Defendida por Isabela Cristina Simoni e aprovada com grau A1 pela Comissão Julgadora a 13/04/84.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

ISABELA CRISTINA SIMONI

" PESQUISA DE LIGAÇÃO DO HYCANTHONE A SÍTIOS CROMATÍNICOS COM DIFERENTE SUPRA-ORGANIZAÇÃO, COMPOSIÇÃO E FUNÇÃO "

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da UNICAMP para obtenção do grau de Mestre em Biologia - Área de Biologia Celular.

Orientadora : Profª DRA. MARIA LUIZA S. MELLO

CAMPINAS

1984

Si57p

" Era ... para mí la vida entera,
como um sol de primavera , mi
esperanza y mi pasión.
Sabia ... que en el mundo no
cabía toda la humilde alegria ,
de mi pobre corazón " .

(Gardel e Le Pera)

Para Cely

Á memória de minha mãe

Ao meu pai e minha irmã

À minha tia Cora e

Ao Marco Antonio

AGRADECIMENTOS

À Profª Dra. Maria Luiza S. Mello, pela sua orientação constante, segura e consciente , mas sobretudo pelo estímulo, amizade e confiança que tornou possível uma realização agradável deste trabalho.

Ao Departamento de Biologia Celular da UNICAMP e ao seu curso de Pós - Graduação que me proporcionou a oportunidade de evoluir e também de desenvolver este trabalho.

Ao Profº Dr. Luiz Cândido de Souza Dias, pelo fornecimento do Etrenol (hycanthone) e ao Prof. Dr. Willian da Silva pelo fornecimento das sementes de milho, utilizadas neste trabalho.

À Profª Dra. Urara Kavasoi pelas sugestões e críticas.

À Dra. Ignês Koseki pelo incentivo e pela leitura crítica do manuscrito desta tese.

Ao Osvaldo Augusto Sant'Anna que gentilmente coletou os linfócitos de camundongo.

Aos funcionários e colegas do Departamento de Biologia Celular da UNICAMP que voluntariamente auxiliaram durante o desenvolvimento desta tese.

Ao Instituto Biológico de São Paulo e à Seção de Biologia Celular a quem devo muito pela minha formação científica e em particular a Evelina Jorge pela companhia e amizade.

À todos os meus familiares e amigos que de alguma forma me incentivaram para a realização deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de aperfeiçoamento de Pessoal de nível Superior (CAPES), pelo auxílio financeiro sob a forma de Bolsa de Mestrado.

À todos que de alguma forma contribuiram para a minha formação e me ajudaram durante a realização deste trabalho.

ÍNDICE -

I - INTRODUÇÃO.....01

1. Considerações gerais.....01
2. O significado de achados de basofilia e anisotropia em núcleos corados com azul de toluidina.....07

II - MATERIAL.....10

III - MÉTODOS.....11

1. Administração do hycanthone em *Triatoma infestans* e obtenção dos preparados de túbulos de Malpighi.....11
2. Obtenção dos preparados de cultura celular da linhagem IB-RB-25(2) de rim bovino tratata com a droga.....12
3. Exposição das raízes de *Zea mays* ao hycanthone e obtenção dos preparados celulares.....12
4. Obtenção dos preparados de linfócitos de camundongo e tratamento com a droga.....13
5. Coloração com azul de toluidina.....14

IV - RESULTADOS.....16

1. Núcleos de *Triatoma infestans*.....16

2. Núcleos das células IB-RB-25(2).....19

3. Núcleos de células de raíz de *Zea mays*.....22

4. Núcleos de linfócitos de camundongo.....24

V - DISCUSSÃO.....30

VI - CONCLUSÕES.....37

VII - RESUMO.....39

VIII - SUMMARY.....40

IX - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....41

I - INTRODUÇÃO

1. Considerações Gerais

O uso do hycanthone em tratamentos clínicos de esquistossomose, foi introduzido em 1965 por ROSI e colaboradores. Trata-se de um agente altamente efetivo sobre o *Schistossoma mansoni* e o *Schistossoma haematobium* (CLARKE *et alii.*, 1973; MARITZ, 1970 - apud SIEBER *et alii.*, 1973; ONG, 1978). Uma única dose de 3 mg da droga por Kg de peso corpóreo, administrada em pacientes infestados, cura cêrca de 90% dos indivíduos (KATZ *et alii.* 1969). Entretanto, são muitos os relatos de autores que observaram efeitos tóxicos desta droga causando comprometimentos hepáticos, renais e cardíacos (Coutinho & Barreto, 1971; Cunha, *et alii.*, 1971; Andrade *et alii.*, 1974; Marinho *et alii.*, 1974), inclusive casos de óbitos de pacientes, o que contra - indicaria o seu uso (LEVI, 1982). Além do hycanthone, duas outras drogas são também efetivas sobre o parasita: o oxamniquine e o praziquantel (DAVIS , 1982). A primeira é efetiva somente sobre o *S. mansoni* e a outra droga ainda está sob estudo e não é utilizada em grande escala. Sabe-se que na África, ocorre apenas o *S. haematobium* (ONG, 1978) e portanto neste lugar o hycanthone ainda é utilizado em tratamentos clínicos, já que o

oxamniquine não é tão efetivo.

Além disso, ação mutagênica e anomalias cromossômicas induzidas pelo hycanthone, têm sido descritas em *Salmonella typhimurium* (HARTMAN *et alii.* , 1973 ; ISONO & YOURNO, 1974), em *Neurospora crassa* (ONG & SERRES, 1975), em células de linfoma de rato L5178y (CLIVE *et alii.*, 1972), em leucócitos humanos (RAY *et alii.*, 1975), em linfócitos estimulados com fitohemaglutinina (SIEBER *et alii.*, 1973), em medula óssea de ratos (GREEN *et alii.*, 1973) e em células meristemáticas de cebola (ROCHA & KATZ, 1973). Aberrações tais como alongamentos cromossômicos, condensação e quebras de cromátides e pontes cromossômicas, estão entre as alterações observadas. Ao atingir o núcleo celular, o hycanthone pode induzir um bloqueio da mitose, redução do índice mitótico e repressão da síntese de DNA e RNA (WEINSTEIN & HIRSCHBERG , 1971; LEA *et alii.*, 1972 ; WILSON *et alii.*, 1972; GREEN *et alii.*,1973 ; *SIEBER* et alii., 1973; ROCHA & KATZ, 1973; PETERSON & BELL, 1974; SIEBER *et alii.*, 1974; SIEBER & ADAMSON,1975; WILSON *et alii.*, 1975; WITTNET *et alii* . , 1971).

