



INSTITUTO DE BIOLOGIA

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pela candidata Ana Mifares Arivalo e aprovada pela comissão Julgadora.

M. Arivalo
24/08/90

M588e

12638/BC

CAMPINAS SP



ESTUDO DA AÇÃO CITOTÓXICA DA TETRAHIDROXIBENZOQUINONA
(THQ) COMO MODELO DE ESTRESSE OXIDATIVO

Autor: ANA MIJARES ARÉVALO

Orientador: Prof.Dra. MARIA EDWIGES HOFFMANN

Tese de Mestrado apresentada
ao Departamento de Bioquímica
do Instituto de Biologia da
Universidade Estadual de Cam-
pinas.

CAMPINAS - 1990

AGRADECIMENTOS

- À Prof.Dra.Maria Edwiges Hoffmann, pela orientação desta tese.
- Aos colegas, professores e funcionários do Departamento pela amizade e apoio.
- À Prof.Dra.Marcela Haun, pelas contribuições no desenvolvimento deste trabalho.
- Ao Prof.Dr.Nelson Durán pelas discussões e empréstimo de reagentes.
- Ao Prof.Dr.Rogério Meneghini do Instituto de Química da USP, pelas discussões e empréstimo de reagentes.
- À Jeanette do Instituto de Química da USP pela colaboração nos experimentos de Ressonância Paramagnética Eletrônica.
- À Dona Maria Alice, pela dedicação no preparo dos materiais de laboratório.
- À CAPES e Fundação de Apoio à Pesquisa da UNICAMP pelas bolsas de estudo concedidas.

ÍNDICE

	Pág.
I. INTRODUÇÃO	1
1. Espécies Reativas de Oxigênio e seus efeitos deletérios	4
2. Ação das ERO sobre o DNA	9
3. Quinonas	12
4. Tetrahidroxiquinona e suas propriedades químicas	14
II. MATERIAL E MÉTODOS	17
1. Células: linhagem utilizada e cultivo	17
2. Reagentes e Soluções: Procedência, Preparo e Dosagem	17
3. Medida do efeito hemolítico da THQ	21
4. Detecção de quebras de fitas simples no DNA celular	22
5. Medida da Taxa de Síntese do DNA	23
6. Determinação do Peróxido de Hidrogênio em soluções de THQ por quimioluminescência	24
7. Detecção de Radicais Semiquinona e Hidroxila por Ressonância Paramagnética Eletrônica	26
III. RESULTADOS	27
1. Alvos celulares da ação citotóxica da THQ	27
1.1 Efeito da THQ sobre a membrana eritrocitária	27
1.2 Efeito da THQ sobre o DNA celular	29
1.2.1 Produção de Quebras de Fitas Simples do DNA de células expostas à THQ	29
1.2.2 Inibição da Taxa de Síntese do DNA de células expostas à THQ. Cinética de Recuperação da Inibição da Taxa de Síntese do DNA	31

2. Inibição da Taxa de Síntese do DNA de células expostas à THQ em função do tempo de estocagem da solução	34
3. Estudos de proteção do efeito de inibição da síntese de DNA em células expostas à THQ	34
3.1 Efeito das enzimas antioxidantes catalase e superóxido dismutase	34
3.2 Efeito da 1,10-fenantrolina e desferal	36
3.3 Efeito dos sequestradores de radical hidroxila Benzoato de Sódio e Manitol	38
4. Efeito do H_2O_2 sobre a replicação do DNA celular. Estudos de Proteção com 1,10-fenantrolina e Etileno Glicol	41
5. Efeito do Etileno Glicol sobre a Inibição da Taxa de Síntese do DNA em células permeabilizadas expostas ao H_2O_2 e à THQ	43
6. Estabilidade das espécies intermediárias produzidas durante a autooxidação da THQ em soluções estocadas	44
6.1 Detecção do H_2O_2 na solução de THQ em função do tempo de estocagem da solução	46
6.2 Detecção dos radicais semiquinona e hidroxila na solução de THQ em função do tempo de estocagem da solução	46
7. Estudos de proteção do efeito de produção de quebras de fitas simples de DNA em células expostas à THQ	49
7.1 Efeito da catalase	50
7.2 Efeito da 1,10-fenantrolina	50

	Pág.
IV. DISCUSSÃO	54
V . CONCLUSÕES	68
VI. SUMÁRIO / SUMMARY	70
1. Estudo da Ação Citotóxica da Tetrahidroxiben- zoquinona (THQ) como Modelo de Estresse Oxi - dativo	70
2. Studies of Tetrahydroxybenzoquinone (THQ) Citotoxic Action as a Oxidative Stress Model	71
VII. BIBLIOGRAFIA	72

1. INTRODUÇÃO

O oxigênio livre apareceu na atmosfera terrestre há aproximadamente dois bilhões de anos, paralelamente à evolução de organismos fotossintetizadores. A evolução de organismos aeróbicos foi favorecida pelas vantagens energéticas decorrentes da utilização do oxigênio como acceptor final de elétrons. No entanto, a presença de oxigênio intracelularmente possibilitou a ocorrência de reações de oxiredução deletérias entre os radicais de oxigênio e as biomoléculas orgânicas. A medida que a concentração de oxigênio aumentava na atmosfera, a matéria orgânica foi sendo exposta aos seus efeitos deletérios, levando a uma pressão seletiva para o desenvolvimento de mecanismos de defesa que pudessem viabilizar a vida em aerobiose (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1985).

Os organismos aeróbicos encontram-se diante de uma situação paradoxal: ao mesmo tempo que dependem do oxigênio para obtenção de energia, só o fazem em função da presença de mecanismos de defesa que possibilitem enfrentar seus efeitos deletérios. A faixa estreita de segurança a que estão submetidos pode ser ilustrada pelo exemplo de que os mamíferos não sobrevivem a uma concentração de oxigênio da ordem de 10 vezes superior à presente no ar (FRIDOVICH, 1976). Nos organismos anaeróbicos, a exposição a concentrações de oxigênio inferiores a do ar é letal, já que estes não apresentam mecanismos de defesa contra o oxigênio.

Acredita-se atualmente que a toxicidade resultante de uma situação de hiperóxia seja decorrente da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) em concentrações superiores às encontradas fisiologicamente, de forma que os mecanismos de defesa celulares sejam incapazes de inativar essas espécies (JAMIESON, 1989).

Os efeitos das ERO nos sistemas biológicos foram investigados inicialmente a partir dos estudos dos efeitos deletérios da radiação ionizante. DEWEY (1960) verificou que na presença de oxigênio a dose letal de radiação ionizante para células corresponde a um terço daquela necessária para produzir efeito similar na ausência de oxigênio (JAMIESON, 1989).

A partir dos estudos da ação da radiação ionizante GERSCHMANN & colaboradores (1954) propuseram que o dano celular causado pela radiação ionizante e por concentrações tóxicas de oxigênio era decorrente de um mecanismo em comum : a produção de espécies reativas de oxigênio (JAMIESON, 1989).

O dano oxidativo causado nos sistemas biológicos é decorrente de processos degenerativos em todas as macromoléculas celulares, como por exemplo proteínas, lipídeos, carboidratos e ácidos nucléicos (SIES, 1985).

Este estudo constitui um modelo bioquímico para a compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na toxicidade do oxigênio. Temos como objetivo mais amplo investigar os eventos citotóxicos decorrentes da presença de ERO.

O ponto de partida deste trabalho foram os estudos pioneiros realizados por MENEHINI e colaboradores sobre a investigação do

efeito do peróxido de hidrogênio nos sistemas biológicos (HOFFMANN & MENECHINI, 1979 e MENECHINI & HOFFMANN, 1980). Estes estudos estabeleceram o efeito genotóxico do peróxido de hidrogênio, assim como a dependência de componentes celulares para a sua ocorrência. Os efeitos genotóxicos foram relacionados à presença do radical hidroxila ($\text{OH}\cdot$), indicando uma ação do peróxido de hidrogênio mimética à da radiação ionizante.

O objetivo deste trabalho foi estudar a ação da tetrahidroxiquinona (THQ) em células fibroblásticas da linhagem V79. As quinonas têm despertado um grande interesse na atualidade em vista de serem amplamente distribuídas na natureza, e de constituírem o segundo maior grupo de compostos antitumorais aprovados para uso clínico nos Estados Unidos (BRUNMARK & CADENAS, 1989 e POWIS, 1989).

Ainda não estão bem estabelecidos os mecanismos envolvidos na ação citotóxica das quinonas. Dentre os possíveis eventos bioquímicos estudados encontra-se a propriedade de quinonas em sofrer ciclo redox com formação de espécies reativas de oxigênio e radical semiquinona. A ação seletiva de quinonas antitumorais tem sido relacionada à deficiência de mecanismos antioxidantes nas células tumorais (POWIS, 1989).

É dentro deste contexto que pretendemos ampliar os conhecimentos básicos relativos aos mecanismos envolvidos na ação citotóxica de quinonas, buscando estabelecer os alvos celulares de sua ação e a participação de ERO nos efeitos observados. Enfocamos o DNA celular como alvo de ação da THQ, e principalmente o processo de sua replicação semiconservativa.

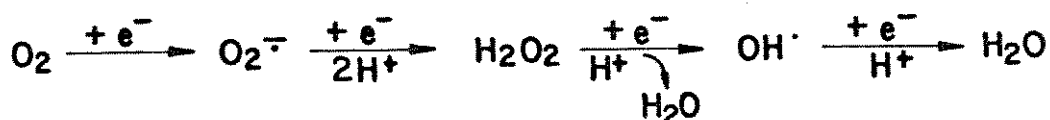
1. ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E SEUS EFEITOS DELETÉRIOS.

O oxigênio molecular em seu estado fundamental possui dois elétrons desemparelhados de mesmo spin. Esta forma triplete impõe restrições à transferência de elétrons, já que a maioria das moléculas encontram-se na forma singlete (spins contrários). Consequentemente, o oxigênio aceita preferencialmente a redução monoeletrônica, sendo pouco reativo com espécies não radicalares.

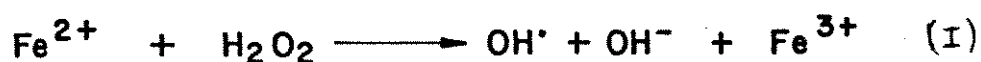
Os intermediários da redução monoeletrônica do oxigênio são espécies radicalares, as quais apresentam uma reatividade aumentada em relação ao oxigênio molecular, sendo por isso denominadas de espécies reativas de oxigênio ou ERO (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1985). São consideradas como espécies reativas de oxigênio os seguintes tipos moleculares: radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroxila ($OH\cdot$), oxigênio singlete (O_2^1) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Estes dois últimos embora não sejam espécies radicalares são incluídos como ERO uma vez que o O_2^1 é uma molécula de oxigênio com reatividade aumentada, e o H_2O_2 uma molécula que devido à sua instabilidade leva quase sempre à formação das espécies anteriores.

A inversão de spin de um elétron do oxigênio molecular dá origem ao oxigênio singlete, o qual possui propriedades oxidantes aumentadas em decorrência do desaparecimento das restrições à transferência de elétrons.

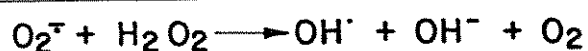
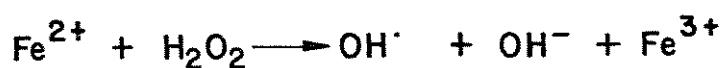
A redução monoeletrônica do oxigênio leva à formação dos seguintes intermediários:



A formação de ERO nos sistemas biológicos envolve a participação de metais de transição, uma vez que estes possuem a propriedade de participar de reações de oxiredução monoeletrônicas (AUST & col., 1985). A reação de Fenton (I), por exemplo, considerada uma reação de importância nos sistemas biológicos leva à formação de $\text{OH}^\cdot$.

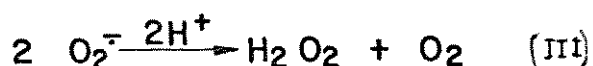


O ferro possui aqui uma função catalizadora, podendo ser novamente reduzido por espécies radiculares como o radical ânion superóxido ou por redutores celulares. A reação entre o O_2^- e H_2O_2 catalizada por ferro é conhecida como reação de Harber Weiss (II):



(II)

O O_2^- é uma espécie muito reativa em ambientes hidrofóbicos, e pouco reativa em soluções aquosas. Nestas ele sofre dismutação espontânea (III) com formação de peróxido de hidrogênio.



O H_2O_2 é também um oxidante fraco. O radical hidroxila, por sua vez, é uma espécie muito reativa, reagindo em uma distância de 1 a 5 diâmetros moleculares do seu local de formação (PRYOR, 1986). Esta propriedade faz com que sua presença tenha sido considerada o evento mais crítico da toxicidade do oxigênio (JAMIESON & col., 1986).

As ERO são formadas nas células tanto através de processos fisiológicos como pela participação de espécies exógenas. O O_2^- é formado em todas as células aeróbicas durante seu metabolismo (FRIDOVICH, 1976). Por exemplo, ele parece ser formado no interior da mitocôndria como um desvio da cadeia transportadora de elétrons (CADENAS & col., 1984). Verifica-se também a liberação de O_2^- durante o surto respiratório de macrófagos estimulados (BAEHNER & col., 1982), e como produto de várias enzimas oxidativas como por exemplo a xantina oxidase.

A descoberta da enzima superóxido dismutase (SOD) (McCORD & FRIDOVICH, 1969) impulsionou a teoria de que o O_2^- seria um radical fisiológico de importância na toxicidade do oxigênio, e que tal enzima deveria ter uma função protetora nas células.

Os mecanismos celulares de proteção contra as ERO incluem outras enzimas antioxidantes e também alguns componentes

celulares de baixo peso molecular (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1985). Dentre as enzimas encontram-se a catalase e glutatona peroxidase, as quais catalizam a degradação do H_2O_2 , além de outras que participam indiretamente de mecanismos antioxidantes. Dentre os componentes celulares com função antioxidante estão, por exemplo, a glutatona, o ácido ascórbico e o α -tocoferol.

SIES (1985) definiu uma situação de estresse oxidativo quando ocorre um desequilíbrio no balanço entre espécies pró e antioxidantes, em favor das primeiras. O dano oxidativo decorrente do estresse está associado à lesões em vários componentes celulares como ácidos nucleicos, proteínas, lipídeos, carboidratos, etc.

Uma série de mecanismos potencialmente tóxicos são desencadeados quando as células são expostas à agentes que levam ao estresse oxidativo. Incluem-se alterações no equilíbrio oxiredutor celular, depleção de tióis, peroxidação de lipídeos, alterações na homeostase do Ca^{2+} intracelular e lesões no DNA (BELLOMO & col., 1987 ; VIDELA & FERNANDEZ, 1988 e MENECHINI, 1988).

A glutatona (GSH) tem função antioxidante participando como redutora no metabolismo do H_2O_2 e de hidroperóxidos orgânicos (ORRENIUS & MOLDEUS, 1984). A redução da glutatona disulfídrica (GSSG) de volta a GSH é feita pela glutatona redutase com consumo de NADPH.

Durante o estresse oxidativo as células tendem a eliminar o excesso de GSSG, a fim de evitar os efeitos deletérios decorrentes de seu acúmulo. Como consequência ocorre a depleção do "pool" de glutathione intracelular.

Os principais mecanismos responsáveis pelo transporte de Ca^{2+} através de membranas celulares são dependentes da homeostase de grupos tióis de proteínas (ORRENIUS & col., 1989). Segundo estes autores, a oxidação e/ou ligação destes grupos podem levar à inativação de mecanismos reguladores da compartimentalização do Ca^{2+} celular, e à alterações nos níveis de Ca^{2+} citossólico. O aumento da concentração de Ca^{2+} citossólico ativa enzimas Ca^{2+} dependentes como fosfolipases, proteases, endonucleases, ocasionando danos irreversíveis, os quais podem resultar nos efeitos tóxicos decorrentes do estresse oxidativo (NICOTERA & col., 1986).

A peroxidação de lipídeos nas membranas biológicas tem sido enfocada como um evento importante na toxicidade de espécies reativas de oxigênio (HORTON & FAIRHURST, 1987). O $\text{OH}^\cdot$ é um radical capaz de iniciar o processo de peroxidação, levando à alterações estruturais de membrana (TAPPEL, 1973) e à produção de compostos intermediários potencialmente tóxicos (VACA & col., 1988). Entre estes incluem-se os radicais lipídicos gerados na etapa de propagação, e compostos aldeídicos produtos do processo de lipoperoxidação. Estes compostos parecem interagir com o DNA, evidenciando uma possível correlação entre o evento da peroxidação e os processos de mutagênese e carcinogênese (VACA & col., 1988).

As espécies reativas de oxigênio estão também envolvidas nos eventos citotóxicos decorrentes de várias condições patológicas. Temos, por exemplo, o dano isquêmico, inflamação, artrite, e câncer (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1984 ; PRYOR, 1986 e CADENAS, 1989). O processo de envelhecimento também tem sido atribuído à uma ação tóxica gradativa do oxigênio (PRYOR, 1986).

2. AÇÃO DAS ERO SOBRE O DNA.

O DNA constitui um alvo importante dos efeitos deletérios da radiação ionizante (FRIEDBERG, 1985). Os mecanismos envolvidos na ação genotóxica da radiação ionizante têm sido associados à eventos mutagênicos e carcinogênicos (SCHULTE-FROHLINDE & VON SONNTAG, 1985). O efeito da radiação ionizante é atribuído a somatória dos eventos decorrentes de uma ação direta da radiação sobre moléculas alvo como o DNA, e da ação indireta de espécies reativas de oxigênio formadas a partir do evento da radiólise da água (HUTCHINSON, 1985). Dentre estas encontra-se o radical hidroxila, considerado o radical que mais reage com o DNA nos sistemas biológicos (PRYOR, 1988).

A partir do estabelecimento da formação de espécies reativas de oxigênio nos sistemas biológicos através de mecanismos diferentes da radiação ionizante, houve um grande interesse no estudo da ação dessas espécies sobre o DNA. Radicais gerados durante o metabolismo celular têm sido considerados como possíveis fatores envolvidos nos eventos de mutagênese e

carcinogênese espontâneos (HSIE & col., 1986 e ZIMMERMAN & GERUTTI, 1984). Adicionalmente, a ação tóxica de substâncias geradoras de ERO tem sido associada aos seus efeitos genotóxicos.

Sabe-se que as ERO têm efeitos deletérios sobre o DNA purificado (DEMPLE & LINN, 1982) e sobre o DNA de células procarióticas e eucarióticas (IMLAY & col., 1988 e HOFFMANN & MENECHINI, 1979). Este assunto foi revisado recentemente por MENECHINI (1988).

O efeito tóxico do peróxido de hidrogênio sobre células em cultura foi correlacionado à produção de quebras de fitas simples (qfs) do DNA celular (HOFFMANN & col., 1984a). Este efeito sobre o DNA mostrou ser dependente de algum componente celular, uma vez que não ocorria com o DNA purificado (MENECHINI & HOFFMANN, 1980).

Entretanto, num sistema gerador de ânion superóxido são detectadas qfs no DNA purificado, as quais são protegidas na presença de catalase (LESKO & col., 1980).

Estes dados, somados a baixa reatividade das espécies $O_2^{\cdot -}$ e H_2O_2 isoladamente sobre o DNA (HUTCHINSON, 1985), foram tomados como evidência da participação do radical hidroxila na produção de qfs por essas espécies. A produção dos radicais hidroxilas através de uma Reação de Harber Weise catalizada por ferro, foi evidenciada através da proteção conferida por quelantes de ferro e sequestradores de radicais $OH\cdot$ (MENECHINI & HOFFMANN, 1980; MELLO-FILHO & MENECHINI, 1984 e 1985), assim como da potencialização do efeito por inibidores da SOD celular (MELLO-FILHO, 1988).

A alta reatividade do $\text{OH}\cdot$ aliado à enorme quantidade de moléculas orgânicas existentes nas células capazes de reagir com essas espécies sugerem que sua formação deva ocorrer próxima à macromolécula alvo. Portanto, a ação genotóxica do H_2O_2 e $\text{O}_2^{\cdot-}$ via Reação de Fenton e Harber Weiss sugerem a proximidade do metal catalizador ao DNA.

