

80487

**Universidade Estadual de Campinas
Departamento de Genética**

**BC/22071
IB/80487**

**AÇÃO GENOTÓXICA DA
ESTREPTOZOTOCINA EM
CULTURAS CELULARES DE
MAMÍFEROS**

**Maria Sílvia Capucci
Tese de Doutorado
1994**

T/UNICAMP
C175_a



AÇÃO GENOTÓXICA DA ESTREPTOZOTOCINA EM CULTURAS CELULARES DE MAMÍFEROS

Trabalho apresentado ao Departamento de Genética do
Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas,
para obtenção do grau de Doutora em Genética, pela aluna

Maria Sílvia Capucci

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(s) candidato a)
Maria Sílvia Capucci
e aprovada pela Comissão Julgadora.

M. Hoffmann
08/04/94

**Orientação: Professora Dra. Maria Edwiges Hoffmann
Professor A.T. Natarajan**

9407812



UNDAE	IB
PL. P. A. C. A.	
TIVNICAMP	
C/75a	
V.	
TOMPO B. C. /	22071
PROG.	286/94
C	<input type="checkbox"/>
	<input checked="" type="checkbox"/>
PRECO	R\$ 11,00
DATA	28/07/94
N.º C.F.D.	

CM-00059926-1

Algumas pessoas prestaram valiosa ajuda na realização deste trabalho e a elas gostaria de expressar meu agradecimento. Aos meus pais, que me ensinaram o valor do trabalho e sempre me estimularam a prosseguir.

Esta tese deve sua existência à Professora Dra. Maria Edwiges Hoffmann, cujo estímulo, bons conselhos e ajuda financeira me encorajaram a realizá-la no exterior.

Estou altamente agradecida ao Professor A.T. Natarajan por todas as facilidades de que desfrutei em seu laboratório; ao Professor Albert A. van Zeeland, por sua amabilidade e valiosas discussões; à Dra. M.A. Zdzienicka pela gentileza de ceder-me suas linhagens celulares mutantes. A colaboração, experiência e estímulo de Anton de Groot foram decisivas para levar a bom termo os experimentos de dosimetria molecular.

A todos os colegas que, durante dois anos fizeram parte de nosso grupo, quero agradecer pelo companheirismo e simpatia, assim como aos amigos Carlos A.R. de Freitas e Marco Lúcio Bittencourt, pela inestimável ajuda nos trabalhos de impressão.

Este trabalho foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e os experimentos foram realizados no Departamento de Radiação e Mutagênese Química da Faculdade de Medicina da Universidade Estadual de Leiden (Holanda), sob a orientação do Professor A.T.Natarajan.

**"Época triste é a nossa, em que é mais difícil
quebrar um preconceito do que um átomo".**

Einstein

Ao Herbert

ÍNDICE

I. Introdução Geral	01
1. Introdução	02
2. Toxicologia Genética	04
3. Interação de agentes alquilantes com a molécula de DNA	11
4. Mecanismos de reparo de lesões induzidas por agentes alquilantes	15
5. Resistência celular a agentes alquilantes	18
6. Estreptozotocina	20
II. Objetivos	23
III. Materiais e Métodos	26
1. Células: cultivo e linhagens	27
2. Compostos Químicos	28
3. Tratamento das células	29
4. Medidas de sobrevivência celular	30
5. Medidas de Indução de mutações gênicas	30
6. Medidas de Indução de aberrações cromossômicas	32
7. Medidas de Indução de trocas entre cromátides irmãs	33
8. Medidas de inibição do ciclo celular	37
9. Medidas da taxa de síntese de DNA	37

10. Isolamento e hidrólise de DNA para determinação de adutos	38
11. Separação e detecção das bases metiladas do DNA	40
12. Compostos químicos e reagentes	45
13. Soluções e Meios	46
IV. Resultados	51
<i>I. Determinação dos efeitos genotóxicos da estreptozotocina.</i>	52
1. Sobrevivência de células CHO-9, V79 e EM-C11 tratadas com STZ	53
2. Indução de aberrações cromossômicas (AC) em células CHO-9, EM-C11 e V79 tratadas com STZ	55
3. Indução de trocas entre cromátides irmãs (TCIs)	58
4. Indução de mutações gênicas	63
<i>II. Análise da resistência de células V79 à alquilação de DNA.</i>	65
1. Sobrevivência de células V79 e CHO-9 tratadas com N-metil-N-nitrosouréia (MNU)	66
2. Sobrevivência de células V79 e CHO-9 tratadas com N-etilnitrosouréia (ENU)	66
3. Efeitos genotóxicos da MNU	68
<i>a) Indução de aberrações cromossômicas pela MNU</i>	68
<i>b) Indução de trocas entre cromátides irmãs</i>	70

<i>III. Detecção de bases metiladas no DNA.</i>	75
1. Indução de N7-MetGua e O ⁶ -MetGua no DNA de células CHO-9 e V79	75
2. Reparo das lesões N7-MetGua e O ⁶ -MetGua	78
<i>IV. Inibição da síntese de DNA e do progresso do ciclo celular</i>	80
1. Inibição da replicação de DNA	80
2. Indução de atraso na progressão do ciclo celular	81
V. Discussão	85
VI. Resumo	97
VII. Summary	100
VIII. Referências Bibliográficas	103

ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS

FIGURA 1. Diferentes tipos de alterações cromossômicas induzidas por tratamentos químicos ou físicos	07
FIGURA 2. Alquilação da molécula de DNA	13
FIGURA 3. Estrutura química da Estreptozotocina	22
FIGURA 4. Esquema explicativo da técnica de marcação de cromátides com 5-bromodesoxiuridina	35
FIGURA 5. Curvas de sobrevivência de células V79, CHO-9 e EM-C11 tratadas com STZ	54
FIGURA 6. Indução de aberrações cromossômicas em células CHO-9, V79 e EM-C11 tratadas com STZ	57
FIGURA 7. Indução de TCIs em células EM-C11 como uma função da concentração de 5-bromodesoxiuridina	59
FIGURA 8. Indução de TCIs em células CHO-9, V79 e EM-C11 tratadas com STZ	62
FIGURA 9. Indução de mutações em células tratadas com STZ	64
FIGURA 10. Curvas de sobrevivência de células V79 e CHO-9 tratadas com MNU	67
FIGURA 11 Curvas de sobrevivência de células V79 e CHO-9 tratadas com ENU	69

FIGURA 12. Indução de aberrações cromossômicas em células CHO-9 e V79 tratadas com MNU	72
FIGURA 13. Indução de TCIs em células V79 e CHO-9 tratadas com MNU	74
FIGURA 14. Indução de N7-MetGua e O ⁶ -MetGua no DNA de células CHO-9 e V79 tratadas com STZ	77
FIGURA 15 Taxa de síntese de DNA em células CHO-9 e V79 tratadas com STZ	82
FIGURA 16 Progressão do ciclo celular em células CHO-9 e V79 tratadas com STZ	84
TABELA 1. Indução de aberrações cromossômicas em células CHO-9, V79 e EM-C11 tratadas com STZ	56
TABELA 2. Indução de TCIs em células CHO-9, V79 e EM-C11 tratadas com STZ	61
TABELA 3. Indução de aberrações cromossômicas em células CHO-9 e V79 expostas à MNU	71
TABELA 4. Indução de TCIs em células CHO-9 e V79 tratadas com MNU	73
TABELA 5. Indução de N7-MetGua e O ⁶ -MetGua no DNA de células CHO-9 e V79 expostas à STZ	76
TABELA 6. Reparo das lesões O ⁶ -MetGua e N7-MetGua em células CHO-9 e V79 expostas à STZ	79

I. Introdução Geral

1. Introdução

Grande número de agentes químicos e físicos, por possuírem a capacidade de reagir com a molécula de DNA, constituem uma ameaça em potencial para a integridade da informação genética das células. Esses agentes são conhecidos pela denominação geral de *genotoxinas* e constituem o alvo de identificação e estudo pela *toxicologia genética*.

Uma correlação positiva foi observada entre o potencial genotóxico e a atividade carcinogênica de agentes químicos e físicos diversos (Sukumar e col., 1983; Harris, 1991; Montesano e col., 1992). Estes agentes são os que se denominam *carcinogênicos genotóxicos*.

Nos últimos anos, as pesquisas em toxicologia genética têm dado grande ênfase na possível atividade cancerígena e no potencial mutagênico dos agentes de ação genotóxica (Ashby e Paton, 1993). Este fato torna-se compreensível quando se constata que inúmeros compostos tóxicos estão sendo constantemente introduzidos no meio ambiente, além daqueles de ocorrência natural, que são reconhecidamente mutagênicos e/ou carcinogênicos. É de extrema importância, portanto, que os compostos aos quais o ser humano está exposto, quer seja intencionalmente (compostos terapêuticos), no curso da vida diária (produtos domésticos, cosméticos) ou inadvertidamente (agrotóxicos), sejam testados

quanto ao seu potencial em induzir danos genéticos e o desenvolvimento de tumores.

Dentre os inúmeros compostos genotóxicos, os chamados *agentes alquilantes* constituem um grupo de grande interesse para cancerologistas devido ao seu duplo papel no processo de carcinogênese: de um lado, como carcinogênicos ambientais e, de outro, como quimioterápicos amplamente utilizados no tratamento de tumores (Kelsen e col., 1991; Pegg, 1991; Michejda, 1991; Montesano e col., 1992).

O presente trabalho focaliza sua atenção no estudo de um agente alquilante de ocorrência natural, a *estreptozotocina (STZ)* (Vavra e col., 1959), cuja capacidade de alterar a molécula de DNA tem sido amplamente documentada (Tjalve, 1983; Le Doux e col., 1986; Wilson e col., 1988).

Resultados anteriores obtidos em nosso laboratório evidenciaram a ação tóxica da estreptozotocina em culturas celulares humanas e de roedores (Eizirick e col., 1986; Capucci, 1990). Em continuidade aos estudos anteriormente desenvolvidos, vários experimentos foram aqui realizados com o objetivo de proporcionar um maior conhecimento dos mecanismos de ação genotóxica da estreptozotocina em células de mamíferos em cultura. Para isso, desenvolvemos estudos a níveis citogenéticos e moleculares, visando contribuir fundamentalmente para a compreensão dos processos através dos quais a estreptozotocina exerce seus efeitos tóxicos.

2. Toxicologia Genética

A atividade carcinogênica de um dado composto é comumente determinada através da sua habilidade em induzir tumores em animais de laboratório; estes estudos, entretanto, requerem longo tempo, além de recursos e técnicas de custo elevado. Estes fatos, aliados ao problema ético de consumo massivo de animais experimentais, levaram à procura de vias alternativas para a detecção de compostos potencialmente carcinogênicos. Assim, diferentes metodologias foram desenvolvidas, utilizando sistemas biológicos *in vitro* em substituição ao uso de animais. Pelo fato de exigirem um período de tempo muito mais reduzido que nos estudos clássicos anteriormente desenvolvidos, estas metodologias são genericamente denominadas *ensaios de curta duração*.

Atualmente, existem inúmeros ensaios, tanto procarióticos como eucarióticos, que permitem a detecção do potencial genotóxico de um dado composto. A principal desvantagem dos ensaios em organismos procarióticos radica, obviamente, no distanciamento filogenético com a espécie humana e nos problemas de extrapolação que tal distanciamento supõe (Venitt e col., 1986; Hofnung e Quillardet, 1986). Os ensaios biológicos desenvolvidos por citogeneticistas em culturas celulares de mamíferos, entretanto, minimizaram os problemas de distanciamento filogenético. Estes ensaios envolvem, principalmente, a análise da capacidade de agentes físicos e químicos de induzir aberrações cromossômicas

(AC), trocas entre cromátides irmãs (TCIs), mutações gênicas e morte celular. Essas técnicas têm sido recomendadas pela comunidade científica devido a sua alta sensibilidade e reprodutibilidade, como também pela economia de tempo e de meios técnicos. No presente trabalho utilizamos essas técnicas para investigar a genotoxicidade da STZ.

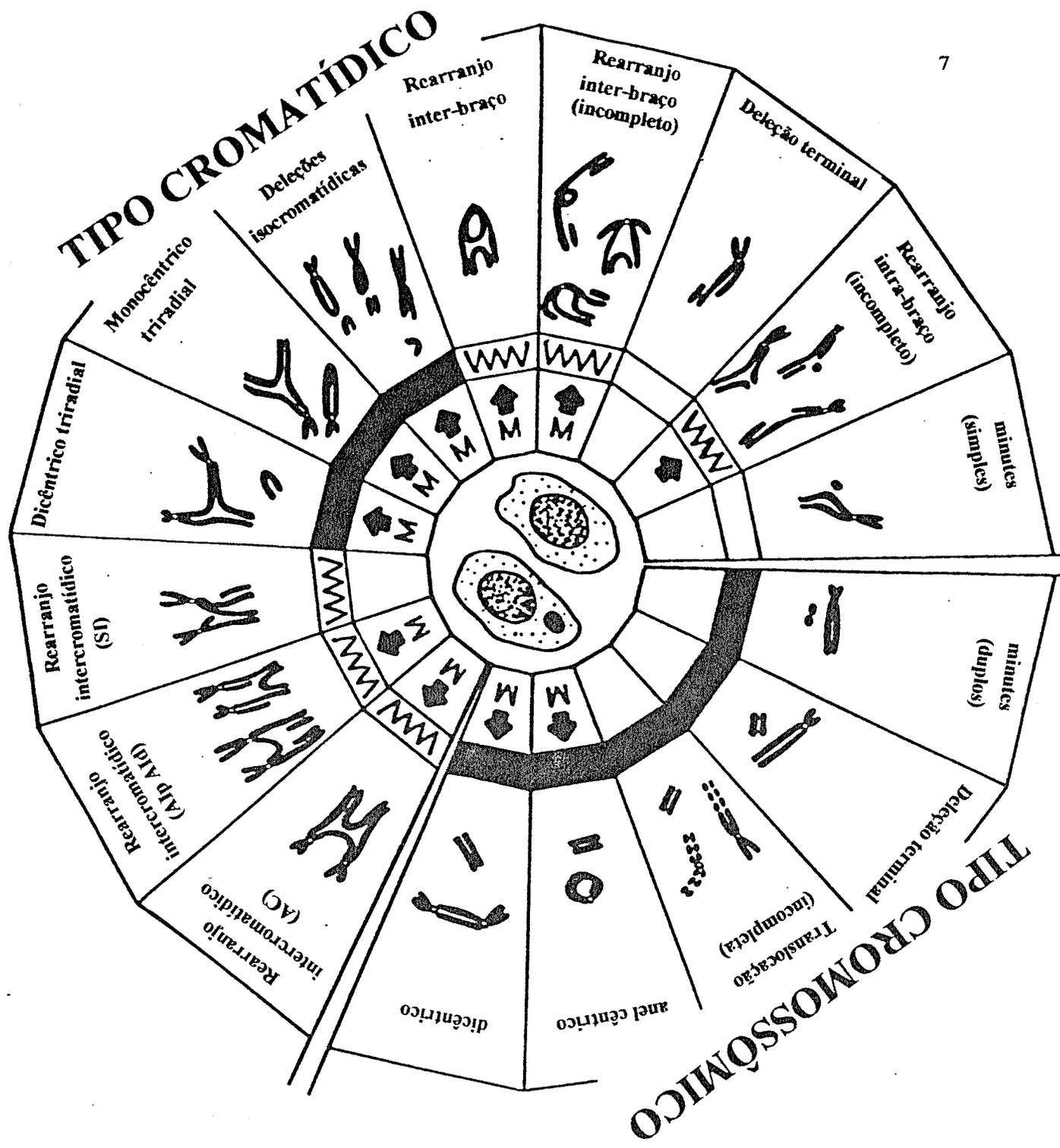
Os testes citogenéticos *in vitro* têm como finalidade demonstrar a indução de danos cromossômicos, visíveis ao microscópio óptico, em culturas celulares de mamíferos. Esses danos cromossômicos constituem as chamadas *aberrações* e sua detecção geralmente envolve estudos no estágio metafásico do ciclo celular (Evans e O'Riordan, 1975; Savage, 1976), onde os cromossomos, por apresentarem-se condensados, são facilmente observados e analisados. Testes de aberrações cromossômicas *in vitro* têm revelado que uma alta porcentagem dos compostos químicos analisados induz AC em culturas primárias ou linhagens celulares estabelecidas (Ishidate e col., 1988; Anderson e col., 1990).

A origem das aberrações é, ainda hoje, objeto de estudo na área da citogenética (Yates e Morgan, 1993), embora alguns modelos propostos sejam considerados clássicos (Sax, 1940; Revell, 1959). Simplificadamente, as aberrações ocorrem devido à presença de lesões na molécula de DNA, e vários trabalhos têm demonstrado que as quebras duplas na cadeia de DNA constituem as lesões responsáveis pela formação de aberrações (Obe e col., 1982; Natarajan e Obe, 1984). Quando quebras duplas são introduzidas na

molécula de DNA, a célula pode reparar a quebra corretamente, bem como não realizar esse processo de reparo, ou ainda fazê-lo de maneira incorreta. A ausência ou erro no reparo das quebras de DNA pode resultar na indução de aberrações cromossômicas e morte celular. Assim, postulou-se que são as quebras duplas as lesões que levam diretamente à formação de aberrações; qualquer outra lesão primária requer sua transformação para quebra-dupla, pelos processos de replicação e/ou reparo da molécula de DNA.

As diferentes formas de aberrações estruturais são classificadas de acordo com o número de cromátides envolvidas em uma aberração. Assim, classificam-se, principalmente, como *aberrações cromossômicas* as aberrações onde ambas as cromátides de um mesmo cromossomo estão envolvidas e cujas alterações localizam-se num mesmo ponto e, como *aberrações cromatídicas*, as que envolvem uma única cromátide. (Savage, 1976) (*Figura 1*).

Os tipos e frequências de aberrações induzidas dependem do tipo de composto utilizado e do estágio do ciclo celular no momento do tratamento. Agentes alquilantes, por exemplo, induzem principalmente aberrações do tipo cromatídicas e a intervenção de uma fase de síntese no ciclo celular é fundamental no aparecimento destas aberrações (Schwartz, 1989). Acredita-se que as aberrações induzidas por alquilação resultam de erros no processo de replicação da molécula de DNA nos sítios alquilados. As radiações ionizantes, por outro lado, induzem aberrações em todos os estágios do ciclo celular.



-  Sempre duas células filhas afetadas
-  Uma ou ambas células filhas afetadas
- M** possíveis problemas mecânicos durante a anáfase

FIGURA 1. Diferentes tipos de alterações cromossômicas induzidas por tratamentos químicos ou físicos (Savage, 1976).

Estas observações levaram à classificação operacional dos agentes indutores de aberrações em *S-independentes* e *S-dependentes*, o que é um reflexo intrínscico dos diferentes tipos de lesões induzidas, assim como do tipo de sistema de reparo de DNA envolvido. Os aspectos básicos relativos às aberrações cromossômicas estão detalhados em uma recente compilação de dados publicados por Obe e Natarajan, (1990).

A detecção de trocas entre cromátides irmãs, primeiramente demonstradas por Taylor (1958) através de técnicas autorradiográficas, tornou-se também uma das metodologias mais sensíveis na detecção de carcinogênicos genotóxicos (Latt e col., 1981; Wolff, 1982; Anderson e col., 1990).

Como o próprio nome indica, uma TCI representa uma troca recíproca de segmentos de cromátides pertencentes a um mesmo cromossomo. Os mecanismos de formação de TCIs não foram todavia elucidados, embora alguns modelos pressuponham a participação fundamental do processo de replicação de DNA na origem de trocas cromatídicas (Painter, 1980; Wolff, 1982). Basicamente, esses modelos apoiam-se na idéia de que quebras duplas de DNA são geradas nas junções entre replicons, completamente e parcialmente duplicados. Durante o processo de reparo das quebras duplas, TCIs podem ser iniciadas quando as cadeias filhas de um replicon duplicado recombinam com as cadeias parentais de um replicon parcialmente duplicado. Quando este último finaliza o processo de replicação, as TCIs se completariam (Painter,

1980).

Várias técnicas permitem a discriminação entre cromátides-irmãs e, conseqüentemente, a visualização de trocas entre as mesmas. A princípio, permite-se que as células incorporem análogos de timidina, como *5-bromodesoxiuridina (BrdU)*, na molécula de DNA, durante dois ciclos celulares, o que resulta em cromossomos com uma cromátide substituída unifilarmente e outra bifilarmente. Através de procedimentos apropriados, esta diferença química é finalmente expressa como uma afinidade diferencial por corantes específicos.

Os ensaios citogenéticos aqui descritos constituem uma medida indireta do potencial mutagênico de um dado composto. Medidas diretas de mutações pontuais em diferentes loci gênicos têm sido realizadas em diversas linhagens celulares de mamíferos, com a finalidade de correlacionar qualitativamente os compostos *mutagênicos* e *carcinogênicos*. Várias metodologias são hoje utilizadas na detecção de mutações gênicas (Cotton, 1993) e um dos ensaios mais utilizados consiste na análise de mutações induzidas em um *gene alvo*, geralmente de fácil seleção em meios de cultura apropriados.

Um problema associado com a seleção de mutantes em células de mamíferos é a presença de duas cópias de cada gene em células diplóides normais. Em muitos casos, o produto do gene mutante atua recessivamente, isto é, o produto gênico adequado é transcrito a partir do gene normal, para suprir as necessidades

celulares. Neste caso, mutações em ambos os genes de uma célula diplóide (um evento muito raro) seriam necessárias para se detectar o fenótipo mutante. Portanto, os estudos de indução de mutações em células de mamíferos são realizados no estado hemizigótico, utilizando-se genes presentes no cromossomo sexual *X* ou genes autossômicos que foram encontrados ou deliberadamente selecionados como hemizigóticos. Um exemplo de um gene localizado no cromossomo *X* e que consiste na base do sistema de seleção de mutações, é o gene que codifica para a enzima *hipoxantina-guanina-fosforibosiltransferase* (HPRT) (Albertini e Demars, 1973; van Zeeland e Simons, 1976). A enzima HPRT atua na via de salvamento das purinas, catalisando a conversão de guanina e hipoxantina ao nucleosídeo-monofosfato correspondente. Essa enzima não é essencial para a sobrevivência das células em cultura, uma vez que estas bases podem ser sintetizadas *de novo*.

Nas células que contêm HPRT, análogos tóxicos de purinas, como 6-tioguanina ou 8-azaguanina, são também convertidos a nucleosídeos e incorporados no DNA, e este fato constitui a base do processo de seleção de mutantes. Assim, células selvagens são mortas pela incorporação dos análogos tóxicos, enquanto as células mutantes, com uma enzima não funcional, alterada ou ausente, são capazes de sobreviver no meio contendo os agentes seletivos (Thaker, 1985, 1986). As purinas são continuamente produzidas nestas células via síntese *de novo*.

Alguns sistemas de mutações utilizam produtos gênicos

mutantes com ação semi-dominante e, nestes casos, mutação em somente um dos dois genes presentes em uma célula diplóide é necessária para a detecção do fenótipo mutante. Por exemplo, mutação do fenótipo semi-dominante de resistência à ouabaína, envolve uma enzima essencial, a *ATPase Na⁺/K⁺-dependente* (Baker e col., 1974). O composto ouabaína induz a morte celular ligando-se a esta enzima e causando distúrbios no fluxo de íons; entretanto, mutantes raros podem ser encontrados, nos quais a enzima perde sua capacidade de ligar-se à ouabaína, mantendo, porém, suas atividades normais de ATPase. A taxa de mutantes detectados por resistência à ouabaína é mais restrita quando comparada às de enzimas não essenciais, como HPRT, pela possibilidade de ocorrência de grandes alterações mutagênicas, como deleções, no gene codificador da enzima ATPase, resultando na perda de sua função essencial e na morte das células mutantes. Assim, as mutações ouabaína estão intrinsecamente relacionadas a *mutações pontuais*, onde a atividade de ATPase permanece funcional (Baker, 1979; Thaker, 1986).