Tanto o hycanthone como o lucanthone, do qual o hycanthone é um metabólito ativo, sendo ambos agentes esquistossomicidas, possuem na sua estrutura molecular três anéis heterocíclicos, aonde, na posição do carbona 4, o hycanthone tem um grupo hidroximetil ao invés de um grupo metil, como no caso da molécula de lucanthone (ONG, 1978) (Fig. 1).Essas drogas possuem similaridades

com muitos compostos do grupo das acridinas, actinomicina D, brometo de etidium e cloroquine, no que concerne à estrutura molecular à capacidade de se intercalar entre os pares de bases da molécula de DNA. Basicamente as drogas intercalantes têm duas propriedades importantes, como foi relatado por WARING, em 1970:

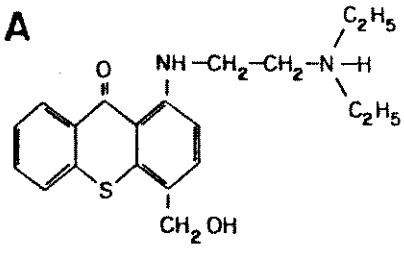
1. Possuem um sistema de anel aromático planar capaz de promover uma forte interação hidrofóbica com os pares de bases do DNA;
2. Com isso, no local da intercalação, essas drogas promovem abertura e desenrolamento da hélice de DNA.

O hycanthone possui tais propriedades e, conforme demonstrado por MELLO e colaboradores (1978), liga-se também aos grupos fosfatos do DNA (Fig. 1).

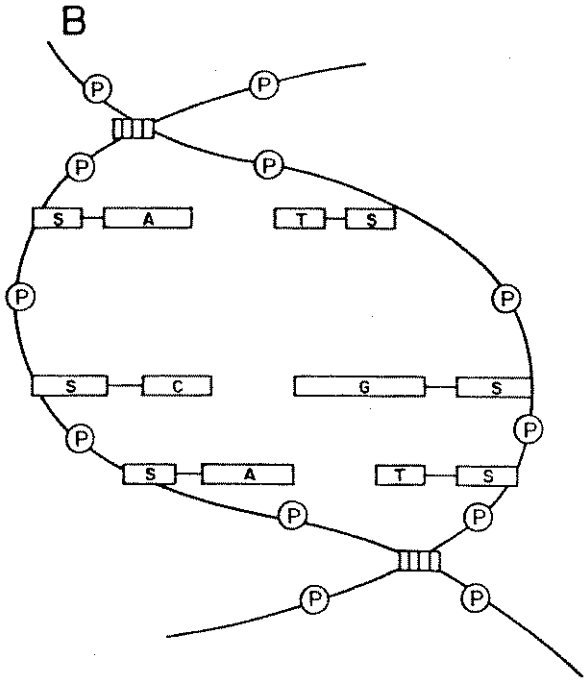
Em trabalho recentemente publicado, HOFF & MAc INNIS (1981), utilizando células ascíticas de camundongo (carcinoma de Erlich), observaram que o hycanthone teria uma ligação preferencial com a cromatina condensada, considerada por eles heterocromatina. Estas observações foram realizadas por microscopia eletrônica . Neste nível e utilizando o material mencionado, seria muito difícil diferenciar, em termos morfológicos a heterocromatina propriamente dita, de uma eucromatina compacta (COMINGS, 1972; MELLO, 1978a). Heterocromatina, como definida atualmente, é uma cromatina condensada durante todo o período da intérfase (HEITZ, 1928; COMINGS, 1972) , mas possui outras características que a diferenciam de uma

HYCANTHONE

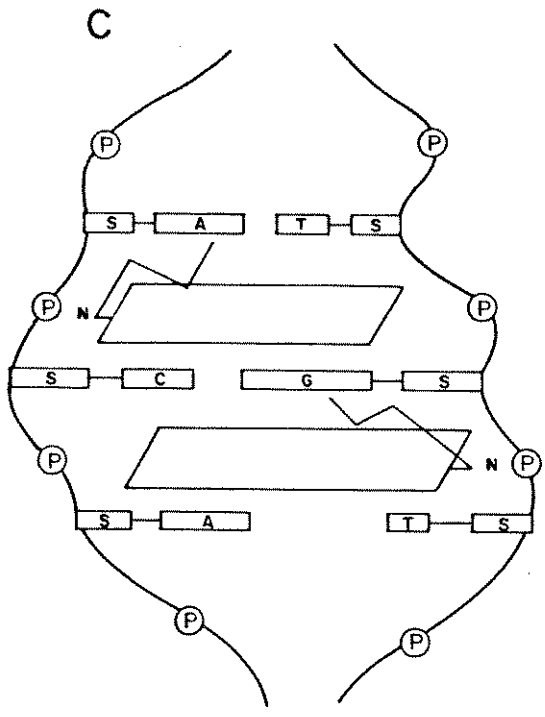
A



B



C



eucromatina condensada (especialmente heterocromatina' constitutiva): replicação do DNA mais lenta que a da eu - cromatina, riqueza em DNA repetitivo e/ou DNA satélite e relativa inatividade de transcrição (SIEBER *et alii*.,1971; COMINGS, 1972; MELLO, 1978b; BRUTLAG, 1980; MELLO, 1983).