Os metais de transição envolvidos nas reações radicalares são insolúveis nas condições fisiológicas. Admite-se que a maior parte esteja complexada à proteínas ou a componentes celulares como citrato, ATP, GTP e outros fosfoésteres (AUST & col., 1985). Floyd & Lewis (1983) demonstraram a formação de $\text{OH}\cdot$ pelo complexo Fe^{2+} nucleotídeo e H_2O_2 "in vitro". VILE e colaboradores (1987) evidenciaram a participação de ferro complexado ao citrato, ADP, e ATP na catalize da Reação de Fenton dirigida por radicais orgânicos.

SHIRES (1982) mostrou a existência de ferro complexado ao DNA. MELLO-FILHO (1988) realizou uma estimativa da quantidade de ferro presente no núcleo de células em cultura, encontrando quantidades significativas desses íons ligados a estruturas não histônicas. O autor admite a possibilidade de ligação dos íons ferro aos fosfatos do DNA.

Os estudos relatados caracterizam o mecanismo de ação envolvido nos efeitos genotóxicos decorrentes da presença do ânion superóxido e do peróxido de hidrogênio.

3. QUINONAS

As quinonas são compostos amplamente distribuídos na natureza, sendo encontradas em plantas superiores, fungos, bactérias, e como participantes dos processos de respiração celular e fotossíntese (SMITH & col., 1985). Elas estão presentes também em vários poluentes ambientais, sendo encontradas por exemplo nas fumaças do cigarro e da combustão do petróleo.

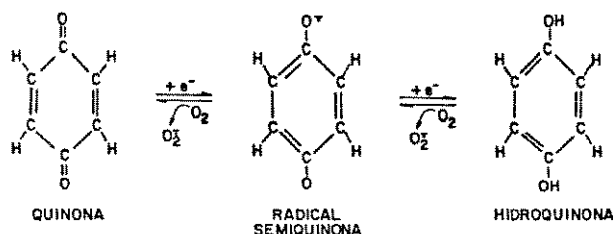
Muitos estudos têm sido realizados no sentido de elucidar os papéis fisiológicos de quinonas, assim como os mecanismos envolvidos na sua ação tóxica (NOHL & col., 1986 e BRUNMARK & CADENAS, 1989).

Os estudos da ação citotóxica de quinonas têm sido realizados através da utilização de quinonas exógenas. Existe um grande interesse nesses estudos, uma vez que as quinonas constituem o segundo maior grupo de agentes antitumorais aprovados para uso clínico nos E.U.A. (POWIS, 1989).

As atividades biológica de quinonas são atribuídas às suas propriedades físico químicas. Quinonas são dicetonas derivadas de compostos aromáticos, com propriedade de sofrer processos de oxiredução reversíveis, assim como de participar de reações de adição à grupos nucleofílicos (BRUNMARK & CADENAS, 1989).

A redução monoeletrônica da quinona forma o radical semiquinona, o qual transfere o elétron recebido para o oxigênio rapidamente com formação do ânion superóxido e da quinona

oxidada. Estabelece-se assim um ciclo redox com formação contínua de $O_2^{\cdot -}$ (SMITH & col., 1985).



A redução da quinona ao radical semiquinona ocorre via reações catalizadas por flavoenzimas e/ou via reações não enzimáticas. Incluem-se nestas a redução da quinona por redutores celulares como a glutatona e ascorbato (SMITH & col., 1985). O radical semiquinona pode ainda ser formado a partir de reações de oxiredução envolvendo a hidroquinona e radicais de oxigênio, assim como pela reação de desproporcionamento entre a quinona e hidroquinona (POWIS, 1989).

A redução bieletrônica da quinona a hidroquinona intracelularmente é catalizada por de quinona redutases. Este tem sido considerado um possível mecanismo de proteção, uma vez que a conjugação enzimática de hidroquinonas a glucuronatos ou sulfatos alteram as características de hidrofobicidade das mesmas, tornando-as mais hidrofílicas e consequentemente mais facilmente excretáveis (BRUNMARK & CADENAS, 1989).

Vários estudos têm demonstrado o efeito citotóxico, genotóxico e mutagênico de quinonas (BEGLEITER, 1985; LEWIS & col., 1988 e GHESIS & col., 1984), enfocando a formação de espécies reativas de oxigênio, via ciclo redox, como um evento importante no mecanismo de ação desses compostos.

Outras hipóteses alternativas têm sido investigadas sobre o mecanismo da ação citotóxica de quinonas. Por exemplo, a menadiona (naftoquinona) leva a uma depleção de glutatona intracelular anteriormente à manifestação de seu efeito citotóxico (DIMONTE & col., 1984). Esta depleção pode ser decorrente de reações de oxidação como também da formação de adutos entre a quinona e glutatona ou grupos tióis de proteínas (ROSSI & col., 1986).

A menadiona promove também uma alteração da homeostase do Ca^{2+} intracelular, aumentando a concentração de Ca^{2+} citossólico em hepatócitos isolados (MOORE & col., 1986).

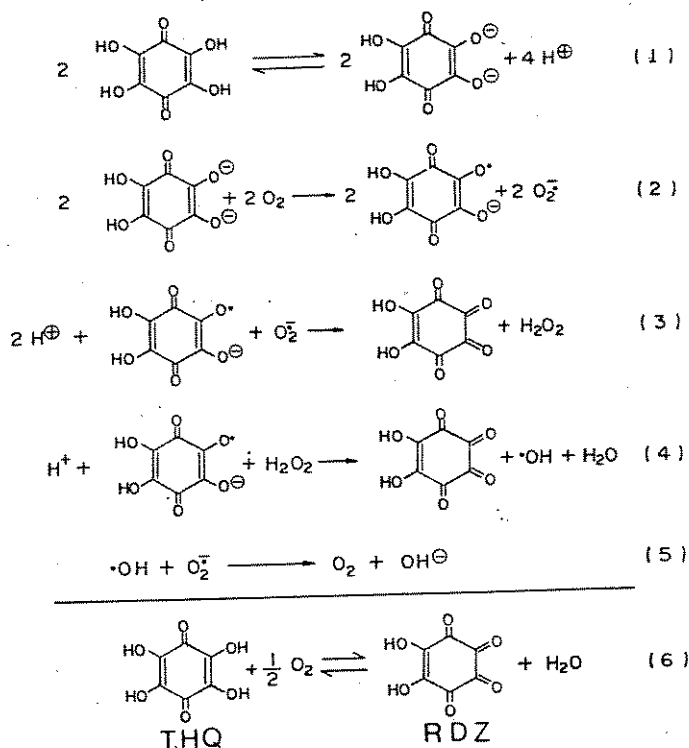
Outros mecanismos foram revisados por BRUNMARK & CADENAS (1989). Todavia, os mecanismos responsáveis pelo evento citotóxico de quinonas não estão completamente elucidados. Várias alterações bioquímicas foram detectadas, sem que ainda estejam definidos as relações de causa e efeito envolvidas.

4. TETRAHIDROXIQUINONA E SUAS PROPRIEDADES QUÍMICAS.

A 2,3,5,6-tetrahidroxi-2,5-ciclohexadieno-1,4-diona, ou tetrahidroxiquinona (THQ), é uma benzoquinona com estrutura enediol similar à do sítio ativo da coenzima Q.

A adição de grupos hidroxila na p-benzoquinona tem como consequência uma diminuição do seu potencial de redução, aumentando a sua velocidade de autooxidação em relação ao composto parental sem substituição (BRUNMARK & CADENAS, 1989).

A THQ sofre autooxidação espontânea quando em condições fisiológicas, com formação de ácido rodizênico (RDZ, forma oxidada da THQ), e de radicais intermediários como o ânion superóxido, o radical hidroxila, radical semiquinona e peróxido de hidrogênio (HOFFMANN & col., 1987), (Vide esquema abaixo).



A autooxidação de hidroquinonas em solução pode ocorrer por transferência de um ou dois elétrons para o oxigênio molecular, com formação de $\text{O}_2^{\ominus}$ ou H_2O_2 respectivamente. A ocorrência de um ou outro mecanismo preferencialmente dependerá da estabilidade do complexo colisional entre essas espécies (BRUNMARK & CADENAS, 1989).

O H_2O_2 pode ser formado também pela oxidação da hidroquinona pelo $\text{O}_2^{\ominus}$, ou pela reação de dismutação do $\text{O}_2^{\ominus}$.

A THQ tem sido utilizada em nosso laboratório como um modelo de estudo da ação de espécies reativas de oxigênio e dos mecanismos envolvidos na produção de seus efeitos biológicos. Constitue uma molécula interessante pela sua simplicidade estrutural quando comparada a outras quinonas, assim como por suas propriedades oxiredutoras. Ressalta-se também o fato de que diferentemente de outras quinonas, os efeitos citotóxicos da THQ independem da adição de cofatores de flavoenzimas.

Em relação à permeabilidade da THQ na membrana celular, SERIS & BRU (1962) mostraram que ela atravessa a membrana celular de leveduras, sugerindo a inexistência de barreiras de permeabilidade.

II. MATERIAL E MÉTODOS

1. CÉLULAS: LINHAGEM UTILIZADA E CULTIVO.

A linhagem celular utilizada foi um clone da V79 designado MB, proveniente do laboratório do Dr. Rogério Meneghini da Universidade Estadual de São Paulo. São células fibroblásticas originadas de pulmão de hamster chinês que crescem aderidas a um substrato sólido e têm um ciclo celular de aproximadamente 12 horas.

As células são cultivadas em garrafas de vidro, em meio de cultura DMEM (Meio de Eagle modificado por Dulbecco) acrescido de 10% (v/v) de sêro fetal bovino, 1,2 g/l de NaHCO_3 , penicilina (100 ug/ml) e de sulfato de estreptomicina (100 ug/ml). A incubação das células é feita à temperatura de 37°C , no escuro, e sob atmosfera úmida contendo 5% de CO_2 . A manutenção das culturas é feita por subcultivos periódicos, em condições de semiconfluência, descolando-se as células com tripsina (0,05 % p/v) e transferindo-as para uma garrafa nova em menor densidade.

2. REAGENTES E SOLUÇÕES : PROCEDÊNCIA, PREPARO E DOSAGEM.

Os reagentes utilizados possuem grau de pureza analítico (P.A.).

-Ácido Tricloroacético (Reagen) 5% (p/v).

-Benzoato de Sódio (Carlo Erba) PM = 144,11

-Catalase de fígado bovino (Sigma) 20000 U/mg . A atividade enzimática foi determinada através do procedimento da Sigma Chemical Company, onde 1 unidade decompõe 1 umol de H_2O_2 por minuto (pH 7.0, 25°C), quando a concentração de H_2O_2 cai de 10.3 para 9.2 umol/ml na mistura de reação. Utilizou-se uma solução de H_2O_2 com A240 de aproximadamente 0.52. Após a adição da enzima cronometrou-se o tempo de decréscimo da A240 de 0.45 para 0.40, que corresponde à decomposição de 3.45 umoles de H_2O_2 .

-Coquetel de Cintilação PPO/POPOP (New England Nuclear). PPO = 4.0 g/l e POPOP = 0.1 g/l em tolueno (Ecibra).

-Desferal (Desferrioxamine mesylated) (CIBA GEIGY) PM = 560,71

-Digitonina (Sigma) PM = 1229,3. Solução estoque em dimetilformamida. Estocada em freezer.

-DMEM, Meio de Eagle Modificado por Dulbecco, com glutamina (Interlab) pH 7.0.

-EDTA, Sal Dissódico do Ácido etilenodiaminotetraacético (Sigma)
PM = 372,24

-Etileno Glicol (J.T.Baker) PM = 63,07 d=1,111

-o- Fenantrolina (1,10-fenantrolina) (Merck) PM = 198,23

-Hidróxido de Sódio (Merck) PM = 40,0

-Manitol (Carlo Erba) PM = 182,12

-Peroxidase de Rabanete (HRP) (Sigma, Tipo VI) PM = 40.000,
 $E_{403 \text{ nm}} = 102.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

-Peróxido de Hidrogênio 30% (Ecibra). As dosagens do peróxido de hidrogênio foram feitas segundo o método de COTTON & DUNFORD (1973), através de sua reação com o iodeto na presença de peroxidase, a qual é seguida espectroscopicamente. O ensaio de 2.0 ml continha 0.2 ml da solução de peróxido de hidrogênio, peroxidase de rabanete $0.5 \times 10^{-8} \text{ M}$, KI 0.05 M e tampão acetato 0.1 M, pH 3.8. O último componente adicionado ao ensaio foi o KI na forma sólida. Após a adição do KI media-se a absorção do iodo formado a 353 nm ($E = 2.55 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) contra um branco sem KI.

-Sacarose (Quimis).

-Tampão Salina Fosfato (PBS-A): NaCl (Reagen) 137 mM, KCl (Riedel de Haen AG), Na_2HPO_4 (Sigma) 8.1 mM e KH_2PO_4 (Ecibra) 1.47 mM. pH = 7.2-7.4. PBS- Ca^{2+} : PBS-A + 1 mM CaCl_2 (Merck).

-Sêro Fetal Bovino (Cultilab)

-Superóxido Dismutase de eritrócito bovino. (Sigma) 3100 U/mg. Foi feita uma avaliação qualitativa da atividade enzimática da SOD, pelo método de MARAL e colaboradores (1977), através da detecção de inibição da redução do azul de nitro-tetrazólio (Nitroblue Tetrazolium, NBT) pelo $O_2^{\cdot -}$ gerado na reoxidação da riboflavina fotoreduzida. Os ensaios continham: riboflavina (4.0ug/ml , Sigma), triptofano (160ug/ml, Sigma), NBT ($2,5 \times 10^{-4} M$, Sigma), PBS-A e SOD (10ug/ml). Esta última não foi adicionada nos ensaios controle. As soluções foram irradiadas em placa de vidro com luz fluorescente (bulbo GE tipo F8T5 W), fixada à 5 cm de altura do fundo da placa, e pré aquecida por 10 minutos. Controles não irradiados foram mantidos no escuro. A cada tempo escolhido de irradiação fez-se uma leitura da absorção à 560 nm de alíquotas das soluções irradiadas contra um branco sem irradiar.

-Timidina Tritilada (3H -Tdr) (DuPont, NEN Products) 50-80 Ci/mmol.

-Tiouréia (J.T.Baker) PM = 76,129

-Tripsina (Difco 1:250) 0.05% (p/v) em PBS-A contendo 1mM de EDTA.

-Tetrahydroxy-1,4 benzoquinone (Sigma) PM = 172,1

3. MEDIDA DO EFEITO HEMOLÍTICO DA THQ.

Este ensaio avalia o efeito lítico do composto sobre hemácias humanas, através da quantificação da hemoglobina liberada após o tratamento em relação a um controle onde a lise é total (SHEETS & col., 1956).

Os ensaios foram realizados com um "pool" de hemácias obtido de amostras de sangue periférico de quatro doadores. Após a coleta de sangue na presença de heparina (500 U/ml), procedeu-se a lavagem de 5,0 ml de cada amostra da seguinte maneira.

- Centrifugação a 2000 RPM por 5 minutos a 5°C, descartando-se o sobrenadante.
- Resuspensão do precipitado em 2,5 ml de salina 0,9% . Agitação suave. Centrifugação a 2000 RPM por 5 minutos a 5°C, descartando-se o sobrenadante.
- Ídem anterior.
- Resuspensão do precipitado em 3,0 ml de salina 0,9%. Agitação suave. Centrifugação a 2500 RPM por 10 minutos, descartando-se o sobrenadante.
- Diluição 1:1 do volume do precipitado de hemácias em salina 0,9%. Suave agitação para obtenção da papa de hemácias , a qual foi mantida a 4°C.

ENSAIO:

Foi feito um "pool" de hemácias misturando-se a papa dos quatro doadores. O ensaio foi realizado com 50 ul do "pool" de hemácias num volume final de 2,5 ml. O controle de 0% de hemólise

foi tratado em salina 0,9% e o 100% em salina 0,1%. Fez-se um branco para cada dose de THQ, sem hemácias.

Dispensou-se a salina 0,9% nos tubos e adicionou-se 50 μ l do "pool" de hemácias. Fez-se a dissolução da THQ (solução estoque 1mM) em salina 0,9%, no escuro. Adicionou-se volumes variáveis desta solução, segundo a concentração final desejada. Agitou-se os tubos suavemente, incubando-os por 15 minutos a 37°C.

Após o tratamento os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 2500 RPM (20 °C). Foi feita então a leitura de absorbância dos sobrenadantes a 576 nm.

4. DETECÇÃO DE QUEBRAS DE FITAS SIMPLES NO DNA CELULAR.

A determinação da formação de quebras no DNA celular foi feita como descrito previamente (HOFFMANN, 1979).

A marcação isotópica do DNA celular foi feita incubando-se células em fase exponencial de crescimento com meio contendo timidina tritiada (^3H -Tdr) durante 24 horas (1 μ Ci/ml, 50-80 ci/ml). A seguir plaqueou-se 5×10^5 células por placa de 5,0 cm de diâmetro, e tratou-se as células 15 horas após o plaqueamento. As células foram então lavadas duas vezes com PBS- Ca^{2+} e lisadas com meio de lise (NaOH 0,3 M, NaCl 1 M e EDTA 10mM) por uma hora a 37°C. Aliquotas de 150 μ l foram aplicadas no topo de gradientes alcalinos de sacarose de 4,5 ml (5 a 20 % de sacarose (p/v) em 0,3 M de NaOH, 1 M NaCl e 0,01 M de EDTA). Os gradientes foram

centrifugados em Rotor Spinco SW 65 por 120 minutos a 25000 RPM, 20°C, numa centrífuga Beckman modelo L-5. Após a corrida coletou-se as frações (27-30 / gradiente) a partir do fundo do tubo sobre tiras de papel Whatman nº 17, segundo o procedimento de CARRIER & SETLOW (1971). A radioatividade de cada fração foi determinada por cintilação líquida, em 5,0 ml de coquetel de cintilação PPO/POPOP.

5. MEDIDA DA TAXA DE SÍNTESE DO DNA.

A quantidade de timidina tritiada (^3H -Tdr) incorporada no material celular ácido insolúvel foi utilizada como medida da atividade de síntese de DNA.

Células em fase exponencial de crescimento (48 horas após o plaqueamento) foram expostas ao tratamento indicado na legenda das figuras. Os plaqueamentos foram feitos em placas de 5,0 cm de diâmetro (2×10^5 cél/placa) ou de 3,5 cm (1×10^5 cél/placa). Após o tratamento as células foram lavadas duas vezes com PBS- Ca^{2+} e incubadas em meio de cultura completo por um período de recuperação de 90 minutos. Em seguida as células foram incubadas em meio contendo ^3H -Tdr (5 a 10 $\mu\text{Ci/ml}$) por um período de marcação de 30 minutos. As células foram então lavadas com PBS- Ca^{2+} gelado duas vezes, fixadas com ácido tricloroacético (TCA) 5% gelado por 5 minutos, e lavadas duas vezes com etanol gelado. Após a secagem das placas ao ar foi feita a lise celular com 1 ou 0.5 ml (placa de 5 ou 3,5 cm de diâmetro respectivamente) de NaOH

0,5 M durante uma hora. Alíquotas de 100 μ l de cada lisado celular foram aplicadas em papel Whatman nº 17 (1,5 X 1,9 cm) em duplicata, sendo posteriormente precipitadas com TCA gelado 5%, e lavadas duas vezes com etanol e uma vez com acetona gelados. Os papéis foram secados em estufa e procedeu-se à medida de radioatividade de cada amostra em 5,0 ml de coquetel de cintilação PPO-POPOP. Uma alíquota de 100 μ l do lisado celular foi utilizada para leitura de absorbância a 260 nm. A razão entre a radioatividade e absorbância de cada amostra foi tomada como expressão da taxa de síntese do DNA (CPM/A260). Os dados foram expressos em porcentagem relativa à síntese do controle (100%), o qual foi exposto somente ao tampão.

Os resultados foram obtidos a partir de dois experimentos independentes (realizados em triplicata), sendo apresentada a média das porcentagens de síntese e o desvio da média de cada tratamento.

6. DETERMINAÇÃO DO PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO EM SOLUÇÕES DE THQ POR QUIMIOLUMINESCÊNCIA.

O objetivo desta determinação foi a detecção de uma variação da concentração de peróxido de hidrogênio na solução de THQ após intervalos crescentes de sua estocagem.

Seguiu-se o método proposto por TOLEDO & colaboradores (1980), onde os compostos I e II da peroxidase são reduzidos por estados excitados da molécula de eosina, gerados por

transferência de energia das espécies excitadas para a eosina em excesso.