3. Interação de agentes alquilantes com a molécula de DNA

Os agentes alquilantes constituem um grupo muito estudado de compostos químicos com reconhecida atividade

mutagênica e carcinogênica (Michejda, 1991; Pegg, 1991; Montesano e col., 1992). Estes compostos induzem danos de grande importância sob o ponto de vista genético, tais como aberrações cromossômicas, trocas entre cromátides irmãs, mutações gênicas e morte celular (Natarajan e col., 1984). Agentes alquilantes são compostos eletrofilicos que reagem com diversos centros nucleofílicos na molécula de DNA (Van Zeeland, 1988; Guttenplan, 1990; Beranek, 1990). A alquilação dos átomos de oxigênio das bases de DNA origina resíduos diversos, como a O⁶-alquilguanina (O⁶AlqG), a O²-alquiltimina (O²AlqT), a O⁴-alquiltimina (O⁴AlqT) e a O²-alquilcitosina (O²AlqC); a alquilação dos átomos de nitrogênio forma N³-alquilguanina (N³AlqG), N³-alquiladenina (N³AlqA), N⁷-alquiladenina (N⁷-alqA), N⁷-alquilguanina (N⁷AlqG) e N³-alquilcitosina (N³AlqC) (*Figura 2*). A alquilação de grupos fosfato origina os alquilfosfotriesteres.

Agentes alquilantes distintos formam diferentes proporções destas bases alquiladas e, assim, dependendo do mecanismo de ação, a eficiência de indução de efeitos biológicos diversos pode variar de um agente alquilante para outro. Por exemplo, as lesões que afetam os átomos de nitrogênio, como as N³-alquilpurinas, por bloquearem o processo de replicação, estão relacionadas com a morte celular (Evensen e Seeberg, 1982; Boiteux e col., 1984; Costa de Oliveira e col., 1986), enquanto que aquelas que se localizam nos átomos de oxigênio são fundamentalmente mutagênicas, uma vez que induzem pareamentos errôneos (Loveless,

1969; Swann, 1990). A O⁶-metilguanina (O⁶-MetGua) forma pareamentos preferenciais com a base timina, originando transições GC→AT (Loveless, 1969; Richardson e col., 1987). As comparações do potencial carcinogênico de diferentes agentes alquilantes com a eficiência de produção de O⁶-MetGua no DNA mostram que essa lesão está diretamente relacionada aos processos de mutagênese e carcinogênese em células de mamíferos (Singer, 1986; Saffhill e col., 1985; Swan, 1990). Além de ser uma lesão mutagênica, a O⁶-MetGua é considerada uma lesão citotóxica, uma vez que células incapazes de remover esse aduto apresentam-se hipersensíveis aos efeitos letais de agentes alquilantes (Day e col., 1980; Brent e col., 1988; Fram e Robichaud, 1990). A lesão N7AlqG é induzida majoritariamente após exposição das células a agentes alquilantes e persiste durante muito tempo no DNA celular, uma vez que é reparada enzimaticamente com baixa eficiência (McCarthy e col., 1984).

A presença de N7AlqG não interfere no processo de replicação de DNA e, portanto, parece ser uma lesão não letal para as células (Park e Ames, 1988). Devido a estas características, o rendimento dessa lesão reflete o grau de alquilação do DNA. Embora seja um aduto bastante estável, a N7AlqG é mais instável que a base parental guanina. Esta instabilidade resulta da ruptura do anel de imidazol, formando resíduos formamidopirimidina (*Fapy*), cuja liberação dá origem a sítios apurínicos (Boiteux e col., 1987). Existem várias observações indicativas de que os *Fapy* poderiam

exercer um papel biológico, conduzindo a processos de mutagênese e/ou morte celular (Boiteux e col., 1987). Várias revisões sobre a ação de agentes alquilantes e seus efeitos biológicos foram recentemente publicadas (Beranek, 1990; Michejda, 1991; Pegg, 1991; Samson, 1992).

4. Mecanismos de reparo de lesões induzidas por agentes alquilantes

Para superar os efeitos deletérios induzidos pela presença de lesões na molécula de DNA o processo evolutivo conferiu às células sistemas capazes de lidar com essas lesões: são os chamados *sistemas de reparo de DNA*.

Os danos introduzidos na molécula de DNA pelos agentes alquilantes podem ser eliminados por diferentes sistemas de reparo, que incluem atividades de enzimas específicas, as *alquiltransferases* e *glicosilases*. Uma completa revisão sobre a atividade destes dois tipos de enzimas foi recentemente publicada (Samson, 1992).

A atividade de alquiltransferase (ATase) foi observada pela primeira vez em bactérias *E.coli*. crescidas em meio de cultura contendo baixas doses de agentes metilantes; nessa condição, as bactérias desenvolviam uma resposta adaptativa, adquirindo uma grande resistência aos efeitos tóxicos de agentes alquilantes (Samson

e Cairns, 1977). A enzima induzida nesse fenômeno de adaptação é uma metiltransferase, denominada ATase I, a qual possui duas funções: por um lado atua como regulador positivo da expressão dos genes envolvidos na resposta adaptativa (Hughes e Sedgwick, 1989) e, por outro, repara as principais lesões mutagênicas induzidas por agentes alquilantes (O^6AlqG e O^4AlqT), preferencialmente as bases metiladas (Sedgwick e col., 1988). O reparo destas lesões se realiza por uma transferência irreversível do grupo alquila a um resíduo de cisteína da própria ATase I. (Volkert, 1988). Embora a ATase I atue preferencialmente sobre grupos metila, reconhece também grupos etila, propila, butila etc; entretanto, a velocidade de reação diminui com o aumento do tamanho do grupo alquila (Brent e col., 1988).

A enzima metiltransferase foi também detectada em células de mamíferos, sendo denominada MGMT (revisto em Pegg, 1990). O cDNA humano para MGMT foi recentemente clonado (Tano e col., 1990) e o gene MGMT mapeado no cromossomo 10 humano (Rydberg e col., 1990). A organização e expressão do gene humano para MGMT foram recentemente demonstradas por Nakatsu e colaboradores, (1993). Em certos tipos celulares a expressão deste gene é induzida em resposta a outros tipos de agentes genotóxicos, como, por exemplo, após tratamento com raios X (Laval, 1990; Bertini e col., 1990; Fritz e col., 1991), diferentemente da enzima bacteriana. Portanto, o mecanismo de indução de MGMT em células de mamíferos parece diferir do mecanismo bacteriano.

Além da resposta adaptativa, as células de mamíferos

removem bases alquiladas do DNA por um mecanismo hidrolítico, catalisado pelas DNA-glicosilases. As DNA-glicosilases, de uma maneira geral, catalisam a ruptura hidrolítica das ligações N-glicosídicas entre uma base anormal ou danificada e uma desoxirribose da cadeia açúcar-fosfato de DNA (Volkert, 1988), e, no processo de hidrólise, produzem sítios apurínicos ou apirimidínicos (AP) na molécula de DNA. A sequência de DNA original, não danificada, pode ser então restaurada pela ação consecutiva das enzimas *AP endonuclease*, *exonuclease*, *DNA polimerase* e *DNA ligase* (revisto em Foster e Eisenstandt, 1985). A ação coletiva destes cinco tipos de enzimas é denominada *reparo de excisão de bases de DNA* (Friedberg, 1985).

No caso das bases alquiladas, foram descritas glicosilases de mamíferos que reparam a lesão 3-metiladenina (3-MetA-glicosilase), tendo-se demonstrado sua capacidade de remover também os adutos 3-metilguanina e 7-metilguanina da molécula de DNA (Male e col., 1987). A remoção das bases, gerando sítios apurínicos, pode ocorrer também espontaneamente; assim, a taxa de remoção desses produtos consiste na soma de reações enzimáticas e não enzimáticas.

5. Resistência celular a agentes alquilantes

Dentre os vários processos relacionados ao fenômeno de resistência celular a agentes alquilantes, os sistemas de reparo de DNA exercem um papel fundamental (Calsou e Salles, 1993). Em células de mamíferos, a resistência aos efeitos tóxicos de agentes metilantes, como a STZ, tem sido frequentemente associada à atividade da enzima *DNA-metiltransferase* (Pegg, 1990). Linhagens celulares que expressam um alto grau de resistência à toxicidade induzida por compostos metilantes são conhecidas como Mer⁺ ou Mex⁺. Células Mer⁺ ou Mex⁺ expressam quantidades detectáveis da enzima MGMT (Day e col., 1980; Pegg, 1990; Mitra e Kaina, 1993). Devido à existência de uma correlação entre a habilidade em reparar a lesão O⁶-MetGua e o fenômeno de resistência celular à metilação de DNA, concluiu-se que a resistência à metilação de DNA é causada por uma alta taxa de remoção desse aduto (Pegg, 1990). Entretanto, muitas linhagens celulares adquirem resistência à metilação de DNA apesar da ausência de atividade da enzima MGMT (Goldmacher e col., 1986; Goth-Goldstein e Hughes, 1987; Fritz e col., 1993). Embora a base molecular deste mecanismo de resistência pareça estar relacionado à tolerância à presença de lesões O⁶-MetGua, os mecanismos celulares envolvidos nesse processo permanecem especulativos.

Goldmacher e colaboradores (1986), fazendo uma

analogia com resultados obtidos em *E. coli* (Sklar e Strauss, 1980; Karran e Marinus, 1982) sugeriram que um defeito no sistema de reconhecimento de pareamentos errôneos de bases (reparo de *mismatch*) poderia resultar numa tolerância à lesão O⁶-MetGua. Tal sistema de reconhecimento foi recentemente caracterizado em células de mamíferos (Hare e Taylor, 1985; Brown e Jiricny, 1987) e, de acordo com este mecanismo, O⁶-MetGua não é uma lesão citotóxica *per se*, mas torna-se letal através do seu reconhecimento e eliminação como base errônea incorporada na molécula de DNA. Assim, uma falha no funcionamento deste sistema que reconhece a base incorreta poderia levar à persistência da mesma na molécula de DNA (Goldmacher e col., 1986), configurando um mecanismo de tolerância.

Por outro lado, Roberts e Basham, (1990), trabalhando com células Hela, evidenciaram uma habilidade em ultrapassar as lesões bloqueadoras do processo de replicação de DNA, o que conferia uma resistência aos efeitos tóxicos de agentes metilantes. Bouffler e colaboradores, (1990) descreveram o isolamento de um gene envolvido na replicação de DNA, utilizando uma molécula de DNA lesada por luz ultravioleta (UV); este gene corrige parcialmente a sensibilidade à luz UV através de um mecanismo de reparo pós-replicação (PRR). Recentemente foi sugerido que este mecanismo de tolerância pós-replicação poderia conferir resistência parcial aos efeitos tóxicos da MNU e ENU em células Mer⁻ (Godfrey e col., 1992).

Os dados acima, embora ainda não esclarecidos em sua totalidade, evidenciam a presença de mecanismos definidos de tolerância à ação tóxica de agentes metilantes em células de mamíferos. Várias revisões sobre estes mecanismos de tolerância foram recentemente publicados (Calsou e Salles, 1993; Karran e Bignami, 1992).

6. Estreptozotocina (STZ)

A STZ, uma nitrosourea ligada ao C₂ da molécula de glicose (Herr e col., 1967) (*Figura 3*), é o produto resultante do processo de fermentação do fungo *Streptomyces achromogenes*, e foi isolada em 1959 por Vavra e colaboradores. Estudos subsequentes apontaram a STZ como um agente de ação cancerígena e altamente diabetogênica (Rerup, 1970). De fato, este composto tem sido amplamente utilizado como indutor de diabetes em animais de laboratório devido à sua toxicidade seletiva para células β de pâncreas, produtoras de insulina (Byrne e Schein, 1981; Le Doux e col., 1986; Andersson e col., 1988; Eizirik e col., 1991). Assim, os estudos dos mecanismos de toxicidade da STZ *in vitro* têm sido principalmente realizados em culturas de células β (LeDoux e col., 1986; Eizirik e col., 1991; Kantwerk-Funke e col., 1991; Kawada, 1992), cuja alta sensibilidade a este composto parece estar relacionada à presença de receptores para o resíduo de D-

glicopirranose da STZ (Rossini e col., 1985; Le Doux e col., 1986; Kawada, 1992). A compreensão dos mecanismos de ação da STZ é fundamental na elucidação das causas do processo diabetogênico. Assim, muitos mecanismos têm sido considerados durante os últimos quarenta anos e um dos modelos mais aceitos na atualidade propõe que o evento letal para as células beta é o esgotamento do NAD intracelular, o qual é utilizado como substrato da enzima poli-ADP-ribose-sintetase, ativada pela formação de quebras de DNA (Okamoto, 1981, 1985).

Em adição à sua ação diabetogênica, a STZ constitui-se num agente quimioterapêutico largamente utilizado no tratamento de pacientes com insulinooma e tumores carcinóides (Weiss, 1982; Kelsen e col., 1991).

O uso da STZ em quimioterapia de tumores baseia-se na sua capacidade de induzir lesões na molécula de DNA (Le Doux e col., 1986; Wilson e col., 1988; Fram e Robichaud, 1990), o que lhe confere um grande potencial mutagênico e carcinogênico. Estudos anteriores demonstraram que durante o processo de decomposição da STZ são geradas espécies de carbono altamente reativas, os ions carbonium, que têm a propriedade de *alquilar* as bases de DNA (Tjälve, 1983); entretanto, os mecanismos exatos da ação tóxica deste composto não foram ainda completamente esclarecidos.

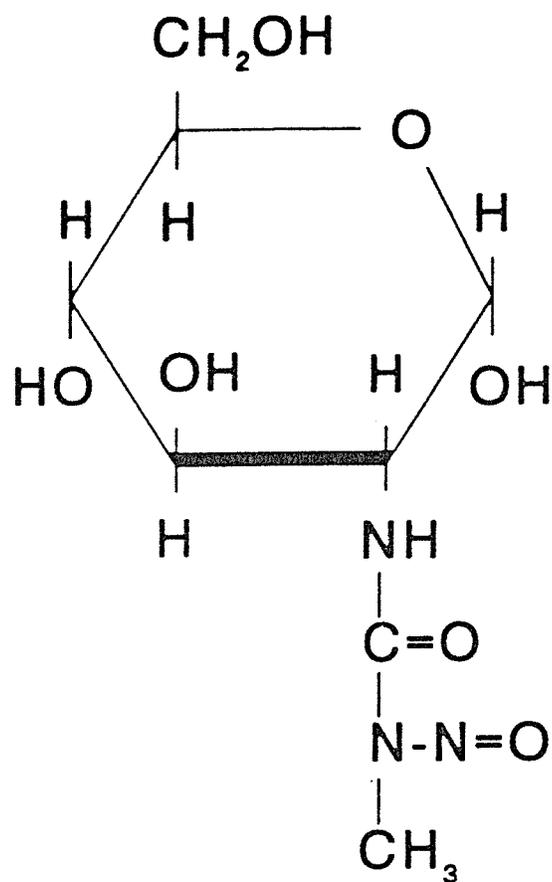


FIGURA 3. Estrutura química da estreptozotocina.

II. Objetivos

1. Como primeiro objetivo do presente trabalho nos propusemos a estudar os efeitos citotóxicos e genotóxicos induzidos pela STZ em células de mamíferos em cultura. Utilizamos, no decorrer dos experimentos, diferentes linhagens celulares de roedores, proficientes e deficientes em sistemas de reparo, a fim de caracterizar linhagens sensíveis e resistentes à STZ, que pudessem ser utilizadas para a investigação posterior de seus mecanismos de ação. Os dados da literatura referentes à ação genotóxica da STZ em células de mamíferos em cultura são bastante limitados, restringindo-se a estudos isolados de sua capacidade de induzir aberrações cromossômicas (Bhuyan, 1970) e TCIs (Tokuda e Bodell, 1988). Iniciamos nosso trabalho realizando uma análise detalhada e sistematizada dos diferentes efeitos genotóxicos induzidos pela STZ em três linhagens celulares selecionadas.

2. Numa segunda etapa, procuramos verificar se as diferentes respostas celulares à STZ eram específicas para este agente metilante, ou se manifestavam também por exposição das células a outros agentes alquilantes. Nesse sentido, analisamos os efeitos citotóxicos e genotóxicos do agente metilante metilnitrosouréia (MNU), um análogo aglicônico da STZ, e do agente etilante etilnitrosouréia (ENU).

3. Procuramos também estabelecer correlações entre as diferentes respostas celulares à STZ e a eficiência de produção de

bases metiladas no DNA destas linhagens, após exposição a este agente metilante. Analisamos, assim, o rendimento do aduto N7-MetGua, cuja produção majoritária reflete o grau de metilação do DNA, e do aduto O⁶-MetGua, cuja indução é correlacionada com a resposta mutagênica.

4. Atualmente, está bem estabelecido que a presença de diferentes tipos de lesões na molécula de DNA induzem a inibição do processo de síntese dessa molécula. Analisamos, então, os efeitos da STZ sobre a taxa de síntese de DNA e sobre a progressão do ciclo celular em duas linhagens de roedores que apresentaram diferentes respostas à STZ: a CHO-9 e a V79, visando correlacionar diferentes sensibilidades celulares com possíveis diferenças quanto às velocidades de replicação de DNA e de divisão celular nas células lesadas.

III. Materiais e Métodos

1. Células: cultivo e linhagens

Linhagens celulares

No presente trabalho foram utilizadas três diferentes linhagens celulares, cujas principais características estão abaixo relacionadas:

V79: fibroblastos originários de pulmão de hamster chinês. Apresentam baixa atividade de *reparo-excisão*, característica comum à maioria das culturas celulares de roedores (Van Zeeland e col., 1981) e não possuem atividade da enzima de reparo *DNA-metiltransferase* (células Mer⁻) (Warren e col., 1979).

CHO-9: clone derivado da linhagem fibroblástica de ovário de hamster chinês CHO. Estas células, assim como as células V79 acima descritas, apresentam baixos níveis de *reparo-excisão* e são Mer⁻ (Kaina, 1987).

EM-C11: clone mutante isolado a partir de células CHO-9 com base na hipersensibilidade à morte celular induzida por etilmetanosulfonato (EMS) (Zdzienicka e col., 1992). Estas células caracterizam-se pela hipersensibilidade a agentes alquilantes monofuncionais e pela alta frequência espontânea de trocas entre cromátides irmãs. O caráter

mutante destas células deve-se a uma deficiência no reparo de quebras simples na cadeia de DNA (Zdzienicka e col., 1992).

Cultivo das células

As linhagens celulares foram rotineiramente cultivadas em placas de Petri plásticas de 10 cm de diâmetro (P₁₀) contendo meio de cultura completo (item 13.1). As células cresciam em monocamada, aderidas ao fundo da placa de cultura. Todas as culturas celulares foram mantidas a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂. Os subcultivos foram feitos mediante repiques periódicos. Para isso, as placas de cultura eram lavadas com solução salina-fosfato (PBS) (item 13.2) e as células descoladas do fundo das placas com 1 ml de solução de tripsina (item 13.3). Obtinha-se, assim, uma suspensão celular de onde alíquotas eram transferidas para novas placas de cultura contendo meio fresco.

2. Compostos Químicos

Estreptozotocina (STZ), N-metil-N-nitrosouréia (MNU) e N-etil-N-nitrosouréia (ENU) foram dissolvidos em meio de cultura completo imediatamente antes de sua utilização. 6-tioguanina (6-TG) foi previamente dissolvida em NaOH 1N e diluída em H₂O para as

concentrações desejadas. Ouabaina foi dissolvida em H₂O e mantida em estoque a -4°C.

3. Tratamento das células

Em todos os experimentos descritos neste trabalho foram utilizadas culturas celulares em crescimento exponencial. Previamente aos protocolos experimentais, as células foram tripsinizadas, individualizadas por pipetações sucessivas e contadas em contador celular automático *Coulter Counter ZM (Coulter Electronics, Nederland)*. Com exceção dos protocolos de medidas de síntese de DNA (item 9) todos os demais tratamentos foram realizados em suspensão, numa densidade celular de 2×10^6 células/ml e por um período de 2 horas. As concentrações utilizadas estão especificadas nas figuras correspondentes a cada experimento. Após os tratamentos as células foram lavadas 2 vezes com PBS, centrifugadas e ressuspensas em meio de cultura. Todas as incubações foram feitas em meio de cultura completo, a 37°C e atmosfera úmida com 5% de CO₂.

4. Medidas de sobrevivência celular

Como parâmetro de sobrevivência celular mediu-se a capacidade de células individualizadas se reproduzirem e formarem colônias visíveis a olho nú. Para isso, as células foram tratadas com os agentes estudados, semeadas numa densidade de 200 células/P₁₀ (5 placas/dose) e incubadas em meio completo por 7 a 10 dias para o crescimento clonal. As placas foram então lavadas com NaCl (0,9% em H₂O), secadas ao ar e coradas com azul de metileno (1% em H₂O). A razão entre o número de colônias formadas e o número de células semeadas fornecia a eficiência de plaqueamento, que, nas condições controle era geralmente de 70 a 100%. A eficiência de plaqueamento de cada população relativa ao controle foi usada para determinar a fração de células sobrevivente aos tratamentos.

5. Medidas de indução de mutações gênicas

Após exposição aos agentes estudados, as células foram cultivadas numa densidade de 5×10^5 células/P₁₅ (3 placas/dose) para expressão dos mutantes induzidos em dois diferentes loci gênicos: hipoxantina-guanina-fosforibosil-transferase (HPRT) e Na⁺/K⁺ ATPase (ouabaína). Após 4 dias de incubação, as células foram subcultivadas e semeadas para seleção de mutantes ouabaína-resistentes (Oua^r). Assim, semearam-se $2,5 \times 10^5$ células/P₁₀ (10

placas/dose) em meio de cultura contendo ouabáina (1 mM) e incubou-se por 10 dias. Paralelamente, 200 células/P₁₀ foram semeadas para cada dose utilizada e incubadas por 7 dias para determinação da eficiência de plaqueamento (5 placas/dose). As células restantes na suspensão foram semeadas numa densidade de $3,5 \times 10^5$ células/P₁₅ (3 placas/dose) contendo meio fresco e incubadas por mais 4 dias. Após esse período de incubação, isto é, 8 dias após o tratamento, as células foram subcultivadas e semeadas para expressão de mutantes HPRT⁻. Para isso, semearam-se 10^5 células/P₁₀ (10 placas/dose) em meio de cultura contendo 6-tioguanina (5 µg/ml) e incubou-se por 10 dias. Novamente, 200 células/P₁₀ (5 placas/dose) foram semeadas em paralelo e incubadas por 7 dias para medidas de eficiência de plaqueamento. O tempo de expressão dos mutantes induzidos pelos tratamentos foi considerado o mesmo, tanto para as linhagens parentais como para a linhagem mutante. Após os respectivos períodos de incubação, as placas foram lavadas e coradas como descrito no item 4. A frequência de mutação induzida foi determinada subtraindo-se a frequência de mutação nas placas-controle das frequências nas placas tratadas e corrigindo-se os valores de acordo com as respectivas eficiências de plaqueamento.