O intuito deste trabalho é confirmar ou não a ligação do hycanthone apenas com a heterocromatina, definida em termos morfológicos e de composição . Uma heterocromatina definida nesses termos (heterocromatina constitutiva) ocorre, por exemplo, nos túbulos de Malpighi do hemíptero *Triatoma infestans* Klug (MELLO,1971 MELLO, 1978b), " knobs " de cromossomos de milho (MORGAN, 1943) e em cromocentros de células somáticas de rim bovino . Por outro lado, a possibilidade de ligação da droga a uma cromatina compactada, independente de se tratar de uma heterocromatina, poderia ser testada em linfócitos de mamíferos, células em que 80% da cromatina se apresenta num estado supra - organizacional condensado.

Os túbulos de Malpighi de *T. infestans* possuem núcleos altamente poliplóides, nos quais a heterocromatina constitui corpos característicos, facilmente detectáveis: os comocentros (MELLO, 1971; MELLO, 1975 ; MELLO, 1978b). Os " knobs " em cromossomos de milho re - presentam áreas heterocromáticas de localização geralmente telomérica (VIDAL *et alii*., 1984) e que em células somáticas apresentam-se sob a forma de pequenos cromocentros - (MORGAN, 1943), característico para a variedade considerada (VIDAL *et alii*., 1983).Quanto às células em cultu -

ra, pequenos cromocentros são muitas vezes detectáveis, principalmente em células de camundongos e de bovinos, representando as áreas heterocromáticas centroméricas destes materiais (HSU & ARRIGHI, 1971; SCHNEDL, 1972).

A confirmação de uma ligação da droga à heterocromatina poderia explicar alongamentos e quebras de cromossomos e perda de porções dos mesmos durante a divisão celular. As regiões centroméricas de cromossomos humanos e de outros vertebrados, através das quais os cromossomos se prendem aos microtúbulos do fuso mitótico, durante a divisão, são comprovadamente áreas heterocromáticas (constitutivas) (COMINGS, 1972; MELLO,1978a).

Para a presente investigação procurou-se, ao invés do uso de métodos complexos de microscopia eletrônica, utilizar metodologia citoquímica relativamente simples mas de alta confiabilidade, qual seja, a análise de características de basofilia nuclear ao nível de microscopia de luz (BERGERON & SINGER, 1958; LISON, 1960; VIDAL, 1972; MELLO, 1980), associada à detecção de anisotropia óptica com microscopia de polarização (ROMHANY , 1967; MELLO, 1983).

2. O significado de achados de basofilia e anisotropia em núcleos corados com azul de toluidina.

A basofilia nuclear, quando da utilização de soluções do corante tiazínico azul de toluidina, a pH 3,0 - 4,0 é decorrente da ligação eletrostática das moléculas deste corante catiônico a grupos aniônicos, disponíveis no substrato, em específico, grupos fosfatos de DNA e RNA (LISON, 1960; VIDAL, 1979). E, para o caso de colorações com este corante, é definida como metacromática, quando ocorre um deslocamento do pico principal da curva espectral de absorção de λ = 630 nm para comprimentos de onda mais curtos (hipsocromismo) (550 nm, metacromasia γ ; ao redor de 590 nm, metacromasia β , com uma diminuição simultânea dos valores de absorvância em 630 nm (hipocromismo) (BERGERON & SINGER, 1958; MIURA & OHBA , 1967; TOEPFER, 1970). Tal fenômeno acha-se intimamente ligado ao grau de empilhamento das moléculas de corante e proximidade entre as mesmas. Quanto mais próximas as moléculas de azul de toluidina estiverem entre si e mais perfeito for seu empilhamento maior a interação dos seus elétrons π e, por consequência, maior o deslocamento do seu máximo de absorção para λ curtos (BERGERON & SINGER , 1958; TOEPFER, 1970).

Quando coramos filamentos de DNA puro com azul de toluidina, as moléculas do corante ligam-se aos grupos fosfatos do ácido nucleico , ficando muito

próximas e empilhadas helicoidalmente ao longo da macromolécula de DNA. Com isso os elétrons ressonantes das moléculas do corante interagem entre si e o resultado final em termos espectrais é que esses fios de DNA puro corado manifestam uma basofilia metacromática (cor violeta). Esse mesmo DNA corado, examinado ao microscópio de polarização, exibe o fenômeno de anisotropia óptica denominado birrefringência. Tal fenômeno é devido ao empilhamento ordenado dos pares de bases do DNA mais o estaqueamento orientado das moléculas de azul de toluidina (WHITE & ELMES , 1952; MELLO & VIDAL, 1977).

Quando o DNA se acha associado a proteínas histônicas, em células somáticas, parte dos seus grupos fosfatos encontram-se ligados aos grupos NH_3^+ dos amino-ácidos. Menos grupos fosfatos ficam, portanto, disponíveis à ligação com moléculas de azul de toluidina . A distância entre as moléculas do corante ligadas ao substrato torna-se maior e, portanto, a metacromasia se apresentará com uma cor azul - violeta (pico de absorção deslocado para λ = 580 nm). Mesmo assim é exibida uma birrefingência com cor de interferência amarelo - esverdeada.

Já quando tratamos DNA com hycanthone, as moléculas da droga se intercalam entre as bases de DNA, promovendo um desarranjo na conformação helicoidal do mesmo (WARING, 1970; ONG, 1978). Além disso, as moléculas de hycanthone competem com as moléculas de azul de toluidina, no que diz respeito à ligação com os grupos fosfatos disponíveis do DNA. Portanto, as moléculas de azul

de toluidina ficarão muito afastadas entre si , não ocorrendo a interação eletrônica que resulta em metacromasia - γ ou β . A basofilia se apresentará com uma cor esverdeada e,também, não será observado o fenômeno de birrefringência,pois o DNA apresentar-se-á estendido e aberto (MELLO *et alii*., 1978).