O ensaio de 4,0 ml realizado num vidro de cintilação em tampão fosfato (0.1 M, pH 6.2) continha: 0.5 mM EDTA, eosina 4.5×10^{-5} M, e 10 μ l de uma solução de THQ 0,5 mM estocada a 25 °C e no escuro. Os valores de quimioluminescência da amostra foram obtidos num contador de cintilação líquida, com o circuito de coincidência desligado. Foram feitas contagens consecutivas até a obtenção de uma leitura estável (background). A reação foi iniciada pela adição de HRP (horse radish peroxidase) $1,6 \times 10^{-6}$ M. Imediatamente após a adição dessa enzima fez-se a contagem de quimioluminescência durante dois minutos, com leituras a cada 10 segundos. A somatória das contagens no intervalo de dois minutos foi tomada como o valor de intensidade de quimioluminescência do tratamento, descontando-se o "background" referente à contagem sem HRP. Cada ensaio foi repetido 3 vezes. Foram feitas as medidas de quimioluminescência da solução de THQ estocada por 0; 0,5; 4 e 6 horas, e de uma solução de H_2O_2 10^{-8} M previamente dosada espectrofotometricamente pelo método de COTTON & DUNFORD (1973). As intensidades de quimioluminescência obtidas para as soluções de THQ foram corrigidas pela diluição da THQ no ensaio (400 x).

7. DETECÇÃO DE RADICAIS SEMIQUINONA E HIDROXILA POR RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELETRÔNICA.

Os espectros desses radicais foram registrados em um espectrometro Bruker (ER-200D-SRC), em uma "flat cell" de 100ul. Os espectros dos radicais semiquinona foram obtidos a partir de uma solução de THQ 1mM (PBS-A, pH 7.2) , na presença de íons Zn^{2+} (80mM), e em condições aeróbicas. As leituras foram efetuadas à temperatura ambiente, com 20 mW de potência de microonda, com uma amplitude de modulação de 5 Gauss, constante de tempo de 2 s e velocidade de registro de 12 Gauss/minuto.

Os espectros dos radicais hidroxila foram obtidos a partir de uma solução de THQ 1mM (PBS-A, pH 7.2) , na presença de 100 mM do captador de spin DMPD (5,5-dimetil 1 pirrolina 1 óxido), e em condições aeróbicas. As leituras foram realizadas à temperatura ambiente, com 20 mW de potência de microonda, com uma amplitude de modulação de 1 Gauss, constante de tempo de 0.2 s , e velocidade de registro de 30 Gauss/minuto.

III. RESULTADOS

1. ALVOS CELULARES DA AÇÃO CITOTÓXICA DA THQ.

1.1 Efeito da THQ sobre a membrana eritrocitária.

A partir do estabelecimento do efeito letal da THQ sobre células da linhagem V79 (CIAMPI & HOFFMANN, dados não publicados) tivemos como interesse verificar uma possível ação sobre a membrana celular. É sabido que espécies reativas de oxigênio atuam sobre membranas biológicas levando à eventos tóxicos como hemólise e peroxidação de lipídeos (MICHELSON & DUROSAY, 1977 e TAPPEL, 1973).

Realizamos experimentos para avaliar o potencial hemolítico da THQ. Utilizando como padrão de hemólise a quantidade de hemoglobina liberada em condições hipotônicas (0,1 % de salina), observamos a ausência de efeito hemolítico em concentrações de THQ entre 0,1 e 0,75 mM , e um pequeno efeito (10,9 %) na concentração de 1,0 mM (Tabela 1). Estes resultados indicam a ausência de uma efeito significativo da THQ sobre a membrana celular.

TABELA 1. EFEITO LÍTICO DA THQ SOBRE HEMÁCIAS HUMANAS.

(THQ) mM	% HEMÓLISE
1,00	10,9
0,75	2,7
0,50	0,6
0,25	0,6
0,10	0,7

Um "pool" de hemácias humanas foi exposto a diferentes concentrações de THQ (15 min, 37°C, salina 0.9%, escuro). A leitura de A578 nm foi realizada contra uma branco sem hemácias. A porcentagem de hemólise é relativa ao controle 100% obtido por lise hipotônica em salina 0.1%. Vide "Métodos" (item 3). É apresentada a porcentagem média de hemólise de tres experimentos independentes.

1.2 Efeito da THQ sobre o DNA celular.

Estudos anteriores de nosso laboratório haviam estabelecido uma ação genotóxica da THQ, detectada através da produção de quebras de fitas simples em DNA purificado e da inibição da transformação blástica de linfócitos (HOFFMANN & col., 1984 b).

Nossos resultados estabeleceram o efeito da THQ sobre o DNA de células V79 "in vivo".

1.2.1 Produção de Quebras de Fitas Simples do DNA de células expostas à THQ.

O DNA pelo seu papel como portador da informação genética tem sido considerado o principal alvo celular da ação tóxica de agentes mutagênicos, dentre os quais incluem-se os geradores de espécies reativas de oxigênio (BRAWN & FRIDOVICH, 1981 e HOFFMANN & MENEHINI, 1979). As quebras de fitas da cadeia do DNA constituem uma lesão típica mediada por espécies reativas de oxigênio. Essa lesão foi inicialmente caracterizada a partir dos estudos da ação da radiação ionizante sobre o DNA (CERUTTI, 1978).

Analisando o DNA de células V79 tratadas com THQ para a detecção de quebras, através de sedimentação em gradientes alcalinos de sacarose, verificamos uma diminuição do peso molecular médio do DNA proveniente de células tratadas em relação ao de células controle (FIG.1).

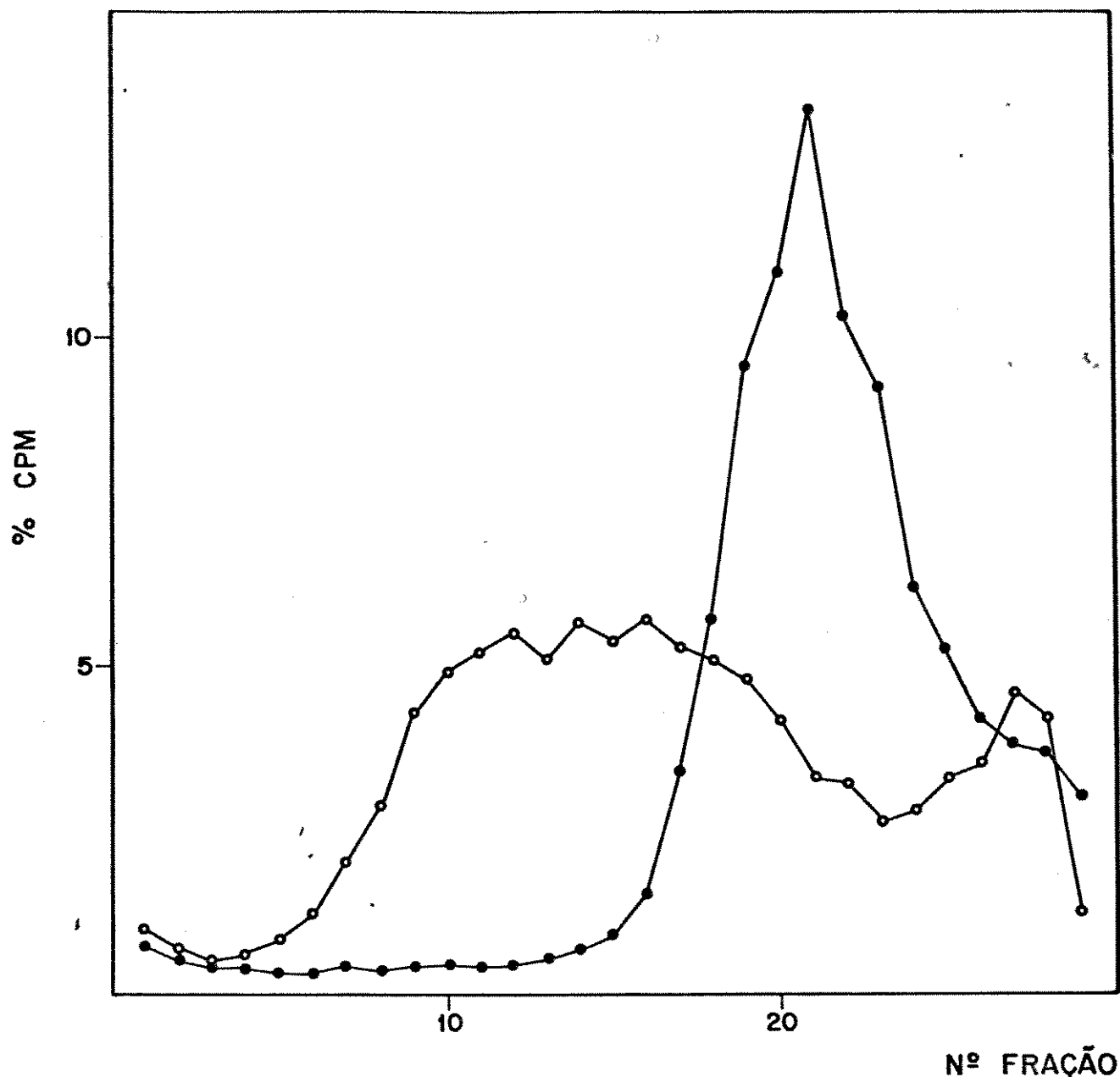


Figura 1 - QUEBRAS DE FITAS SIMPLES DO DNA DE CÉLULAS EXPOSTAS A THQ.

Células V79 com o DNA marcado isotopicamente e semeadas em placas de Petri de 5 cm de diâmetro (5×10^5 cél/placa) foram tratadas com 0 (O) ou 0.5mM (●) de THQ (30 min, 37°C e PBS-A). Após o tratamento os lisados celulares foram analisados por ultracentrifugação em gradientes de sacarose em meio alcalino como descrito em "Métodos" (item 4). São mostrados os perfís de distribuição de radioatividade no gradiente (sedimentação da direita para a esquerda).

Este efeito indica a presença de descontinuidades físicas na cadeia do DNA, as quais podem ser decorrentes de rompimentos reais de ligações fosfodiésteres ou de certas modificações de bases que tornam estas ligações susceptíveis de quebra em meio alcalino (STRAUSS & HILL, 1970 e LINDAHL & NYBERG, 1972).

1.2.2 Inibição da Taxa de Síntese do DNA de células expostas à THQ. Cinética de Recuperação da Inibição da Taxa de Síntese do DNA.

Após a verificação de um efeito da THQ sobre o DNA celular, interessou-nos investigar sua ação ao nível da replicação do DNA. Para tanto determinamos a atividade de incorporação de timidina tritiada no DNA de células V79 previamente expostas a diferentes concentrações de THQ.

Verificamos que a THQ inibe a replicação do DNA de células V79, com uma resposta dose dependente (FIG.2). A resposta bifásica observada mostra um efeito intenso em baixas doses e um aumento pequeno da inibição em doses mais elevadas.

A fim de melhor compreender o mecanismo envolvido na inibição da síntese do DNA celular pela THQ realizamos experimentos para verificar a ocorrência ou não de recuperação da taxa de síntese de DNA aos níveis normais.

Verificamos que a inibição da replicação causada por 0,5 mM de THQ apresenta uma cinética de recuperação onde a velocidade de síntese inicial é retomada seis horas após o tratamento (FIG.3). A cinética observada é característica da parada da síntese do DNA decorrente de lesões na sua estrutura molecular (PAINTER, 1977).

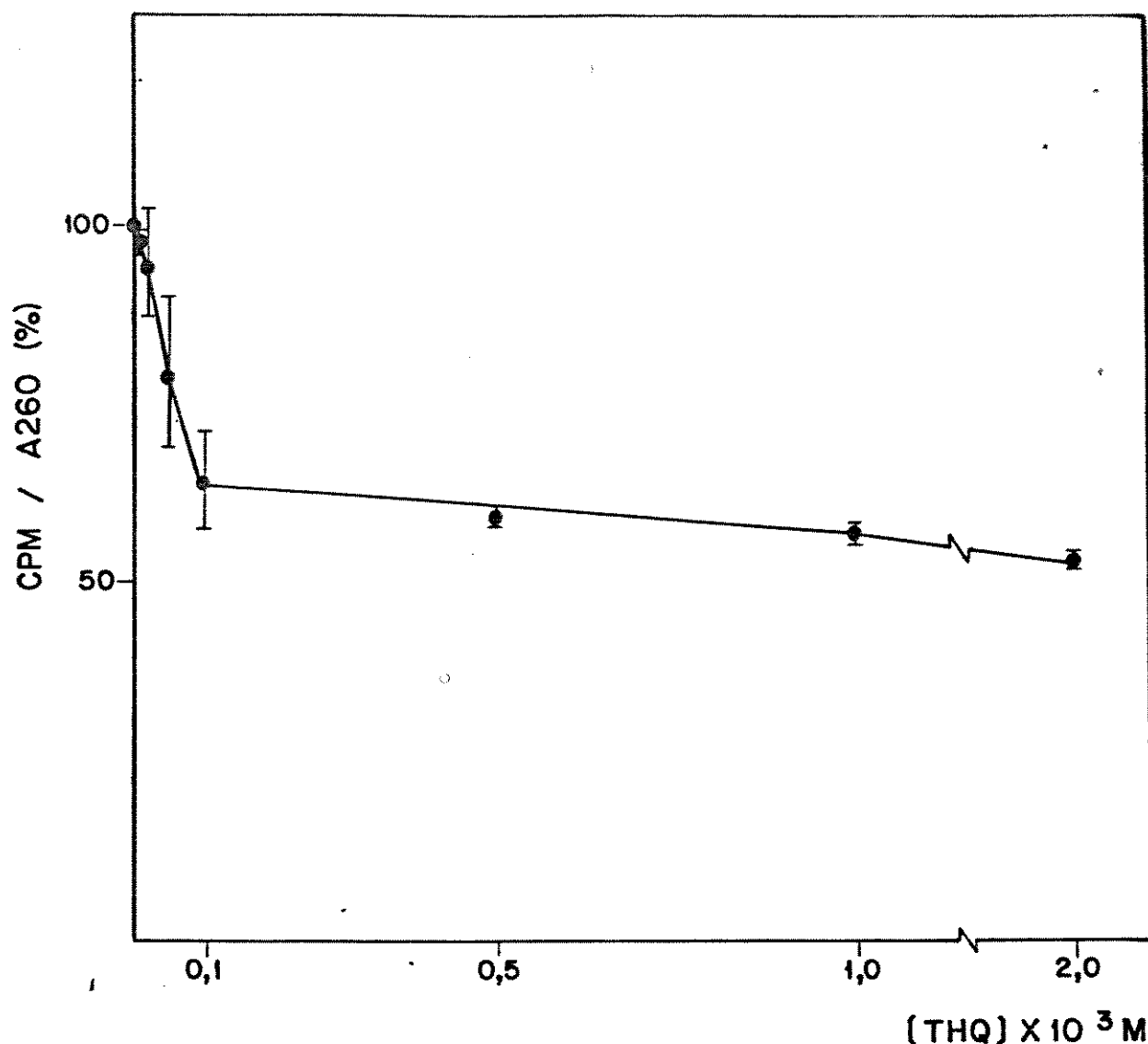


Figura 2 - TAXA DE SÍNTESE DO DNA DE CÉLULAS EXPOSTAS A THQ.

Células V79 em fase exponencial de crescimento foram tratadas com doses crescentes de THQ (PBS-A, 30 min, 37°C). A medida de síntese de DNA foi realizada após um período de recuperação de 1,5 hora (DMEM + 10% SFB), incubando as células em meio contendo ^3H -Timidina (10 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$) por um período de 30 minutos. A quantidade de ^3H -Timidina incorporada no material celular ácido insolúvel foi utilizada como atividade de síntese de DNA (Vide "Métodos" item 5). A razão entre a radioatividade e absorbância de cada amostra foi tomada como expressão da síntese de DNA (CPM/A260 %). Os dados foram expressos em porcentagem relativa à síntese do controle (100%), o qual foi exposto somente ao tampão. Os desvios apresentados referem-se ao desvio da média da porcentagem de síntese de DNA de dois experimentos independentes.

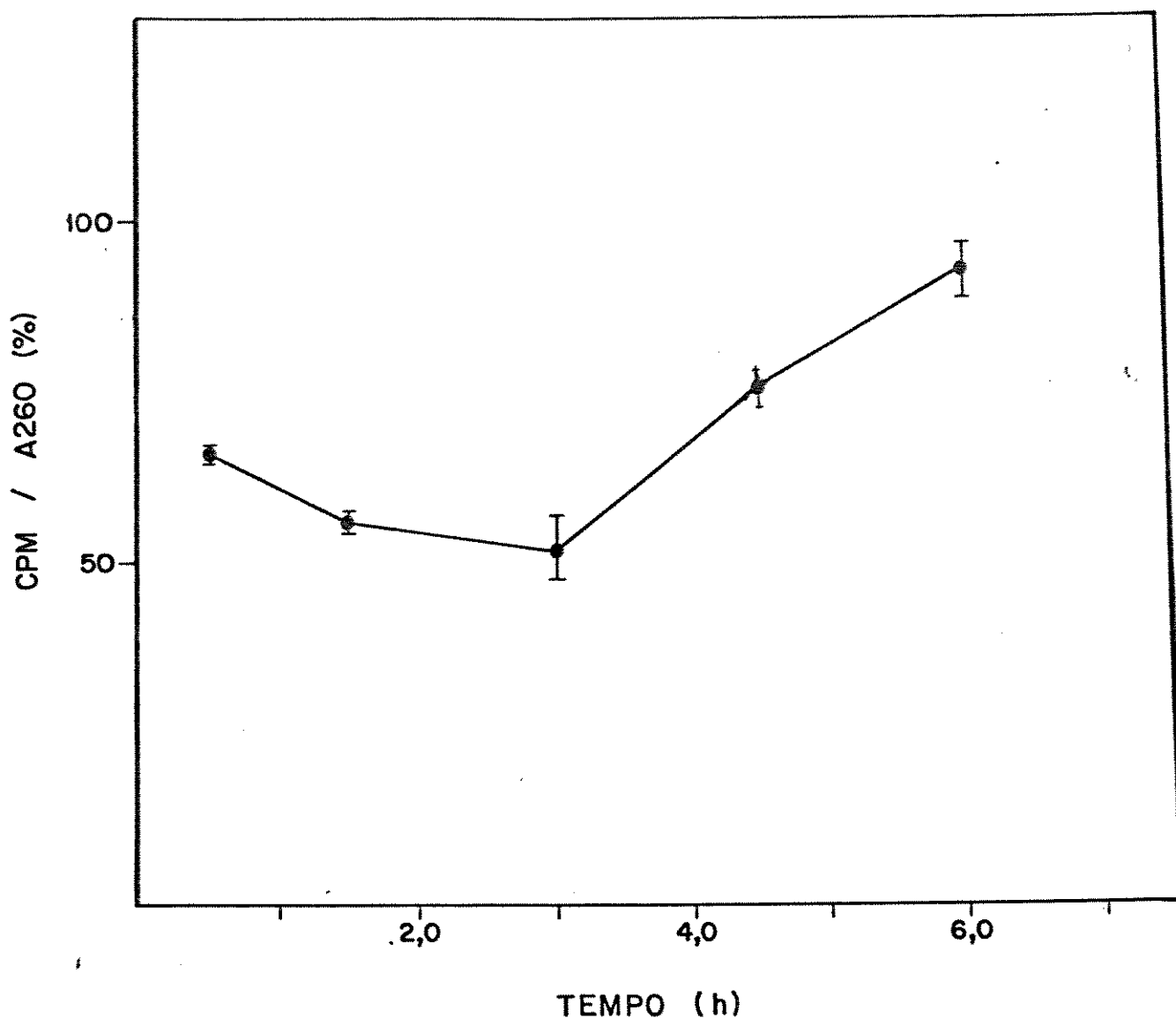


Figura 3 - CINÉTICA DE RECUPERAÇÃO DO EFEITO DE INIBIÇÃO DA SÍNTESE DE DNA INDUZIDO PELA THQ.

Células V79 em fase exponencial de crescimento foram tratadas com 0.5mM de THQ (PBS-A, 30 min, 37°C). A marcação com ^3H -Tdr foi realizada após intervalos crescentes de recuperação. Foi feito um controle para cada tempo de recuperação. A taxa de síntese de DNA foi medida como descrito na Fig.2. Experimento típico realizado em triplicata, sendo apresentados os desvios da média.