6. Medidas de indução de aberrações cromossômicas

Para as análises das aberrações cromossômicas induzidas pelos compostos estudados, as células foram tratadas e cultivadas numa densidade de 2×10^6 células/P₁₀ por aproximadamente um ciclo celular. Após esse período, as culturas foram tripsinizadas e as suspensões celulares coletadas em tubos de ensaio. Duas horas antes da tripsinização, adicionou-se colchicina (0,1 µg/ml) às placas de cultura para bloqueio do fuso mitótico e consequente obtenção de cromossomos metafásicos. Procedeu-se, então, à hipotonização das células para ruptura da membrana nuclear e espalhamento cromossômico. O tratamento hipotônico foi realizado centrifugando-se as suspensões (1000 rpm por 5 minutos) e ressuspendendo o precipitado celular resultante em 5 ml de solução hipotônica (item 13.4). As suspensões foram então homogeneizadas e incubadas em banho-maria por 25 minutos a 37°C.

Após a hipotonização, as suspensões celulares foram centrifugadas novamente (800 rpm por 5 minutos), o sobrenadante removido e 5 ml de solução fixadora (item 13.5) foram adicionados a cada tubo de ensaio. Centrifugações e renovações dessa solução foram feitas 3 vezes. Após a última adição de solução fixadora, os respectivos precipitados celulares foram ressuspendidos em 0,75 ml dessa mesma solução e mantidos a 4°C por, no mínimo, 24 horas.

Para as preparações cromossômicas a serem analisadas

posteriormente, 2 a 3 gotas de cada suspensão celular foram pingadas sobre lâminas de vidro com o auxílio de uma pipeta Pasteur e secadas ao ar por 24 horas. Para verificação da qualidade das preparações foi utilizado um microscópio de contraste de fase *Leitz*. Após secagem, as lâminas foram coradas por imersão em solução de Giemsa (2% em H₂O) por 15 minutos e lavadas com água. As análises das preparações metafásicas assim obtidas foram feitas em microscópio óptico comum *Leitz wetzlar*.

7. Medidas de indução de trocas entre cromátides irmãs (TCIs)

Diferentes técnicas permitem a discriminação entre duas cromátides irmãs e, conseqüentemente, a visualização de trocas recíprocas entre as mesmas. No presente trabalho foram utilizadas duas metodologias diferentes, descritas a seguir.

a) Visualização das trocas cromatídicas segundo

Perry e Wolff (1974)

Após o tratamento, as células foram semeadas numa densidade de 10⁶ células/P₁₀ em meio de cultura contendo 10 µM de 5-bromodeoxiuridina (BrdU). As placas foram então incubadas por um período de tempo correspondente a dois ciclos celulares. Após

incubação, as células foram tripsinizadas e procedeu-se à hipotonização, fixação e preparo das lâminas como descrito no item 6. Para visualização das trocas, as lâminas foram imersas em solução do corante Hoechst (0,25 µg/ml em PBS) por 15 minutos; a seguir foram lavadas com PBS e cobertas com uma lamínula de vidro, mantendo-se, assim, uma película de PBS entre a lâmina e a respectiva lamínula. As lâminas foram então colocadas sobre uma chapa de metal aquecida a 55-60°C sob luz ultravioleta por 25 minutos. As lamínulas foram então removidas e as lâminas imersas em solução de Giemsa (5% em H₂O) por 15 minutos. A contagem do número de trocas cromatídicas induzidas pelo tratamento foi feita em microscópio óptico comum *Leitz*.

b) Visualização das trocas cromatídicas segundo

Natarajan e col., (1986)

Uma segunda técnica para visualização de trocas entre cromátides irmãs foi utilizada em nossos experimentos. Para isso, as células foram tratadas e cultivadas numa densidade de 10⁶ células/P₁₀ durante um ciclo celular em meio de cultura contendo BrdU e durante um segundo ciclo em meio contendo somente desoxitimidina (dThy) (4 µM). Nestas condições experimentais, uma das cromátides de cada cromossomo era unifilarmente substituída por BrdU enquanto que na outra cromátide não havia nenhuma substituição (*Figura 4*).

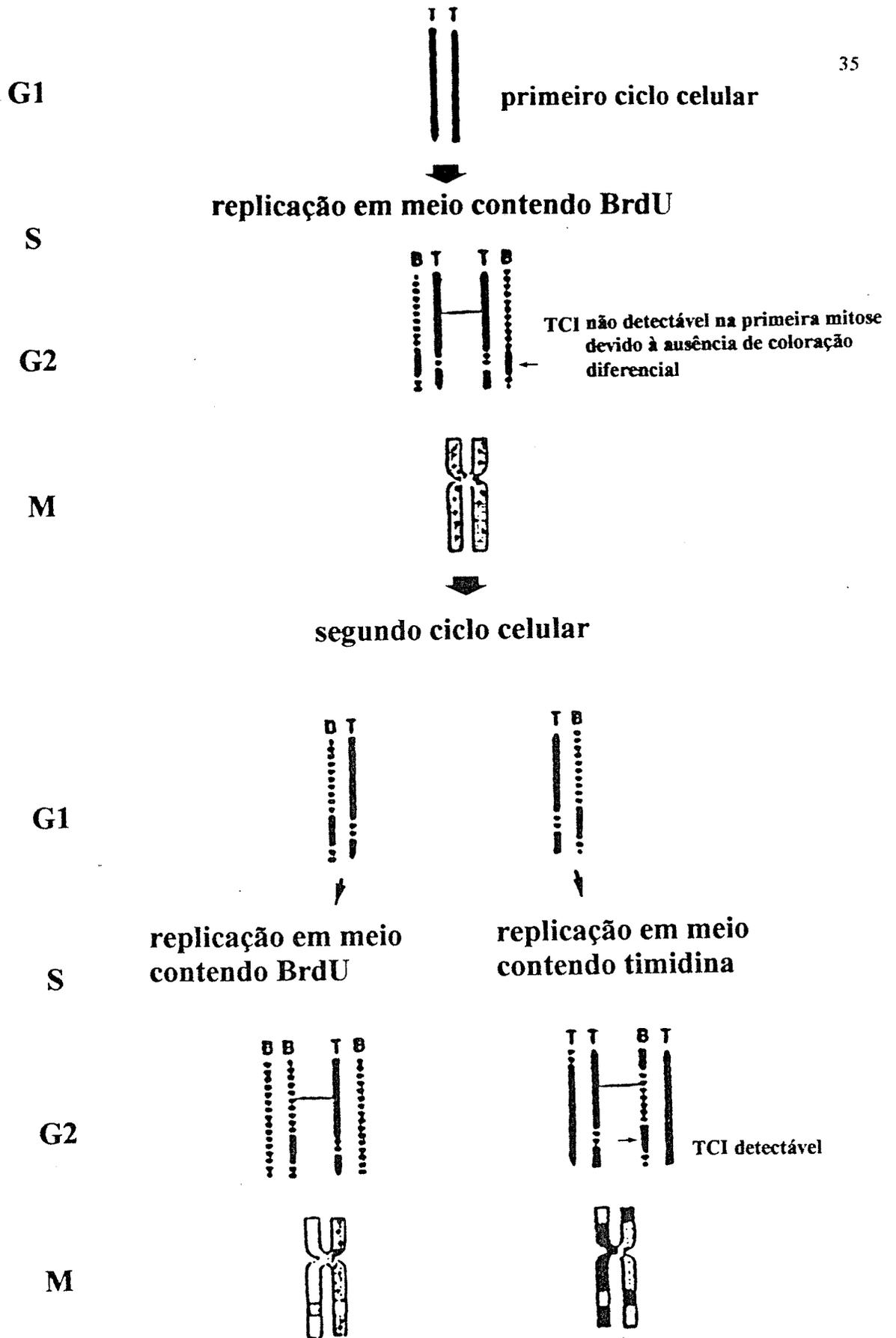


FIGURA 4. Esquema explicativo da técnica de marcação de cromátides com 5-bromodesoxiuridina (Kihlman e col., 1978).

Durante o primeiro ciclo celular, a síntese endógena de timidina foi bloqueada pela adição de fluordesoxiuridina (100 μM) e desoxicitidina (100 μM). As taxas de substituição de BrdU foram controladas pela adição ao meio de cultura de x μM BrdU e y μM dThy, respeitando-se a proporção $x + y = 10$ μM . As células foram então hipotonizadas, fixadas e as lâminas preparadas como descrito no item 6.

Num primeiro passo para a visualização das trocas cromatídicas, o DNA foi desnaturado pelo aquecimento das lâminas a 80°C por 4 minutos em formamida [40% em solução salina-citrato 2 vezes concentrada (2 x SSC)]. As lâminas foram então lavadas com PBS e H₂O. A seguir, foram incubadas por 60 minutos a 37°C com anticorpo anti-BrdU [20 $\mu\text{g/ml}$ em PBS contendo 0,1% de tween-20 (PBS-20) + 5% de albumina sérica bovina (ASB)]. Após incubação com o anticorpo, as lâminas foram lavadas com PBS contendo 0,5% e 0,1% de tween 20, sequencialmente. Finalmente, as lâminas foram incubadas por 60 minutos a 37°C com anticorpo "rabbit-anti-mouse" fluoresceinado (RAM-FITC) (1 : 400 em PBS-20 + 5% ASB), lavadas com PBS-20 e analisadas em microscópio de fluorescência *Leitz Aristoplan* após montagem com DABCO-Pi (item 13.6).

8. Medidas de inibição do ciclo celular

Para verificar o efeito do tratamento com o agente estudado na progressão do ciclo celular das linhagens CHO-9 e V79, as células foram cultivadas em meio de cultura contendo BrdU (10 μ M) durante 36 horas. Posteriormente, as células foram fixadas, hipotonizadas e as preparações cromossômicas realizadas como descrito no item 7. A contagem das metáfases em primeiro, segundo e terceiro ciclos celulares (índice mitótico) foi feita em microscópio óptico comum *Leitz*.

9. Medidas da taxa de síntese de DNA

Para medidas das taxas de replicação de DNA, 5×10^5 células/P₅ foram semeadas e incubadas por 3 dias em meio de cultura contendo 0,01 μ Ci/ml [¹⁴C]timidina (50 mCi/mmol). Após incubação, o meio radioativo foi substituído por meio fresco contendo o agente estudado. Foram feitos dois tratamentos distintos: (a) exposição das células a crescentes concentrações do agente e (b) exposição a uma única concentração determinada. Após o tratamento, as células foram lavadas com PBS e supridas de meio fresco. No experimento (a), as células foram incubadas por 60 minutos em meio fresco e posteriormente com meio contendo 5 μ Ci/ml [³H]timidina (100 mCi/mmol) por 40 minutos. No

experimento (b), as amostras foram marcadas com 5 $\mu\text{Ci/ml}$ [^3H]timidina por 40 minutos em diferentes intervalos de tempo após o tratamento, representados na *Figura 15b*. Em ambos os experimentos, após a marcação com timidina tritiada, o meio radioativo foi removido, as células lavadas com PBS e lisadas com 1 ml de meio de lise (item 13.7). Os lisados celulares foram então transferidos para tubos de ensaio e incubados em banho-maria a 50° C por 60 minutos. A seguir, adicionou-se a cada tubo 1 ml de ácido tricloroacético (TCA) (20%) e incubou-se a 4°C por 30 minutos sob ligeira agitação. Todos os lisados foram posteriormente filtrados em filtros Whatman, e a seguir lavados com TCA (5%), etanol e acetona. Os filtros foram secados ao ar, colocados em frascos contendo líquido de cintilação (item 13.8) e as medidas da radioatividade incorporada foram feitas em cintilador Tri-carb 1500 (Packard). A relação $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ foi expressa como taxa de incorporação, corrigindo-se todos os valores obtidos com relação à taxa controle.

10. Isolamento e hidrólise de DNA para determinação de adutos

Amostras de DNA foram isoladas de células tratadas com os agentes em estudo para posteriores medidas dos níveis de metilação dessa molécula, através de Cromatografia Líquida de Alta Pressão (HPLC). Todo o procedimento foi realizado no interior de uma

câmara fria a 4°C. Após o tratamento, cerca de 30×10^6 células foram suspensas em 5 ml de Tris 0,01 M / EDTA 0,01 M pH 8.0. (item 13.9). A esta suspensão adicionaram-se 500 µl de SDS 10% (concentração final 1%) e 50 µl de solução de proteinase K (item 13.10), incubando-se por 60 minutos a 37°C. Posteriormente realizou-se uma primeira extração com fenol, para a qual foram adicionados 0,3 g de 4-aminosalicilato (concentração final 6%), 250 µl de NaCl 3 M (concentração final 1%) e 5 ml (1 volume) de mistura fenólica (item 13.11). Incubou-se durante 30 minutos com ligeira agitação e, após centrifugação por 5 minutos a 4000 rpm, removeu-se a camada de fenol, cuidadosamente. Os ácidos nucleicos foram precipitados pela adição de 2 volumes de etanol/m-cresol (9 : 1) (v/v) a -20°C, agitando-se suavemente até que o material precipitado se tornasse visível. Este material foi então coletado com o auxílio de um bastão de vidro, transferido para tubos Eppendorf e lavado com etanol (70% em H₂O) (v/v) / acetato de sódio (2% em H₂O) (p/v) gelado. Após centrifugação (3000 rpm, 3 minutos) e remoção do sobrenadante, o material precipitado foi dissolvido novamente em 360 µl de H₂O bi-destilada e 70,6 µl de acetato de sódio saturado. O RNA contido nas preparações foi então eliminado incubando-se as amostras por 60 minutos a 37°C com 3 µl de RNase (10 mg/ml) e 0.3 µl de RNase T₁ (100 U/ml). Após incubação, centrifugou-se durante 5 minutos a 4000 rpm, guardou-se o sobrenadante e lavou-se o precipitado 3 vezes com acetato de sódio 3M. O DNA foi precipitado com 2 volumes de 2-etoxietanol a -20°C

e a extração do DNA foi feita com o auxílio de um bastão de vidro, após a qual foi lavado 3 vezes com etanol (70%) (v/v)/acetato de sódio (2%) (p/v) gelados, 2 vezes com etanol e secado à vácuo. Obtinha-se, assim, 200 a 300 µg de DNA, calculadas por medidas de absorbância a 260 nm. O DNA, anteriormente às análises em HPLC, foi submetido a um processo de hidrólise segundo o método descrito por Beranek e col., (1980). Adicionou-se ácido fórmico pH 2.0 ao DNA isolado (1 µl/µg) e aqueceu-se a 70°C durante 30 minutos. Neste processo obtinha-se a hidrólise das ligações N-glicosídicas das bases e sua liberação do DNA.

11. Separação e detecção das bases metiladas do DNA

O processo de detecção eletroquímica (DE) foi introduzido recentemente como uma nova e sensível técnica para determinação de adutos de DNA após separação em HPLC. A metodologia aqui descrita foi utilizada para determinação de N7- e O⁶- metilguaninas. Este método de detecção é utilizado para adutos de DNA com alta atividade eletroquímica (Park e col., 1989). Previamente à detecção eletroquímica, realizou-se uma separação dos adutos de interesse por HPLC. O fracionamento das bases metiladas foi realizado em uma bomba HPLC LKB-2150 (Pharmacia) pela injeção de 250 µl do DNA hidrolisado em uma coluna de HPLC Whatman Partisil SCX de

250 x 4,6 mm (tamanho da partícula 10 µM). A separação foi feita através de um gradiente que variava de 0,02 M de formiato amônico, pH 4.0 em 6% metanol a 0,2 M de formiato amônico, pH 4.0, em 8% metanol, a uma velocidade de fluxo de 2 ml/minuto durante 20 minutos. Paralelamente, DNA hidrolisado proveniente de amostras-padrão foi injetado para efeitos de calibração. Assim, amostras contendo 20 µg de guanina, 20 µg de adenina, 400 pmol de O⁶-metilguanina e 400 pmol N7-metilguanina foram injetadas no início e final de cada série de separações. Os picos foram detectados por absorção na região ultravioleta a 260 nm e as áreas correspondentes à guanina e adenina foram utilizadas para os cálculos do conteúdo de DNA nas amostras. Padrões comerciais de O⁶-metilguanina e N7-metilguanina foram utilizadas para localização dos picos nos cromatogramas e para checar a reprodutibilidade dos mesmos. Foram realizados controles com hidrolisados de DNA não tratado, e com ácido fórmico, isoladamente. As frações das amostras correspondentes à O⁶-metilguanina e N7-metilguanina foram coletadas em tubos de ensaio de 10 ml e secadas por liofilização. A seguir, os adutos foram dissolvidos em 1 ml de ácido fórmico pH 3.0 a 70°C por 30 minutos, e novamente liofilizados. O resíduo resultante foi dissolvido em ácido fórmico (pH 3.0 a 70°C por 30 minutos) para análise em HPLC com detector eletroquímico. O volume de ácido fórmico utilizado em nosso procedimento-padrão foi de 50 µl para as amostras tratadas e amostras-padrão, e 1000 µl para as amostras de calibração.

Para a análise eletroquímica, 5 µl de cada amostra foram injetados em uma coluna de fase reversa Chrompack contendo Hypersil ODS (partícula de tamanho 100 x 3.0 µm). A fase móvel utilizada consistiu em 0.02 M de fosfato de potássio pH 6.0 contendo 2% de metanol para separação de N7-metilguanina ou 5% de metanol para a O⁶-metilguanina; a velocidade de fluxo foi de 0.7 ml/minuto. A detecção eletroquímica foi realizada a uma voltagem de 1.1-1.15V, através de um detector ANTEC VT-03 (Bloemhoff e Valkenburg, 1991) e uma unidade controladora CU-03 (ANTEC Leiden, The Netherlands) para controle de voltagem e medida de corrente. Nas nossas condições experimentais, cerca de 0.4 a 0.7 metilações/milhão de nucleotídeos podem ser detectadas em 25 µg de DNA, para O⁶-metilguanina e N7-metilguanina. O procedimento total do protocolo de detecção eletroquímica está resumido em esquema apresentado na página a seguir.

Cálculo da quantidade de DNA injetada na coluna

A quantidade de DNA injetada na coluna foi estimada com base nas áreas dos picos de adenina e guanina nos cromatogramas de UV. A calibração foi feita com quantidades conhecidas destas purinas. A fórmula a seguir foi utilizada para calcular a quantidade de DNA injetada:

ISOLAMENTO DO DNA



HIDRÓLISE

Hidrólise do DNA (1 µg/µl) em ácido fórmico pH 2.0 a 70°C por 30

minutos



SEPARAÇÃO PRÉVIA EM HPLC

250 µl de DNA hidrolisado e amostras-padrão são injetados numa forte coluna de troca catiônica e separados por HPLC. As respectivas frações são coletadas e os picos de guanina e adenina, medidos. As injeções são feitas na seguinte ordem:

- Amostras-padrão 1: Guanina, Adenina, O⁶-metGua, N7-metGua*
- Amostras de calibração 1: ácido fórmico pH 2.0*
- Amostras de calibração 2: hidrolisado de DNA não tratado*
- Amostras: hidrolisado de DNA tratado- Amostras-padrão 2: Guanina, adenina, O⁶-MetGua, N7-MetGua*



LIOFILIZAÇÃO DAS FRAÇÕES



ANÁLISE DOS ADUTOS POR DETECÇÃO ELETROQUÍMICA

5 µl de cada amostra é dissolvido em ácido fórmico pH 3. e injetado e separado em HPLC, com uma coluna de fase reversa, e detectado por ECD a 1.15 V.

Esquema do procedimento seguido na DE de bases metiladas.

- $\text{DNA } (\mu\text{g}) = [(2G + 2A) \times 6,023 \times 10^{23}] / 1,83 \times 10^{15}$

$\mu\text{g de DNA} = 1,83 \times 10^{15}$ nucleotídeos

- $6,023 \times 10^{23}$ = número de Avogadro
- G = moles de guanina
- A = moles de adenina

O número total de nucleotídeos do DNA (n) injetados na coluna é calculado a partir da relação:

1 μg de DNA = $1,83 \times 10^{15}$ nucleotídeos. Então:

$$n = \mu\text{g DNA} \times 1,83 \times 10^{15} \quad (1)$$

O número de moléculas de aduto (n_a) nas frações de interesse é calculado a partir do número de moles injetados:

$$n_a = \text{número de f moles injetados} \times 6,02 \times 10^8 \quad (2)$$

O rendimento (R) de cada aduto é expresso pelo número de bases metiladas por 10^6 nucleotídeos: $R = (n_a/n) \times 10^6$

12. Compostos químicos e reagentes

A relação a seguir apresenta a procedência dos principais compostos e reagentes químicos utilizados no presente trabalho. Os demais produtos não citados foram do mais alto grau de pureza disponível.

Estreptozotocina	Sigma
Metilnitrosouréia	Sigma
Etilnitrosouréia	Sigma
dThy	Sigma
BrdU	Sigma
Azul de metileno	Sigma
Hoechst	Sigma
Albumina bovina	Sigma
5-BrdU	New England Nuclear
FdUrd	New England Nuclear
Anticorpo antiBrdU	Partec
Ouabaina	Merck
6-tioguanina	Merck
Giemsa	Merck
³ H-Thy	Amershan
¹⁴ C-Thy	Amershan
N ⁷ -MetGua	Amershan
O ⁶ -MetGua	Amershan
RAM-FITC	Nordic Immunology

13. Soluções e meios

1. Meio de cultura

Uso: Para suspender, diluir e cultivar as linhagens celulares. Também utilizado na dissolução dos agentes alquilantes estudados.

Composição para 20 litros:

Meio Ham's F10 (Boeringer, Mannheim): 240.4 g

Carbonato hidrogenado de sódio: 24 g

Dissolver em água bidestilada.

Penicilina: 100 IU/ml

Estreptomicina: 100 µg/ml

Conservação: 4°C

2. Solução Salina (PBS)

Uso: Para lavar as placas de cultura antes dos repiques periódicos e após tratamento das células com os agentes estudados.

Composição para 1 litro:

NaCl: 10 g (0,171 M)

KCl: 0,25 g (3,4 M)

Na₂HPO₄: 1,43 g (10,1 M)

KH₂PO₄: 0,26 g (1,9 M)

Conservação: temperatura ambiente

3. Solução de Tripsina

Uso: Para descolamento da monocamada de células, tanto nos subcultivos, como nos experimentos.

Composição:

Tripsina: 0,5%

EDTA: 0,02%

Dissolver em PBS

Conservação: 4°C

4. Solução Hipotônica

Uso: para obtenção de preparações metafásicas.

Composição:

KCl (PM = 74,56): 5,6 g/ 1000 ml

Conservação: 4°C

5. Solução Fixadora

Uso: para fixação das células nas preparações cromossômicas.

Composição:

ácido acético : metanol (1 : 3)(v/v)

Conservação: 4°C

6. Solução de 1,4 diazociclo 2,2,2 octano-iodeto de propídio (DABCO-Pi)

Uso: para melhor resolução nas preparações cromossômicas tratadas com anticorpo anti-BrdU.

Composição:

Glicerol: 9 partes

Tris-EDTA pH 7.5: 1 parte

Azoto de sódio: 0.02%

iodato de propídio: 0.5 µg/ml

DABCO: 2%.

Dissolver o DABCO em glicerol a 70°C

Conservação: 4°C

7. Meio de Lise

Uso: Lise das células nas medidas de taxa de síntese de DNA.

Composição:

TRIS-HCl: 10 mM pH 8.0

NaCl: 150 mM

EDTA: 1 mM

SDS: 0.5%

proteínase K: 100 µg/ml

Conservação: 4°C

8. Líquido de Cintilação

Uso: para medidas de incorporação de ^3H -timidina e ^{14}C -timidina nos experimentos de taxa de síntese de DNA.

Composição:

tolueno : 1l

2,5-difenil oxazol (PPO): 5 g/l

p-bis/2-(5-fenil oxazol/-benzeno) (POPOP): 0,1 g/l

Procedência: Packard

Conservação: temperatura ambiente

9. TRIS 0,01 M/EDTA 0,01 M pH 8.0

Uso: isolamento de DNA nos experimentos de dosimetria molecular.