Tanto os fenômenos de basofilia como de anisotropia nucleares são influenciados pela fixação, uma vez que esta pode preservar diferentemente os complexos DNA-proteína. Geralmente, para o estudo desses denômenos são indicados como fixadores solução de ácido-acético ou etanol-acético (Dick & Johns, 1967; MELLO, 1983). Uma vez que testes preliminares indicaram a solubilidade do hy. em etanol, neste trabalho a fixação foi sempre realizada em solução de ácido-acético.

II - MATERIAL

Foram utilizados:

1. Túbulos de Malpighi de ninfas de 5º estadio de *Triatoma infestans* Klug (Hemíptera, Reduviidae) provenientes da SUCEN - Superintendência de Controle de Endemias - de Mogi Guacú;

2. Linhagem celular IR-RB-25(2)de rim bovino, estabelecidas no Instituto Biológico de São Paulo. Os métodos de manutenção e repiques usados foram descritos anteriormente (CASTRO, 1970; KOSEKI & ABUHAB, 1979);

3. Células meristemáticas de raízes de um tipo de milho (*Zea mays*) proveniente da linha isogênica de endosperma " flint " amarelo derivado da cultivar PD(MS) da ilha de Cuba, bem como de um tipo de milho de origem incerta;

4. Linfócitos de camundongos *Mus musculus*, de 3 meses de idade e peso corpóreo de 28g, da linhagem H/F , boa produtora de anticorpos contra antígenos flagelares de *Salmonellae*.

III- MÉTODOS

1. Administração do hycanthone em *Triatoma infestans* e obtenção dos preparados de túbulos de Malpighi.

As ninfas foram injetadas com solução de hycanthone ou tiveram seus túbulos de Malpighi incubados em meio contendo a droga. No que se refere as injeções, foram usados volumes de 0,05 ml de uma solução de hycanthone na diluição de 10^{-4} M e de 30 *ul* ou 60 *ul* da solução na diluição de 10^{-3} M. Estes insetos foram expostos à droga durante 40 minutos para a primeira diluição e 30 ou 60 minutos para a última, quando os túbulos de Malpighi foram então, retirados para a fixação, esmagamento e coloração. Já nos experimentos com túbulos removidos, estes foram colocados em um meio com hycanthone diluído a 10^{-3} M numa solução aquosa contendo 20% de soro fetal bovino e 0,7% de NaCl (PIMPINELLI *et alii.*, 1975). O material foi removido após 10, 15 e 20 minutos de tratamento para fixação, esmagamento e coloração. Como controle foram usados túbulos colocados no meio acima mencionado na ausência da droga.

A fixação do material foi realizada por 1 minuto em uma gota de ácido acético a 45%. Nesta solução foi efetuado um esmagamento muito suave. A remoção

das lamínulas foi feita por congelamento do material em nitrogênio líquido. A seguir efetuou-se a coloração.

2. Obtenção dos preparados de cultura celular da linhagem IB_RB-25(2) de rim bovino tratada com a droga.

Tubos de Leighton contendo lamínulas foram semeados com 1 ml de suspensão celular e mantidos em estufa a 37°C durante 48 horas. As lamínulas foram então retiradas e imersas numa solução de hycanthone 10^{-3}M em água destilada por 5, 15, 30 minutos e 1 hora.

As culturas celulares foram fixadas em ácido acético a 30% durante 2 segundos e a seguir coradas.

Como controle foram utilizadas lamínulas, cujas células não sofreram tratamento com a droga.

Alguns preparados foram submetidos ao método de banda C de SUMNER (1972) para identificação de áreas heterocromáticas (cromocentros).

3. Exposição das raízes de *Zea mays* ao hycanthone e obtenção dos preparados celulares.

As raízes do milho, em fase inicial de germinação, foram tratadas com uma solução de hycanthone a 10^{-3}M em água corrente.

O tempo de exposição à droga variou de 20, 30, 35, 40, 50 minutos, 6 horas e 24 horas. Após estes períodos, as raízes foram fixadas em ácido acético a 45% por um tempo que variou de 10, 15, 20, 30 e 50 minutos. O material foi então esmagado entre lâmina e lamínulas numa gota do fixador. A remoção das lamínulas após o esmagamento, foi realizado por congelamento do material em nitrogênio líquido. A seguir efetuou-se a coloração. Como controle foram utilizados raízes mergulhadas em água de torneira.

4. Obtenção dos preparados de linfócitos de camundongo e tratamento com a droga.

O sangue dos camundongos foi colhido com uma pipeta Pasteur pelo plexo retro - orbital, e colocado em tubos contendo solução anti - coagulante de Alsever. Em seguida o material foi centrifugado por 10 minutos a 1200 rpm. Após a centrifugação, dispensou-se o sobrenadante e retirou-se a Película formada logo acima das hemáceas. O material foi ressuspendido em solução salina com NaCl a 0,85% centrifugado novamente por 10 minutos a 1200 rpm colocado em um tubo, e ressuspendido novamente.

Uma parte da suspensão, usada como controle, foi colocada sobre lâmina, sem a droga. No restante do material adicionou-se hycanthone diluido em solução com NaCl a 0,85%. A concentração final desta solução foi de 10^{-3}M. Após 15 minutos de exposição à droga, o material é retirado e colocado sobre lâminas, fixado imediatamente ou após 20 minutos pingando-se 2 gotas de ácido acético a 45%. A seguir todos os preparados foram colocados numa cubeta contendo ácido acético a 45% por 1 minuto para a remoção de detritos. Quando os preparados estavam secos, efetuou-se a coloração

5. Coloração com azul de toluidina.

Os vários preparados foram submetidos a tratamentos com RNase numa concentração de 0,05% (1 hora para os túbulos de Malpighi e para as células de rim bovino e 2 horas para as raízes de milho), antes da coloração. Esta foi realizada com uma solução de 0,02% de azul de toluidina em tampão McIlvaine a pH 4, durante 15 minutos (LISON, 1960). Para o caso dos linfócitos dispensou-se o tratamento enzimático, uma vez que a participação de RNA nessas células é bastante reduzida.