2. INIBIÇÃO DA TAXA DE SÍNTESE DO DNA DE CÉLULAS EXPOSTAS À THQ EM FUNÇÃO DO TEMPO DE ESTOCAGEM DA SOLUÇÃO.

Este experimento foi realizado com o objetivo de investigar o papel dos intermediários da autooxidação da THQ no efeito inibitório a nível de síntese do DNA.

Observamos uma diminuição gradual do efeito de inibição da taxa de síntese do DNA em função do tempo de estocagem da solução (FIG.4). A inibição produzida pela solução de THQ dissolvida imediatamente antes da exposição (55 %) é reduzida a 15% após 4,0 horas de estocagem da solução, e praticamente desaparece depois de 6,0 horas da dissolução.

O resultado obtido indica a participação das espécies intermediárias produzidas durante a autooxidação da THQ no evento da inibição da replicação.

A partir deste ponto nosso interesse voltou-se para o estudo do mecanismo de ação pelo qual esses intermediários estariam promovendo lesões no DNA.

3. ESTUDOS DE PROTEÇÃO DO EFEITO DE INIBIÇÃO DA SÍNTESE DE DNA EM CÉLULAS EXPOSTAS À THQ.

3.1 Efeito das enzimas antioxidantes catalase e superóxido dismutase.

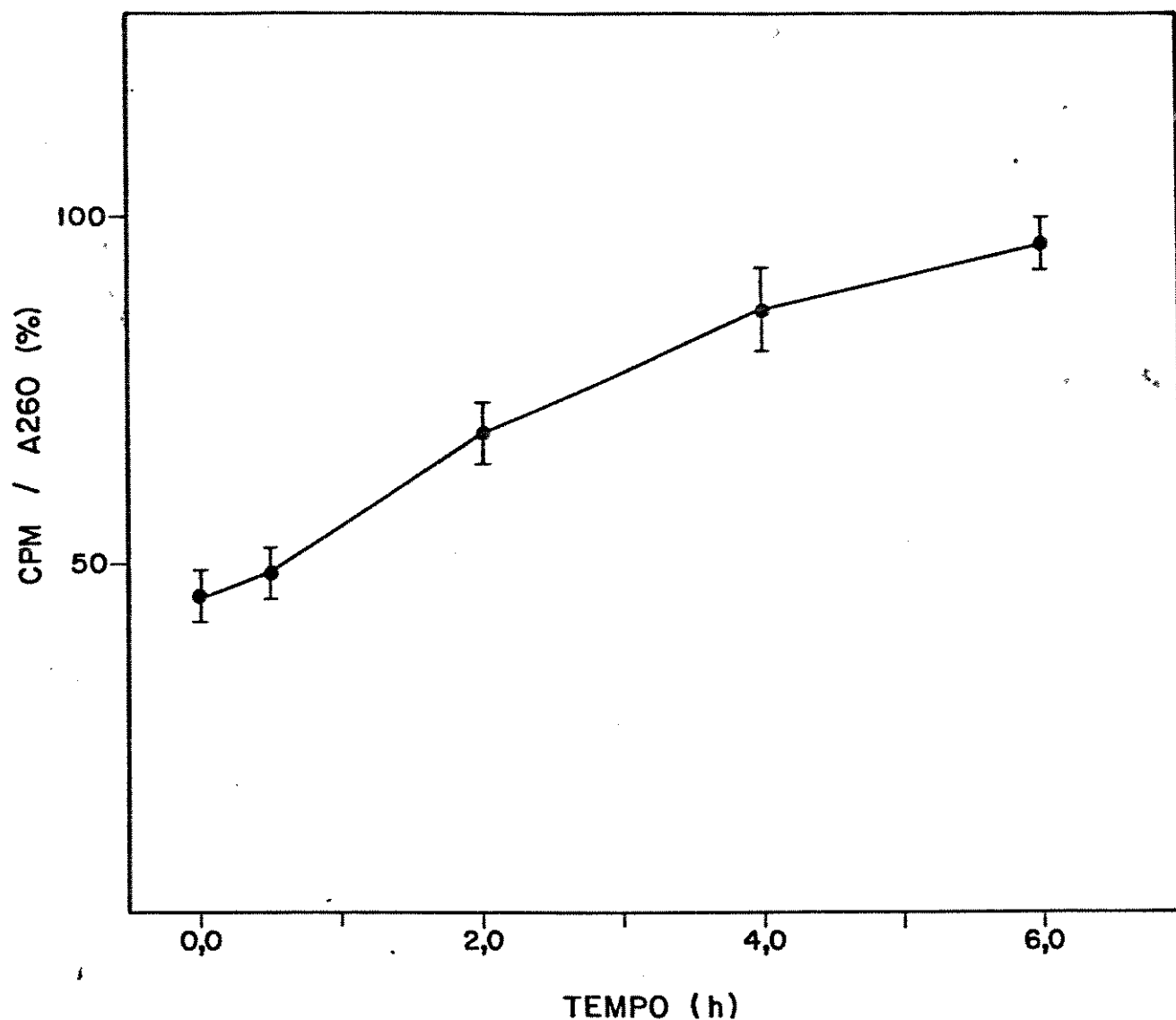


Figura 4 - TAXA DE SÍNTESE DO DNA DE CÉLULAS EXPOSTAS A SOLUÇÕES DE THQ COM DIFERENTES TEMPO DE ESTOCAGEM.

Células V79 em fase exponencial de crescimento foram tratadas com soluções de THQ (0.5mM) estocadas por 0, 0.5, 2.0, 4.0, e 6.0 horas após a sua dissolução (PBS-A, 30 min, 37°C). As soluções foram estocadas a 25 °C e protegidas da luz. A taxa de síntese do DNA foi medida e expressa como descrito na Fig.2.

Como o H_2O_2 e o O_2^- são produzidos a partir da reação de autooxidação da THQ, realizamos experimentos para evidenciar a participação dessas espécies no evento da inibição da replicação. Para tanto realizamos exposições das células à THQ na presença das enzimas antioxidantes catalase e superóxido dismutase.

A FIG.5 mostra o efeito de proteção total conferido pela catalase (A), e a ausência de proteção da superóxido dismutase (B) sobre a inibição da síntese de DNA causada pela THQ. A proteção conferida pela catalase é dependente de sua atividade enzimática, já que a catalase inativada pelo calor não apresenta efeito algum (FIG.5A).

A ausência de proteção pela superóxido dismutase indica a não participação dos radicais ânion superóxidos gerados extracelularmente na inibição da replicação do DNA causada pela THQ.

Os resultados apresentados evidenciam o papel central do H_2O_2 no mecanismo de inibição da síntese de DNA induzida pela THQ.

3.2 Efeito da 1, 10-fenantrolina e desferal.

Estes complexantes de ferro foram utilizados com a finalidade de detectar a participação desse metal no mecanismo estudado.

A 1,10-fenantrolina é um complexante de Fe^{2+} que impede a redução do H_2O_2 por esses íons (BURGESS & PRINCE, 1965), e tem a propriedade de atravessar membranas

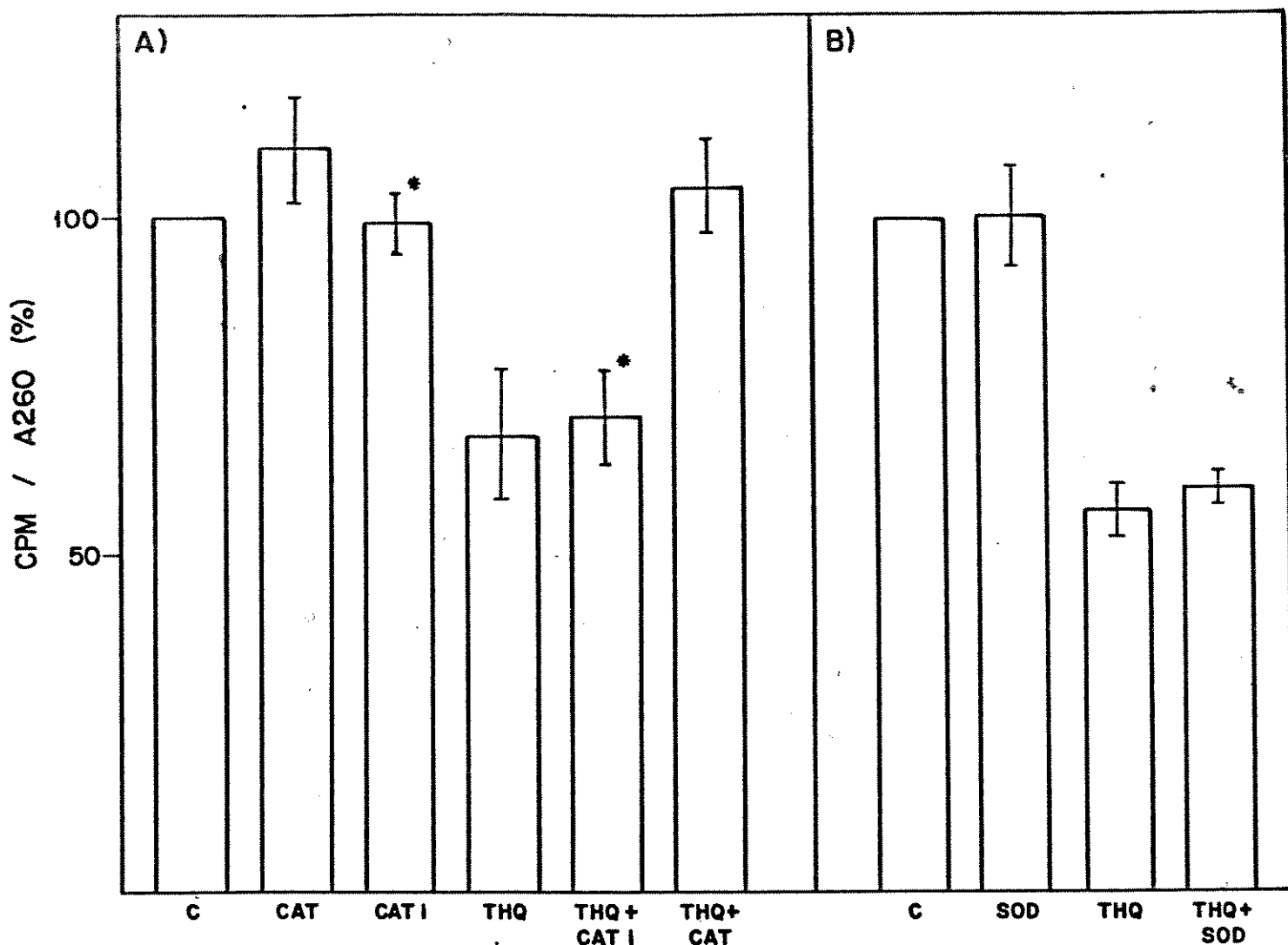


Figura 5 - EFEITO DA CATALASE (CAT) E SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD) NA INIBIÇÃO DA SÍNTESE DE DNA INDUZIDA PELA THQ.

Células V79 em fase exponencial de crescimento foram expostas a 0.5 mM de THQ na presença de 250u/ml de catalase (A) e 100 U/ml de SOD (B) (PBS-A, 30 min, 37°C). Foi realizado um controle com catalase inativada (CAT I) pelo calor (fervida por 7 min). A taxa de síntese de DNA foi medida e expressa como descrito na Fig.2. * (experimento típico onde é apresentado o desvio da média das triplicatas do tratamento).

biológicas (NUNEZ & col., 1983). O desferal é um complexante com alta afinidade por Fe^{3+} .

A fenantrolina e o desferal não apresentaram efeito protetor sobre a inibição da taxa de síntese do DNA causada pela THQ (FIG. 6 A e B), indicando a não participação do ferro no seu mecanismo de ação.

3.3 Efeito dos sequestradores de radical hidroxila Benzoato de Sódio e Manitol.

Com a finalidade de verificar a participação dos radicais hidroxila no mecanismo de inibição de síntese de DNA produzido pela THQ realizamos estudos de proteção com sequestradores específicos desses radicais.

Os sequestradores Benzoato de Sódio e Manitol não conferiram proteção sobre a inibição da síntese de DNA causada pela THQ (FIG. 7 A e B), da mesma forma que outros utilizados (Tiouréia 10 mM e DMSO 0.2%) cujos resultados não estão apresentados aqui.

A resposta negativa obtida não elimina a participação desse radical no processo de lesão do DNA pela THQ. CZAPSKI e BORG & SCHAICH (apud, WINTERBOURN & SUTTON, 1989) apontaram algumas das razões pelas quais a ausência de proteção por sequestradores de radicais hidroxila não elimina a possibilidade do envolvimento desses radicais no evento estudado. Dentre estas estão a formação dos $OH\cdot$ na proximidade do alvo (reação sítio específica), e a existência de barreiras de permeabilidade aos sequestradores.

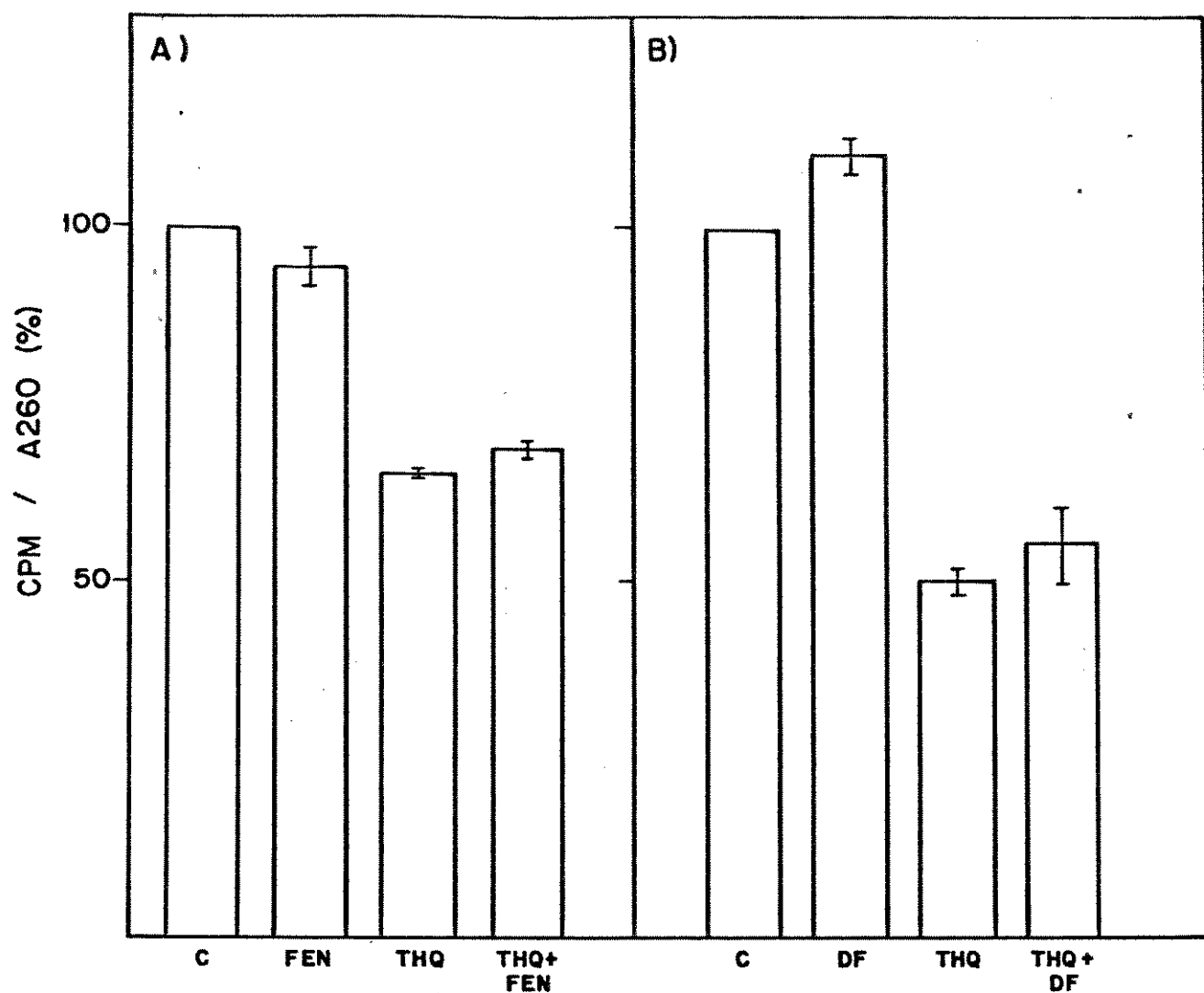


Figura 8 - EFEITO DA 1,10-FENANTROLINA (FEN) E DESFERAL (DF) NA INIBIÇÃO DA SÍNTESE DE DNA INDUZIDA PELA THQ.

Células V79 em fase exponencial de crescimento foram expostas a 0.5 mM de THQ na presença de 0.1 mM de fenantrolina (A) e 50 μ M de desferal (B) (PBS -A, 30 min, 37°C). A taxa de síntese de DNA foi medida e expressa como descrito na Fig.2.

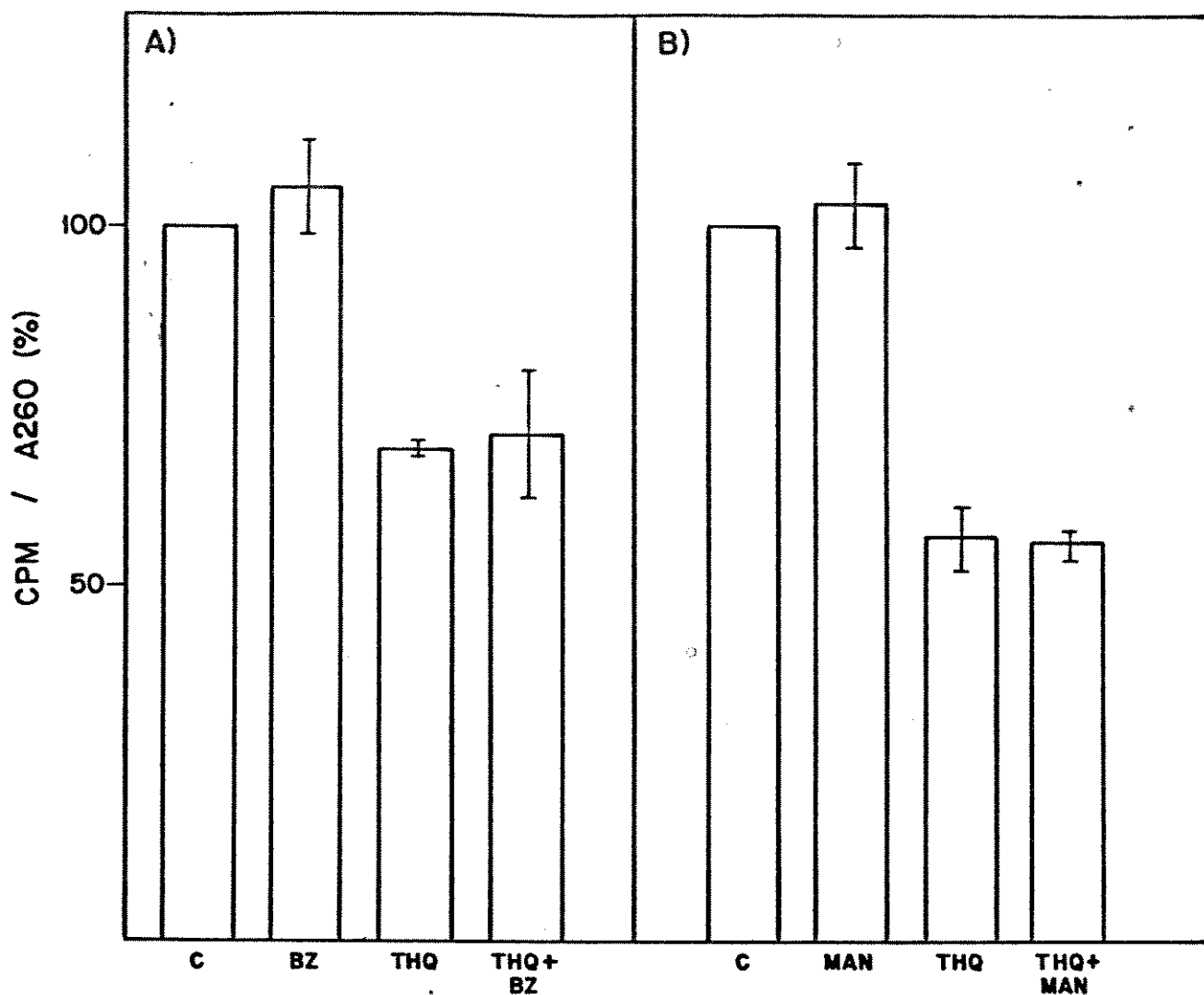


Figura 7 - EFEITO DO BENZOATO DE SÓDIO (BZ) E MANITOL (MAN) NA INIBIÇÃO DA SÍNTESE DE DNA INDUZIDA PELA THQ.