Composição:

Tris (PM = 121.1): 1.21 g (0,01 M)

EDTA (PM 372.2): 3.72 g (0,01 M)

Ajustar pH para 8.0

Conservação: temperatura ambiente

10. Solução de Proteinase K

Uso: para desproteinização das amostras no isolamento de DNA.

Composição:

TRIS-EDTA: pH 8.0

proteínase K: 10 mg/ml

Preparar a fresco

11. Mistura Fenólica

Uso: isolamento do DNA para dosimetria molecular.

Composição:

Fenol destilado (PM = 94,11): 100 g

m-cresol (PM = 108,13): 15 ml

8-hidroxiquinolina (PM = 145,15): 0,1 g

água destilada: 11 ml

Conservação: -20°C

IV. Resultados



I. DETERMINAÇÃO DOS EFEITOS GENOTÓXICOS DA ESTREPTOZOTOCINA

Como primeiro objetivo de nosso trabalho nos propusemos a analisar os efeitos genotóxicos induzidos pela estreptozotocina em células de mamíferos em cultura. As linhagens celulares CHO e V79 foram aqui utilizadas como modelos nos testes de mutagenicidade dos compostos alquilantes de interesse. A genotoxicidade da STZ foi avaliada de forma sistemática, através de diversos parâmetros, como a indução de aberrações cromossômicas, trocas entre cromátides irmãs, de mutações gênicas e de morte celular, nas linhagens parentais CHO-9 e V79, assim como no clone mutante EM-C11, derivado das células CHO-9. A escolha das células EM-C11 deveu-se ao fato de serem derivadas de um clone mutante recentemente isolado e cuja deficiência em reparo de DNA relaciona-se, especificamente, à ação tóxica de agentes alquilantes monofuncionais (Zdzienicka e col., 1992). Os resultados apresentados a seguir foram analisados estatisticamente pelo teste de regressão linear múltipla.

1. Sobrevivência de células CHO-9, V79 e EM-C11 tratadas com STZ

Como um primeiro passo para a análise dos efeitos genotóxicos induzidos pela STZ, procurou-se verificar as respostas de diferentes linhagens celulares à indução de morte celular por este composto. As curvas de sobrevivência obtidas após tratamento com doses crescentes de STZ estão apresentadas na *Figura 5*. Os resultados demonstram que a exposição de células CHO-9 e EM-C11 à STZ levou a um declínio dependente de dose nas taxas de sobrevivência celular ($p < 0,0001$, para ambas as linhagens celulares). Entretanto, as células parentais V79 mostraram-se mais resistentes aos efeitos letais da STZ ($p < 0,001$), em comparação às células CHO-9 e V79. As concentrações do agente que induziram uma taxa de sobrevivência de 37% (D_{37}) foram de 189 μM para as células CHO-9 e 3770 μM para V79. Assim, pode-se afirmar que a linhagem parental CHO-9 mostrou-se 20 vezes mais sensível à ação tóxica da STZ do que a linhagem parental V79. O clone mutante EM-C11 mostrou-se ligeiramente mais sensível ao tratamento (1.3 vezes) ($p = 0,034$), quando comparado com as células parentais CHO-9.

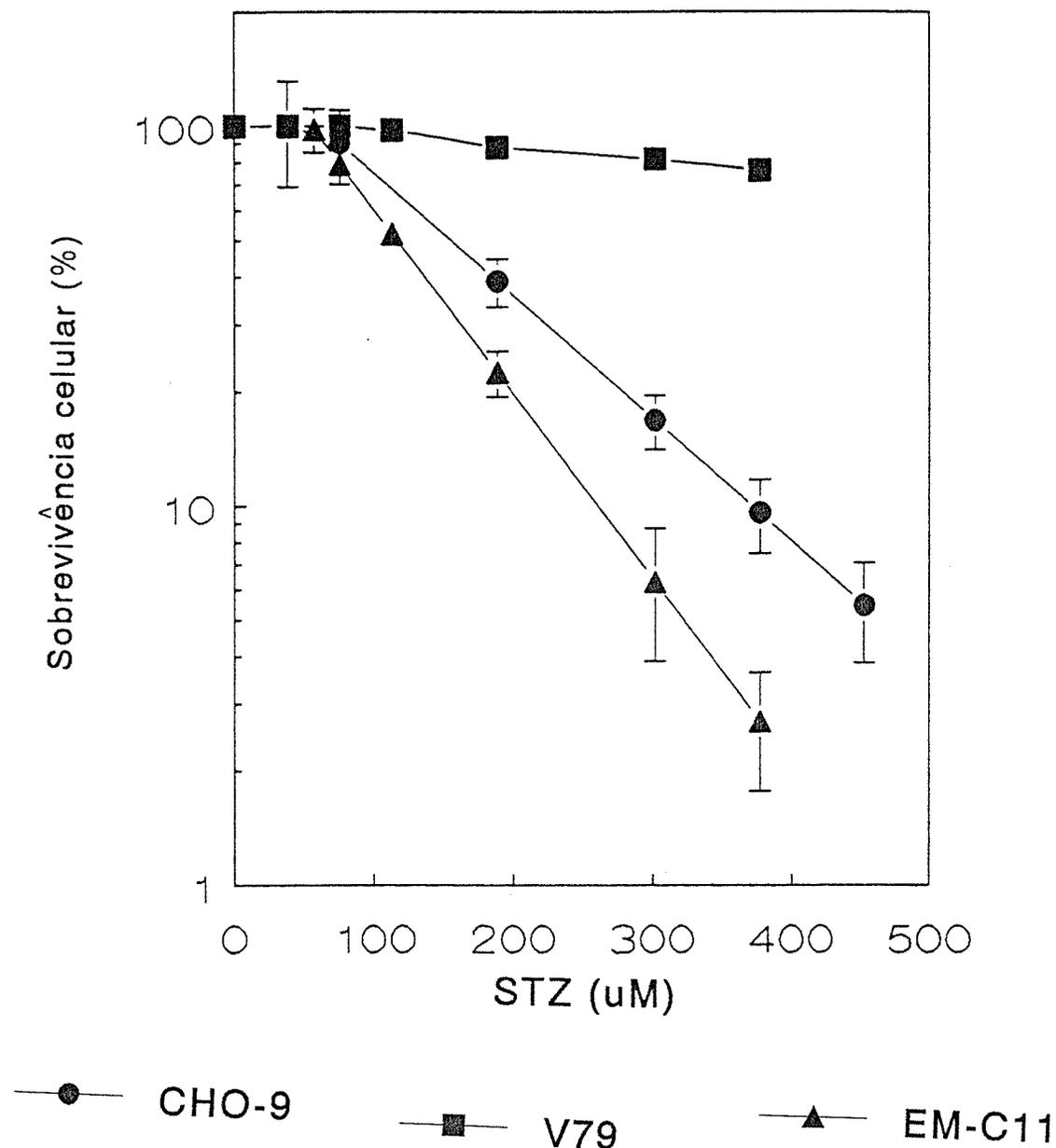


FIGURA 5. Curvas de sobrevivência de células V79, CHO-9 e EM-C11 tratadas com STZ.

Células em suspensão ($2 \times 10^6/\text{ml}$) foram expostas a diferentes concentrações de STZ por 2 horas e depois semeadas em placas para o crescimento clonal (200 cél./placa). Após 7 dias de crescimento, as colônias foram fixadas, coradas e contadas como descrito em Materiais e Métodos (item 4). A taxa de sobrevivência foi expressa em porcentagens, em relação ao número de clones sobreviventes nas placas-controle. Cada ponto corresponde ao valor médio de 5 experimentos independentes, com os respectivos desvios-padrão. A ausência de desvios em alguns pontos deve-se à inclusão dos mesmos dentro dos respectivos símbolos.

2. Indução de aberrações cromossômicas (AC) em células CHO-9, EM-C11 e V79 tratadas com STZ

Os dados referentes à indução de diferentes tipos de aberrações cromossômicas pelo tratamento com STZ estão sumarizados na *Tabela 1*. Na *Figura 6* estão representados os valores totais obtidos para cada dose de STZ utilizada. Após exposição a concentrações crescentes deste composto, as células CHO-9 e EM-C11 responderam com um aumento dependente de dose nas frequências de AC ($p = 0,0248$ e $p = 0,0232$, respectivamente).

Análises estatísticas indicaram que a taxa de aumento das frequências de AC/dose de STZ foi mais acentuada na linhagem mutante, em comparação às células parentais CHO-9 ($p = 0,027$). As maiores frequências de aberrações foram obtidas com as doses de 302 μM para as células CHO-9 e 377 μM para EM-C11, respectivamente. Tomando-se como parâmetro de comparação a dose de STZ que induziu a maior taxa de AC na linhagem CHO-9 (302 μM), observa-se que, nas células mutantes, a frequência de aberrações induzidas foi cerca de 2 vezes mais elevada. Os dados da tabela demonstram que as aberrações do tipo cromatídicas foram majoritárias, com altas frequências de quebras e rearranjos cromatídicos. As células V79, entretanto, mostraram-se resistentes à indução de AC: o tratamento com doses crescentes de STZ não alterou significativamente as taxas espontâneas de aberrações observadas

linhagem celular	STZ (uM)	n*	células lesadas (%)	quebras cromatídicas	rearranjos interocromátide	cromossômicos intracromátide	quebras cromossômicas	anéis	fragmentos	falhas	total de lesões
CHO-9	0	2	8.0 (+/- 2.8)	2.5 (+/- 2.1)			1.0 (+/- 1.4)		0.5 (+/- 0.7)	2.5 (+/- 2.1)	6.5
CHO-9	38	1	1.0	0.0		1.0				2.0	3.0
CHO-9	75	2	15.0 (+/- 1.4)	2.5 (+/- 3.5)		3.5 (+/- 3.5)	0.5 (+/- 0.7)		0.5 (+/- 0.7)	11.5 (+/- 0.7)	18.5
CHO-9	302	2	26.0 (+/- 8.5)	10.0 (+/- 2.8)		1.5 (+/- 2.1)	2.0 (+/- 2.8)		2.0 (+/- 1.4)	14.5 (+/- 3.5)	30.0
CHO-9	377	1	23.0	11.0		3.0			1.0	14.0	29.0
CHO-9	452	2	14.0 (+/- 7.0)	4.0 (+/- 2.0)		3.0 (+/- 2.5)	3.0 (+/- 3.0)			7.0 (+/- 3.0)	17.0
EM-C11	0	2	7.0 (+/- 2.0)	2.0 (+/- 2.7)						5.0 (+/- 3.2)	7.0
EM-C11	38	2	18.0 (+/- 5.0)	8.0 (+/- 3.0)	1.0 (+/- 2.0)	2.0 (+/- 3.0)	1.0 (+/- 1.5)		2.0 (+/- 1.0)	7.0 (+/- 3.0)	21.0
EM-C11	75	3	16.7 (+/- 1.9)	9.8 (+/- 3.9)	3.5 (+/- 2.1)	7.5 (+/- 2.1)	1.8 (+/- 1.0)	1.0 (+/- 2.0)	2.0 (+/- 1.5)	8.0 (+/- 4.0)	33.6
EM-C11	302	4	35.0 (+/- 2.8)	23.0 (+/- 2.8)	14.6 (+/- 0.8)	7.8 (+/- 6.7)	4.0 (+/- 0.1)		2.4 (+/- 2.3)	5.0 (+/- 0.3)	56.8
EM-C11	377	2	51.0 (+/- 4.0)	27.0 (+/- 5.0)	28.0 (+/- 5.0)	11.0 (+/- 3.0)	11.0 (+/- 3.2)	1.0 (+/- 1.5)	7.0 (+/- 3.1)	27.0 (+/- 7.0)	112.0
EM-C11	452	1	33.0	32.0	39.0	3.0	4.0		2.0		80.0
V79	0	2	11.0 (+/- 7.0)	6.0 (+/- 4.0)						5.0 (+/- 2.0)	11.0
V79	38	2	6.0 (+/- 4.0)	2.0 (+/- 1.0)	1.0 (+/- 2.0)					3.0 (+/- 2.0)	6.0
V79	75	2	7.0 (+/- 1.5)	3.0 (+/- 2.0)						4.0 (+/- 2.0)	7.0

TABELA 1. Indução de aberrações cromossômicas em células CHO-9, V79 e EM-C11 tratadas com STZ.
(*n = número de experimentos independentes)

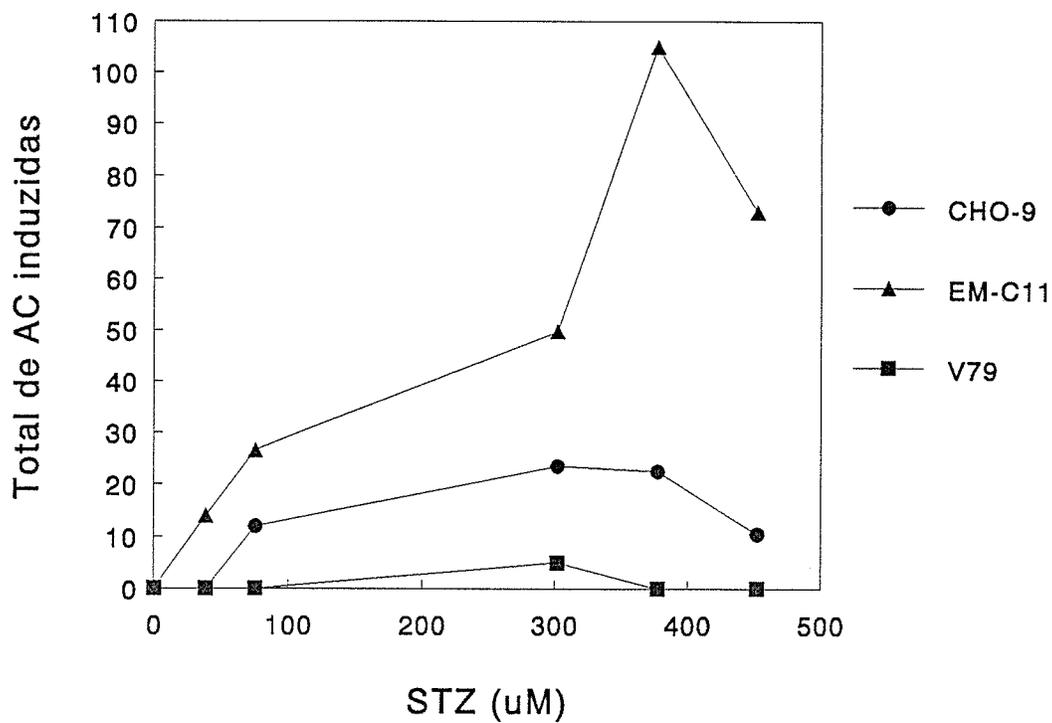


FIGURA 6. Indução de aberrações cromossômicas em células CHO-9, V79 e EM-C11 tratadas com STZ.

As curvas representam os números totais de aberrações cromossômicas induzidas pela STZ em células CHO-9, V79 e EM-C11, de acordo com os valores apresentados na Tabela 1.

em células não tratadas. Uma pequena indução de AC pode ser observada após exposição a 302 μM de STZ.

3. Indução de trocas entre cromátides-irmãs (TCIs)

As células mutantes EM-C11, em contraste com a linhagem parental CHO-9, caracterizam-se pela alta taxa espontânea de TCIs, cerca de 10 vezes mais elevada (Zdzienicka e col., 1992). De fato, a exposição destas células não tratadas à concentração de BrdU comumente utilizada na literatura (10 μM) resultou numa frequência de aproximadamente 80 TCIs/célula, um índice 10 vezes mais elevado que o observado nas células CHO-9, não tratadas. Pelo fato do composto BrdU ser citotóxico (Meuth e Green, 1974) e indutor de TCIs (Kato, 1974), as células mutantes apresentam uma maior sensibilidade à incorporação do análogo na molécula de DNA. Assim, com a finalidade de reduzir os efeitos tóxicos da BrdU, trataram-se as células EM-C11 com baixas concentrações deste composto, em associação com 100 μM desoxicidina (dCyt) e 100 μM fluordesoxiuridina (FdU), o que levou a um decréscimo do número de TCIs/célula, de maneira dependente da concentração de BrdU. Os resultados mostraram que concentrações de 1, 5 e 8 μM de BrdU induziram frequências de aproximadamente 18, 25 e 50 TCIs/célula, respectivamente (*Figura 7*).

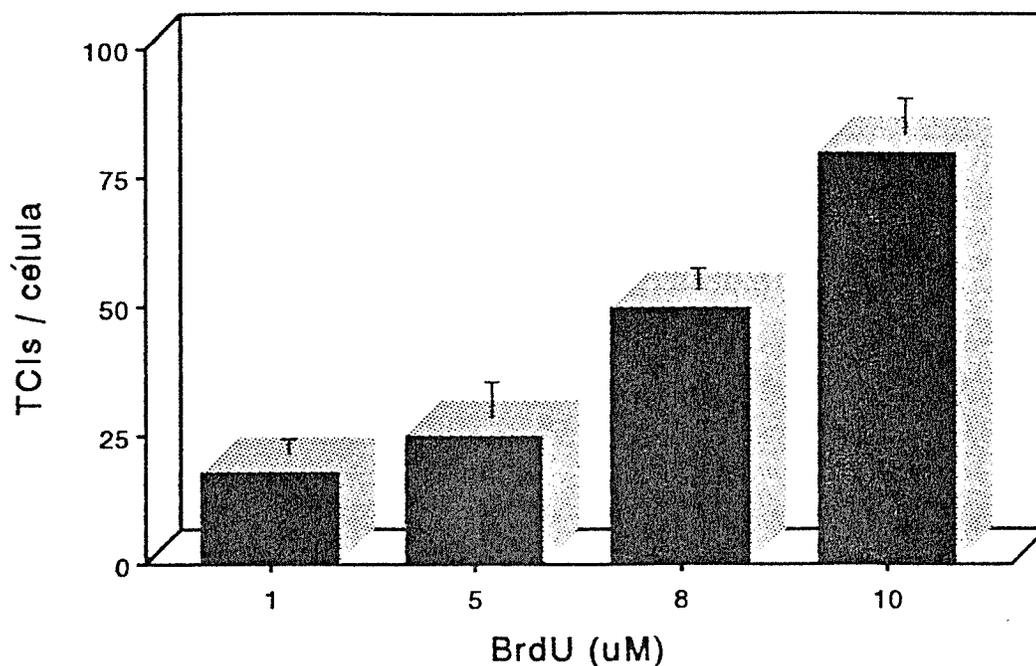


FIGURA 7. Indução de TCIs em células EM-C11 como uma função da concentração de 5-bromodesoxiuridina.

As células foram semeadas (10^6 cél./placa) em meio de cultura contendo $100 \mu\text{M}$ de fluordesoxiuridina, $100 \mu\text{M}$ de desoxicidina e diferentes concentrações de 5-BrdU e cultivadas por um período correspondente a um ciclo celular. As taxas de substituição de BrdU foram controladas pela adição de $x \mu\text{M}$ BrdU e $y \mu\text{M}$ desoxitimidina, respeitando-se a proporção $x + y = 10 \mu\text{M}$. Durante o segundo ciclo celular o meio de cultura foi substituído por meio fresco contendo somente $4 \mu\text{M}$ de desoxitimidina. As TCIs foram visualizadas por fluorescência segundo metodologia de Natarajan e col., (1986), descrita em Materiais e Métodos (item 7b). As barras correspondem aos desvios-padrão da média de 2 experimentos independentes.

Assim, em nossos experimentos, optou-se pelo crescimento das células mutantes em meio de cultura contendo 1 μ M de BrdU, que induzia a menor frequência de TCIs/célula. Estas condições experimentais permitiram a análise das frequências de trocas induzidas nas células mutantes pelo tratamento com STZ, cujos resultados estão apresentados na *Tabela 2* e *Figura 8*. A exposição à STZ induziu um aumento significativo nas taxas de TCIs em células EM-C11 e CHO-9 ($p < 0,0001$, para ambas as linhagens celulares) como uma função linear das concentrações utilizadas. Pode-se observar que a taxa de aumento de TCIs/dose de STZ das células mutantes não diferiu da taxa apresentada pelas células parentais ($p = 0,718$) e, é interessante salientar que, para cada dose de STZ utilizada, a taxa de aumento de TCIs/célula manteve-se constante, em torno de 1,2 a 1,6 vezes maior. As células V79 também responderam com um aumento significativo de TCIs em função da dose de STZ ($p < 0,001$). Entretanto, o tratamento destas células com doses equimolares de STZ induziu menores frequências de trocas cromatídicas quando comparadas às frequências observadas em células CHO-9 ($p = 0,0034$). Estes resultados demonstram, portanto, uma maior resistência das células V79 à indução de TCIs pelo tratamento com STZ.

linhagem celular	STZ (μ M)	TCI / célula
CHO-9	0	8.69 (+/- 0.1)
CHO-9	38	13.2 (+/- 0.87)
CHO-9	75	17.71 (+/- 0.77)
CHO-9	189	31.26 (+/- 0.66)
CHO-9	302	44.8 (+/- 0.91)
CHO-9	377	53.83 (+/- 1.2)
EM-C11	0	18.78 (+/- 0.77)
EM-C11	38	23.38 (+/- 0.7)
EM-C11	75	27.98 (+/- 0.5)
EM-C11	189	41.79 (+/- 0.6)
EM-C11	302	55.59 (+/- 0.4)
EM-C11	377	64.8 (+/- 0.89)
V79	0	6.0 (+/- 4.0)
V79	75	10.2 (+/- 3.2)
V79	189	16.6 (+/- 5.0)
V79	302	16.1 (+/- 6.6)
V79	453	23.7 (+/- 6.7)

TABELA 2. Indução de TCIs em células CHO-9, V79 e EM-C11 tratadas com STZ.

As células foram tratadas em suspensão (2×10^6 cél./ml) com diferentes concentrações de STZ por 2 horas. A seguir, as células CHO-9 e V79 (cerca de 10^6 cél./placa) foram cultivadas em meio de cultura contendo 10μ M de BrdU durante um período correspondente a dois ciclos celulares. As células EM-C11 foram cultivadas (10^6 cél./placa) por um ciclo celular em meio contendo 1μ M BrdU + 9μ M dThy. As TCIs foram visualizadas por coloração Giemsa ou por fluorescência, conforme descrito em Materiais e Métodos (item 7, *a* e *b*). Estão representados os valores médios de 2 experimentos independentes, com os respectivos desvios-padrão.