A seguir os preparados foram lavados em água destilada e secos ao ar, segundo método de VIDAL (MELLO & VIDAL, 1980). Foram finalmente diafaniza-

dos em xilol e montados em bálsamo do Canadá.

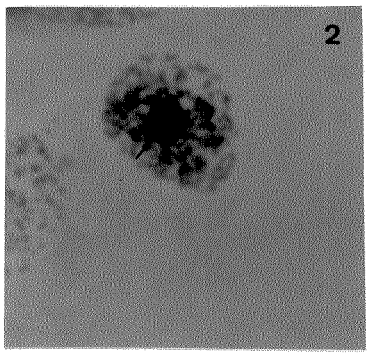
A observação do material foi realizada num fotomicroscópio Zeiss equipado para microscopia de polarização

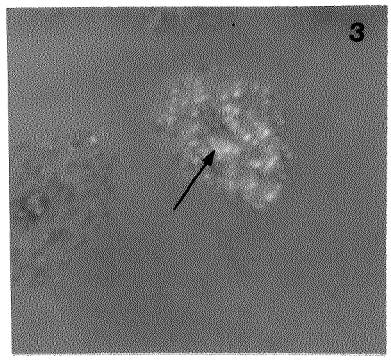
Uma fonte de luz ultra - violeta , foi usada para investigações de anisotropia.

IV - RESULTADOS

1. Núcleos de *Triatoma infestans*.

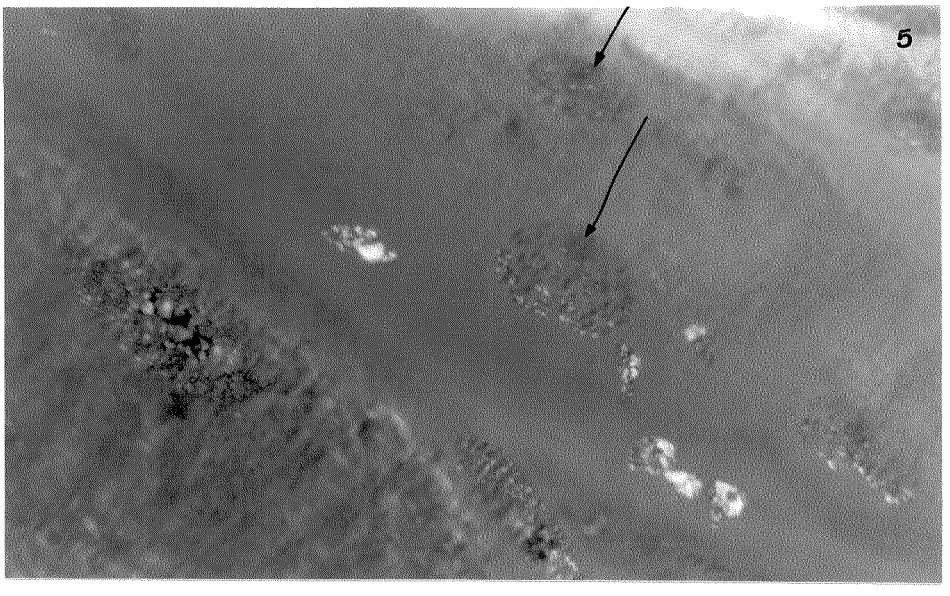
Nas figuras 2 a 7 são observados os núcleos poliplóides das células epiteliais de túbulos de Malpighi de *Triatoma infestans* corados com azul de to - luidina a pH 4,0 , após tratamento com RNase. No material controle tanto a eucromatina como a heterocromatina exibem metacromasia (Fig. 2). Além disso, ambos os tipos de cro matina, examinados com microscopia de polarização, mostram se birrefringentes. (Fig. 3).