Células V79 em fase exponencial de crescimento foram expostas a 0.5 mM de THQ na presença de 50 mM de benzoato de sódio (A) e 50 mM de manitol (B) (PBS-A, 30 min, 37°C). A taxa de síntese do DNA foi medida e expressa como descrito na Fig.2.

Desta maneira resolvemos explorar algumas condições experimentais, buscando a confirmação da participação ou não dos radicais hidroxila.

Realizamos um estudo comparativo da ação do H_2O_2 sobre a replicação do DNA como controle positivo, uma vez que a produção de qfs do DNA de células expostas ao H_2O_2 é tida como decorrente da presença de radicais hidroxila formados via Reação de Harber Weiss catalizada por ferro (MELLO-FILHO & MENECHINI, 1984).

4. EFEITO DO H_2O_2 SOBRE A REPLICAÇÃO DO DNA CELULAR. ESTUDOS DE PROTEÇÃO COM 1,10-FENANTROLINA E ETILENO GLICOL.

Verificamos que o peróxido de hidrogênio inibe a síntese do DNA em células V79, e que a fenantrolina confere proteção significativa sobre esse efeito (FIG.8). Nas duas concentrações de peróxido de hidrogênio utilizadas a fenantrolina (0,1 mM) reduziu aproximadamente 85 % do efeito inibitório detectado.

Este resultado estabelece uma diferença fundamental entre o mecanismo de ação da THQ e do H_2O_2 sobre a replicação do DNA: uma via independente e outra dependente de ferro, respectivamente.

Para evidenciar a participação do radical hidroxila no evento de inibição de síntese do DNA induzida pelo H_2O_2 utilizamos o etileno glicol como sequestrador, uma vez que MELLO-FILHO (1988) obteve proteção das qfs do DNA e do efeito letal causados pelo H_2O_2 em células V79 utilizando esse sequestrador.

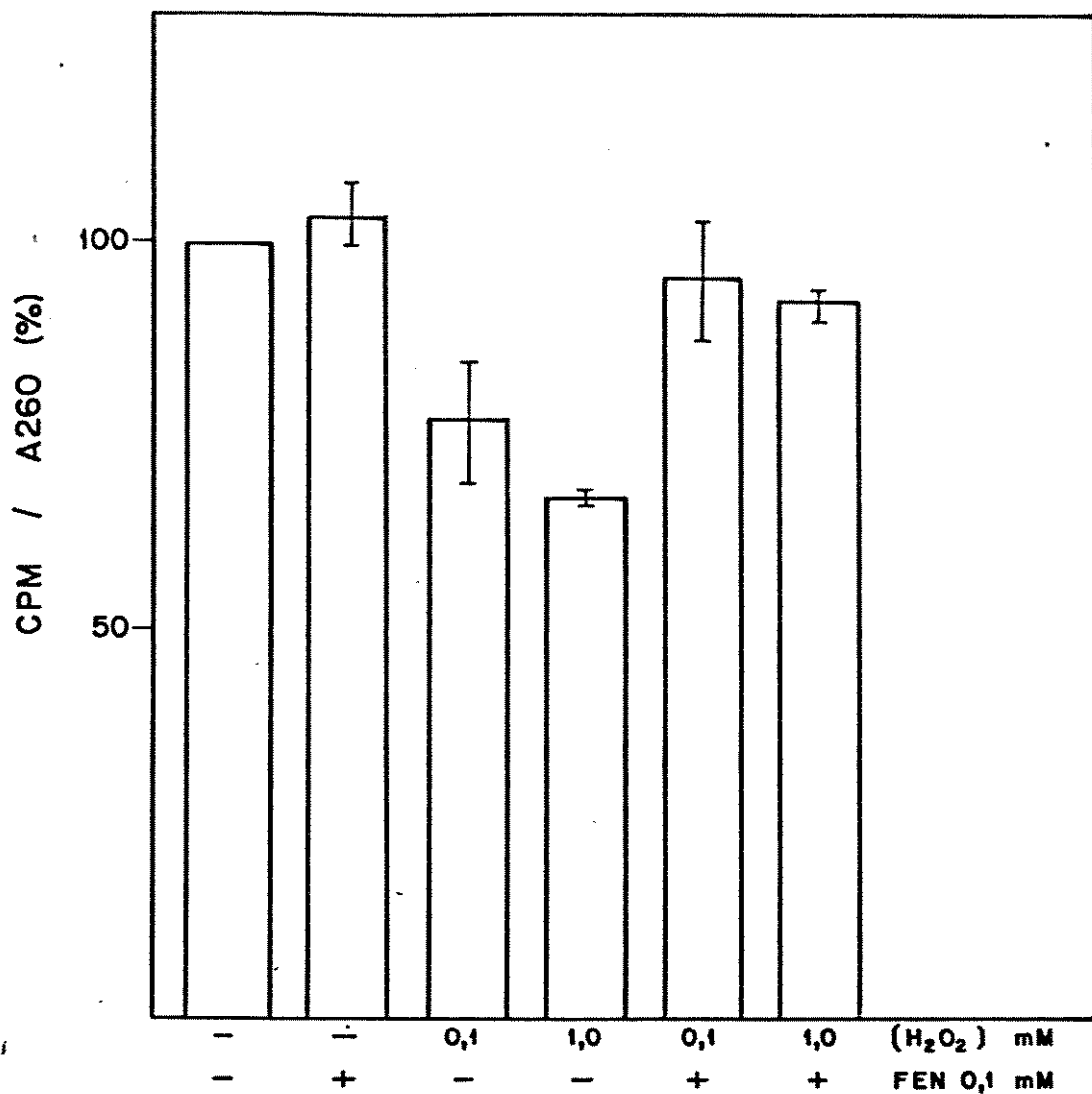


Figura 8 - EFEITO DA 1,10-FENANTROLINA (FEN) NA INIBIÇÃO DA SÍNTESE DE DNA INDUZIDA PELO H₂O₂.

Células V79 em fase exponencial de crescimento foram expostas ao H₂O₂ na presença ou não de fenantrolina (PBS-A, 30 min, 37°C). A taxa de síntese de DNA foi medida e expressa como descrito na Fig.2.

Verificamos que o etileno glicol não confere proteção sobre a inibição da replicação causada pelo H_2O_2 (FIG.9 A).

Este resultado negativo evidencia a dificuldade de se obter proteção ao nível de replicação através do uso de sequestradores de radicais hidroxila, indicando a possibilidade de que a concentração intracelular desses sequestradores no sítio de ação não seja suficiente para conferir proteção.

Buscando estabelecer uma condição que permitisse um maior aporte do sequestrador para dentro da célula realizamos experimentos de proteção em células permeabilizadas com digitonina.

5. EFEITO DO ETILENO GLICOL SOBRE A INIBIÇÃO DE TAXA DE SÍNTESE DO DNA EM CÉLULAS PERMEABILIZADAS EXPOSTAS AO H_2O_2 E À THQ.

Aqui, a exposição das células ao H_2O_2 ou à THQ foi feita na presença de digitonina. Esta saponina tem sido utilizada para permeabilizar a membrana plasmática de diferentes tipos celulares, sem afetar a funcionalidade de organelas intracelulares como a mitocôndria e o retículo endoplasmático (DOCAMPO & VERGESI, 1989).

Inicialmente selecionamos a concentração de digitonina que, em nossas condições experimentais, não afetava a morfologia dos fibroblastos. Verificamos que 10^{-4} % (p/v) de digitonina mostrou-se ser a concentração que morfologicamente não afetava as células. Na concentração de 5×10^{-4} % observamos alterações morfológicas, descolamento de células e incorporação de azul de

tripano.

Verificamos que na presença de 10^{-4} % de digitonina o etileno glicol conferiu proteção significativa sobre a inibição da síntese de DNA causada por H_2O_2 e THQ (FIG.9). Nas mesmas condições experimentais não se observou proteção quando os tratamentos foram realizados na ausência de digitonina (FIG.9).

Apesar da proteção observada ter sido parcial, ela constitui uma evidência da participação do radical hidroxila no mecanismo de inibição da síntese de DNA pela THQ e H_2O_2 se considerarmos a alta reatividade desses radicais (PRYOR, 1986). Esta alta reatividade faz com que os $OH\cdot$ reajam indiscriminadamente com qualquer substrato, sendo portanto inesperado um efeito de proteção total por sequestradores específicos.

Estes resultados indicam que, embora através de vias provavelmente distintas, os efeitos do H_2O_2 e THQ ao nível de replicação do DNA envolvem a formação de radicais hidroxila.

6. ESTABILIDADE DAS ESPÉCIES INTERMEDIÁRIAS PRODUZIDAS DURANTE A AUTOOXIDAÇÃO DA THQ EM SOLUÇÕES ESTOCADAS.

Foi observado que o efeito inibitório da THQ sobre a replicação do DNA desaparece gradativamente em função do tempo de estocagem da solução. Buscando o entendimento de tal evento ao nível molecular realizamos estudos para investigar a estabilidade das espécies geradas durante a autooxidação da THQ em solução.

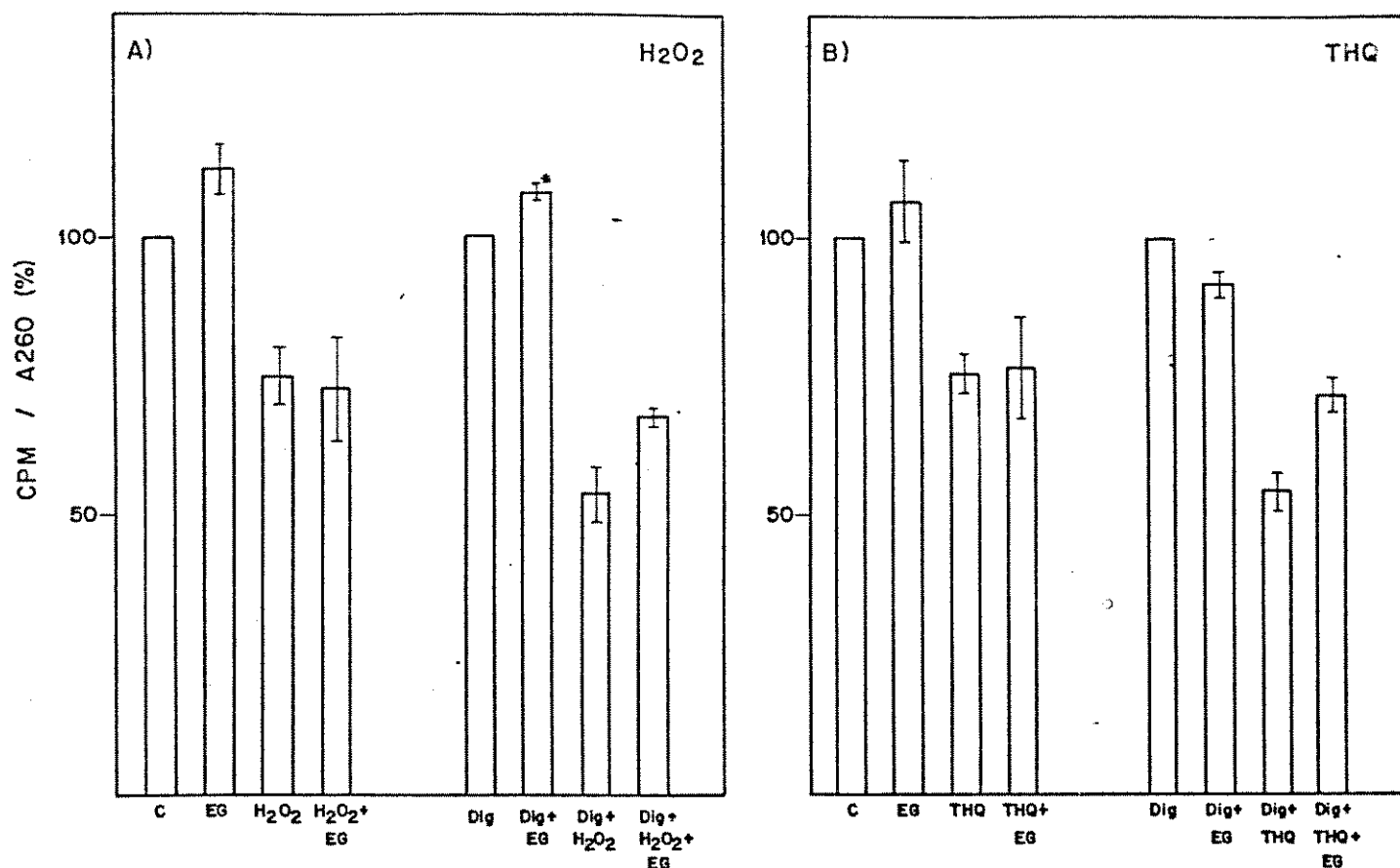


Figura 9 - EFEITO DO ETILENO GLICOL (EG) SOBRE A INIBIÇÃO DA TAXA DE SÍNTESE DO DNA DE CÉLULAS PERMEABILIZADAS EXPOSTAS AO H₂O₂ E THQ.

Células V79 em fase exponencial de crescimento foram expostas a 1 mM H₂O₂ (A) e 0.5 mM THQ (B) na presença ou não de 0.5 M de etileno glicol, assim como de digitonina 10⁻⁴ % (PBS-A, 30 min, 37°C). A taxa de síntese de DNA foi expressa e medida como descrito na Fig.2. * (experimento típico onde é apresentado o desvio da média das triplicatas de cada tratamento).

6.1 Detecção do H_2O_2 na solução de THQ em função do tempo de estocagem da solução.

Foram realizadas dosagens do peróxido de hidrogênio nas soluções de THQ estocadas por intervalos de 0 a 6 horas. Os resultados são apresentados na TABELA 2. Verificamos um aumento gradativo da intensidade de quimioluminescência medida ao longo do tempo de estocagem, atingindo 37 % a mais do valor inicial depois de 6 horas de estocagem. A intensidade de quimioluminescência de uma solução recém dissolvida, se comparada à da solução de H_2O_2 10^{-8} M indica uma concentração de H_2O_2 da ordem de 10^{-6} M. Este resultado evidencia que o H_2O_2 não é a espécie responsável pelo desaparecimento do efeito de inibição da replicação na solução de THQ estocada por 6 horas. Se assim fosse seria esperado uma diminuição de sua concentração, com o tempo de estocagem, na solução de THQ.

6.2 Detecção dos radicais semiquinona e hidroxila na solução de THQ em função do tempo de estocagem da solução.

Detectamos através da técnica de ressonância eletrônica paramagnética (EPR) a presença dos radicais semiquinona e hidroxila na solução de THQ recém dissolvida, como mostrado anteriormente por HOFFMANN e colaboradores (1987) (FIGs 10a e 11a).

TABELA 2. DOSAGEM DE H_2O_2 EM SOLUÇÕES DE THQ.

TRATAMENTO	$\bar{X}$ IQ (contagem/2 min) $\pm$ d.m.
THQ = 0	40.330.666 $\pm$ 1.926.666
THQ = 30 min	45.889.333 $\pm$ 4.414.667
THQ = 4,0 hs	50.628.606 $\pm$ 6.306.000
THQ = 6,0 hs	55.365.333 $\pm$ 5.481.333
$H_2O_2 = 10^{-8}$ M	237.065 $\pm$ 21.567

Foram realizadas medidas de intensidade de quimioluminescência (IQ) de soluções de THQ 0.5 mM após os seguintes tempos de sua dissolução: 0, 30 min, 4 e 6 horas. Vide "Métodos" (item 6). Uma solução de H_2O_2 10^{-8} M dosada por método espectrofotométrico (vide "Material e Métodos, item 2") foi utilizada como padrão de referência.

São apresentados os valores médios e os desvios da média (d.m.) de dois experimentos independentes.

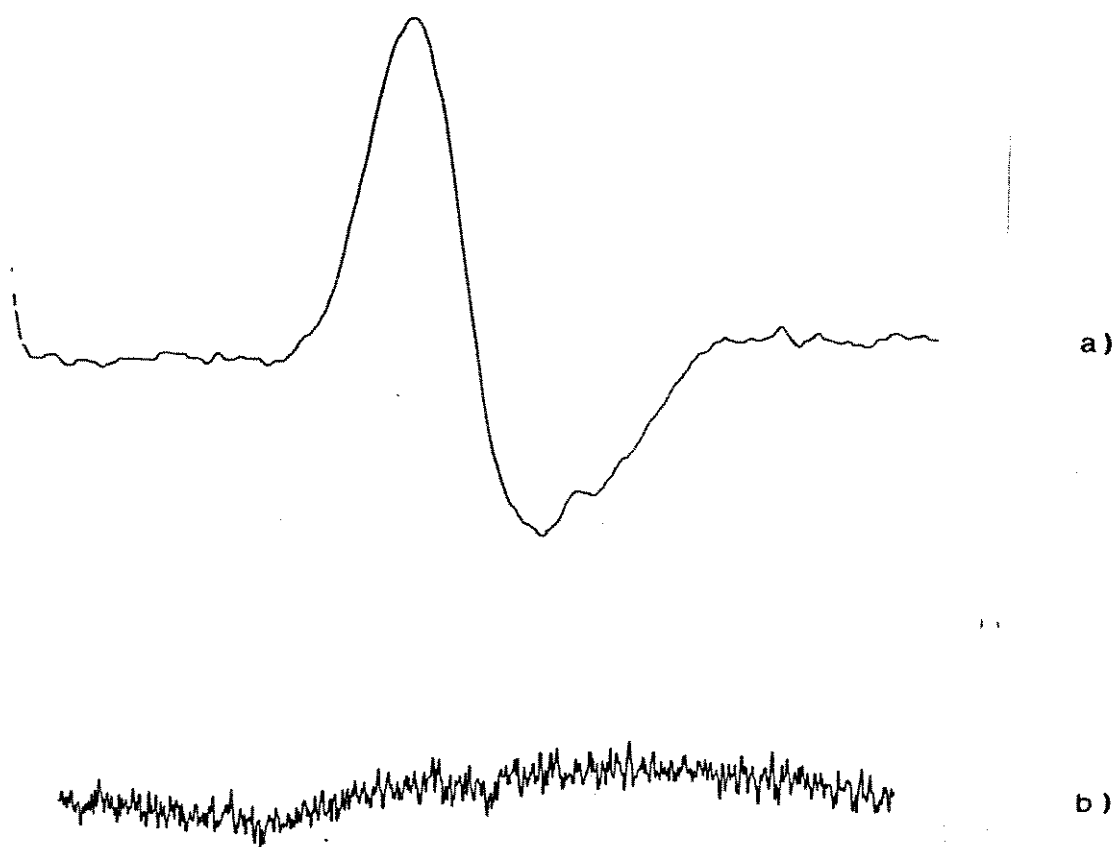


Figura 10 - ESPECTRO DE RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELETRÔNICA DO RADICAL SEMIQUINONA DA THQ.

Os espectros foram registrados nas condições descritas em "Métodos" (item 7), a partir de uma solução de THQ 1 mM, na presença de Zn^{2+} (80 mM) (PBS-A, pH 7.2).

a) solução recém dissolvida.

b) solução estocada por 30 minutos.

O espectro do radical semiquinona foi obtido em condições aeróbicas e na presença de íons Zn^{2+} , os quais estabilizam o radical semiquinona (EATON, 1964). O sinal deste radical não é mais detectado na solução estocada por 30 minutos (FIG.10b).

A FIG.11 mostra o espectro do radical aduto DMPD-OH na solução de THQ. O DMPD é um captador de spin utilizado com frequência na detecção de radicais hidroxila (BORS & col., 1978). O DMPD reage com o radical hidroxila com uma constante de reação de aproximadamente $3,4 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, formando um radical aduto DMPD-OH com espectro característico. Detectamos na solução de THQ recém dissolvida um sinal típico e intenso do aduto DMPD-OH (FIG.11a). Este sinal decresce gradativamente nas soluções estocadas por 1 e 2 horas (FIG.11 b e c), desaparecendo após 6 horas de estocagem da solução (FIG.11 d).

