and proteins. *Biochem. Pharmacol.*, **30**: 1907. 1981.

MATTES, W.B.; HARTLEY, J.A.; KHON, K.W. & MATHESON, D.W. G-C-rich regions in genomes as targets for DNA alkylation. *Carcinogenesis*, **9(11)**: 2065. 1988.

MCCARTHY, T.V.; KARRAN, P. & LINDAHL, T. Inducible repair of O-alkylated DNA pyrimidines in *Escherichia coli*. *Embo J.*, **3**: 545. 1984.

MENEGHINI, R.; MENCK, C.F. & SCHUMACHER, R.I. Mechanism of tolerance to DNA lesions in mammalian cells. *Quartely Rev. Biophys.*, **14**: 381. 1981.

MONTESANO, R.; BRESIL, H. & MARGINSON, G.P. Increased excision of O<sup>6</sup>-methylguanine from rat liver DNA after chronic administration of dimethylnitrosoamine. *Cancer Res.*, **39**: 1798. 1979.

- MONTESANO, R.; BRESIL, H.; PLANCHE-MARTEL, G.; MARGINSON, G.P. & PEGG, A.E. Effect of chronic treatment of rats with dimethylnitrosoamine on the removal of O<sup>6</sup>-methylguanine from DNA. *Cancer Res.*, **40**: 452. 1980.
- MORTEN, J.E.N. & MARGINSON, G. Increased O<sup>6</sup>-alkylguanine alkyltransferase activity in chinese hamster V79 cells following selection with chloroethylating agents. *Carcinogenesis*, **9(1)**: 45. 1988.
- MOUSTACCHI, C.; CHUMANN, U.K. FRIDEBERG, C.C. Defective recovery of semiconservative DNA synthesis in xeroderma pigmentosum cells following split dose ultraviolet-irradiation. *Mut. Res.*, **62**: 159. 1979.
- MURRAY, V. O<sup>6</sup>-methylguanine specifically induces AT-GC transition mutations. *Mut. Res.*, **190**: 267. 1987.
- MUSK, S.R.; HATTON, D.H.; BOUFFLER, S.B.; MARGINSON, G.P. & JOHNSON, R.T. Molecular mechanisms of alkylation sensitivity in Indian muntjac cell lines. *Carcinogenesis*, **10(7)**: 1219. 1989.
- NAKABEPPU, Y.; KONDO, H. & SEKIGUCHI, M. Cloning and characterization of the alk A gene of *Escherichia coli* that encodes 3-methyladenine DNA glycosylase II. *J. Biol. Chem.* **259**: 13723. 1984.

- NAKABEPPU, Y. & SEKIGUCHI, M. Regulatory mechanisms for induction of synthesis of repair enzymes in response to alkylating agents: Ada protein acts as a transcriptional regulator. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.*, 83(11): 6297. 1986.
- NATARAJAN, A.T.; SIMONS, J.W.I.M.; VOGEL, E.M. & ZEELAND, A.A. relationship between cell killing, chromosomal aberrations, sister-chromatid exchanges and point mutations induced by monofunctional alkylating agents in Chinese hamster cells. *Mut. Res.*, 128: 31. 1984.
- NEWBOLD, R.F.; WARREN, W.; MEDICALF, A.C.S. & AMOS, J. Mutagenicity of carcinogenic methylating agents is associated with a specific DNA modification. *Nature*, 283: 596. 1980.
- NICOTERA, P.; THOR, H. & ORRENIUS, S. Cytosolic free  $Ca^{++}$  and cell killing in hepatoma iclc7 exposed to chemical anoxia. *FASEB J.*, 3: 59. 1989.
- O'CONNOR, T.R.; BOITEUX, S. & LAVAL, J. Ring opened 7-methylguanine residues in DNA are a block to in vitro DNA synthesis. *Nucleic Acids Res.*, 16: 13.5879. 1988.
- OKAMOTO, H. Reguylation of proinsulin synthesis in pancreatic islets and a new aspect to insulin dependent diabetes. *Mol. cell Biochem.*, 37: 43. 1981.