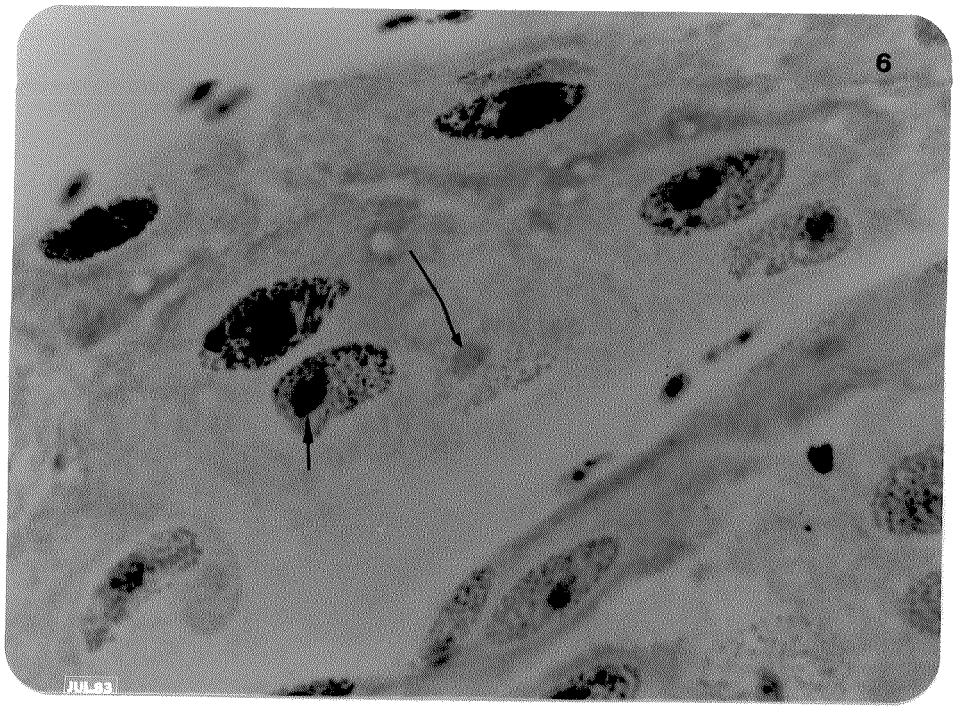


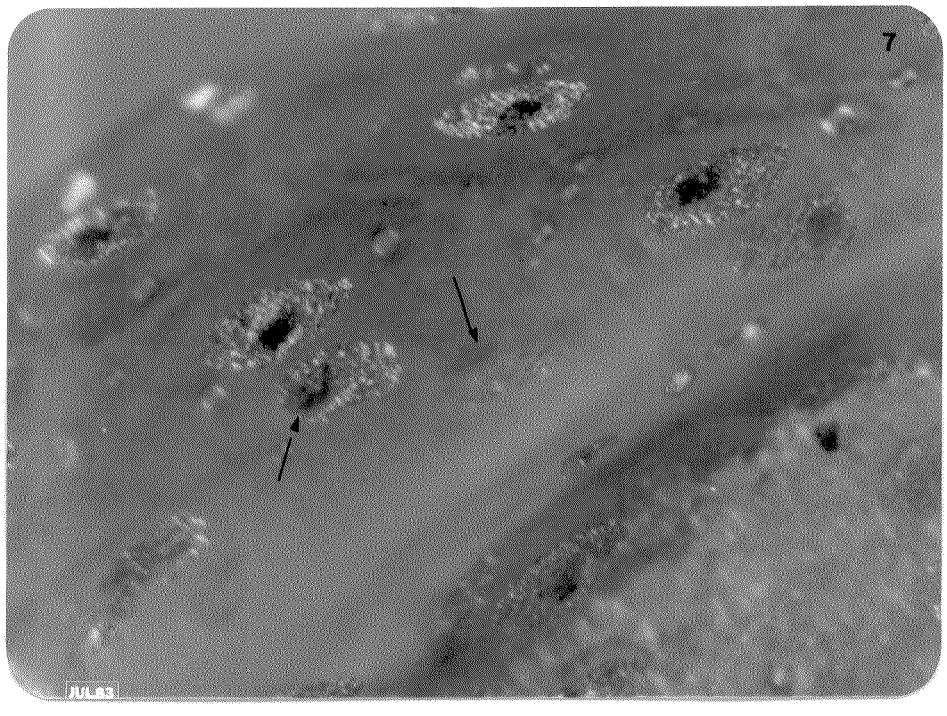


Figs. 2 e 3 - Aspecto visual da basofilia (2) e birrefringência (3) de um mesmo núcleo poliplóide de túbulo de Malpighi de *Triatoma infestans* corado com azul de toluidina a pH 4,0 após remoção de RNA.As setas indicam a área heterocromática. Aumento 660 X.

4


5


6
JUL93

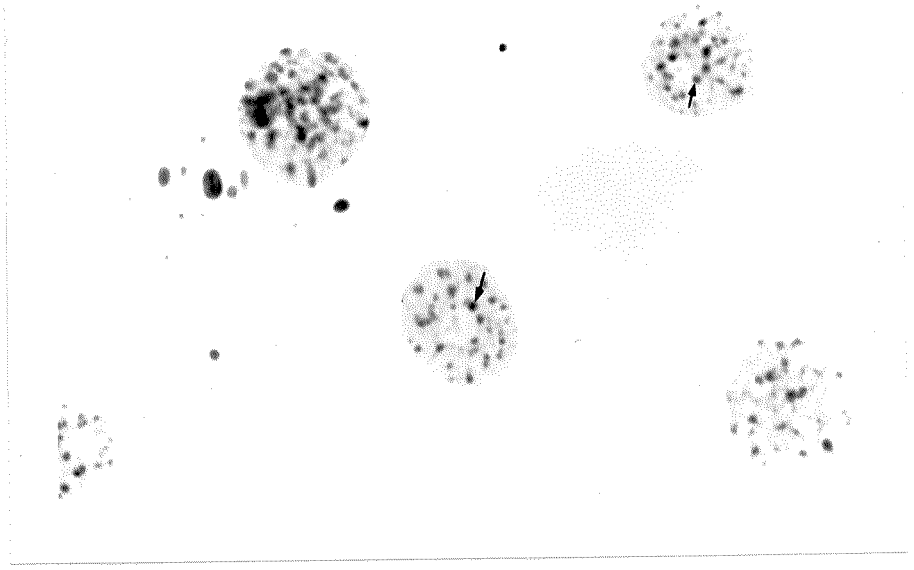

7
JUL93

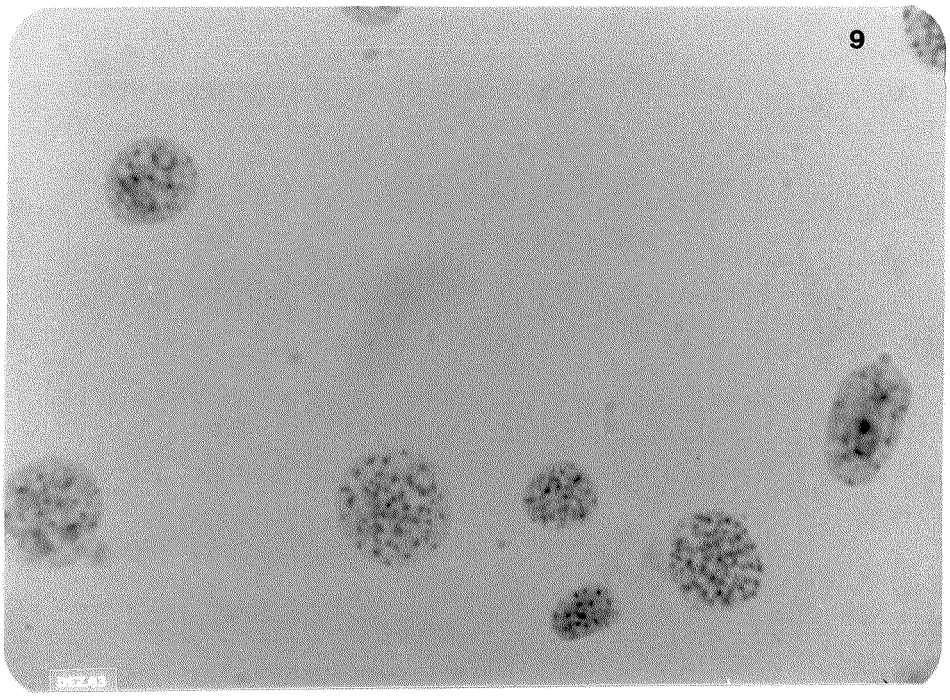
Por outro lado, em todos os experimentos nos núcleos de túbulo de Malpighi incubados com hycanthone ou provenientes dos insetos injetados com a mesma droga podem aparecer algumas imagens semelhantes às do controle (Figs. 4 e 5), porém na maioria dos casos a heterocromatina exibe uma basofilia de cor esverdeada e azulada, enquanto a eucromatina aparece violeta (Figs. 4 e 6). Então, deixa de ser detectada birrefringência na heterocromatina (Figs. 5 e 7). Alguns núcleos foram também observados onde a basofilia geral, inclusive da eucromatina, apareceu esverdeada (Fig. 6), acompanhada por total ausência de birrefringência (Fig. 7).