Os resultados obtidos mostram um paralelo entre o desaparecimento do efeito da THQ ao nível da replicação e o desaparecimento do radical hidroxila na solução de THQ.

7. ESTUDOS DE PROTEÇÃO DO EFEITO DE PRODUÇÃO DE QUEBRAS DE FITAS SIMPLES DE DNA EM CÉLULAS EXPOSTAS À THQ.

Estes experimentos foram realizados com o objetivo de verificar a existência de uma correlação entre os mecanismos moleculares de inibição da replicação e de produção de quebras de fitas simples do DNA celular induzidos pela THQ.

7.1 Efeito da catalase.

Como a catalase mostrou proteção total ao nível de replicação (FIG.5A) analisamos seu efeito sobre a formação de quebras no DNA de células expostas à THQ. Verificamos que a catalase não conferiu proteção alguma sobre as qfs produzidas pela THQ (FIG.12). Este resultado indica uma diferença entre o mecanismo de produção da parada de replicação e o envolvido na produção de quebras simples da cadeia do DNA.

7.2 Efeito da 1-10 fenantrolina.

Este complexante de ferro também não conferiu proteção sobre as qfs do DNA produzidas pela THQ (FIG. 13), sugerindo uma via independente de ferro no mecanismo de formação das qfs induzidas pela THQ.

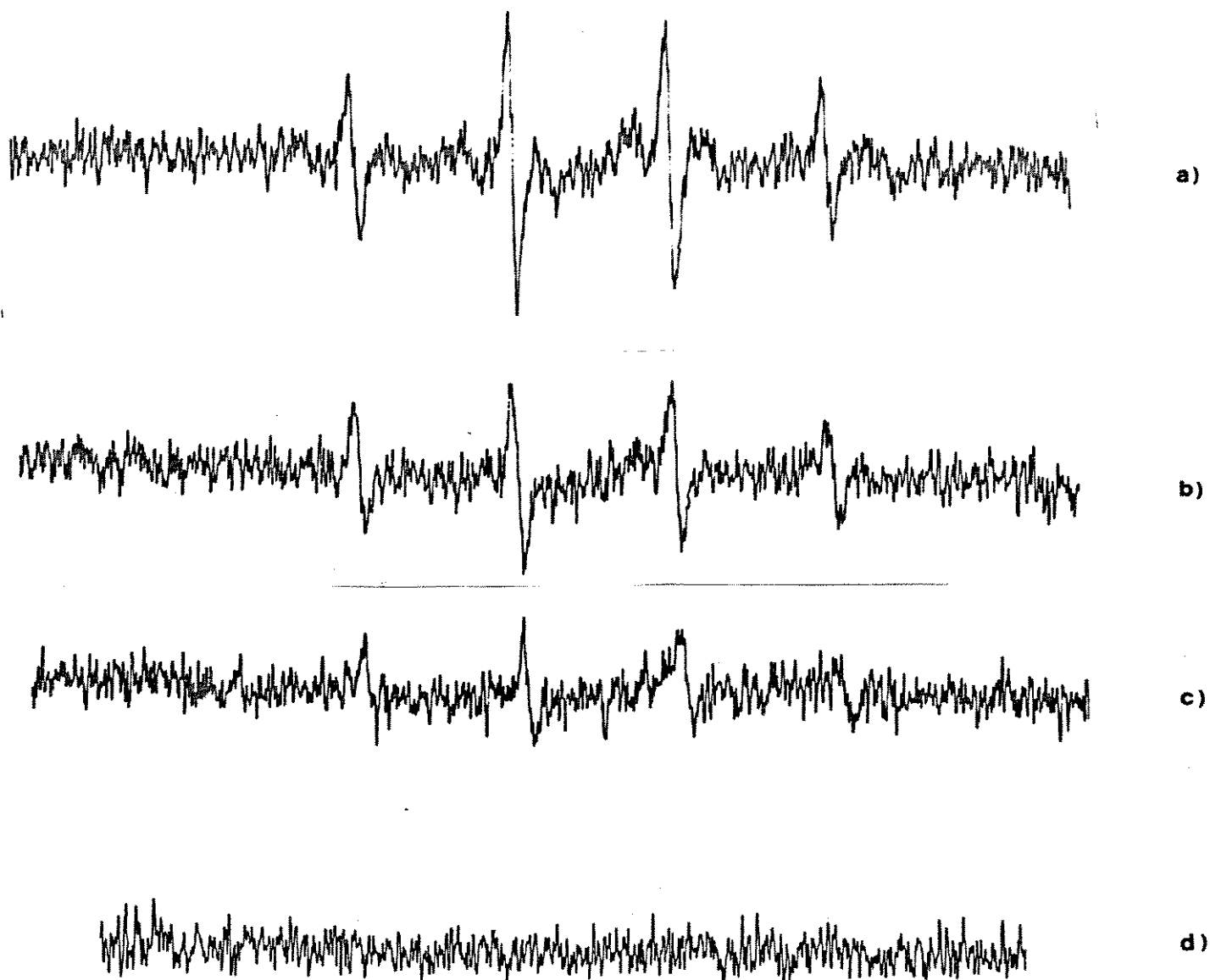


Figura 11 - ESPECTRO DE RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELETRÔNICA DO RADICAL ADUTO DMPO-HIDROXILA.

Os espectros foram registrados nas condições descritas em "Métodos" (item 7), a partir de uma solução de THQ 1 mM, na presença de DMPO(150mM)(PBS-A, pH7.2).

- a) solução recém dissolvida.
- b) solução estocada por 1 hora.
- c) solução estocada por 2 horas.
- d) solução estocada por 6 horas.

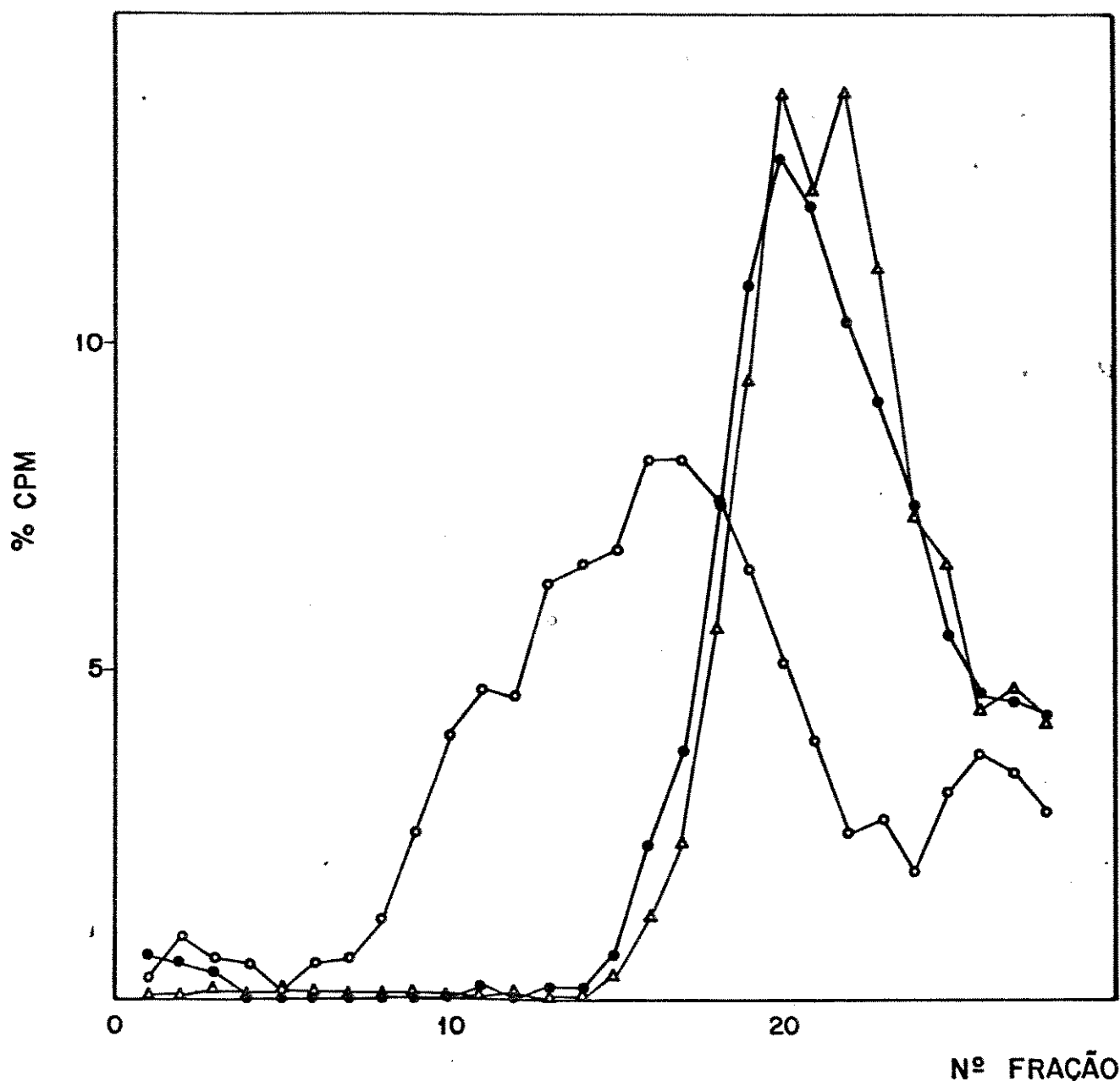


Figura 12 - EFEITO DA CATALASE SOBRE AS QUEBRAS DO DNA DE CÉLULAS EXPOSTAS A THQ.

Células V79 com o DNA marcado isotopicamente e semeadas em placas de Petri de 5 cm de diâmetro (5×10^5 cél/placa) foram expostas a 0.75 mM de THQ na presença (Δ) ou não ($\bullet$) de 250 U/ml de catalase (PBS-Ca²⁺, 30 min, 37°C). Células controles ($\circ$) foram expostas ao PBS-Ca²⁺. Após o tratamento os lisados celulares foram analisados por ultracentrifugação em gradientes de sacarose em meio alcalino, como descrito em "Métodos" (item 4). São mostrados os perfis de distribuição de radioatividade nos gradientes (sedimentação da direita para a esquerda).

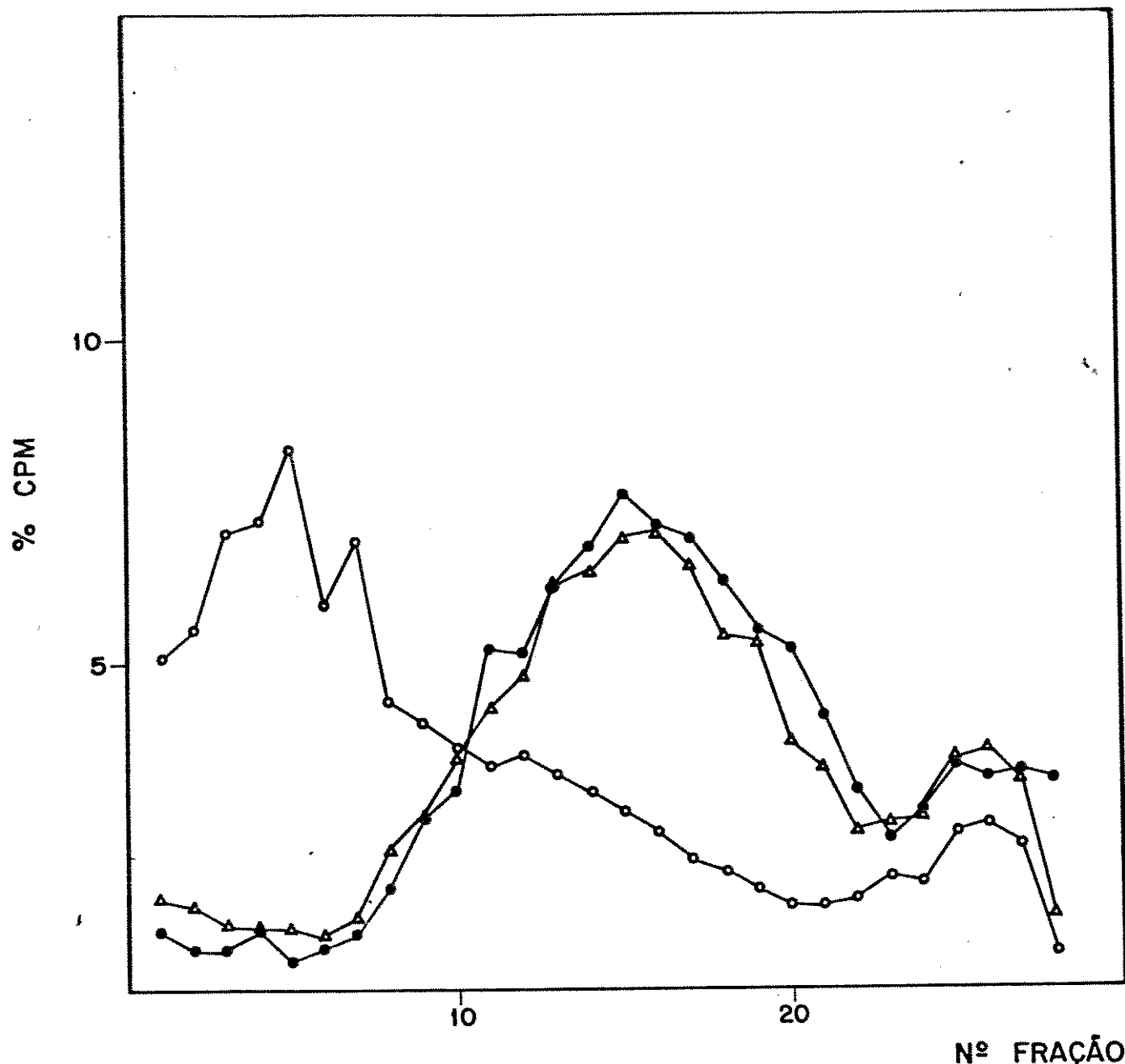


Figura 13 - EFEITO DA 1,10 FENANTROLINA SOBRE AS QUEBRAS DO DNA DE CÉLULAS EXPOSTAS A THQ.

Células V79 com o DNA marcado isotopicamente e semeadas em placas de Petri de 5 cm de diâmetro (5×10^5 cél/placa) foram expostas a 0.75 mM de THQ na presença (Δ) ou não ($\bullet$) de 10^{-4} M de 1,10-fenantrolina (PBS- Ca^{2+} , 30 min, 37°C). Células controles ($\circ$) foram expostas ao PBS- Ca^{2+} . Após o tratamento os lisados foram analisados por ultracentrifugação em gradientes de sacarose em meio alcalino, como descrito em "Métodos" (item 4). São mostrados os perfís de distribuição de radioatividade no gradiente (sedimentação da direita para a esquerda).

IV. DISCUSSÃO

O metabolismo de quinonas nas células ocorre através de reações bioquímicas diversas, sendo portanto pouco provável que um único mecanismo esteja envolvido na produção de seus efeitos citotóxicos (BRUNMARK & CADENAS, 1989). Estes autores consideram razoável a idéia de que dentre os diversos alvos celulares existam reações críticas responsáveis pelo desencadeamento da resposta tóxica.

As características óxido-redutoras e o carácter eletrofílico das quinonas fundamentam a sua reatividade em sistemas biológicos. As quinonas participam de dois tipos principais de reações: a) reações de transferência de elétrons uni ou bieletrônicas ; b) reações de adição com agentes nucleofílicos.

A oxidação de hidroquinonas com transferência de elétrons para o oxigênio molecular resulta na formação de espécies reativas de oxigênio, as quais estão claramente envolvidas nos efeitos tóxicos de quinonas (SMITH & col., 1985). A citotoxicidade decorrente da ação de espécies reativas de oxigênio tem sido relacionada à lesões em diversos alvos celulares como DNA, membranas e proteínas (MENEHINI, 1988 ; TAPPEL, 1973 e DAVIS, 1987), assim como à alterações da homeostase de diversos metabólitos celulares como glutatona, nucleotídeos de pirimidina, grupos tióis de proteínas e íons Ca^{2+} (DIMONTE & col., 1984 e MOORE & col., 1987). Nas células, as reações de adições nucleofílicas com quinonas ocorrem com resíduos de macromoléculas importantes como os ácidos nucleicos e as

proteínas, e outros metabólitos como por exemplo a glutatona (ROSSI & col., 1986 e BRUNMARK & CADENAS, 1989).

O pequeno efeito hemolítico observado (inferior a 10%) utilizando concentrações citotóxicas de THQ indica que a membrana celular não deve constituir um alvo de importância na determinação de tal evento. Esta observação é apoiada pela ausência de alterações morfológicas visíveis ao microscópio óptico em células V79 expostas à THQ (observações pessoais).

Duas linhas de evidências experimentais apontam o DNA como um alvo crítico da ação da THQ em células V79: a ocorrência de quebras simples das fitas (FIG.1), e a inibição do processo de replicação semiconservativa do DNA celular (FIG.2).

O efeito da THQ sobre a replicação é dependente do tempo de estocagem da solução, desaparecendo após seis horas de estocagem (FIG.4).Esta resposta indica o envolvimento dos intermediários da reação de autooxidação (espécies reativas de oxigênio e/ou do radical semiquinona) no bloqueio da síntese de DNA. Considerando que a autooxidação da THQ é imediata, e que o tempo de vida das espécies radicalares intermediarias é curto, este resultado indica também o envolvimento de um produto da autooxidação da THQ no evento de inibição da replicação. Este produto seria decomposto lentamente e poderia, hipoteticamente, estar reciclando a produção de radicais de oxigênio.

A inibição da síntese semiconservativa do DNA em células eucarióticas pode resultar de diferentes tipos de perturbações no processo de replicação (HALL & MOUNT, 1981). Ela pode ser causada por um bloqueio da iniciação das unidades de replicação

(replicons), pelo bloqueio da progressão dos pontos de crescimento do DNA já existentes, e pela redução da velocidade de deslocamento da forquilha de replicação (PAINTER & HOWARD, 1982). Incluem-se também alterações das enzimas envolvidas no próprio processo de síntese (FRIEDBERG, 1985).

A cinética de recuperação da inibição da síntese de DNA causada pela THQ (FIG.3) é característica de agentes que lesam o DNA, de acordo com PAINTER (1977). Esta resposta distingue-se daquela decorrente de lesões em outros alvos, onde a síntese é retomada aos níveis normais imediatamente ou brevemente após a remoção do agente.

A resposta bifásica de inibição de síntese de DNA pela THQ (FIG.2) assemelha-se à obtida para a radiação ionizante. Neste caso a inibição acentuada, produzida por baixas doses de radiação, é atribuída ao bloqueio da iniciação de replicons; e a menos acentuada, à uma ação sobre o progresso da forquilha de replicação (PAINTER & YOUNG, 1980). No primeiro caso o alvo é mais abrangente em decorrência da existência de domínios de replicons vizinhos ("replicons clusters"), sendo portanto sensível à doses baixas. No segundo, o alvo é mais localizado e consequentemente sensível a doses maiores. Uma resposta similar foi obtida pelo tratamento com THQ, com um aumento da inibição acentuada entre 0,01 e 0,1 mM, e com uma pequena variação da inibição entre 0,1 e 2,0 mM.

A proteção total conferida pela catalase (FIG.5) sobre a inibição de síntese do DNA induzida pela THQ rescém dissolvida mostra o papel central do H_2O_2 em tal evento. No entanto, não se

pode atribuir o efeito observado a uma ação direta desse composto uma vez que a diminuição do efeito em função do tempo de estocagem das soluções de THQ (FIG.4) não é acompanhado de uma diminuição, em paralelo, da concentração do H_2O_2 formado (TABELA 2). Ao contrário, observa-se um ligeiro aumento da concentração do H_2O_2 produzido durante a estocagem da solução (TABELA 2). Acrescenta-se a isso o fato do H_2O_2 não possuir propriedades oxidantes suficientes para lesar o DNA por si só (HOFFMANN & MENECHINI, 1979).

Admitindo-se que as enzimas antioxidantes utilizadas nos estudos de proteção não atravessam as membranas celulares , a proteção pela catalase é atribuída à uma diminuição da concentração intracelular do peróxido de hidrogênio, devida à sua livre difusão através da membrana plasmática. Esta interpretação está de acordo com a de outros trabalhos onde a catalase tem efeito protetor (DOROSHOW, 1986 e SANDY & col., 1987).