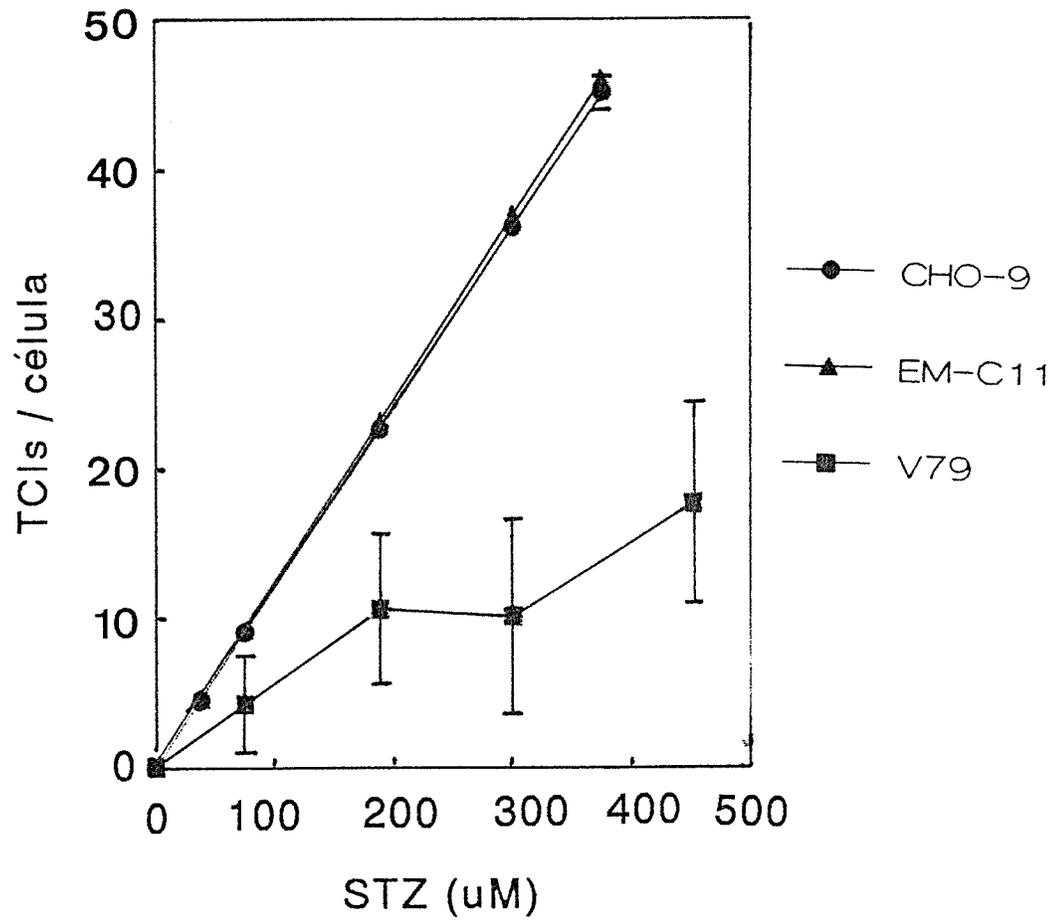


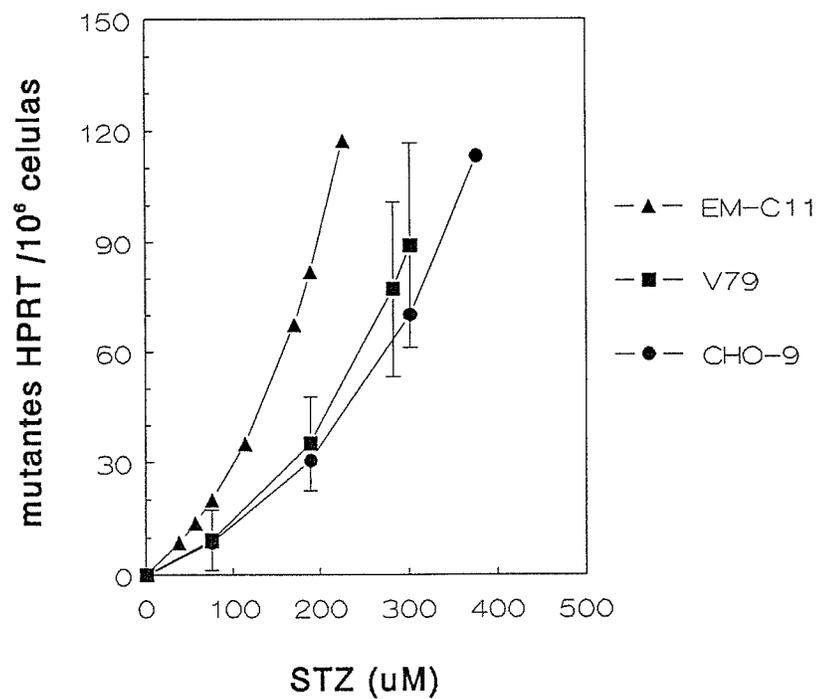
FIGURA 8. Indução de TCIs em células CHO-9, V79 e EM-C11 tratadas com STZ.

As curvas representam os valores totais das TCIs induzidas pela STZ em células CHO-9, V79 e EM-C11, de acordo com a Tabela 2.

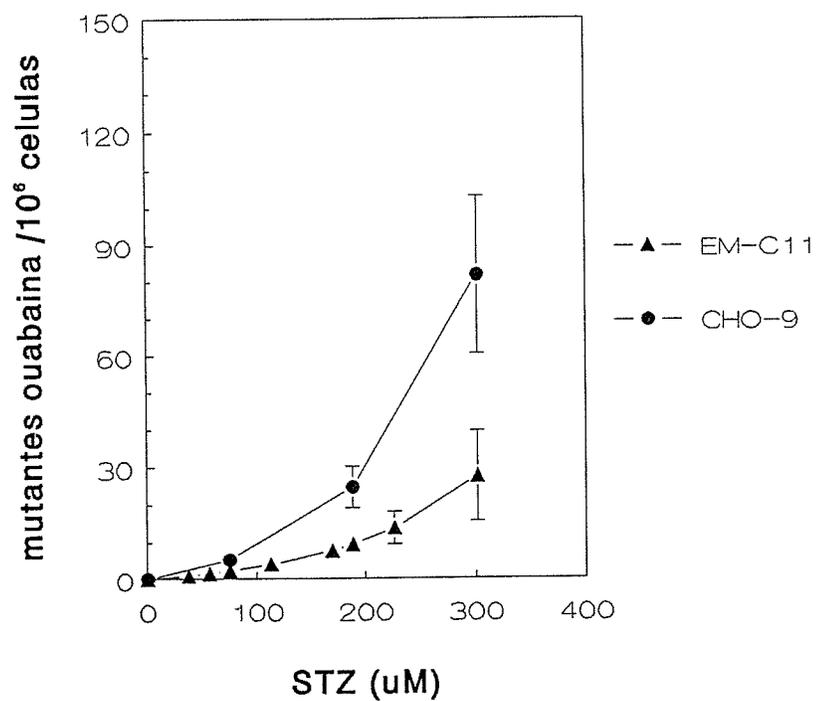
4. Indução de mutações gênicas

As respostas celulares à indução de mutantes em locus HPRT foram também analisadas (*Figura 9a*). Para o clone mutante, nossa análise estendeu-se à indução de mutações em locus ouabáina (*Figura 9b*). Os resultados apresentados na *Figura 9a* demonstram que o tratamento com STZ induziu um aumento dependente de dose nas frequências de mutantes HPRT nas três linhagens celulares estudadas ($p_{V79} < 0,001$; $p_{EM-C11} = 0,0088$ e $p_{CHO-9} = 0,0002$). Análises comparativas indicaram que não houve diferença significativa no aumento nas frequências de mutação em células V79 e CHO-9 ($p = 0,053$). Porém, nas células EM-C11, houve uma maior indução de mutantes HPRT ($p = 0,153$). Um aumento dependente de dose nas frequências de mutantes Oua^r também foi observado em células CHO-9 ($p = 0,0001$) e EM-C11 ($p = 0,0003$) (*Figura 9b*). Análises estatísticas revelaram que a resposta das células EM-C11 não diferiu significativamente da resposta apresentada pelas células CHO-9 ($p = 0,848$).

PAINEL A



PAINEL B



II. ANÁLISE DA RESISTÊNCIA DE CÉLULAS V79 À ALQUILAÇÃO DE DNA

O fenômeno de resistência celular representa um dos maiores obstáculos aos programas de terapia de tumores envolvendo agentes alquilantes. Os resultados apresentados na primeira parte deste trabalho revelaram uma resistência das células V79 aos efeitos biológicos induzidos pela STZ, em comparação às células CHO-9. Os resultados anteriores, somados ao fato da estreptozotocina ser um agente quimioterapêutico largamente utilizado no tratamento de pacientes com tumores pancreáticos, despertaram nosso interesse para o estudo dos possíveis mecanismos envolvidos nesse processo de resistência celular. Nesta segunda parte de nosso trabalho procuramos definir se as respostas diferenciais das células V79 e CHO-9 à STZ eram específicas ou também ocorriam frente a outros agentes alquilantes. Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente pelo teste de regressão linear múltipla.

1. Sobrevivência de células V79 e CHO-9 tratadas com N-metil-N-nitrosourea (MNU)

Com o objetivo de verificar se a resistência apresentada pelas células V79 poderia estar relacionada a algum mecanismo específico de toxicidade da STZ, analisamos as respostas das duas linhagens parentais (CHO-9 e V79) à indução de morte celular pelo tratamento com um outro agente metilante, a N-metil-N-nitrosouréia (MNU).

As curvas de sobrevivência celular apresentadas na *Figura 10* demonstram que ambas as linhagens celulares foram susceptíveis ao tratamento com MNU, que induziu um declínio dependente de dose nas taxas de sobrevivência celular ($p < 0,001$, para ambas as linhagens celulares). As células V79, entretanto, mostraram-se mais resistentes aos efeitos letais deste composto. Os valores de D_{37} obtidos foram de 218 μM para CHO-9 e 920 μM para V79. Portanto, de acordo com os valores de D_{37} , as células V79 mostraram-se 4 vezes mais resistentes aos efeitos letais da MNU ($p = 0.019$).

2. Sobrevivência de células V79 e CHO-9 tratadas com N-etil-N-nitrosourea (ENU)

Em face à baixa sensibilidade das células V79 aos efeitos letais induzidos pela STZ e MNU, procuramos determinar se a resistência celular observada era ou não restrita à *metilação* de

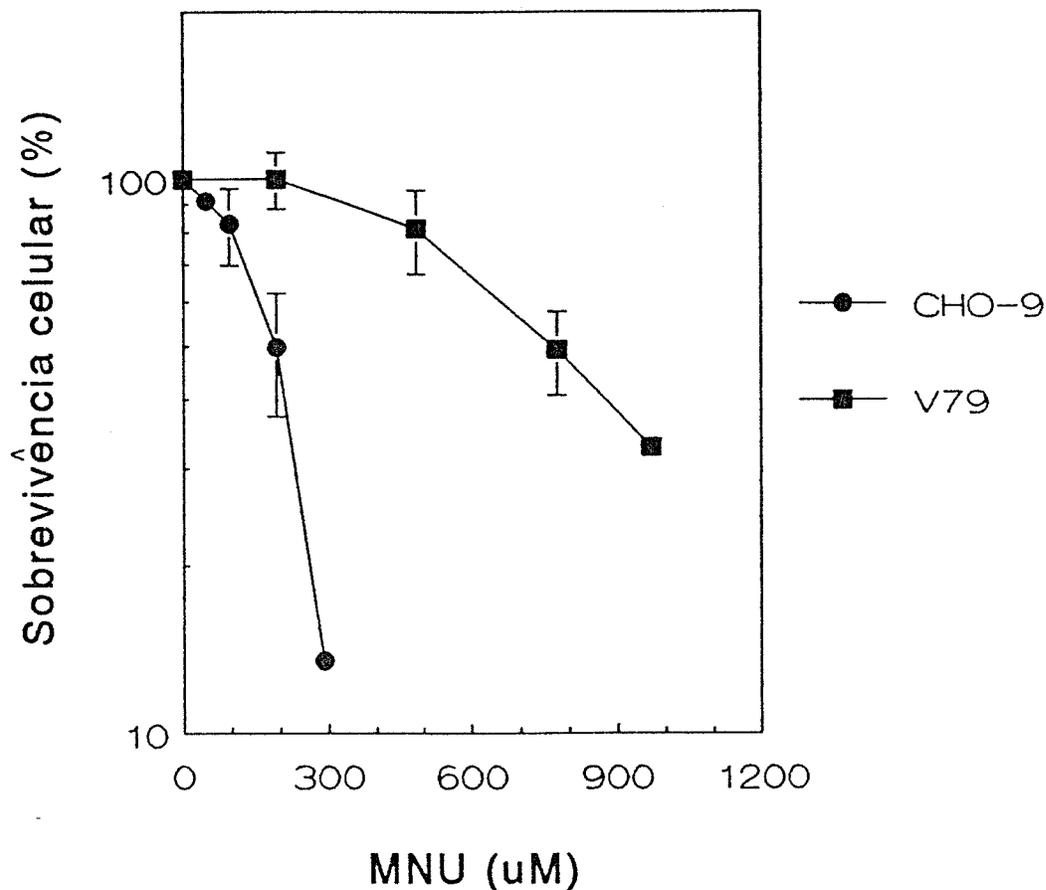


FIGURA 10. Curvas de sobrevivência de células V79 e CHO-9 tratadas com MNU.

Células em suspensão (2×10^6 cél./ml) foram expostas a diferentes concentrações de MNU por 2 horas e depois semeadas em placas para o crescimento clonal (200 cél./placa). Após 7 dias de crescimento, as colônias foram fixadas, coradas e contadas como descrito em Materiais e Métodos (item 4). A taxa de sobrevivência foi expressa em porcentagens, em relação ao número de clones sobreviventes nas placas-controle. Cada ponto corresponde ao valor médio de 3 experimentos independentes, com os respectivos desvios-padrão. A ausência de desvios em alguns pontos deve-se à inclusão dos mesmos dentro dos respectivos símbolos.

bases de DNA. Para isso, tratamos as células CHO-9 e V79 com doses crescentes do agente *etilante* ENU.

Os resultados apresentados na *Figura 11* demonstram que ambas as linhagens celulares mostraram-se igualmente sensíveis aos efeitos letais induzidos pela ENU ($p < 0,001$), de maneira dependente de dose, sendo $D_{37} = 2990 \mu\text{M}$, para ambas as linhagens.

3. Efeitos genotóxicos da MNU

A diferente sensibilidade apresentada pelas células V79 e CHO-9 aos efeitos letais induzidos pela MNU levou-nos a analisar as respostas das duas linhagens celulares à indução de alterações cromossômicas. Os resultados apresentados a seguir mostram as frequências de aberrações cromossômicas e TCIs induzidas pela MNU.

a) Indução de aberrações cromossômicas pela MNU

A *Tabela 3* resume os dados relativos à indução de diferentes tipos de AC em células V79 e CHO-9, após tratamento com doses crescentes de MNU. Na *Figura 12* estão representados os valores totais obtidos para cada dose de MNU. As análises foram feitas em metáfases de primeiro (22 horas após o tratamento) e segundo ciclos (36 e 40 horas após o tratamento). Os dados da tabela demonstram que as células V79 mostraram-se

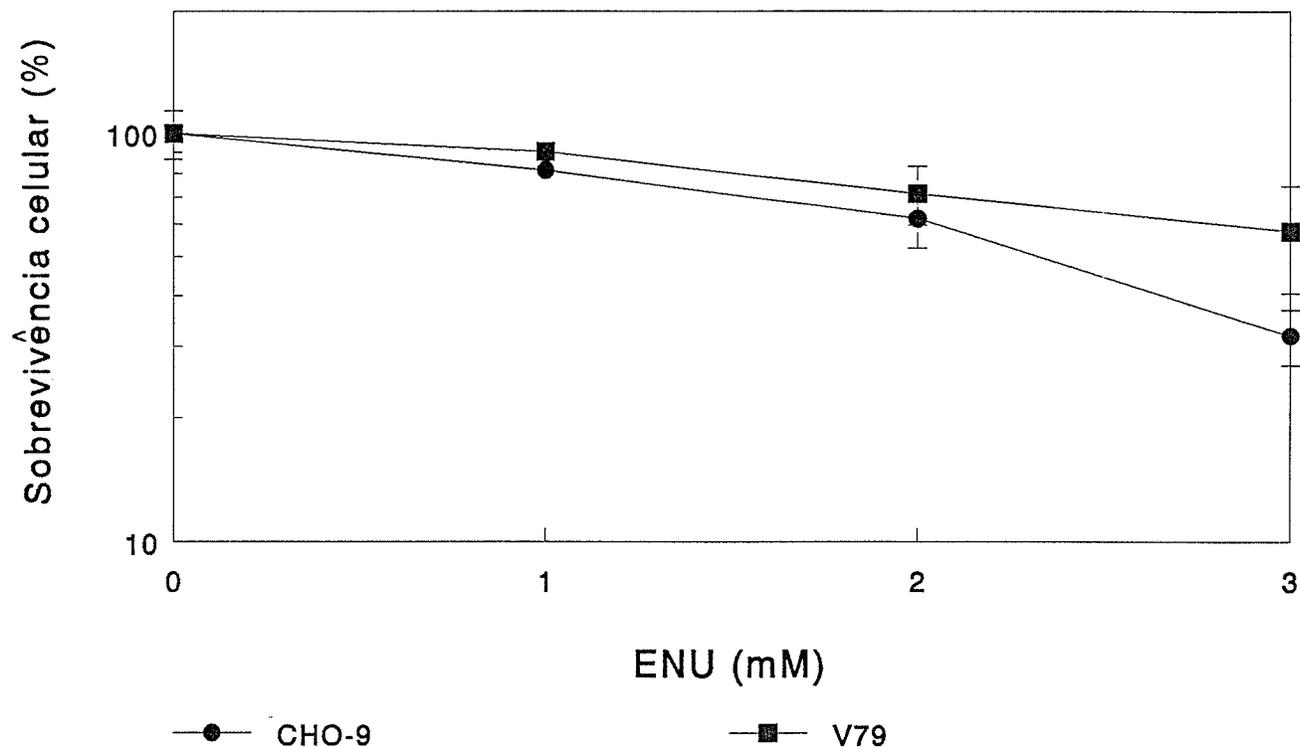


FIGURA 11. Curvas de sobrevivência de células V79 e CHO-9 tratadas com ENU.

Células em suspensão (2×10^6 cél./ml) foram expostas a diferentes concentrações de ENU por 2 horas e depois semeadas em placas para o crescimento clonal (200 cél./placa). Após 7 dias de crescimento, as colônias foram fixadas, coradas e contadas como descrito em Materiais e Métodos (item 4). A taxa de sobrevivência foi expressa em porcentagens, em relação ao número de clones sobreviventes nas placas-controle. Cada ponto corresponde ao valor médio de 3 experimentos independentes, com os respectivos desvios-padrão. A ausência de desvios em alguns pontos deve-se à inclusão dos mesmos dentro dos respectivos símbolos.

resistentes à indução de AC após exposição à MNU: mesmo nas concentrações mais elevadas deste composto, as frequências de aberrações foram semelhantes às observadas em células não tratadas.

A resposta das células CHO-9 ao tratamento com MNU, entretanto, foi completamente distinta. Os resultados mostraram um aumento da frequência de aberrações em metáfases de segundo ciclo, analisadas 36 e 40 horas após o tratamento ($p = 0.0023$). Esse aumento na frequência total de aberrações resulta, principalmente, de uma elevada frequência de rearranjos inter-cromatídicos.

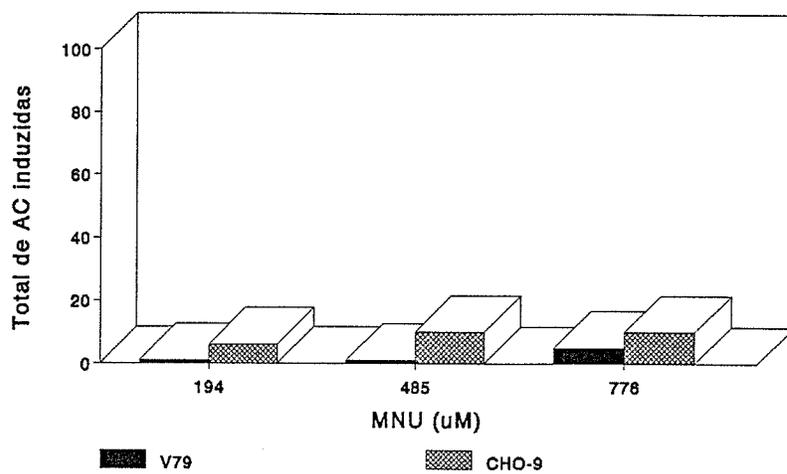
b) Indução de trocas entre cromátides irmãs

As TCIs induzidas pelo tratamento das células CHO-9 e V79 com MNU estão representadas na *Tabela 4* e *Figura 13*. O tratamento com concentrações crescentes de MNU elevou significativamente as frequências de TCIs em células CHO-9 ($p < 0,001$), de forma dependente de dose. Entretanto, as células V79, de modo similar ao tratamento com STZ, mostraram-se mais resistentes ao tratamento com MNU. É importante salientar que, a STZ e MNU foram igualmente efetivas na indução de TCIs em ambas as linhagens celulares.

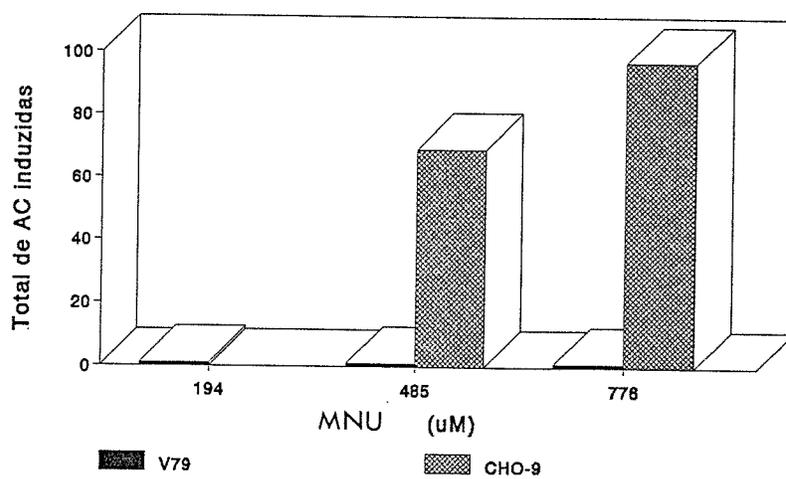
linhagem celular	tempo de fixação (h)	MNU (μ M)	células lesadas (%)	quebras cromatídicas	rearranjos intercromátide	cromossômicos intracromátide	quebras cromossômicas	anéis	fragmentos	falhas	metáfases pulverizadas	total de lesões
V79	22	0	8	3			2		1	4		10
V79	22	194	2	2								2
V79	22	485	9	4		5	1			1		11
V79	22	776	12	1			3		1	10		15
V79	36	0	7	3		2			1	2		8
V79	36	194										0
V79	36	485	1					1				1
V79	36	776	1	1								1
V79	40	0	6			3				1		4
V79	40	194	2	1		1						2
V79	40	485	4	2	1					1		4
V79	40	776	7	5	1					2		8
CHO-9	22	0	11	3		6				2		11
CHO-9	22	194	14	4	1	2				10		17
CHO-9	22	485	20	7		4	3		1	6		21
CHO-9	22	776	18	9	1	9				2		21
CHO-9	36	0	10	2		4	2			1		9
CHO-9	36	194	3	3	2		1					6
CHO-9	36	485	41	9	54	7	2	1			5	78
CHO-9	36	776	52	22	54	5	1	2	10		12	106
CHO-9	40	0	3	1			6					7
CHO-9	40	194	23	9	19			2	2			32
CHO-9	40	485	42	21	56	1		1	7		6	92

TABELA 3. Indução de aberrações cromossômicas em células CHO-9 e V79 expostas à MNU

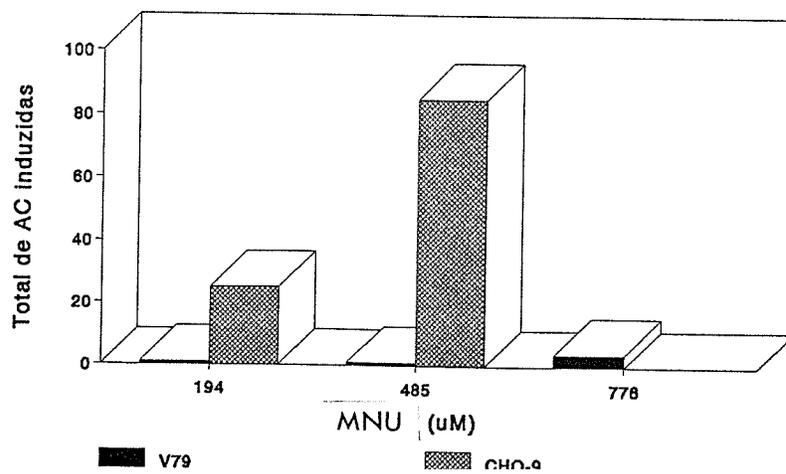
PAINEL A (22h)



PAINEL B (36h)



PAINEL C (40h)



linhagem celular	MNU (uM)	TCI/ célula
V79	0	3.3 (+/- 1.9)
V79	194	15.3 (+/- 6.3)
V79	485	26.7 (+/- 8.9)
V79	776	29.3 (+/- 8.1)
CHO-9	0	3.6 (+/- 2.7)
CHO-9	194	31.4 (+/- 14.0)
CHO-9	485	51.4 (+/- 14.8)
CHO-9	776	55.6 (+/- 11)

TABELA 4. Indução de TCIs em células CHO-9 e V79 tratadas com MNU.