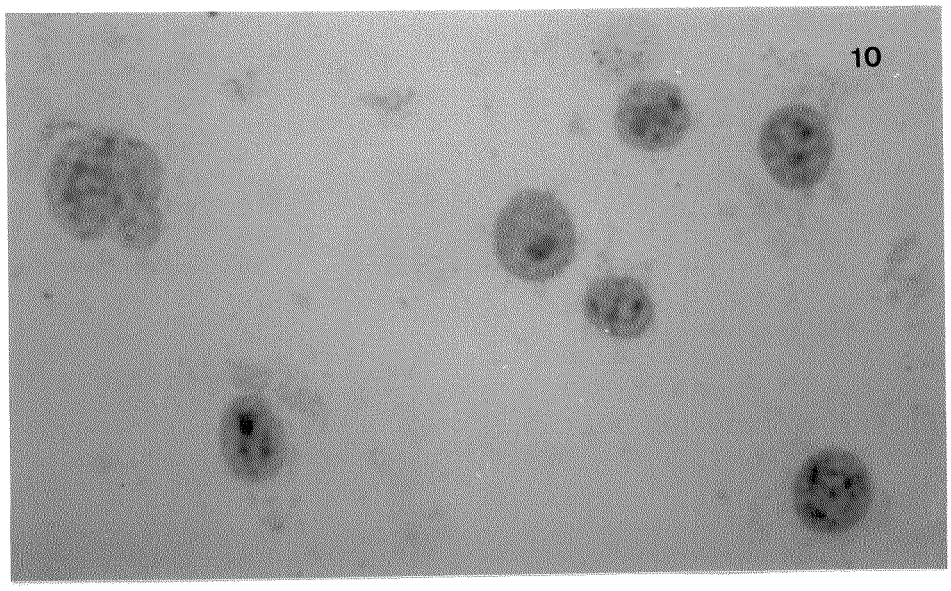
Não deve deixar de ser mencionado que, ao lado dos núcleos poliplóides dos túbulos de Malpighi, núcleos pequenos, de outros tecidos , podem aparecer nos mesmos preparados. Estes núcleos não parecem ser afetados em suas propriedades de basofilia e anisotropia pelo hycanthone (Figs. 4 a 7), principalmente no material em que foi injetado a droga. No material que foi inoculado com hycanthone, observamos alguns poucos núcleos esverdeados.

2. Núcleos das células IB-RB-25(2).

Primeiramente os núcleos das células da linhagem IB-RB-25(2), foram submetidos ao método de




9


10

banda C de SUMNER (1972), a fim de se confirmar a presença de cromocentros já descritos para núcleos interfásicos de bovinos (SCHNEDL, 1972). Foram encontradas diversas áreas condensadas mais intensamente coradas e espalhadas por todo o núcleo (Fig. 8) e que equivalem às regiões heterocromáticas centroméricas já descritas (SCHNEDL,1972).

As células tratadas com RNase e corado com azul de toluidina a pH 4, exibiu metacromasia especialmente nos cromocentros (Fig. 9). Em culturas tratadas com hycanthone, a cromatina apresentou-se com uma basofilia de cor azul - esverdeada, especialmente na heterocromatina (Fig. 10). Além disso, os cromocentros aparecem mais dilatados e com forma heterogênea (Fig. 10). Em todos os tratamentos foram obtidos os mesmos resultados acima relatados.

O fenômeno de birrefringência foi constatado nos núcleos do material controle, porém com intensidade muito fraca, o que impediu sua documentação fotográfica. Nas células tratadas com hycanthone , os núcleos não exibiam tal fenômeno de anisotropia.

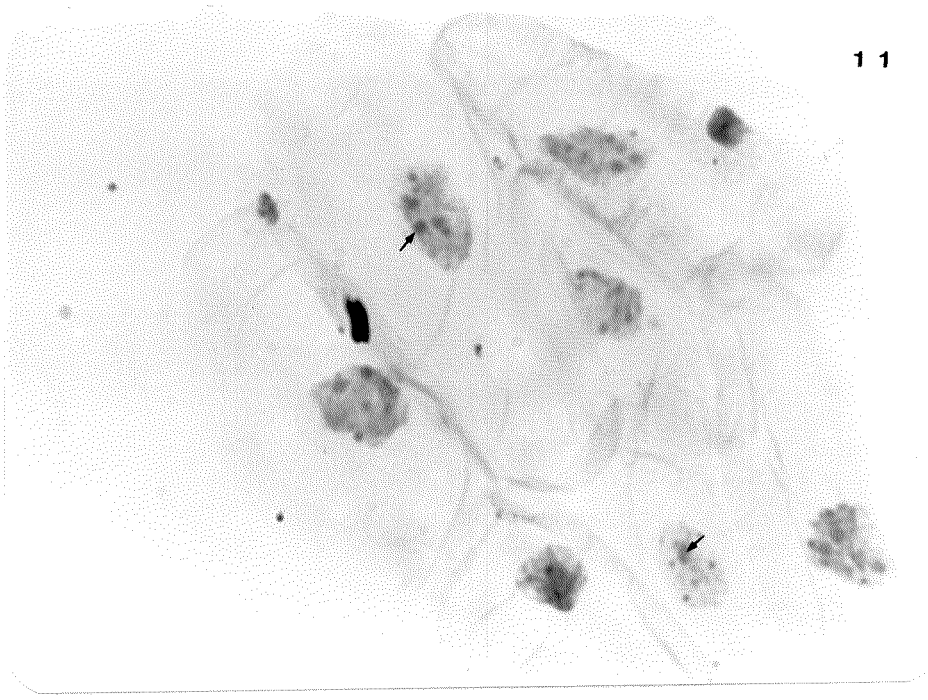
3. Núcleos de células de raíz de *Zea mays*.