A ausência de proteção pela superóxido dismutase indica a não participação dos radicais superóxidos gerados extracelularmente no evento da parada da replicação produzido pela THQ. Uma vez que a passagem desses radicais através das membranas biológicas é restrita (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1986), não podemos eliminar a participação dos radicais superóxidos gerados intracelularmente em tal evento.

O resultado de proteção por catalase sugere em princípio, que a THQ, similarmente ao H_2O_2 isoladamente, atuaria formando os radicais hidroxila via reação de Harber-Weiss. Esses radicais são considerados a principal espécie responsável pelos efeitos

genotóxicos do peróxido de hidrogênio (HOFFMANN & MENECHINI, 1979 e MELLO-FILHO & MENECHINI, 1984). Também no caso da THQ, os radicais hidroxila estão envolvidos no evento da inibição da replicação do DNA, como indicado pelos experimentos de proteção com etileno glicol em células permeabilizadas (FIG.9).

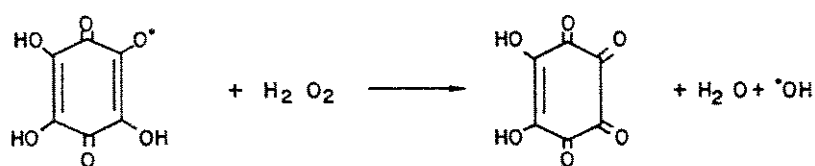
Nas células não permeabilizadas, a ausência de proteção por sequestradores de radical hidroxila sobre a inibição da síntese de DNA causada pelo H_2O_2 e THQ foi interpretada como decorrente da baixa concentração desses compostos intracelularmente. Consideramos também a possibilidade da ocorrência de reações de formação de $OH\cdot$ sítio específica, onde o metal de transição estaria ligado à macromolécula alvo gerando radicais muito próximos do sítio de ação (SAMUNI & col., 1983). Neste caso, a proteção conferida por sequestradores específicos do radical $OH\cdot$ deve ser parcial ou inexistente. Consideramos que a permeabilização das células permitiu um maior aporte do sequestrador no local de formação desses radicais. Observamos também que nas células permeabilizadas com digitonina o efeito de inibição da replicação promovido pelo H_2O_2 e pela THQ é maior que nas células não permeabilizadas (FIG.9). Este resultado indica que a permeabilização promoveu um maior aporte desses compostos para dentro da célula.

Constituem evidências adicionais do papel central dos radicais hidroxila no mecanismo de ação da THQ a detecção desses radicais na solução de THQ (FIG.11), e a relação encontrada entre a cinética de desaparecimento dos radicais na solução (FIG.11) e a cinética de desaparecimento do efeito de inibição da

síntese do DNA (FIG.4), em função do tempo de estocagem da solução de THQ.

Entretanto, os estudos de proteção com quelantes de ferro indicaram a operação de mecanismos de ação distintos para a THQ e o H_2O_2 . No caso deste último, a proteção conferida pela fenantrolina (FIG.8) indica a ocorrência da reação de Fenton/Harber-Weiss na inibição da replicação do DNA, de acordo com o mecanismo proposto anteriormente para explicar o efeito citotóxico e a produção de qfs no DNA celular (MENEHINI & HOFFMANN, 1980 e MELLO-FILHO & MENEHINI, 1984). A ausência de proteção por quelantes de ferro sobre o efeito inibitório da THQ no nível da replicação do DNA (FIG.6) sugere um mecanismo de ação independente de ferro, descartando-se a reação de Fenton/Harber-Weiss como o mecanismo causador do bloqueio da replicação.

Esses resultados conduziram à proposição de uma hipótese sobre o mecanismo de inibição da síntese de DNA pela THQ, que admite que os radicais hidroxila seriam gerados via redução do peróxido de hidrogênio (formado durante a autooxidação da THQ) pelos radicais semiquinona intermediários, em vez do íon ferroso.



Essa reação, conhecida como do tipo Fenton Orgânica, foi proposta primeiramente por WINTERBOURN (1981) para explicar os efeitos tóxicos do herbicida paraquat, através da geração de radicais paraquat (tipo semiquinona) enzimaticamente.

Essa reação foi também evidenciada como um mecanismo de produção fisiológica de radicais hidroxila em mitocôndrias, através da reação entre o radical semiquinona derivado da ubisemiquinona e o peróxido de hidrogênio mitocondriais, independentemente de ferro (NOHL & JORDAN, 1987).

Em aerobiose devemos considerar a existência de uma competição pelo radical semiquinona entre o oxigênio e o peróxido de hidrogênio. WINTERBOURN (1981) admite a ocorrência da Reação de Fenton Orgânica em condições parcialmente oxigenadas.

YOUNGMAN & ELSTNER (1981) reportaram a ocorrência da reação entre o radical paraquat gerado enzimaticamente e o peróxido de hidrogênio em condições de oxigênio limitantes. A formação de radicais hidroxila (detectadas a partir da redução do metional à etileno) foi inibida pela presença de catalase, e não sofreu inibição na presença da superóxido dismutase e sequestradores de radicais hidroxila. Estes resultados levaram à proposição da formação de radicais $\text{OH}\cdot$ presos ("crypto- $\text{OH}\cdot$ radicals"). Estes resultados de proteção, obtidos a partir de estudos "in vitro", assemelham-se aos obtidos nos estudos de proteção da inibição da síntese de DNA induzida pela THQ , reforçando a hipótese da Reação de Fenton Orgânica como mecanismo de produção de radicais hidroxila.

Considerando que a concentração de oxigênio nas células de mamíferos é muito menor que a encontrada nas soluções aeradas (WINTERBOURN & SUTTON, 1984) é possível admitir o favorecimento da Reação de Fenton Orgânica em concentrações intracelulares de oxigênio limitantes.

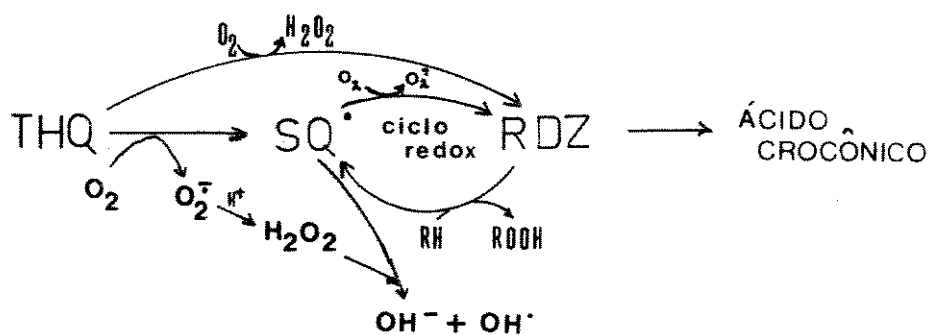
A detecção do radical semiquinona transientemente na solução de THQ (FIG.10) constitui um suporte adicional para a proposição da Reação de Fenton Orgânica como mecanismo de ação genotóxica da THQ. O radical semiquinona ocorre como intermediário da autooxidação da THQ a ácido rodizônico, via transferência unieletrônica para o oxigênio molecular, em duas etapas consecutivas (ver esquema 1). O desaparecimento do sinal do radical semiquinona na solução de THQ 30 minutos após a sua dissolução não invalida a proposta de sua participação na reação de Fenton Orgânica, uma vez que em condições fisiológicas a redução de quinonas ao radical semiquinona pode ocorrer através da ação de flavoenzimas e de reações não enzimáticas (POWIS, 1989).

No caso da THQ é possível admitir a ocorrência de uma reação similar à proposta por SAKURAI & MIURA (1989) para explicar a ação citotóxica da aloxana. Aqui, a forma radicalar da aloxana é formada às custas da oxidação de grupos sulfidrilas de proteínas. SERIS (1960) mostrou que o ácido rodizônico, a forma oxidada da THQ, tem efeito oxidante sobre grupos tióis de proteínas, corroborando para tal hipótese. Neste caso grupos tióis de proteínas seriam também alvo da ação citotóxica da THQ.

É importante salientar que os radicais semiquinona são relativamente estáveis em relação a outros radicais (PETHIG & col.,1983). Estes autores estabeleceram uma correlação entre a meia vida dos radicais semiquinona e a atividade citotóxica para diferentes quinonas, concluindo que esses radicais seriam de importância no evento citotóxico.

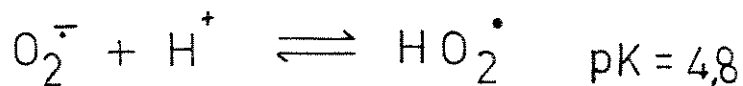
A redução do ácido rodizônico ao radical semiquinona e consequente reoxidação estabelece um ciclo redox intracelularmente, gerando espécies reativas de oxigênio por um mecanismo adicional ao da autooxidação (ver esquema 1).

O desaparecimento do efeito de inibição da síntese de DNA induzido pela THQ em função do tempo de estocagem da solução pode ser explicado pelo desaparecimento das espécies radicalares geradas durante a autooxidação da THQ, assim como pela interrupção do ciclo redox. Esta seria decorrente da decomposição do ácido rodizônico durante a estocagem da solução, de tal modo que não existiria mais RDZ na solução estocada por 6 horas. TAKAHASHI e colaboradores (1965) reportaram a instabilidade dessa espécie em pH neutro, a qual se transforma gradativamente em ácido crocônico, um análogo estrutural do ácido rodizônico contendo um anel de 5 carbonos. Esta hipótese sugere a relevância do ciclo redox no evento de inibição da replicação do DNA pela THQ, uma vez que dá continuidade à Reação de Fenton Orgânica através da regeneração do radical semiquinona.

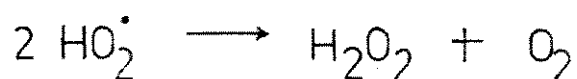


O H_2O_2 , que possui um papel central no evento de inibição da síntese de DNA induzida pela THQ, é formado principalmente pela

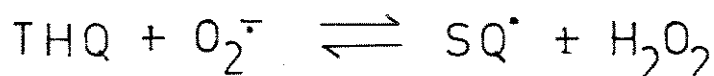
reação de dismutação do ânion superóxido gerado a partir da redução monoelétrica do oxigênio pela THQ. O radical ânion superóxido está em equilíbrio com a sua forma protonada, o radical hidroperóxido.



Em condições fisiológicas prevalece a forma desprotonada do radical, devido ao baixo pK deste equilíbrio. A constante de reação de dismutação da forma desprotonada do radical superóxido é muito pequena ($8 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), sendo favorecida em pH ácido (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1985). Em condições fisiológicas a superóxido dismutase possui função catalizadora dessa reação ($k = 2 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$).



Adicionalmente, o H_2O_2 pode ser produzido através de vias secundárias de oxidação da THQ, pelo próprio ânion superóxido intermediário ou pela transferência bieletrônica para o oxigênio molecular, conforme os esquemas de reações abaixo.



Os estudos de proteção das quebras de fitas simples de DNA produzidas pela THQ tiveram como objetivo evidenciar uma correlação entre os mecanismos moleculares de indução de quebras e de inibição da síntese do DNA. Iniciamos este estudo buscando

demonstrar o envolvimento dos intermediários reativos de oxigênio formados durante a autooxidação da THQ na formação das quebras de DNA. É sabido que estas espécies atacam as bases nitrogenadas e os resíduos de d-ribose componentes da estrutura do DNA através de reações de abstração de H^+ ou de adição à duplas ligações (HUTCHINSON, 1985), com consequente produção de quebras simples da cadeia do DNA.

Os nossos resultados dos estudos de proteção das qfs produzidas pela THQ (FIG.12 e 13) indicam que o H_2O_2 , distintamente do que foi observado para o mecanismo de inibição da replicação, não é uma espécie determinante na produção das quebras observadas. As quebras produzidas pelo tratamento com H_2O_2 isoladamente são totalmente prevenidas pela o-fenantrolina (MELLO-FILHO & MENECHINI, 1984).

Na análise destes resultados, entretanto, deve-se considerar a limitação técnica existente na comparação das metodologias de detecção de síntese de DNA e produção de quebras no DNA. Existe uma grande diferença de sensibilidade entre os dois métodos utilizados, sendo a medida de síntese de DNA uma técnica mais sensível que a detecção de quebras por ultracentrifugação em gradientes de densidade. Concentrações de THQ capazes de causar inibição da síntese de DNA (ordem de 0,1 mM, por exemplo) não induzem qfs detectáveis metodologicamente. As quebras só foram detectadas em concentrações superiores a 0,5 mM.

Nossa hipótese é que as quebras detectadas em concentrações de THQ superiores a 0,5 mM são resultantes de alterações drásticas do metabolismo celular. Estas, entretanto, não

constituíriam um único tipo de quebra produzido no DNA. Admitimos que as quebras de DNA podem ser geradas por, pelo menos, dois tipos de mecanismos: um preponderante em concentrações elevadas de THQ, e o outro operante em concentrações inferiores à 0,5 mM. As quebras resultantes de concentrações limitantes de THQ poderiam ser geradas, por exemplo, por um mecanismo dependente de peróxido de hidrogênio, não sendo entretanto detectadas metodologicamente devido a baixa concentração de H_2O_2 produzido (ordem 10^{-6} M). Em concentrações de THQ superiores à 0,5 mM teríamos o estabelecimento de uma situação de estresse oxidativo severa, caracterizada por perturbações metabólicas em diversos níveis, incluindo a regulação da homeostase do Ca^{2+} intracelular.

Esta proposição encontra suporte no modelo de ação citotóxica do H_2O_2 em bactérias, onde concentrações de H_2O_2 entre 1 e 3 mM produzem um efeito citotóxico do tipo 1, e concentrações superiores à 20 mM um efeito tipo 2. No primeiro caso, verifica-se uma resposta a qual é protegida pela fenantrolina, indicando um mecanismo de produção do efeito citotóxico que envolve a reação de Fenton. A resposta do tipo 2 não é alterada na presença de fenantrolina (IMLAY & LINN, 1988). O efeito tipo 1 é causado por lesões no DNA, enquanto que no tipo 2 ainda não são conhecidos os alvos celulares.

Nossa hipótese de atuação da THQ via desregulação da homeostase do Ca^{2+} intracelular está apoiada na literatura atual, a qual apresenta evidências da ação de diversos agentes oxidoredutores a esse nível (HYSLOP & col., 1986 e MOORE & col., 1987). A menadiona, por exemplo, inibe as translocases de Ca^{2+}

presentes na mitocôndria, retículo endoplasmático e membrana plasmática de hepatócitos, levando a um aumento da concentração do Ca^{2+} citossólico (ORRENIUS & col., 1989). Experimentos preliminares realizados em nosso laboratório mostram que mitocôndrias isoladas de fígado de rato sofrem alterações dos processos de transporte de Ca^{2+} quando expostas a 0,5 mM de THQ.

Sabe-se que o aumento da concentração do Ca^{2+} citossólico leva à estimulação anormal de processos fisiológicos como por exemplo a ativação de enzimas proteolíticas (ORRENIUS & col., 1989). Dentre estas estão incluídas endonucleases, as quais estão provavelmente envolvidas na indução de quebras do DNA em condições de estresse oxidativo (CANTONI & col., 1989).

Em continuidade à este trabalho, pretende-se avaliar a contribuição de possíveis alterações na concentração do Ca^{2+} citossólico no mecanismo de citotoxicidade da THQ. O estudo do mecanismo de produção de qfs pela THQ deverá ser estendido abordando-se a questão da ativação de endonucleases Ca^{2+} dependentes e estudos de proteção usando-se metodologia mais sensível. Será também importante identificar as lesões que constituem os bloqueios para o processo da replicação.

A elucidação destas questões trará certamente contribuições importantes para a conhecimento do mecanismo de toxicidade de quinonas. Este conhecimento além da importância acadêmica tem interesse prático na área médica, uma vez que quinonas constituem o segundo maior grupo de agentes utilizados no tratamento do câncer. O estudo de toxicidade de quinonas visa também o entendimento dos efeitos colaterais promovidos por esses

compostos.

Além disso, estes estudos têm uma relevância maior pelo fato de constituírem um modelo de estudo de estresse oxidativo. O aumento da concentração intracelular de espécies reativas de oxigênio (estado prooxidante) é decorrente de diversas situações dentre as quais incluem-se a ação de xenobióticos como quinonas. Estados prooxidantes têm sido associados a fenômenos biológicos de grande importância como mutação, câncer e envelhecimento (GERUTI, 1985).

V. CONCLUSÕES

1. A membrana celular não representa um alvo de importância da ação citotóxica da THQ.
2. O DNA constitui um alvo da ação tóxica da THQ em células V 79.
3. A parada da replicação do DNA constitui uma resposta imediata das células V 79 frente ao tratamento com THQ.
4. O peróxido de hidrogênio formado na reação de autooxidação da THQ tem papel central no mecanismo de inibição da replicação do DNA.
5. Os radicais hidroxila representam a espécie oxidante final no mecanismo de parada da replicação do DNA induzida pela THQ e pelo H_2O_2 isoladamente.
6. O mecanismo de inibição da replicação do DNA induzida pela THQ é independente de ferro, enquanto aquele envolvido na inibição induzida pelo H_2O_2 isoladamente é dependente de ferro (Reação de Fenton/Harber-Weiss).
7. A detecção do radical semiquinona na solução de THQ suporta a hipótese de que a reação de Fenton Orgânica é o mecanismo de produção dos radicais hidroxila pela THQ.
8. A cinética de recuperação do efeito de inibição da síntese de DNA induzida pela THQ indica que o bloqueio da replicação é resultante da presença de lesões no DNA.
9. A THQ causa lesões no DNA celular caracterizada como quebras simples de sua cadeia.
10. As quebras da cadeia do DNA foram detectadas somente em condições de alta concentração de THQ. Essas quebras são produzidas

por um mecanismo independente de H_2O_2 e de ferro.

11. Os mecanismos de inibição da replicação e de produção de quebras no DNA induzidos pela THQ são aparentemente distintos, sugerindo que as quebras do DNA não constituem o bloqueio principal do processo da replicação.

VI. SUMÁRIO / SUMMARY

1. ESTUDO DA AÇÃO CITOTÓXICA DA TETRAHIDROXIBENZOQUINONA (THQ) COMO MODELO DE ESTRESSE OXIDATIVO.

Este trabalho tem como objetivo o estudo do mecanismo de ação citotóxica da THQ em células da linhagem V79. A THQ sofre autooxidação espontânea em condições fisiológicas com produção do ânion superóxido, peróxido de hidrogênio, radical hidroxila, radical semiquinona e ácido rodizônico. Estudamos a ação da THQ sobre o DNA celular, enfocando seu efeito sobre a replicação semiconservativa. Verificamos que as espécies geradas durante a autooxidação da THQ estão envolvidas no evento da inibição da síntese de DNA promovido por essa quinona. Entre estas, o H_2O_2 tem papel central, através de um mecanismo independente de ferro. Evidenciamos também o envolvimento de radicais hidroxila nesse evento, assim como no mecanismo de inibição da replicação do DNA de células expostas ao H_2O_2 . Aqui, distintamente da THQ, o ferro participa do evento da inibição da replicação, evidenciano a ocorrência da Reação de Fenton como mecanismo de produção dos radicais hidroxila. No caso da THQ estes radicais parecem estar sendo formados via Reação de Fenton Orgânica. A cinética de recuperação da inibição da replicação causada pela THQ indica a presença de lesões no DNA. Detectamos a produção de quebras simples nas fitas do DNA de células expostas à THQ, através da técnica de sedimentação em gradiente de sacarose alcalino. Estas quebras são independentes da presença de H_2O_2 e Fe, sugerindo que os eventos de inibição da replicação e de produção de quebras do DNA não são mediados por um mecanismo único.

2. STUDIES OF TETRAHYDROXYBENZOQUINONE (THQ) CITOTOXIC ACTION AS A OXIDATIVE STRESS MODEL.

This work investigates the THQ citotoxicity mechanisms on V79 cell line. THQ undergoes spontaneous autoxidation under physiological conditions generating superoxide anion radical, hydrogen peroxide, hydroxyl radical and rodizonic acid. THQ has an genotoxic action, inhibiting the DNA semi conservative replication process and inducting the production of DNA single strand breaks. The intermediates of THQ autoxidation are involved on the DNA synthesis inhibition mechanism. Among these, hydrogen peroxide plays a central role, through an iron independent pathway. Hydroxyl radical was evidenciaded as the final oxidant of DNA synthesis inhibition mechanism in cells exposed to THQ and H_2O_2 . In the latter, iron is participating in the mechanism, indicating a Fenton type reaction for the hydroxyl radicals generation. For THQ, these radicals seems to be generated through an Organic Fenton Reaction. The recovery kinetics pattern of DNA synthesis inhibition induced by THQ indicates the presence of DNA lesions. The DNA single strand breaks, detected by DNA sedimentation in alkaline sucrose gradient, are not H_2O_2 and Fe dependent. These results suggest that the two events studied, DNA synthesis inhibition and DNA single strand breaks, are not mediated by a single mechanism.