As células foram tratadas em suspensão (2×10^6 cél./ml) com diferentes concentrações de MNU por 2 horas e, a seguir, cerca de 10^6 células/placa foram cultivadas em meio de cultura contendo $10 \mu\text{M}$ de BrdU durante um período correspondente a dois ciclos celulares. As TCIs foram visualizadas por coloração Giemsa, conforme descrito em Materiais e Métodos (item 7a). Estão representados os valores médios de 2 experimentos independentes, com os respectivos desvios-padrão.

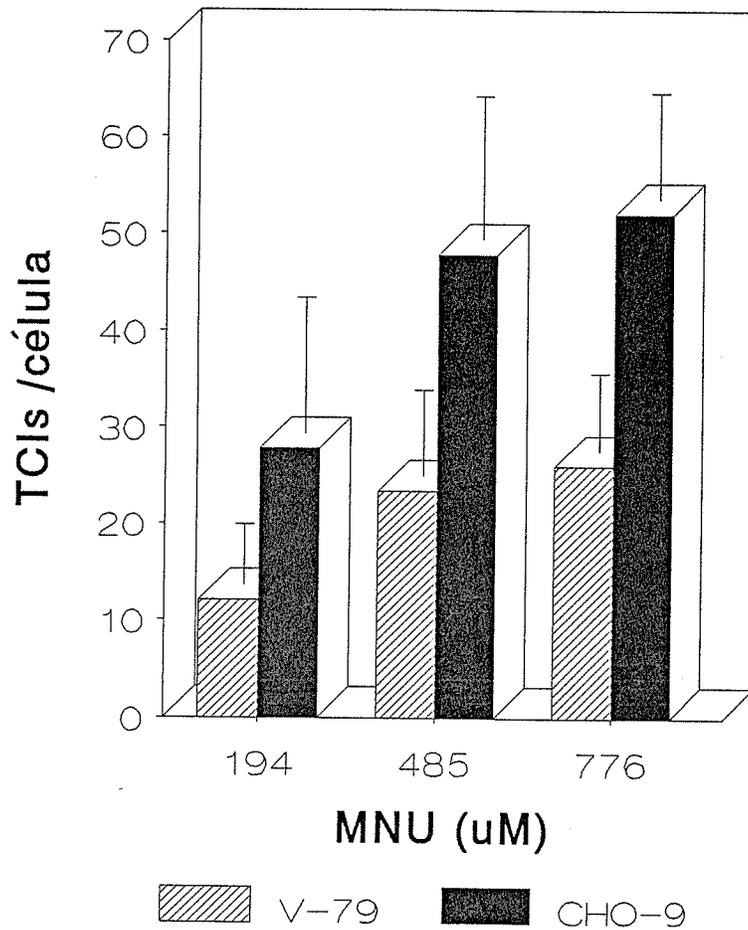


FIGURA 13. Indução de TCIs em células CHO-9 e V79 tratadas com MNU

As curvas representam os valores totais das TCIs induzidas pela MNU em células CHO-9 e V79, de acordo com os valores apresentados na Tabela 4.

III. Detecção de Bases Metiladas no DNA

O fenômeno de resistência celular apresentado pelas células V79 poderia ser explicado por diferenças celulares quanto à extensão de metilação de bases de DNA, ou quanto à velocidade de sua remoção. Para verificação destas hipóteses, analisamos, primeiramente, os níveis dos adutos N7-metilguanina (N7-MetGua) e O⁶-metilguanina (O⁶-MetGua) induzidos pelo tratamento das células CHO-9 e V79 com STZ, e, posteriormente, as capacidades celulares de reparo dessas lesões.

1. Indução de N7-MetGua e O⁶-MetGua no DNA de células CHO-9 e V79

O rendimento dos adutos N7-MetGua e O⁶-MetGua do DNA de células CHO-9 e V79 expostas à STZ foi determinado através de análise por HPLC com detecção eletroquímica, e expresso pelo número de bases alteradas por 10⁶ nucleotídeos. A *Tabela 5* e a *Figura 14* mostram a quantidade de base metilada produzida em função da concentração de STZ, nas duas linhagens celulares. Observamos que as proporções de O⁶-MetGua (painel A) e de N7-MetGua (Painel B) aumentam em função do aumento da concentração de STZ, de maneira equitativa, em ambas as linhagens ($p < 0,001$). A lesão N7-MetGua é induzida em maior extensão do que a O⁶-MetGua, nas duas linhagens celulares.

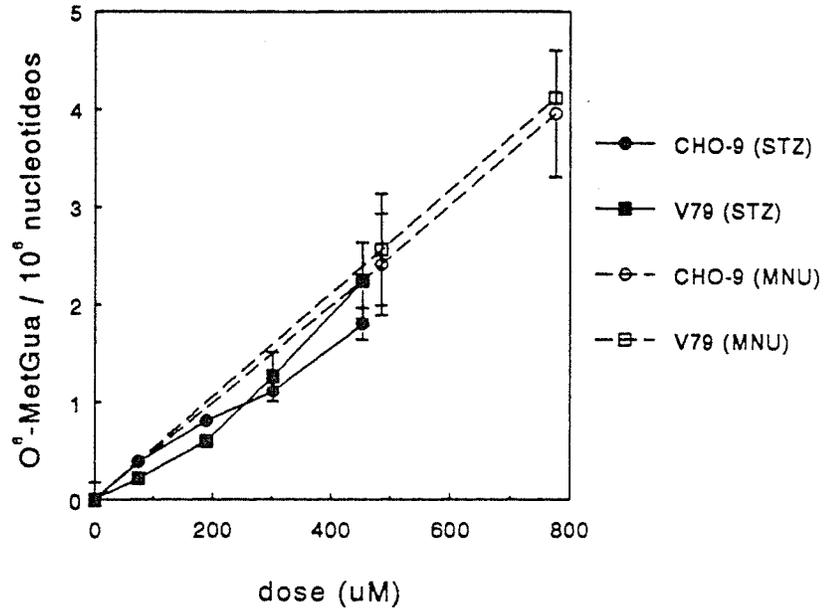
n* = número de experimentos independentes

linhagem celular	agente	dose (μM)	O ⁶ -MetGua por milhão de nucleotídeos	n*	N ⁷ -MetGua por milhão de nucleotídeos	n*
CHO-9	STZ	0	0.01 (+/- 0.01)	2	0.630 (+/- 0.04)	2
CHO-9	STZ	75	0.40 (+/- 0.03)	2	4.280 (+/- 0.19)	2
CHO-9	STZ	189	0.82 (+/- 0.04)	2	11.05 (+/- 0.95)	2
CHO-9	STZ	302	1.12	1	14.50 (+/- 0.18)	2
CHO-9	STZ	453	1.81 (+/- 0.16)	2	21.36 (+/- 0.36)	2
V79	STZ	0	0.18 (+/- 0.18)	3	0.610 (+/- 0.30)	3
V79	STZ	75	0.40 (+/- 0.04)	2	3.670 (+/- 0.20)	2
V79	STZ	189	0.78 (+/- 0.06)	2	8.690 (+/- 0.26)	3
V79	STZ	302	1.44 (+/- 0.25)	3	13.15 (+/- 1.47)	2
V79	STZ	453	2.42 (+/- 0.39)	2	19.13 (+/- 0.48)	2
CHO-9	MNU	0	0.53 (+/- 0.01)	2	0.440 (+/- 0.44)	2
CHO-9	MNU	194	0.49	1	13.56	1
CHO-9	MNU	485	2.94 (+/- 0.52)	2	26.62 (+/- 4.87)	2
CHO-9	MNU	776	4.48 (+/- 0.65)	2	44.63 (+/- 6.00)	2
V79	MNU	0	0.00	2	1.800 (+/- 1.72)	2
V79	MNU	194	0.00	2	7.70	1
V79	MNU	485	2.56 (+/- 0.57)	2	30.86 (+/- 8.10)	2
V79	MNU	776	4.11 (+/- 0.09)	2	52.87 (+/- 8.44)	2

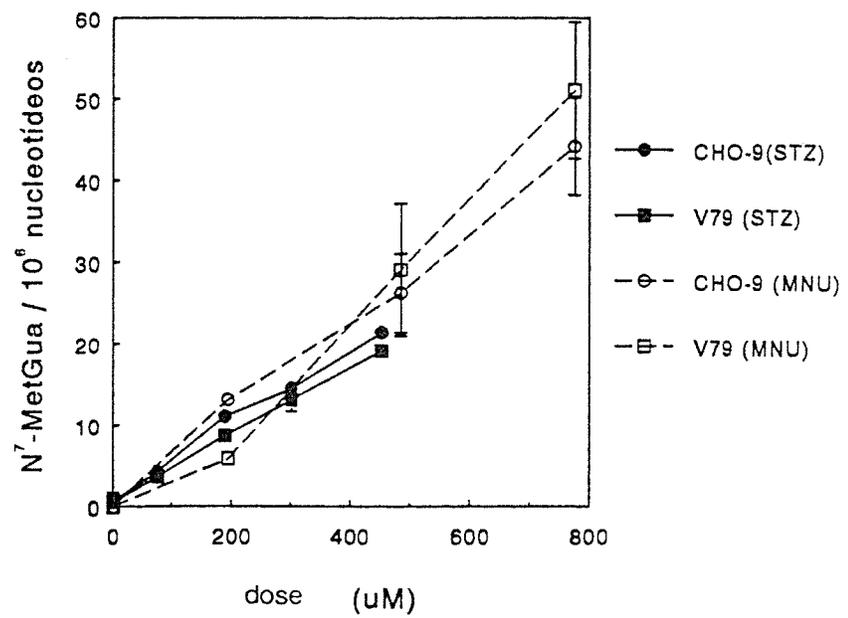
TABELA 5. Indução de N⁷-MetGua e O⁶-MetGua no DNA de células CHO-9 e V79 expostas à STZ.

Cerca de 30×10^6 células foram tratadas em suspensão (2×10^6 cél./ml) com diferentes concentrações de STZ. A seguir, o DNA celular foi imediatamente isolado para medidas do rendimento das lesões O⁶-MetGua e N⁷ MetGua em HPLC com detecção eletroquímica, conforme descrito em Materiais e Métodos (ítems 10 e 11). Estão representados os valores médios obtidos, com os respectivos desvios-padrão.

PAINEL A



PAINEL B



Na maior concentração de STZ utilizada (453 μM), por exemplo, detectamos uma fração de aproximadamente 20 adutos N⁷-MetGua/10⁶ nucleotídeos, enquanto que, apenas cerca de 2 adutos O⁶-MetGua/10⁶ nucleotídeos foram detectados, em ambas as linhagens celulares. Comparativamente, analisamos a formação desses adutos em células expostas à MNU. Também aqui, os rendimentos das bases metiladas O⁶-MetGua e N⁷-MetGua foram similares em ambas as linhagens.

2. Reparo das lesões N⁷-MetGua e O⁶-MetGua

Vários estudos demonstraram, anteriormente, que linhagens celulares de roedores são deficientes na remoção das lesões O⁶-metilguanina (Mer⁻) e possuem baixa atividade de reparo-excisão (Warren e col., 1979; Van Zeeland e col., 1981). Com a finalidade de confirmar esta característica e, sobretudo, de comparar as eficiências celulares de eliminação da lesão N⁷-MetGua, medimos a quantidade de lesões remanescentes 24 horas após a exposição das células à STZ. Os resultados apresentados na *Tabela 6* demonstram que, no caso da base O⁶-MetGua não houve nenhuma remoção significativa de lesões, tanto em células CHO-9 como em V79, como esperado para células Mer⁻. Entretanto observou-se uma remoção de resíduos N⁷-metilguanina 24 horas após o tratamento, corrigindo-se os dados obtidos pelo cálculo dos fatores de diluição.

linhagem celular	n*	tempo de reparo (h)	O6-MetGua / milhão de nucleotídeos	N7-MetGua / milhão de nucleotídeos
CHO-9	2	0	1.79 (+/- 0.33)	16.71 (+/- 1.0)
CHO-9	2	24	1.22 (+/- 0.16)	6.75 (+/- 0.4)
V79	2	0	1.45 (+/- 0.21)	18.4 (+/- 1.64)
V79	2	24	1.56 (+/- 0.57)	10.97 (+/-5.0)

n* = número de experimentos independentes

TABELA 6. Reparo das lesões O⁶-MetGua e N7-MetGua em células CHO-9 e V79 expostas à STZ.

Cerca de 30×10^6 células foram tratadas em suspensão (2×10^6 cél./ml) com uma dose de $302 \mu\text{M}$ de STZ, por 2 horas. A seguir, o DNA celular foi imediatamente isolado para medidas da remoção das lesões O⁶-MetGua e N7-MetGua, imediatamente ou 24 horas após o tratamento. As medidas foram feitas em HPLC com detecção eletroquímica, conforme descrito em Materiais e Métodos (itens 10 e 11). Cada ponto representa o valor médio de pelo menos duas determinações independentes e as barras correspondem aos respectivos desvios-padrão.

As taxas de remoção de N7-MetGua foram semelhantes em ambas as linhagens celulares ($p = 0.075$).

IV. Inibição da síntese de DNA e do progresso do ciclo celular

Há muito se sabe que, na maioria dos organismos, as lesões de DNA induzem uma resposta celular imediata, que é a inibição da síntese de DNA, após a exposição ao agente genotóxico.

Atualmente, é reconhecido também que as lesões de DNA causam um atraso na progressão do ciclo celular e na entrada em mitose, tanto em organismos procarióticos, como eucarióticos (Fornace e col., 1989). Tendo em vista esses fatos, decidimos analisar os efeitos da STZ a nível da síntese de DNA e da atividade mitótica de células CHO-9 e V79, procurando esclarecer as diferentes sensibilidades dessas células à STZ.

1. Inibição da replicação de DNA

A taxa de síntese de DNA foi medida pela incorporação de ^3H -timidina, 60 min. após a exposição a diferentes concentrações de STZ (*Figura 15a*). Os resultados mostram que o tratamento com STZ causou uma inibição das taxas de replicação de DNA, dependente da concentração de STZ. Essa

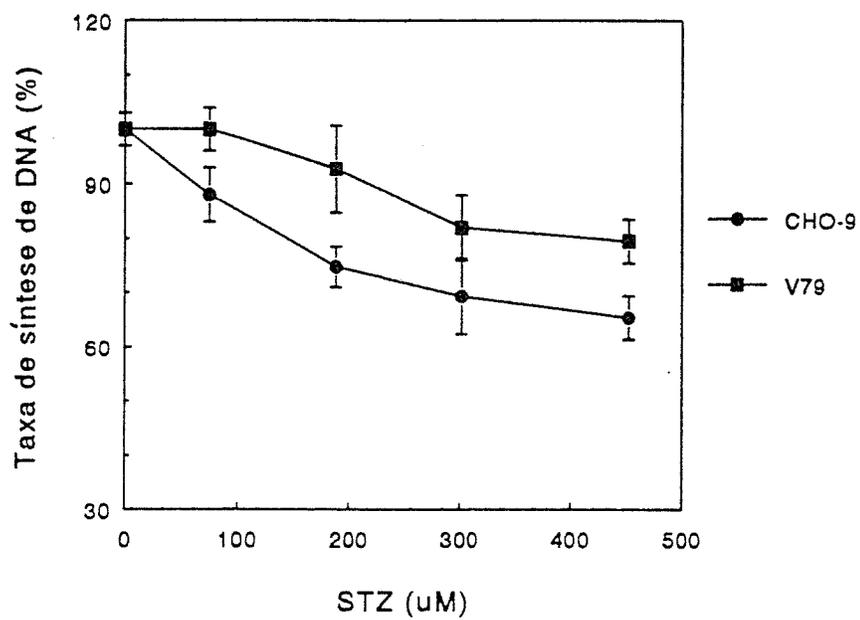
inibição é limitada, observando-se apenas uma redução de 30% nos níveis de síntese de DNA após a exposição das células à concentração máxima de STZ de 452 μM . Análises estatísticas revelaram que as taxas de replicação de DNA foram inibidas de maneira semelhante em ambas as linhagens celulares ($p = 0.008$).

Procuramos então verificar se a cinética de recuperação de síntese de DNA era diferente nas duas linhagens celulares. Para isso, as medidas de incorporação de ^3H -timidina foram feitas em diferentes intervalos de incubação após o tratamento. Os resultados apresentados na *Figura 15b* nos mostram que o tratamento com STZ levou à uma inibição máxima de 30% nas taxas de síntese de DNA, observada 3 horas após o tratamento. Pode-se observar também que, após esse intervalo, os níveis de síntese sofreram uma recuperação lenta, atingindo 20% 7 horas após o tratamento. Novamente, nenhuma diferença significativa foi observada nas respostas das células CHO-9 e V79 ($p = 0,0061$).

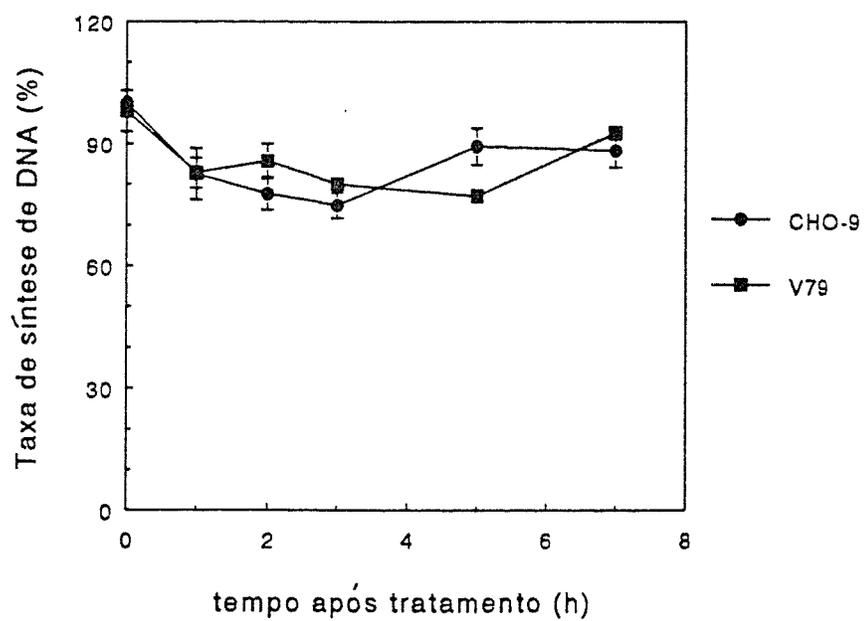
2. Indução de atraso na progressão do ciclo celular

A observação das colônias nos experimentos de sobrevivência celular já sugeria que o tratamento com STZ ou MNU poderia estar afetando os ciclos celulares das linhagens V79 e CHO-9 de maneira diferente. Isso porque os clones celulares de células CHO-9 mostravam-se sempre menores do que os clones da linhagem V79. Por esta razão, analisamos os

PAINEL A

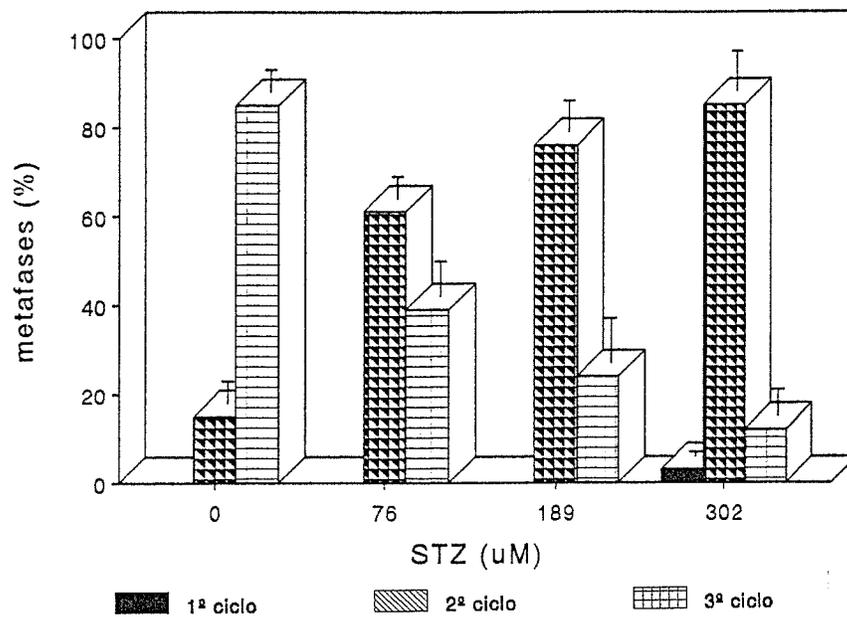


PAINEL B

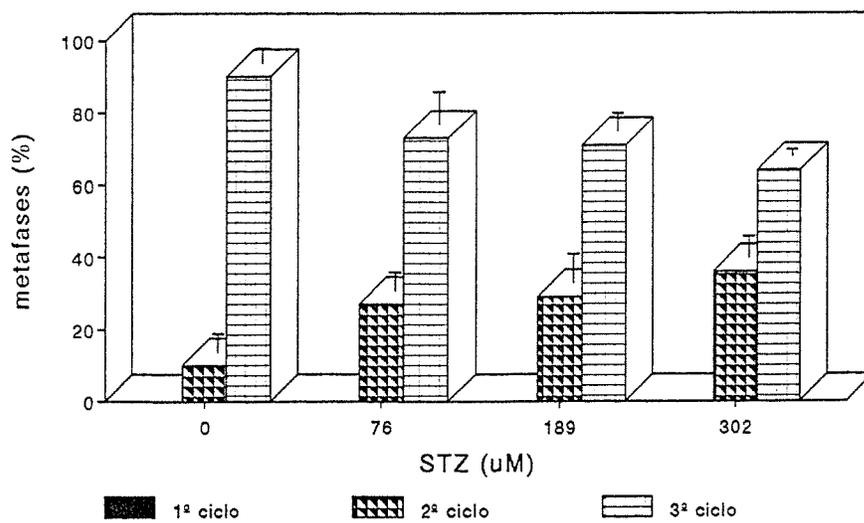


efeitos da STZ na porcentagem de células CHO-9 e V79 em diferentes fases do ciclo celular (*Figuras 16a e 16b*, respectivamente). A exposição das células CHO-9 a concentrações crescentes de STZ levou a um aumento progressivo do número de células no segundo ciclo e a uma diminuição, também progressiva, da população no terceiro ciclo (*Figura 16a*). Esse resultado mostra que a STZ causa um atraso da progressão do ciclo celular nas células CHO-9, de maneira dependente de dose. Entretanto, nas células V79, este efeito foi bastante discreto, não ocorrendo grandes variações nos índices mitóticos com o aumento da concentração de STZ utilizada (*Figura 16b*).