- OKAMOTO, H. The role of poly (ADP-ribose) syntetase in the development of insulin-dependent diabetes and islet-cell regeneration. *Biomed. Biochim. Acta*, 1: 15. 1985.
- OLSSON, M. & LINDAHL, T. Repair of alkylated DNA in *E. coli*, methyl group transfer from O<sup>6</sup>-methylguanine to a protein cysteine residue. *J. Biol. Chem.*, 255: 10569. 1980.
- OLSSON, M. On the role of calcium in toxic cell injury.<sup>70</sup> International Washington Spring Symposium. Washington, D.C. May, 19-22. Abstract 12. 1987.
- PAINTER, R. B. Rapid test to detect agents that damage DNA. *Nature*, 2: 65. 1977.
- PAINTER, R. B. DNA synthesis inhibition in Hela cells as a simple test for agents tha damage human DNA. *J. Environ. Toxicol.*, 2: 65. 1978.
- PARK, S.D. & CLEAVER, J.E. Post-replication repair: questions of its definition and possible alteration in XF cells strains. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 76: 3927. 1979.
- PATERSON, M.C. & GENTNER, N.E. Introduction: environmentally induced DNA lesions and their biological consequences. In: *Repairable lesions in microorganisms*. Hurst, A. & Nasim, A., eds., Academic Press, New York, pp 1. 1984.

PEGG, A.E. Formation and subsequent repair of alkylation lesions in tissues of rodents treated with nitrosoamines. *Arch. Toxicol. Suppl.*, 3: 55. 1980.

PEGG, A.E. & FERRY, W. Stimulation of transfer of methyl groups from O<sup>6</sup>-methylguanine in DNA to protein by rat liver extracts in response to hepatotoxins. *Carcinogenesis*, 2: 1195. 1981.

RADMAN, M. Is there SOS induction in mammalian cells? *Photochem. Photobiol.*, 32: 823. 1980.

RAJALAKSHMI, S.; RAD, P.N. & AND SARMA, D.S.R. Chemical carcinogenesis: interactions of carcinogens with nucleic acids. In: *Cancer: A comprehensive treatise. v 1.* Becker, F.F., ed., Plenum Press, N.Y.: 335. 1982.

RAKIETEN, N.; RAKIETEN, M.L. & NADKARNI, M.V. Studies on the diabetogenic action of streptozotocin (NSC-37917). *Cancer Treat. Rep.*, 29: 91. 1963.

RAKIETEN, N.; GORDON, B.S. & COONEY, D.A. Renal tumorigenic action of streptozotocin (NSC 85998). *Cancer Treat. Rep.*, 52: 563. 1968.

RAKIETEN, N.; GORDON, B.S & BEATY, A. Pancreatic islet cell tumors produced by combined action of streptozotocin and nicotinamide. *Proc. Soc. Explt. Biol. Med.*, 137: 280. 1971.

RERUP, C.C. Drugs producing diabetes through damage of the insulin secreting cells. *Pharmacol. Rev.*, 22: 185. 1970.

ROBBINS, M.J.; SHARP, R.A.; SLONIM, A.F. & BURR, I.M. Protection against streptozotocin-induced diabetes by superoxido dismutase. *Diabetologia*, 18: 55.1980.

ROBERTS, J.J. The repair of DNA modified by cytotoxic, mutagenic and carcinogenic chemicals. *Adv. Rad. Biol.*, 7: 211. 1978.

ROSSINI, M.D.; LIKE, A.A.; DULIN, W.E. & CAHILL, G.F.Jr. Pancreatic beta cell toxicity by streptozotocin Anomers. *Diabetes*, 26: 1120. 1977.

SAFFHIL, R. MARGINSON, G.P. & O'CONNOR, F.J. Mechanisms of carcinogenesis induced by alkylating agents. *Biochim. Biophys. Acta*, 823: 11. 1985.

SAMSON, L. & CAIRNS, J. Anew pathway for DNA repair in *E. coli*. *Nature*, 267: 281. 1977.

SAMSON, L. & SCHWARTZ, J.L. Evidence for an adaptative DNA repair pathway in CHO and human skin fibroblast cell lines. *Nature*, 267: 861. 1980.