VII. BIBLIOGRAFIA

- AUST, S.D. ; MOREHOUSE, L.A. & THOMAS, C.E. 1985. Role of Metals in Oxygen Radical Reactions. *J.Free Rad.Biol.Med.* 1:3-25.
- BAEHNER, R.L. ; BOXER, L.A. & INGRAHAM, L.M. 1982. Reduced oxygen byproducts and white blood cells. In: PRYOR, W.A., ed. *Free Radical in Biology*. New York, Academic V.5, p.91-108.
- BEGLEITER, A. 1985. Studies on the Mechanism of Action of Quinone Antitumor Agents. *Biochem.Pharmacol.* 34:2629-2636.
- BELLOMO, G. ; THOR, H. ; LASTBOM, E.L. ; NICOTERA, P. & ORRENIUS, S. 1987. Oxidative Stress-Mechanisms of Cytotoxicity. *Chem.Scr.* 27A:117-120.
- BORS, W. ; SARAN, M. ; LENGFELDER, E. ; MICHEL, C. ; FUCHS, C. & FRENZEL, C. 1978. Detection of oxygen radicals in Biological Reactions. *Photochem.Photobiol.* 28:629-638.
- BRAUN, K. & FRIDOVICH, J. 1981. DNA strand scission by enzymatically generated oxygen radicals. *Arch.Biochem.Biophys.* 206:411-414.
- BRUNMARK, A. & CADENAS, E. 1989. Redox and Addition Chemistry of Quinoid Compounds and its Biological Implications. *Free Rad. Biol.Med* 7: 435-477.
- BURGESS, J. & PRINCE, R.H. 1965. Kinetics of reaction of ligand-substituted Tris-(2,2 bipyridil)iron(II) complexes. *J.Chem.Soc.* V:6061-6066.
- CADENAS, E. ; BOVERIS, A. & CHANCE, B. 1984. Low level chemiluminescence of biological systems. In: PRYOR, W.A., ed. *Free Radicals in Biology*. New York, Academic V.6, p.212-238.

- CADENAS, E. 1989. Biochemistry of Oxygen Toxicity. *Ann. Rev. Biochem.* 58:79-110.
- CANTONI, O. ; SESTILI, P. ; CATTABENI, F. ; BELLOMO, G. ; POU, S. ; COHEN, M. & CERUTTI, P. 1989. Calcium chelator Quin 2 prevents hydrogen peroxide induced DNA breakage and cytotoxicity. *Eur. J. Biochem.* 182:209-212.
- CARRIER, W.L. & SETLOW, R.B. 1971. A paper strip method for essaying gradient fractions containing radioactive molecules. *Anal. Biochem.* 43:427-432.
- CERUTTI, P.A. 1978. Repairable Damage in DNA. In: HANAWALT, P.C. ; FRIEDBERG, E.C. & FOX, C.F., ed. *DNA Repair Mechanisms*. New York, Academic, p.1-14.
- CERUTTI, P.A. 1985. Prooxidant States and Tumor Promotion. *Science* 227:375-381.
- CHESIS, P.L. ; LEVIN, D.E. ; SMITH, M.T. ; ERNSTER, L & AMES, B.N. 1984. Mutagenicity of quinones: Pathway of metabolic activation and detoxification. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:1696-1700.
- COTTON, M.L. & DUNFORD, H.B. 1973. Studies on horseradish peroxidase XI. On the Nature of Compounds I and II as determined from kinetics of the oxidation of ferrocyanide. *Can. J. Chem.* 51:582-587.
- DAVIS, K.J.A. 1987. Protein Damage and Degradation by Oxygen Radicals. I. General Aspects. *J. Biol. Chem.* 262:9895-9901.
- DEMPLE, B. & LINN, S. 1982. 5,6 saturated thymine lesion in DNA: production by light or hydrogen peroxide. *Nucleic Acid Res.* 10:3781-3789.

- DEWEY, D.L. 1960. Effect of oxygen and nitric oxide on the radiosensitivity of human cells in tissue culture. *Nature* 186:780.
- DIMONTE, D. ; ROSS, D. ; BELLOMO, G. ; EKLOW, L. & ORRENIUS, S. 1984. Alterations in Intracellular Thiol Homeostasis during the Metabolism of Menadione by Isolated Rat Hepatocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* 235: 334-342.
- DOCAMPO, R. & VERCESI, A.E. 1989. Characteristics of Ca^{2+} Transport by T.cruzi Mitochondria in situ. *Arch. Biochem. Biophys.* 272: 122-129.
- DOROSHOW, J.H. 1986. Prevention of Doxorubicin - Induced Killing of MCF-7 Human Breast Cancer Cells by Oxygen Radical Scavengers and Iron Chelating Agents. *Biochem. Biophys. Research. Comm.* 135: 330-335.
- EATON, D.R. 1964. Complexing of metal ions with semiquinones. An electron spin resonance study. *Inorg. Chem.* 3:1268-1271.
- FLOYD, R.A & LEWIS, C.A. 1983. Hydroxyl Free Radical Formation from Hydrogen Peroxide by Ferrous Iron-Nucleotide Complexes. *Biochemistry* 22:2645-2649.
- FRIDOVICH, I. 1976. Oxygen Radicals, Hydrogen Peroxide, and Oxygen Toxicity. In: PRYOR, W.A., ed. *Free Radical in Biology*. New York, Academic V.1, p.239-277.
- FRIEDBERG, E.C. 1985. *DNA Repair*. New York, Freeman, p.54-59.
- GERSCHMAN, R. ; GILBERT, D.L. ; NYE, S.W. ; DWYER, P. & FENN, W.O. 1954. Oxygen poisoning and x-irradiation: a mechanism in common. *Science* 119: 623-626.
- HALL, J.D. & MOUNT, D.W. 1981. Mechanisms of DNA Replication and Mutagenesis in Ultraviolet Irradiated Bacteria and Mammalian

Cells. Prog.Nucleic Acid Res.Mol.Biol.25: 53-126.

- HALLIWELL,B. & GUTTERIDGE,J.M. 1984. Oxygen Toxicity,Oxygen radicals, transition metals and disease. Biochem.J. 219:1-4.
- HALLIWELL,B. & GUTTERIDGE,J.M. 1985. Free Radicals in Biology and Medicine. New York, Oxford University Press.346p.
- HALLIWELL,B. & GUTTERIDGE,J.M. 1986. Oxygen Free Radicals and Iron in Relation to Biology and Medicine: Some Problems and Concepts. Arch.Biochem.Biophys.246(2):501-514.
- HOFFMANN,M.E. 1979.Fomação de Peróxido de Hidrogênio por fotoreativação entre compostos fisiológicos e sua ação sobre células de mamíferos em cultura. Tese de Doutorado apresentada ao Dept^o de Bioquímica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo.
- HOFFMANN,M.E. & MENEHINI,R. 1979. Action of Hydrogen Peroxide on Human Fibroblasts in Culture. Photochem.Photobiol. 30:151-155.
- HOFFMANN,M.E. ; MELLO-FILHO,A.C. & MENEHINI,R. 1984 a. Correlation Between Cytotoxic effect of Hydrogen Peroxide and the yield of DNA Strand Breaks in Cells of Different Species. Biochim.Biophys.Acta 781:234-238.
- HOFFMANN,M.E. ; CIAMPI,D.B. & DURAN,N. 1984b. Cytotoxicity and DNA Damage Activities of Tetrahydroxy-1,4 Quinone: Mediation of Hydrogen Peroxide. IV Congresso PAABS, Buenos Aires,Argentina, 4 a 8 novembro.
- HOFFMANN,M.E. ; CIAMPI,D.B. & DURAN,N. 1987. The autooxidation of 2,3,5,6, tetrahydroxy-2,5-cyclohexadiene 1,4 dione under physiological conditions. Experientia 43:217-230.

- HORTON, A.A. & FAIRHURST, S. 1987. Lipid Peroxidation and Mechanisms of Toxicity. *CRC Critical Reviews in Toxicology* 18:27-79.
- HSIE, A.W. ; REGIO, L. ; KATZ, D.S. ; LEE, C.Q. ; WAGNER, M. & SCHENLEY, R.L. 1986. Evidence for reactive oxygen species inducing mutations in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:9616-9620.
- HUTCHINSON, F. 1985. Chemical Changes Induced in DNA by Ionizing Radiation. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 32:115-154.
- HYSLOP, P.A. ; HINSHAW, D.B. ; SCHRAUFSTATTER, I.V. ; SKLAR, L.A. ; SPRAGG, R.G. & COCHRANE, C.G. 1986. Intracellular Calcium Homeostasis During Hydrogen Peroxide Injury to Cultured P388 D1 Cells. *J. Cell Phys.* 129:356-366.
- IMLAY, J.A. & LINN, S. 1988. DNA Damage and Oxygen Radical Toxicity. *Science* 240:1302-1309.
- IMLAY, J.A. ; CHIN, S.M. & LINN, S. 1988. Toxic DNA Damage by Hydrogen Peroxide Through the Fenton Reaction in vivo and in vitro. *Science* 240 : 640-642.
- JAMIESON, D. ; CHANCE, B. ; CADENAS, E. & BOVERIS, A. 1986. The Regulation of Free Radical Production to Hyperoxia. *Ann. Rev. Physiol.* 48 :703-719.
- JAMIESON, D. 1989. Oxygen Toxicity and Reactive Oxygen Metabolites in Mammals. *Free Rad. Biol. Med.* 7: 87-108.
- LESKO, S.A. ; LORENTZEN, R.J. & TS O, P. 1980. Role of superoxide in DNA strand scission. *Biochemistry* 19: 3023-3028.
- LEWIS, J.G. ; STEWART, W. & ADAMS, P.O. 1988. Role of Oxygen Radicals in Induction of DNA Damage by Metabolites of Benzene.

Canc.Research 48:4762-4765.

- LINDAHL, T. & NYBERG, B. 1972. Rate of Depurination of Native Deoxyribonucleic Acid. Biochemistry 11: 3610-3618.
- MARAL, J. ; PUNGET, K. & MICHELSON, A.M. 1977. Comparative study of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase levels in erythrocytes of different animals. Biochem.Biophys. Res.Comm. 77: 1525-1535.
- McCORD, J.M. & FRIDOVICH. 1969. Superoxide Dismutase. An Enzymic Function for Erythrocyte Hemocuprein (Hemocuprein). J.Biol.Chem. 244: 6049-6055.
- MELLO-FILHO, A.C. & MENECHINI, R. 1984. In vivo formation of single strand breaks in DNA by Hydrogen Peroxide is mediated by the Harber Weiss reaction. Blochim.Biophys.Acta 781:56-63.
- MELLO-FILHO, A.C. & MENECHINI, R. 1985. Protection of mammalian cells by o-phenantroline from lethal and DNA damaging effects produced by active oxygen species. Blochim.Biophys.Acta 847: 82-89.
- MELLO-FILHO, A.C. 1988. Efeito de Espécies Reativas de Oxigênio sobre células de Mamíferos em Cultura. Tese de Doutorado apresentada ao Dept^o de Bioquímica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo.
- MENECHINI, R. & HOFFMANN, M.E. 1980. The damaging action of hydrogen peroxide on DNA of Human fibroblasts is mediated by a non dialyzable compound. Blochim.Biophys.Acta 608: 167-173.
- MENECHINI, R. 1988. Genotoxicity of active oxygen species in mammalian cells. Mut.Research 195: 215-230.

- MICHELSON, A.M. & DUROSAY, P. 1977. Hemolysis of erythrocytes by activated oxygen species. *Photochem. Photobiol.* 25:55-63
- MOORE, G.A. ; O BRIEN, J.P. & ORRENIUS, S. 1986. Menadione (2 methyl -1,4-naphthaquinone) induced Ca^{2+} release by NAD(P)H oxidation. *Xenobiotica* 16:873-882.
- MOORE, G.A. ; ROSSI, L. ; NICOTERA, P. ; ORRENIUS, S. & O BRIEN, P. 1987. Quinone Toxicity in Hepatocytes: Studies on Mitochondrial Ca^{2+} Release Induced by Benzoquinone Derivatives. *Arch. Biochem. Biophys.* 259:283-295.
- NICOTERA, P. ; HARTZELL, P. ; BALDI, G. ; SVENSSON, S.A. & BELLOMO, G. 1986. Cystamine induces toxicity in hepatocytes through the elevation of cytosolic Ca^{2+} and the stimulation of lysosomal proteolytic system. *J. Biol. Chem.* 261: 14628-14635.
- NOHL, H. ; JORDAN, W. & YOUNGMAN, R.J. 1986. Quinones in Biology: Function in Electron Transfer and Oxygen Activation. *Adv. Free Rad. Biol. Med.* 2 (1):211-279.
- NOHL, H. & JORDAN, W. 1987. The Involvement of Biological Quinones in the Formation of Hydroxyl Radicals via the Harber Weiss Reaction. *Bioorg. Chem.* 15: 374-382.
- NUNEZ, M.T. ; COLE, E.S. & GLASS, J. 1983. The reticulocyte plasma membrane pathway of iron uptake as determined by the mechanism of , -dipyridyl inhibition . *J. Biol. Chem.* 258(2):1146-1151.
- ORRENIUS, S. & MOLDEUS, P. 1984. The multiple roles of glutathione in drug metabolism. *Trends Pharmacol. Sci.* 5:432-635.
- ORRENIUS, S. ; McCONKEY, D.J. & NICOTERA, P. 1989. Role of calcium in Oxidative Cell Injury. In: FISKUM, G., ed. *Cell Calcium Me-*

- tabolism. Physiology, Biochemistry, Pharmacology, and Clinical Implications. New York, Plenum, p.451-561.
- PAINTER, R.B. 1977. Rapid test to detect agents that damage human DNA. *Nature (London)* 265: 650-651.
 - PAINTER, R.B. & YOUNG, B.R. 1980. Radiosensitivity in ataxia telangiectasia: a new explanation. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 77: 7315-7317.
 - PAINTER, R.B. & HOWARD, R. 1982. The HeLa DNA synthesis inhibition test as a rapid screen for mutagenic carcinogens. *Mut. Research* 92: 427-437.
 - PETHIG, R. ; GASCOYNE, P.R.C. ; MCLAYGHLIN, J.A. & SZENT-GYORGYI, A. 1983. Ascorbate-quinone interactions: Electrochemical, free radical, and cytotoxic properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 129-132.
 - POWIS, G. 1989. Free Radical Formation by Antitumor Quinones. *Free Rad. Biol. Med.* 6: 63-101.
 - PRYOR, W.A. 1986. Oxy-Radicals and Related Species: Their Formation, Lifetimes, and Reactions. *Ann. Rev. Physiol.* 48: 657-667.
 - PRYOR, W.A. 1988. Why is the Hydroxyl Radical the only Radical that commonly adds to DNA? Hypothesis: It has a rare combination of High Electrophilicity, High Thermochemical Reactivity and a Mode of Production That Can Occur Near DNA. *Free Rad. Biol. Med.* 4: 219-223.
 - ROSSI, L. ; MOORE, G.A. ; ORRENIUS, S. & O BRIEN, P.J. 1986. Quinone Toxicity without Oxidative Stress. *Arch. Biochem. Biophys.* 251: 25-35.

- SAMUNI, A. ; ARONOVITCH, J. ; GODINGER, P. ; CHEVION, M. & CZAPSKI, G. 1983. On the cytotoxicity of vitamin C and metal ions. A site specific Fenton mechanism. *Eur.J.Biochem.* 137:119-124.
- SANDY, M.S. ; MOLDEUS, P. ; ROSS, D. & SMITH, M.T. 1987. Cytotoxicity of the Redox Cycling Compound Diquat in Isolated Hepatocytes: Involvement of Hydrogen Peroxide and Transition Metals. *Arch.Biochem.Biophys.* 259 :29-37.
- SAKURAI, K. & MIURA, T. 1989. Generation of Free Radicals by Alloxan in the Presence of Bovine Serum Albumin: A Role of Protein Sulfhydryl Groups in Alloxan Cytotoxicity. *Biochemistry International* 19:405-412.
- SCHULTE-FROHLINDE, D. & VON SONNTAG, C. 1985. Radiolysis of DNA and Model Systems in the Presence of Oxygen. In: SIES, H., ed. *Oxidative Stress*. London, Academic. p.11-40.
- SERIS, J-L. 1960. Sur quelques propriétés biochimiques de l'acide rhodizonique. *Compt.Rend.* 251: 158-160.
- SERIS, J-L. & BRU, A. 1962. Sur le mécanisme de la protection des cellules de levure contre l'action des rayons X par la tétrahydroxyquinone et les composés voisins. *Compt.Rend.* 255: 1027-1029.
- SHEETS, R.F. ; HAMILTON, H.E. & DEGOWIN, E.L. 1956. Hemolysis of Human Erythrocytes by a Sulfhydryl Inhibitor, p-chloromercuribenzoic acid. *Proc.Societ.Exp.Biol.Med.* 91:423-427.
- SHIRES, T.K. 1982. Iron mediated DNA damage and synthesis in isolated rat liver nuclei. *Biochem.J.* 205:321-329.
- SIES, H., ed. 1985. *Oxidative Stress*. London, Academic. 507p.

- SMITH, M.T. ; EVANS, C.G. ; THOR, H. & ORRENIUS, S. 1985. Quinone Induced Oxidative Injury to Cells and Tissues. In: SIES, H., ed. Oxidative Stress. London, Academic. p.91-113.
- STRAUSS, B. & HILL, T. 1970. The Intermediate in Degradation of DNA Alkylated with a Monofunctional Alkylating Agent. *Biochim. Biophys. Acta* 213: 14-25.
- SUTTON, H.C. & WINTERBOURN, C.C. 1989. On the Participation of Higher Oxidation States of Iron and Copper in Fenton Reactions. *Free Rad. Biol. Med.* 6 :53-60.
- TAKAHASHI, H. ; KOTAKI, A. & YAGI, K. 1965. Tetrahydroxybenzoquinone and its related substances. *Seikagaku* 37: 413-418.
- TAPPEL, A.L. 1973. Lipid peroxidation damage to cell components. *Federation Proceedings* 32:1870-1874.
- TOLEDO, S.M. ; HAUN, M. ; BECHARA, E.J.H. & DURAN, N. 1980. Peroxidase and Hydrogen Peroxide Detection by a Bioenergized Method *Anal. Biochem.* 105: 36-38.
- VACA, C.E. ; WILHELM, J. & HARMS-RINGDAHL, M. 1988. Interaction of lipid peroxidation products with DNA. A review. *Mut. Research* 195:137-149.
- VILE, G.F. ; WINTERBOURN, C.C. & SUTTON, H.C. 1987. Radical Driven Fenton Reactions: Studies with Paraquat, Adriamycin, and Anthraquinone 6-Sulfonate and Citrate, ATP, ADP, and Pyrophosphate Iron Chelates. *Arch. Biochem. Biophys.* 259:616-626.
- VIDELA, L.A. & FERNANDEZ, V. 1988. Biochemical aspects of cellular oxidative stress. *Arch. Biol. Med. Exp.* 21:85-92.
- WINTERBOURN, C.C. 1981. Production of Hydroxyl Radicals From Paraquat Radicals and H_2O_2 . *FEBS Lett.* 128: 339-342.

- WINTERBOURN, C.C. & SUTTON, H.C. 1984. Hydroxyl Radical Production from Hydrogen Peroxide and Enzymatically Generated Paraquat Radicals: Catalytic Requirements and Oxygen Dependence. Arch. Biochem. Biophys. 235: 116-126.
- ZIMMERMAN, R. & CERUTTI, P. 1984. Active Oxygen acts as promoter of transformation in mouse embryo C3H/10T 1/2 /C18 fibroblasts. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 81: 2085-2087.
- YOUNGMAN, R.J. & ELSTNER, E.F. 1981. Oxygen Species in Paraquat Toxicity: The crypto-OH Radical. FEBS Lett. 129:265-268.