PAINEL A



PAINEL B



V. DISCUSSÃO

O clone mutante EM-C11, recentemente isolado e caracterizado pela sua hiper sensibilidade a EMS e MMS, vem sendo continuamente testado quanto a sua sensibilidade a diferentes compostos genotóxicos (Zdzienicka e col., 1992). A utilização desta linhagem celular em nosso trabalho se justificava em termos da busca de identificação de células mutantes especialmente sensíveis à STZ. Entretanto, a exposição das células EM-C11 à STZ revelou uma sensibilidade apenas um pouco maior do que as células parentais CHO-9 (1.3 vezes). Resultados anteriores demonstraram que estas células mutantes mostraram-se também apenas ligeiramente mais susceptíveis que a linhagem parental ao tratamento com mitomicina C (1.6 vezes) e ENU (2 vezes) (Zdzienicka e col., 1992). Estas diferenças nas susceptibilidades celulares aos efeitos tóxicos de diferentes agentes alquilantes são conseqüências prováveis de diferenças quanto ao mecanismo de ação de cada composto em particular e, sobretudo, quanto à maneira pela qual as células lidam com as diversas lesões introduzidas na molécula de DNA.

Dados de literatura mostram que a STZ induz quebras na molécula de DNA de maneira dependente de dose (Yamamoto e col., 1981; LeDoux e col., 1986). Assim, o maior índice de mortalidade celular induzido nas células EM-C11 pela STZ, em comparação às células parentais CHO-9, poderia ser explicado pelo reparo defectivo de quebras de DNA observado nestas células (Zdzienicka e col., 1992). A presença de quebras duplas de DNA em maior proporção nas células EM-C11 poderia explicar a maior frequência de aberrações

cromossômicas induzida nestas células pela STZ (Obe e col., 1982; Natarajan e Obe, 1984), em concordância com dados obtidos após tratamento desta linhagem celular com EMS (Zdzienicka e col., 1992). A indução majoritária, pela STZ, de aberrações do tipo cromatídicas, reflete uma característica demonstrada para os agentes alquilantes em geral (Schwartz, 1989). A menor frequência de aberrações cromossômicas observada nas células mutantes e parentais expostas a doses mais elevadas de STZ (452 μM) deve-se, provavelmente, à alta mortalidade celular resultante de alterações cromossômicas letais.

Nossos resultados mostraram que a STZ foi capaz de induzir TCIs nas três linhagens celulares, embora com menor eficiência nas células V79. Sob esse parâmetro, as células mutantes apresentaram uma resposta similar às células parentais, mostrando um aumento similar da frequência de TCIs em função da dose de STZ. Entretanto, nas células mutantes, foi observada uma alta frequência espontânea de TCIs, em consequência da incorporação de BrdU no DNA celular. Este análogo de timidina é bastante instável, induzindo quebras de cadeia e, conseqüentemente, a formação de trocas cromatídicas (Latt e col., 1981). Por esse motivo, nas células mutantes foi utilizada uma variante da técnica de detecção de TCIs, onde as células foram tratadas com baixas concentrações de BrdU (1 μM), na presença de FdU e dCyt, o que permitiu, pela primeira vez, a análise da indução de TCIs em células EM-C11, após exposição a um agente genotóxico. Nas células parentais CHO-9, a frequência de TCIs mostrou-se independente da faixa de concentração de BrdU utilizada. Este dado está em concordância com

resultados obtidos anteriormente (Pinkel e col., 1985). As células EM-C11 e CHO-9 mostraram-se igualmente sensíveis à indução de mutações em locus ouabaina (pontuais), embora maiores frequências de mutantes HPRT⁻ tenham sido observadas nas células mutantes. O reparo deficiente das quebras de DNA nestas células poderia explicar as maiores frequências de mutantes HPRT⁻, uma vez que estes são originados não só por mutações pontuais, mas também por macroalterações cromossômicas, como deleções e translocações, originadas pela presença de quebras na molécula de DNA. Entretanto, a principal característica aqui identificada, a expressiva diferença de sensibilidade das linhagens CHO-9 e V79 frente à STZ, não encontra explicações fundamentadas na literatura: ambas as linhagens fibroblásticas são originárias de uma mesma espécie, são igualmente deficientes em reparo excisão (Van Zeeland e col., 1981) e deficientes na atividade da enzima DNA-metiltransferase (Warren e col., 1979; Kaina, 1987). Quanto à indução de mutações gênicas, observou-se uma frequência similar de mutações no locus HPRT nas duas linhagens parentais. Essa resposta, aparentemente discrepante das anteriores, encontra explicação nas evidências de literatura mostrando que os efeitos citotóxicos e mutagênicos de agentes alquilantes constituem fenômenos diferentes, causados, provavelmente, por lesões também diferentes (Baker e col., 1979; Suter e col., 1980; Morris e col., 1982; Samson e Linn, 1987). A capacidade da STZ em induzir AC, TCIs e mutações gênicas aqui demonstrada está em concordância com demonstrações anteriores de sua capacidade genotóxica *in vivo* (Reddy e col., 1984; Tyson e Mirsalis,

1985; Hard, 1985; Liegibel e col., 1992) e *in vitro* (Buyan, 1970; Tokuda e Bodell, 1988).

Nossos resultados indicam que o fenômeno de resistência celular da linhagem V79 não está relacionado com um mecanismo específico de toxicidade da STZ, uma vez que estas células mostraram-se também mais resistentes a um outro agente metilante, a MNU, como evidenciado pelas menores taxas de morte celular, AC e TCIs observadas nestas células, em comparação com a linhagem CHO-9. Além disso, o fato de ambas as linhagens serem igualmente sensíveis aos efeitos tóxicos da ENU indica que a resistência das células V79 é provavelmente restrita à ação tóxica de agentes metilantes.

Como apontado por Calsou e Salles, (1993), vários mecanismos podem estar envolvidos no fenômeno de resistência celular aos efeitos tóxicos de agentes alquilantes: (1) absorção diferencial do agente; (2) vias diferentes de metabolismo; (3) diferenças em sistemas de reparo de DNA. A análise da eficiência de produção de lesões no DNA pela STZ e MNU, medida pela quantificação dos adutos N7-MetGua e O⁶-MetGua, revelou que esses agentes metilantes foram igualmente efetivos na metilação do DNA de ambas as linhagens celulares. Isso elimina a possibilidade de absorção ou de bioconversão diferencial desses agentes pelas células. Parece, portanto, que as diferentes sensibilidades das células CHO-9 e V79 aos agentes metilantes acima está mais intrinsecamente relacionada com as diferentes maneiras pelas quais as células lidam com as lesões de DNA, do que com a eficiência de indução das lesões propriamente ditas. Os

valores de D_{37} obtidos após exposição das células V79 à STZ (3770 μ M) e MNU (920 μ M) evidenciam esta hipótese: apesar de induzir o mesmo número de lesões, a MNU mostrou-se mais tóxica do que a STZ. As medidas da produção de lesões no DNA celular revelaram que ambos os compostos induziram maiores frequências de adutos N7-MetGua em comparação à O⁶-MetGua, em concordância com dados da literatura (LeDoux e col., 1986). A lesão O⁶-MetGua é uma lesão mutagênica (Loveless, 1969); assim, a eficiência de produção de O⁶-MetGua está diretamente relacionada à indução de mutações em células tratadas com agentes metilantes. Nossos dados confirmam este fato, uma vez que a frequência de mutantes HPRT⁻ induzidos pela STZ aumentou linearmente em função da concentração de O⁶-MetGua, tanto em células V79 como CHO-9. Além de mutagênica, esta lesão é também considerada citotóxica e o processo de resistência celular a agentes metilantes parece estar associado à capacidade de remoção desta lesão pela enzima MGMT nas células de mamíferos (revisto em Pegg e Byers, 1992). Nossos resultados mostraram que as lesões O⁶-MetGua induzidas pela STZ não são eliminadas do DNA das células CHO-9, nem das V79, no período de 24 horas subsequente ao tratamento, indicando a ausência da atividade de MGMT nessas células. Isto está de acordo com a literatura, em vista da caracterização das células de roedores como fenótipo Mer⁻ (Warren e col., 1979; Day e col., 1980). Assim, a sensibilidade diferencial das células CHO-9 e V79 à STZ parece ser independente do reparo da lesão O⁶-MetGua. A possibilidade de que um reparo diferencial de outras bases metiladas, como a 3-MetGua, N7-

MetGua e/ou 3-MetAde, possa ser responsável pela resistência observada em células V79 não parece provável. Os dados obtidos mostraram que ambas as linhagens celulares foram igualmente eficientes na eliminação dos adutos N7-MetGua. Além disso, estudos recentes sobre o reparo das lesões 3-MetAde induzidas por STZ em diferentes linhagens tumorais humanas mostram que as atividades da enzima 3-metiladenina-DNA-glicosilase não variam significativamente entre as diferentes linhagens para explicar as diferenças de sensibilidade encontradas (Fram e Robichaud, 1990).

Nossos resultados indicam, portanto, que as células V79 são capazes de tolerar as lesões de DNA induzidas pela STZ. Recentemente, foi verificada a existência de mecanismos de tolerância que protegem células Mer⁻ dos efeitos tóxicos de agentes metilantes (Karran e Bignami, 1992) e, atualmente, concentra-se grande atenção na identificação da causa molecular determinante desse fenômeno (Fritz e col., 1993). Parece ser um consenso que a O⁶-MetGua é a lesão tolerada pelas linhagens celulares resistentes, e algumas hipóteses têm sido propostas para explicar esse processo de tolerância, com base na falha ou perda do sistema de reconhecimento de pareamentos errôneos (Aquilina e col., 1989) ou na habilidade celular de replicar a molécula de DNA contendo lesões (reparo-pós replicação) (Bouffler e col., 1990; Godfrey e col., 1992). A operação destes mecanismos, entretanto induz um aumento nas taxas de mutação, devido à persistência da lesão pré-mutagênica O⁶-MetGua no DNA celular (Goldmacher e col., 1986; Ishida e Utsumi, 1990).

Entretanto, nossos resultados mostraram que as células V79 apresentam os mesmos índices mutacionais que as células CHO-9. Este fato parece indicar que as células V79 possuem um mecanismo desconhecido de tolerância à metilação de DNA, que lhes confere proteção à indução de aberrações cromossômicas, TCIs e morte celular, mas que não altera os índices de mutação. Este mecanismo parece ser deficiente em células CHO-9. A existência de genes que conferem resistência aos efeitos tóxicos de agentes metilantes já foi evidenciada, através de experimentos de transfecção de células CHO com DNA humano (Kaina e col., 1987), e estudos recentes relatam o isolamento e clonagem do gene humano (c81), cujo cDNA confere resistência às células CHO aos efeitos tóxicos de MNNG, e MMS após transfecção (Fritz e col., 1993). Entretanto, tanto as células resistentes transfectadas como as não transfectadas expressam um RNAm que hibridiza com a proteína produzida pelo gene c81; porém, as células resistentes transfectadas exibem uma maior concentração do produto gênico. Este fato nos permite supor que uma sub-expressão deste gene poderia ser responsável pelo aumento de sensibilidade das células CHO-9 aos agentes metilantes STZ e MNU ou, a resistência das células V79 poderia estar relacionada a uma super-expressão do produto do gene c81. Embora não esteja ainda estabelecida a função deste produto gênico, Fritz e colaboradores (1993) propuseram que o mesmo poderia exercer um papel a nível de regulação do ciclo celular, com base na sua expressão aumentada em células confluentes e na maior dependência de soro para a proliferação dos clones transfectados.

A investigação dos mecanismos de controle do ciclo celular sofreu um grande avanço nesta última década, a partir da descoberta das ciclinas, proteínas que são sintetizadas e degradadas ciclicamente, acumulando-se na fase S do ciclo celular e desaparecendo no final da mitose (Evans e col., 1983). O ciclo celular passou a ser entendido como uma série de eventos ordenados e independentes, controlados por mecanismos ativos em pontos específicos, designados *checkpoints*, e não por fatores intrínsecos aos eventos propriamente ditos (Hartwell e Weinert, 1989). Desde então foi postulado que a eliminação dos *checkpoints* poderia levar a uma maior susceptibilidade celular a agentes genotóxicos e à morte celular. Nossos resultados, mostrando um atraso na progressão do ciclo celular em células CHO-9 expostas à STZ, sugerem que sua maior sensibilidade a este agente genotóxico pode estar relacionada com a atividade de algum mecanismo ao nível do *checkpoint que regula a transição G1 → S ou G2 → M*. Está claramente estabelecido que, em organismos eucarióticos, o bloqueio da replicação do DNA por inibidores específicos ou pela presença de lesões de DNA, previne a entrada das células em mitose. Também a parada de síntese de DNA causada por alterações do *checkpoint* que controla a entrada em fase S levaria, conseqüentemente, a um impedimento da mitose (Hartwell e Weinert, 1989). Nossos dados sobre a inibição de síntese de DNA pela STZ mostram uma pequena inibição deste processo nas células CHO-9 e V79, medida imediatamente após o tratamento. Essa inibição deve ser consequência da presença de lesões no DNA da população de células ativas na replicação. Entretanto, não reflete o

processo a nível de população total, principalmente por não expressar o bloqueio da replicação que pode ocorrer a nível do *checkpoint* que controla a transição G1 → S, denominado *start*. As medidas dos índices mitóticos nos levam a supor que nas células CHO-9 estaria ocorrendo um bloqueio da replicação a nível do *checkpoint start*, enquanto nas células V79 não, o que lhes permitiria continuar seu processo normal de proliferação, passando para o segundo e terceiro ciclos celulares. O fato das células CHO-9 permanecerem estacionárias poderia explicar a alta frequência de aberrações cromossômicas e TCIs, em consequência da formação de quebras de DNA. A longa duração do bloqueio de replicons, próximos uns aos outros, aumenta a probabilidade de ocorrência de quebras em suas junções; estas quebras podem dar início a processos de recombinação, gerando AC e TCIs (Strauss, 1971; Kaina, 1979).

É evidente que estudos adicionais se tornam necessários a fim de se correlacionar o fenômeno da resistência celular aos efeitos de agentes metilantes observada nas células V79 com a expressão de genes específicos que controlam a sua entrada na fase S. Entretanto, ao nível hipotético, seria plausível e excitante pensar que alterações ao nível da expressão das ciclinas, ou de fatores regulatórios de suas atividades, seriam responsáveis pela maior sensibilidade das células CHO-9 a agentes metilantes. Alternativamente, outra hipótese interessante, com base na resposta diferencial das células CHO-9 e V79 à presença de lesões no DNA, seria a ação da STZ a nível da indução da expressão de genes que controlam ativa e especificamente a parada da proliferação

celular (*growth arrest specific genes*). Uma família de genes antiproliferativos de células de camundongo, os genes *gas*, foi recentemente descrita, e sua expressão é negativamente regulada pela estimulação da proliferação celular com soro fetal (Schneider e col., 1988). Um outro grupo de genes reguladores da parada da proliferação celular foi identificado em células de hamster (CHO), cuja expressão é induzida pelo tratamento com agentes genotóxicos (geralmente agentes metilantes), os genes *gadd* (*growth arrest DNA damage inducible genes*) (Fornace e col., 1992). A expressão aumentada dos genes tipo *gadd* foi recentemente detectada em ilhotas pancreáticas de rato e em cultura de células secretoras de insulina expostas à STZ ou à MMS (Eizirik e col., 1993). Em analogia com o que acontece com células beta hipersensíveis à STZ, é possível admitir que um gene antiproliferativo do grupo *gadd* seja induzido em células CHO-9 expostas à STZ ou MNU, cujo produto atuaria controlando negativamente a progressão do ciclo celular. A expressão basal desse gene nos fibroblastos V79 explicaria a habilidade das células de progredir no ciclo celular, e sua resistência à ação citotóxica e genotóxica da STZ e MNU. Entretanto, o papel dos genes *gadd* não é ainda conhecido.

A descoberta dos genes antiproliferativos abre novas perspectivas na área de investigação sobre o controle da proliferação celular. A identificação dos produtos destes genes e de suas funções, bem como o esclarecimento dos mecanismos que controlam sua expressão, e daqueles que a alteram, certamente trarão novos e importantes conhecimentos a nível dos processos fisiológicos de

regulação do crescimento celular e dos processos toxicológicos e patológicos correlatos.

VI. RESUMO

Os ensaios de curta duração demonstraram sua utilidade na previsão da atividade carcinogênica de compostos potencialmente genotóxicos. O presente trabalho explora as possibilidades destes ensaios na verificação do potencial genotóxico do composto carcinogênico estreptozotocina. Ao mesmo tempo, procurou-se aprofundar-se no estudo dos mecanismos moleculares relacionados à ação mutagênica e carcinogênica deste composto. Primeiramente, os efeitos citotóxicos da STZ foram avaliados em células de ovário de hamster Chinês, linhagem parental CHO-9, no clone mutante derivado de células CHO-9, EM-C11 e em células de pulmão de hamster chinês, linhagem V79. A habilidade deste composto em induzir aberrações cromossômicas, trocas entre cromátides irmãs (TCIs), mutações gênicas e morte celular foi analisada comparativamente nas três linhagens celulares. As células mutantes mostraram-se ligeiramente mais sensíveis aos efeitos letais induzidos pela STZ, em comparação com as células parentais CHO-9. As células EM-C11 também responderam ao tratamento com maiores frequências de aberrações cromossômicas, mas mostraram a mesma sensibilidade que as células parentais à indução de TCIs. Com relação à indução de mutações gênicas, ambas as linhagens celulares responderam com frequências similares de mutantes Na^+/K^+ -ATPase (ouabaina). Entretanto, as células EM-C11 responderam com maiores frequências de mutantes HPRT⁻. A maior sensibilidade destas células a alguns dos parâmetros biológicos estudados deve-se, provavelmente, à sua deficiência no processo de reparo

de quebras na cadeia de DNA (Zdzienicka e col., 1992). As células V79, entretanto, mostraram-se mais resistentes que as células CHO-9 aos efeitos letais da STZ. Observou-se também uma maior resistência da linhagem V79 à indução de morte celular pela MNU; entretanto ambas as linhagens celulares foram igualmente sensíveis aos efeitos letais induzidos por ENU. A resistência das células V79 não limitou-se aos efeitos de morte celular; elas mostraram-se também mais resistentes à indução de aberrações cromossômicas e TCIs pela STZ e MNU, assim como à inibição da progressão do ciclo celular pela STZ. Entretanto, a STZ foi igualmente efetiva em induzir mutantes HPRT⁻ em ambas as linhagens celulares. O fenômeno de resistência observado não deveu-se a uma alquilação diferencial da molécula de DNA, a diferenças no processo de remoção de bases lesadas ou no processo de inibição de replicação de DNA. Os resultados sugerem que algum mecanismo desconhecido de tolerância à metilação da molécula de DNA parece estar mais ativo em células V79, o qual poderia ser responsável pelas diferentes respostas observadas.

VII. Summary

Mechanisms underlying cytotoxicity by the monofunctional nitrosourea streptozotocin (STZ) were evaluated in Chinese hamster ovary cells, wild-type (CHO-9), in a mutant hypersensitive to alkylating agents, designated as EM-C11, and in the wild type V79 fibroblasts. The ability of STZ to induce chromosomal aberrations, cell killing, sister-chromatid exchanges (SCEs) and mutations was compared between the three cell lines. The mutant cells were found to be slightly more sensitive to STZ killing effects than the parental cell line. EM-C11 cells also responded with higher levels of STZ-induced chromosomal aberrations, but appeared to be equally sensitive to induction of SCEs. For the frequencies of induced mutations, both cell lines responded with similar frequencies of Na⁺/K⁺-ATPase-resistant mutants. However, EM-C11 cells responded with an increased frequency of HGPRT⁻ mutants. The hypersensitivity of this mutant cell line to some of the analyzed endpoints is probably due to a defective repair of DNA strand breaks (Zdzienicka et al., 1992). V79 cells, however, appeared to be more resistant than CHO-9 cells to the lethal effect of STZ. We also observed that this cell line was more resistant to treatment with MNU, but both cell lines were equally sensitive to the killing effects of ENU. V79 cells were also more resistant to STZ or MNU-induced chromosomal aberrations and SCEs, as well as, to inhibition of cell cycle progression by STZ. Nevertheless, STZ was equally effective in inducing HGPRT⁻ mutants in both cell lines. The observed resistance of V79 cells was not due to a differential alkylation of DNA molecule or

different levels of adducts removal, nor to differences in DNA synthesis inhibition rates. Our results suggest that some unknown tolerance mechanism that confers resistance to DNA methylation is more active in V79 cells, which could explain the differences in susceptibility found between the two cell lines.

VIII. Referências Bibliográficas

- Albertini, R.J. and R. DeMars (1973)** Somatic cell mutations. Detection and quantification of x-ray-induced mutation in cultured, diploid human fibroblasts. *Mut. Res.*, 18, 199-224.
- Andersson, P.J.; P.S. Schein; M.G. McMenamin and D.A. Cooney (1988)** Streptozotocin diabetes: correlation with extent of depression of pancreatic islet nicotinamide adenine dinucleotide. *J. Clin. Invest.*, 54, 672-677.
- Anderson, B.E.; E. Zeiger; M.D. Shelby; M.A. Resnick; D.K. Gulati; J.L. Ivett and K.S. Loveday (1990)** Chromosome aberration and sister chromatid exchange test results with 42 chemicals. *Environ. Mol. Mutagen.*, 16 Suppl 18, 55-137.
- Aquilina, G.; A. Zijno; N. Moscufo; E. Dogliotti and M. Bignami (1989)** Tolerance to methylnitrosourea-induced DNA damage is associated with 6-thioguanine resistance in CHO cells. *Carcinogenesis*, 10 : 7, 1219-1223.
- Ashby, J. and D. Paton (1993)** The influence of chemical structure on the extent and sites of carcinogenesis for 522 rodent carcinogens and 55 different human carcinogen exposures. *Mut. Res.*, 286 (1), 3-74.
- Baker, R.M.; D.M. Brunette; R. Mankovitz; L.H. Thompson; G.F. Whitmore; L. Siminovich and J.E. Till (1974)** Ouabain-resistant mutants of mouse and Chinese hamster cells. *Cell*, 1, 9-

21.

Baker, R.M. (1979) Nature and use of ouabain-resistant mutants. In: Hsie, A.W.; J.P. O'Neill and V.K. McElheny (Eds) Mammalian cell mutagenesis: the maturation of the test systems. New York, Cold Spring Harbor Laboratory, 237-247 (*Banbury Report*, 2).

Baker, R.M.; W.C. VanVoorhis and L.A. Spencer (1979) HeLa cell variants that differ in sensitivity to monofunctional alkylating agents, with independence of cytotoxic and mutagenic responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 76, 5233-5249.

Beraneck, D.T.; C.C. Weis, and D.H. Swenson (1980) A comprehensive quantitative analysis of methylated and ethylated DNA using high pressure liquid chromatography, *Carcinogenesis*, 1, 595-606.

Beraneck, D.T. (1990) Distribution of methyl and ethyl adducts following alkylation with monofunctional alkylating agents. *Mut. Res.*, 231, 11-30.

Bertini, R. P. Coccia; P. Pagani; C. Marinello; M. Salmona and D'Incalci (1990) Interferon inducers increase O⁶-alkylguanine-DNA-alkyltransferase in the rat liver. *Carcinogenesis*, 11, 181-183.

Bhuyan, J. (1970) The action of streptozotocin on mammalian cells. *Cancer Res.*, 30, 2017-2023.