- SANDLER, S. & ANDERSON, A. The partial protective effect of the hydroxyl radical scavenger dimethylurea on streptozotocin-induced diabetes in the mouse in vivo and in vitro. *Diabetologia*, 23: 374. 1982.
- SANDLER, S.; WELSH, M. & ANDERSON, A. Streptozotocin-induced impairment of islet beta-cell metabolism and its prevention by a hydroxyl radical scavenger and inhibitor of poly (ADP-ribose) synthetase. *Acta Pharmacol. Toxicol.*, 53: 392. 1983.
- SANDLER, S. & SWENNE, I. Effects of streptozotocin exposure in vitro on the replication and repair of DNA in fetal rat pancreatic islets cells. *Pancreas*, 4(1): 53. 1989.
- SARASIN, A.R. & HANAWALT, P.C. Carcinogens enhance survival of UV-irradiated simian virus 40 in treated monkey cells: induction of a recovery pathway? *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 75: 346. 1978.
- SCHEIN, P.S.; CODNEY, D.A. & VERDOM, M.L. The use of nicotinamida to modify toxicity of streptozotocin diabetes without loss of antitumor activity. *Cancer Res.*, 27: 2324. 1967.
- SCHOENTHAL, R. Alkylation of coenzymes and the effects of alkylating hepatotoxins. *FEBS Lett.*, 61: 111. 1976.

- SCUDIERO, D.A.; MEYER, S.A.; CLATTERBUCK, B.E.; MATTERN, M.R.; ZIOLKOVSKY, C.H.J. & DAY, R.S.III. Sensitivity of human cell strains having different abilities to repair O<sup>6</sup>-methylguanine in DNA to inactivation by alkylating agents including chloroethylnitrosoureas. *Cancer Res.*, 44: 2467. 1984.
- SEDGWICK, B. Molecular Signal for induction of the adaptive response to alkylation damage in *Escherichia coli*. *J. Cell Sci. Suppl.*, 6: 215. 1987.
- SINGER, B. Correlations between sites of chemical modification of DNA, repair and carcinogenesis. In: *Primary and Tertiary Structure of Nucleic Acids and Cancer Research*. Miwa, M. Nishimura, S. Rich, A.; Soll, D.G. & Sugimura, T., eds, Tokyo, Japan Sci Soc. 119. 1982.
- SINGER, B. The chemical effects of nucleic acid alkylation and their relation to mutagenesis and carcinogenesis. *Prog. Nuc. Acid. Res. Mol. Mol. Biol.*, 15: 219. 1975.
- SINGER, B. & KUSHIEREK, J.T. Chemical mutagenesis. *Ann. Res. Biochem.*, 52: 655. 1982.
- SINGER, B. & GRUNBERGER, D. *Molecular biology of mutagens and carcinogens*. Plenum Press, N.Y., pp 55. 1983.

SWANN, P.F. & MACE, R. Changes in O<sup>6</sup>-methylguanine disappearance from rat liver DNA during chronic dimethylnitrosoamine administration. A possible similarity between the system removing O<sup>6</sup>methylguanine from DNA in rat liver and in *E. coli* adapted to N-methyl-Nnitro-N-nitrosoguanidine. *Chem. Biol. Interact.*, 3: 235. 1980.

TEO, J. & KARRAN, P. Excision of O<sup>6</sup>-methylguanine from by human fibroblasts determined by a sensitive competition method. *Carcinogenesis*, 3: 923. 1982.

TEO, J.; SEDGWICK, B.; DEMPLE, B. LI, B. & LINDAHL, T. Induction of resistance to alkylating agents in *E. coli*: the *ada* gene product serves both as a regulatory protein and as an enzyme for repair of mutagenic damage. *EMBO J.*, 3: 2151. 1984.

TEO, J.; SEDGWICK, B.; KILPATRICK, M.W.; McCARTHY, T.V. & LINDAHL, T. The intracellular signal for induction of resistance to alkylating agents in *E. coli*. *Cell*, 45: 315. 1986.

THIELMANN, H.W.; SCHRODER, C.H. & HSIE, A.W. Formation and removal of DNA adducts after treatment of chinese hamster ovary cells with N-methyl and N-ethyl-N-nitrosourea. *Mut. Res.*, 202(1): 235. 1988.

TJALVE, H.; WILANDER, E. & JOHANSON, E.B. Distribution of labelled streptozotocin in mice: uptake and retention in pancreatic islets. *J. Endocr.*, 69: 455. 1976.

- TJALVE, H. Streptozotocin distribution, metabolism and mechanisms of action. *Uppsala J. Med. Sci. Suppl.*, 39: 145. 1983.
- TOKUDA, K. & BODELL, W.J. Cytotoxicity and induction of Sister Chromatid Exchanges in Human and Rodent Brain tumor cells Treated with Alkylating Chemotherapeutic Agents. *Cancer Res.*, 48: 3100. 1988.
- TUCH, B.E.; TURTLE, J.R. & SIMEONOVIC, C.J. Streptozotocin is not toxic to the human fetal B cell. *Diabetologia*, 32: 678. 1989.
- UCHIGATA Y.; YAMAMOTO, H.; KAWAMURA, A. & OKAMOTO, H. Protection by superoxide dismutase, catalase and poly (ADP-ribose) synthetase inhibitors against alloxan and streptozotocin induced islet DNA strand breaks and against the inhibition of proinsulin synthesis. *J. Biol. Chem.*, 257: 6084. 1982.
- VAVRA, J.J.; DE BOER, C. & DIETZ, A. Streptozotocin, a new antibacterial antibiotic. *Antibiotics Annual*, 230. 1959.
- VENTURA, A.M. & MENEHINI, R. Inhibition and recovery of the rate of DNA synthesis in V79 Chinese hamster cells following ultraviolet light irradiation. *Mut. Res.*, 131: 81. 1984.

- VENTURA, A.M.; ORTEGA, J.M.; SCHUMARCHER, R.I. & MENEGHINI, R.  
Recovery of DNA synthesis from inhibition by ultraviolet light in mammalian cells. *J. Cell Sci. Suppl.*, 6: 191. 1987.
- VERCESI, A.E.; MACEDO, D.V.; LIMA, S.A.; GADELHA, F.R. & DO CAMPO, R.  
Ca<sup>++</sup> transport by protozoa treated with digitonin. *Arq. Biol. Tecnol.* 32(1): A6. 1989.
- WALDSTEIN, E.A.; CAO, E.H.; BENDER, M.A. & SETLOW, R.E. Abilities of extracts of human lymphocytes to remove O<sup>6</sup>-methylguanine from DNA. *Mut. Res.*, 95: 405. 1982a.
- WALDSTEIN, E.A.; CAO, E.H. & SETLOW, R.B. Adaptive increase of O<sup>6</sup>-methylguanine-acceptor protein in HeLa cells following N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine treatment. *Nucleic Acids Res.*, 10: 4595. 1982 b.
- WALKER, G.C. Mutagenesis and inducible responses to deoxyribonucleic acid damage in *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.*, 48: 60. 1984.
- WARREN, W.; CRATHORN, A.R. & SHOOTER, K.V. The stability of methylated purines and methylphosphotriesters in DNA of V79 cells after treatment with N-methyl-N-nitrosourea. *Biochem. Biophys. Acta*, 563: 82. 1979.

- WILANDER, E. & GUNNARSSON, R. Diabetogenic effects of N-nitrosomethylurea in the chinese hamster. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. A* 83: 206. 1975.
- WILSON, G.L.; PATTON, N.J. McCORD, J.M.; MULLINS, D.W. & MOSSMAN, B.T. Mechanisms of streptozotocin and alloxan induced damage in rat beta-cells. *Diabetologia*, 27: 587. 1984.
- WILSON, G.L.; HARTIG, P.C.; PATTON, N.J. & LE DOUX, S.P. Mechanisms of nitrosourea-induced beta-cell-damage. Activation of poly(ADP-ribose) synthetase and cellular distribution. *Diabetes*, 37: 231. 1988.
- WITKIN, E.M. UV-mutagenesis and inducible DNA repair in E.coli. *Bact. Rev.*, 40: 869. 1976.
- YAMAMOTO, Y.; UCHIGATA, Y.; OKAMOTO, H. Streptozotocin and alloxan induced DNA strand breaks and poly (ADP-ribose) synthetase in pancreatic islets. *Nature*, 294: 284. 1981.
- YAROSH, D.B. The role of O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA-methyltransferase in cell survival, mutagenesis and carcinogenesis. *Mut. Res.*, 145: 1. 1985.