Bloemhoff, H. and C.F.M. Valkenburg (1991) Sensitive Method for the determination of vincristine in human serum by high-performance liquid-chromatography after online column-extraction, *Biomedical appl. J. Chrom.*, 572, 171-179.

Boiteux, S.; O. Huisman and J. Laval (1984) 3-Methyladenine residues in DNA induce the SOS function *sfiA* in *Escherichia coli*. *EMBO J.*, 6, 3177-3183.

Boiteux, S.; T.R. O'Connor and J. Laval (1987) Formamidopyridine-DNA glycosylase of *Escherichia coli*: cloning and sequencing of the *fpg* structural gene and overproduction of the protein. *EMBO J.*, 6, 3177-3183.

Bouffler, S.D.; D. Godfrey; M.J. Raman; S.R.R. Musk and R.T. Johnson (1990) Molecular cloning of a mammalian gene involved in the fixation of UV-induced mutations, *Somat. Cell Mol. Genet.*, 16, 507-516.

Brent, T.P., M.E. Dolan; H. Fraenkel-Conrat; J. Hall; P. Karran; F. Laval; G.P. Marginson; P. Montesano; A.E. Pegg; P.M.Potter; B. Singer; J.A. Swenberg and D.B. Yarosh (1988) Repair of O-alkylpyrimidines in mammalian cells: a present consensus. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 85, 1759-1762.

- Brown, T. and J. Jiricny (1987)** A specific mismatch repair events protects mammalian cells from loss of 5-methylcytosine. *Cell*, 50, 945-950.
- Byrne, P.J. and P.S. Schein (1981)** Streptozotocin and Nitrosoureas: Current Status and New Developments. *Prestaiko, A.W. et al., Eds. New York, Academic Press, 367-378.*
- Calsou, P. and B. Salles (1993)** Role of DNA repair in the mechanisms of cell resistance to alkylating agents and cisplatin, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 32, 85-89.
- Capucci, M.S. (1990)** Ação tóxica da estreptozotocina em culturas celulares de mamíferos, *Tese de mestrado. Universidade Estadual de Campinas.*
- Costa de Oliveira, R.; J. Laval and S. Boiteux (1986)** Induction of SOS and adaptive responses by alkylating agents in *Escherichia coli* mutants deficient in 3-methyladenine-DNA-glycosylase activities. *Mut. Res.*, 183, 11-20.
- Cotton, R.G.H. (1993)** Current methods of mutation detection. *Mut. Res.*, 285, 125-144.
- Day III, R.S.; C.H.J. Ziolkowski; D.A. Scudiero; S.A. Meyer; A.S. Libiniecki; A.J. Girardi; S.M. Galloway and G.D. Bynum (1980)** Defective repair of alkylated DNA by human

tumor and SV-40 transformed human cell strains. *Nature*, 288, 724-727.

Eizirick, D.L.; M.A. De Lucio; A.C. Boschero and M.E. Hoffmann (1986) 1,10 phenantroline, a metal chelator, protects against alloxan-but not streptozotocin-induced diabetes. *J. Free Rad. Biol. Med.*, 2, 189-193.

Eizirick, D.L., S. Sandler, G. Ahnstron and M. Welsh (1991) Exposure of Pancreatic Islets to Different Alkylating Agents Decreases Mitochondrial DNA Content But Only Streptozotocin Induces Long-Lasting Functional Impairment of β -cells. *Biochemical Pharmacology*, 42: 12, 2275-2282.

Eizirick, D.L.; A. Bjorklund and E. Cagliero (1993) Genotoxic agents increase expression of growth arrest and DNA damage-inducible genes gadd 45 in rat pancreatic islets. *Diabetes*, 42 (5), 738-745.

Evans, H.J. and M.L. O'Riordan (1975) Human peripheral blood lymphocytes for the analysis of chromosomal aberrations in mutagen tests. *Mut. Res.*, 31, 135-148.

Evans, T.; E.T. Rosenthal; J. Youngblom; D. Distel and T. Hunt (1983) Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell*, 33, 389-393.

Evensen, G. and E. Seeberg (1982) Adaptation to alkylation resistance involves the induction of a DNA-glycosylase. *Nature*, 296, 773-775.

Fornace, A.J. Jr.; J. Jackman; M.C. Hollander; B. Hoffman-Liebermann and D.A. Liebermann (1992) Genotoxic-stress-response genes and growth-arrest-genes gadd, MyD, and other genes induced by treatments eliciting growth arrest. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 663, 139-153.

Fram, R.J. and N. Robichaud (1990) Mechanisms underlying resistance to streptozotocin in Mer⁺ and Mer⁻ human tumor lines. *Biochem. Pharmacol.*, 39 (5), 959-964.

Friedberg, E.F. (1985) DNA repair, W. H. Freeman and Company, chapters 3, 4 and 5, pp 79-323.

Fritz, G.; K. Tano; S. Mitra and B. Kaina (1991) Inducibility of the DNA repair gene encoding O⁶-methylguanine-DNA-methyltransferase in mammalian cells by DNA-damaging treatments. *Mol. Cell. Biol.*, 11, 4660-4668.

Fritz, G.; J. Dosch; H.W. Thielmann and B. Kaina (1993) Molecular and Cellular Characterization of Mex⁻/Methylation-resistant Phenotype. *The journal of Biological Chemistry*, 268, 1-11.

Godfrey, D.B.; S.D. Bouffler; S.R.R. Musk; M.J.Raman and R.T. Johnson (1992) Mammalian cells share a common pathway for the relief of DNA replication arrest by O⁶-alkylguanine, incorporated 6-thioguanine and UV photoproducts, *Mut. Res., DNA repair*, 274, 225-235.

Goldmacher, V.S.; R.A. Cuzich and W.G. Thilly (1986) Isolation and partial characterization of human cell mutants differing in sensitivity to killing and mutation of methylnitrosourea and N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, *J. Biol. Chem.*, 261, 12462-12471.

Goth-Goldstein, R. and M. Hughes (1987) Characterization of a CHO variant in respect to alkylating agent-induced biological effects and DNA repair, *Mut. Res.*, 184, 139-146.

Guttenplan, J.B. (1990) Mutagenesis by N-nitroso compounds: relationships to DNA adducts, DNA repair and mutational efficiencies. *Mut. Res.*, 233, 177-187.

Hard, G.C. (1985) Identification of a high-frequency model for renal carcinoma by the induction of renal tumors in the mouse with a single dose of streptozotocin. *Cancer Res.*, 45, 703-706.

Hare, J.T. and T. Taylor (1985) One role for DNA methylation in vertebrate cells is strand discrimination in mismatch repair. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 82, 7350-7354.

- Hartwell, L. and T. Weinert (1989)** Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science*, 246, 629-634.
- Harris, C.C. (1991)** Chemical and physical carcinogenesis: advances and perspectives for the 1990's. *Cancer Res.*, 51, 5023-5044.
- Herr, R.R., H.K. Jahnke and A.D. Argoudelis (1967)** The structure of streptozotocin, *J. Am. Chem. Soc.*, 89, 4808-48.
- Hofnung, M and P. Quillardet (1986)** Recent developments in bacterial short-term tests for the detection of genotoxic agents. *Mutagenesis*, 1, 319-330.
- Hughes, S.J. and B. Sedgwick (1989)** The adaptive response to alkylation damage. *J. Biol. Chem.*, 264, 21369-21375.
- Ishida, R. and K.R. Utsumi (1990)** Differences in induction of sister chromatid exchange in MNNG-resistant HeLa S3-Mer^r cell lines. *Carcinogenesis*, 11, 1209-1212.
- Ishidate, M.Jr.; M.C. Harnois; T. Sofuni (1988)** A comparative analysis of data on clastogenicity of 951 chemical substances tested in mammalian cell cultures. *Mut. Res.*, 195, 151-213.
- Kaina, B. (1987)** Correction of alkylation hypersensitivity of CHO-W27-1 by transfection with human DNA. *Carcinogenesis*,

8(12), 1935-1938.

Kaina, B. (1979) Significance and consequences of differential chromatin condensation in the production of chromosomal structural changes. *Biol. Zbl*, 98, 129-152.

Kaina, B.; A.A. Van Zeeland; C. Backendorf; H.W. Thielmann and P. Van de Putte (1987) Transfer of human genes conferring resistance to methylating mutagens, but not to UV irradiation and cross-linking agents, into Chinese Hamster Ovary Cells. *Molecular and Cell Biology*, 7, 2024-2030.

Kantwerk Funk, G.; V. Burkart and H. Kolb (1991) Low dose streptozotocin causes stimulation of the immune system and of anti-islet cytotoxicity in mice. *Clin. Exp. Immunol.*, 86, 266-270.

Karran, P. and M.G. Marinus (1982) Mismatch correction of O⁶-methylguanine residues in *E. coli* DNA. *Nature (London)*, 296, 868-869.

Karran, P. and M. Bignami (1992) Self-destruction and tolerance in resistance of mammalian cells to alkylation damage, *Nucleic Acids Research*, 20 (12), 2933-2940.

Kato, H. (1974) Espontaneous sister chromatid exchange detected by BUdR labelling method. *Nature, (London)*, 251, 70-72.

- Kawada, J. (1992)** New hypothesis for the Mechanisms of Streptozotocin and Alloxan Inducing Diabetes-Mellitus. *Yakugaku Zasshi- Journal of the Pharmaceutical Society of Japan*, 112 : 11, 773-791.
- Kelsen, D., C. Hudis, D. Niedzwiecki, J. Dougherty, E. Casper, J. Botet, V. Vinciguerra and R. Rosenbluth (1991)** A Phase-III Comparison Trial of Streptozotocin, Mitomycin, and 5-Fluorouracil with Cisplatin, Cytosine Arabinoside, and Caffeine in Patients with Advanced Pancreatic Carcinoma. *Cancer*, 68: 5, 965-969.
- Latt, S.A.; J. Allen; S.E. Blom; A. Carrano; E. Falke; D. Kram; E. Schneidern; R. Schreck; R. Rice; B. Whitfield and S. Wolff (1981)** Sister-chromatid exchanges: a report of the Gene-Tox Programme. *Mut. Res.*, 87, 17-62.
- Laval, F. (1990)** Induction of proteins involved in the repair of alkylated bases in mammalian cells by DNA-damaging agents. *Mut. Res.*, 233, 211-218.
- LeDoux, S.P.; S.E. Woodley; N.J. Patton; G.L. Wilson (1986)** Mechanisms of Nitrosourea-Induced β -cell Damage. Alterations in DNA. *Diabetes*, 35, 866-872.
- Liegibel, U.; H. Tinwell; R.D. Callander; P. Schmezer and J. Ashby (1992)** Clastogenicity to the mouse bone marrow of the

- mouse germ cell genotoxin streptozotocin. *Mutagenesis*, 7(6), 471-474.
- Loveless, A. (1969)** Possible relevance of O⁶-alkylation of deoxyguanosine to the mutagenicity and carcinogenicity of nitrosoamines and nitroaoamides. *Nature*, 223, 206-209.
- Male, R.; B.I. Haukanes; D.E. Helland; Kleppe (1987)** Substrate specificity of 3-methyladenine-DNA-glycosilase from calf thymus. *Eur. J. Biochem.*, 165, 13-19.
- McCarthy, T.V.; P. Karran and T. Lindahl (1984)** Inducible repair of O-alkylated DNA pyrimidines in *Escherichia coli*. *EMBO J.*, 3, 545-550.
- Meuth, M. e H. Green (1974)** Induction of a deoxycytidineless state in cultured mammalian cells by bromodeoxyuridine. *Cell*, 2, 109-112.
- Michejda, C.J. (1991)** Carcinogenic consequences of DNA alkylation. *Contrib. Gynecol. Obstet.*, 18, 71-78.
- Mitra S. and B. Kaina (1993)** Regulation of repair of alkylation damage in mammalian genomes. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, 44, 109-142.

Montesano, R.; J. Hall e C.P. Wild (1992) Alkylating agents relating to carcinogenesis in man. *Prog. Clin. Biol. Res.*, 374, 175-196.

Morris, S.M.; D.T. Heflich; D.T. Beranek and R.L. Kodell (1982) Alkylation-induced sister-chromatid-exchanges correlate with reduced cell survival, not mutations. *Mut. Res.*, 105, 163-168.

Nakatsu, Y.; K. Hattori; H. Hayakawa; K. Shimizu and M. Sekiguchi (1993) Organization and expression of the human gene for O6-methylguanine-DNA-methyltransferase. *Mut. Res.*, 293, 119-132.

Natarajan, A.T.; J.W.I.M. Simons; E.W. Vogel and A.A. Van Zeeland (1984) Relationship between cell killing, chromosomal aberrations, sister chromatid exchanges and point mutations induced by monofunctional alkylating agents in Chinese hamster cells. *Mut. Res.*, 128, 31-40.

Natarajan, A.T. and G.Obe (1984) Molecular mechanisms involved in the production of chromosomal aberrations, III. Restriction Endonucleases. *Chromosoma (Berl.)*, 90, 120-127.

Natarajan, A.T.; A.H.M. Rottevel; J. Van Pieterse and M.G. Schliermann (1986) Influence of incorporated 5-bromodeoxyuridine on the frequencies of spontaneous and

induced sister-chromatid exchanges, detected by immunological methods. *Mut. Res.*, 163, 51-55.

Obe, G.; A.T. Natarajan; F. Palitti (1982) Role of DNA double-strand breaks in the formation of radiation-induced chromosomal aberrations. In: Natarajan, A.T.; G. Obe and H. Altmann (Eds). DNA repair, chromosome alterations and chromatin structure, Amsterdam, Oxford, New York, Elsevier Science Publishers, pp 1-9 (*Progress in Mutation Research*, vol. 4).

Obe, G. and A.T. Natarajan (Eds) (1990) Chromosomal Aberrations, Basic and Applied Aspects. Springer-Verlag.

Okamoto, H. (1981) Regulation of proinsulin synthesis in pancreatic islets and new aspect to insulin-dependent diabetes. *Mol. Cell. Biochem.*, 37, 43-47.

Okamoto, H. (1985) The role of poly (ADP-ribose) syntetase in the development of insulin-dependent diabetes and islet cell regeneration. *Biomed. Biochim. Acta*, 1, 15-19.

Painter, R.B. (1980) A replication model for sister chromatid exchange. *Mut. Res.*, 70, 337-341.

Park, J.W. and B.N. Ames, (1988) 7-Methylguanine adducts in DNA are normally present at high levels and increase on aging: analysis by HPLC with electrochemical detection. *Proc. Natl.*

Acad. Sci., USA, 85, 7467-7470.

Park, J.W.; C.K. Cundy and B.N.Ames (1989) Detection of DNA adducts by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection, *Carcinogenesis, 10, 827-832.*

Pegg, A.E. (1990) Mammalian O⁶-alkylguanine-DNA-alkyltransferase: regulation and importance in response to alkylating carcinogenic and therapeutic agents. *Cancer Res., 50, 6119-6129.*

Pegg, A.E. (1991) Factors influencing carcinogenesis by alkylating agents. *Recent Results in Cancer Research, 122, 23-32.*

1. Pegg, E. and T.L. Byers (1992) Repair of DNA containing O⁶-alkylguanine. *The FASEB journal, 6, 2302-2310.*

Perry, P. and S. Wolff (1974) New Giemsa method for the differential staining of sister chromatides. *Nature, 251, 156-158.*

Pinkel, D.; L.H. Thompson; J.W. Gray and M. Vaderlaan (1985) Measurement of Sister-Chromatid-Exchanges at Very Low Bromodeoxyuridine Substitution levels Using a Monoclonal Antibody in Chinese Hamster Ovary Cells. *Cancer Res., 45, 5795-5798.*

Reddy, M.V.; R.C. Gupta; E. Randerath and K. Randerath

- (1984) 32-p-post-labeling test for covalent DNA binding of chemicals in vivo: application to a variety of chemical carcinogens and methylating agents. *Carcinogenesis*, 5, 231-243.
- Rerup, C.C. (1970)** Drugs producing diabetes through damage of the insulin secreting cells. *Pharmacol. Rev.*, 22, 185-189.
- Revell, S.H. (1959)** The accurate estimation of chromatid breakage and its relevance to a new interpretation of chromatid aberrations induced by ionizing radiation. *Proc. Royal Soc. Lond. Ser. B*, 150, 563-589.
- Richardson, K.K.; F.C. Richardson; R.M. Crosby; J.A. Swenberg and T.R. Skopek (1987)** DNA base changes and alkylation following in vivo exposure of *Escherichia coli* to N-methyl-N-nitrosourea or N-ethyl-N-nitrosourea. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 84, 344-348.
- Roberts, J.J. and C. Bashan (1990)** Properties of Mer^r HeLa cells sensitive or resistant to the toxic effects of MNU; effects on DNA synthesis and post treatment with caffeine. *Mut. Res.*, 233, 253-263.
- Rossini, M.D.; A.A. Like; W.E. Dulin and G.F. Cahill Jr. (1985)** Pancreatic beta cell toxicity by streptozotocin anomers. *Diabetes*, 26, 1120-1125.

- Rydberg, B.; N. Spurr and P. Karran (1990)** cDNA cloning and chromosomal assignment of the human O⁶-methylguanine-DNA-methyltransferase. *J. Biol. Chem.*, 265, 9563-9569.
- Saffhil, R.; G.P. Marginson and P.J. O'Connor (1985)** Mechanisms of carcinogenesis induced by alkylating agents. *Biochim. Biophys. Acta*, 823, 111-145.
- Samson, L. and J. Cairns, (1977)** A new pathway for DNA repair in *Escherichia coli*. *Nature*, 267, 281-282.
- Samson, L. and S. Linn (1987)** DNA alkylation repair and the induction of cell death and sister chromatid exchange in human cells, *Carcinogenesis*, 8, 227-230.
- Samson, L.D. (1992)** The repair of DNA alkylation damage by methyltransferases and glycosylases. *Essays Biochem.*, 27, 69-78.
- Savage, J.R.K. (1976)** Annotation: Classification and relationships of induced chromosomal structural changes. *J. Med. Genet.*, 13, 103-122.
- Sax, K. (1940)** An analysis of x-ray induced chromosomal aberrations in *Tradescantia*. *Genetics*, 25, 41-68.
- Schneider, C.; R.M. King and L. Philipson (1988)** Genes specifically expressed at growth arrest of mammalian cells. *Cell*,

54, 787-793.

Schwartz, J.L. (1989) Monofunctional alkylating agent-induced S-phase dependent DNA damage. *Mut. Res.*, 216, 111-118.

Sedgwick, B. P. Robins; N. Totty and T. Lindahl (1988) Functional domains and methyl acceptor sites of the *Escherichia coli* Ada protein. *J. Biol. Chem.*, 263, 4430-4433.

Singer, B. (1986) O-alkylpurines in mutagenesis and carcinogenesis: occurrence and significance. *Cancer Res.*, 46, 4879-4885.

Sklar, R. and B. Strauss (1980) Role of the uvr E gene product and of inducible O⁶-methylguanine removal in the induction of mutations by N-methyl-N'-nitro-N-nitroso-guanidine. *J. Mol. Biol.*, 143, 343-362.

Strauss, B.S. (1971) The relationship of repair mechanisms to the induction of chromosome aberrations in eukaryotic cells, in: *H. Altmann and F.K. Schauttauer (Eds), DNA repair Mechanisms, Schauttauer Verlag, Stuttgart, pp 151-171.*

Sukumar, S.; V. Notario; D. Martin Zanca e M. Barbacid (1983) Induction of mammary carcinomas in rats by nitrosomethylurea involves malignant activation of H-ras-1 locus by single point mutations. *Nature*, 315, 382-385.

- Suter, W.; J. Brennan; S. McMillan and M. Fox (1980)**
Relative mutagenicity of antineoplastic drugs and other alkylating agents in V79 chinese hamster cells, independence of cytotoxicity and mutagenic responses, *Mut. Res.*, 73, 171-181.
- Swann, P.F. (1990)** Why do O⁶-alkylguanine and O⁴-alkylthymine miscode? The relationship between the structure of DNA containing O⁶-alkylguanine and O⁴-alkylthymine and the mutagenic properties of these bases. *Mut. Res. Fundam. Mol. Mech. Mutagenesis*, 233, 81-94.
- Tano, K.; S. Shiota; J. Collier; R.S. Foote and S. Mitra (1990)**
Isolation and structural characterization of a cDNA clone encoding the human DNA repair protein for O⁶-methylguanine. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 87, 686-690.
- Taylor, J.H.; P.S. Woods and W.L. Hughes (1958)** The organization and duplication of chromosomes as revealed by autoradiographic studies using tritium-labelled thymidine. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 43, 122-128.
- Thaker, J. (1985)** The molecular nature of mutations in cultured mammalian cells: A review. *Mut. Res.*, 150, 431-442.
- Thaker, J. (1986)** Molecular characterization of HPRT-deficient mutants induced by gamma-rays or alpha-particles showing that the majority have deletions of all or part of the HPRT gene. *Mut.*

Res., 160, 267-275.

Tjälve, H. (1983) Streptozotocin: distribution, metabolism and mechanisms of action. *Upsala J. Med. Sci. Suppl.*, 39, 145-157.

Tokuda, K. and W.J. Bodell (1988) Cytotoxicity and induction of sister chromatid exchanges in human and rodent brain tumors cells treated with alkylating chemotherapeutic agents. *Cancer Res.*, 48, 3100-3105.

Tyson, C.K. and J.C. Mirsalis (1985) Measurement of unscheduled DNA synthesis in rat kidney cells following in vivo treatment with genotoxic agents. *Environ. Mutagenesis*, 7, 889-899.

Van Zeeland, A.A. and J.W.I.M. Simons (1976) Linear dose-response relationships after prolonged expression times in V79 Chinese hamster cells. *Mut. Res.*, 35, 129-138.

Van Zeeland, A.A.; C.A. Smith and P.C. Hanawalt (1981) Sensitive determination of pyrimidine dimers in DNA of UV-irradiated mammalian cells: introduction of T4 endonuclease V into frozen and thawed cells. *Mut. Res.*, 82, 173-189.

Van Zeeland, A.A. (1988) Molecular dosimetry of alkylating agents: quantitative comparison of genetic effects on the basis of DNA adduct formation. *Mutagenesis*, 3 (3), 179-191.

Vavra, J.J.; C. De Boer and A. Dietz (1959) Streptozotocin, a new antibacterial antibiotic. *Antibiotics Annual*, 230-232.

Vennit, S.; H. Bartsch; G. Becking; R.P.P. Fuchs; M. Hofnung; C. Malaveille; T. Marsushima; M.R. Rajewsky; M. Roberfroid and H.S. Rosenkrans (1986) Short-term assays using bacteria. In: Montesano, R.; H. Bartsch; H. Vainio; J. Wilbourn and H. Yamasaki (Eds). "Long-Term assays for Carcinogenesis: a Critical Araisal. *IARC Scientific Publications*, vol. 83. Lyon, pp 143-161.

Volkert, M.R. (1988) Adaptive response of *Escherichia coli* to alkylation damage. *Environ. Mol. Mutagen.*, 11, 241-255.

Warren, W., A.R. Crathorn and K.V. Shooter (1979) The stability of methylated purines and of methylphosphotriesters in the DNA of V79 cells after treatment with N-methyl-N-nitrosourea. *Biochim. Biophys. Acta*, 563, 82-88.

Weiss, R. (1982) Streptozotocin: a review of its pharmacology, efficacy and toxicity. *Cancer Treatment Report*, 66, 427-438.

Wilson, G.L.; P.C. Hartig; N.J. Patton and S.P. LeDoux (1988) Mechanisms of nitrosourea-induced cell damage. Activation of poly (ADP-ribose) synthetase and cellular distribution. *Diabetes*, 37, 231-235.