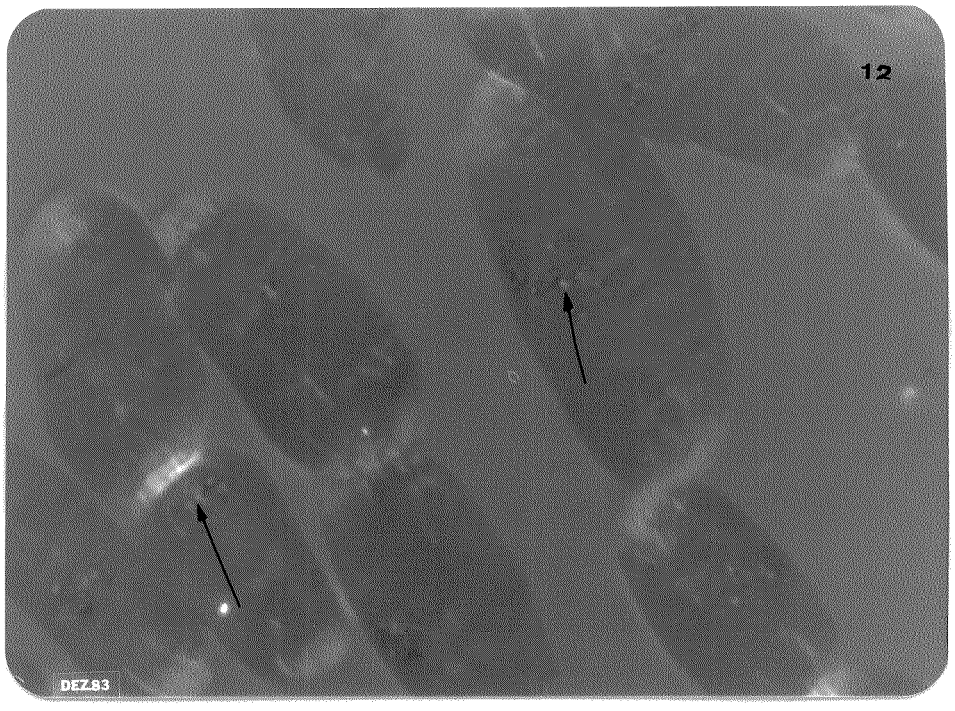
Nas Figs. 11 a 15, são observados núcleos de células merismáticas de raíz de milho que foram coradas com azul de toluidina após tratamento com RNase.

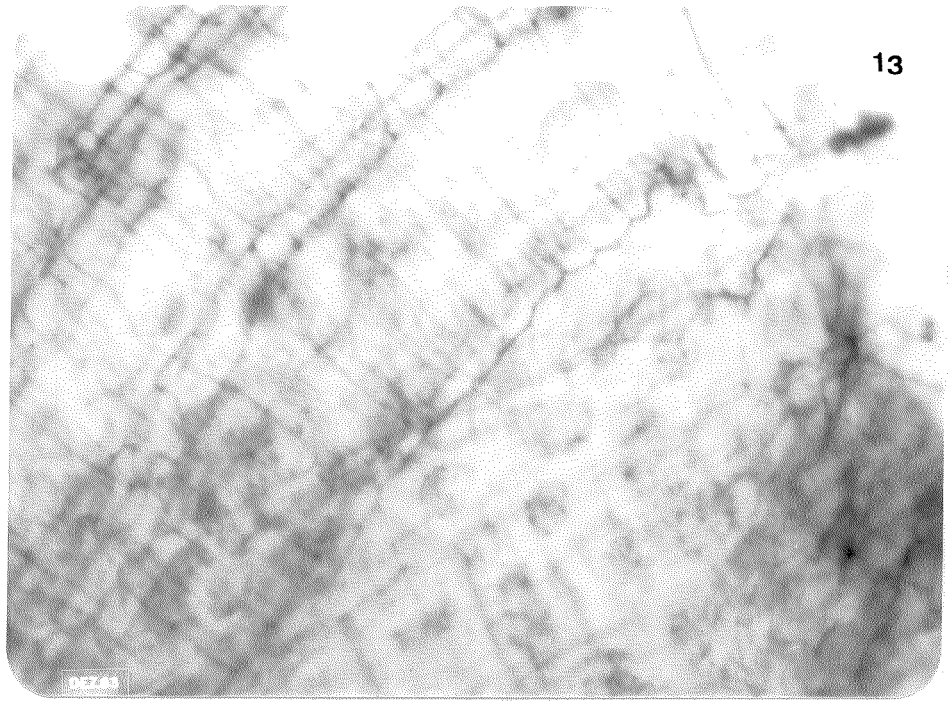
Os núcleos do material controle - (Fig. 11) apresentam-se metacromáticos, evidenciando nitidamente regiões pontuadas mais coradas que constituem os pequenos cromocentros, no caso, " knobs ". Entretanto, nos núcleos das raízes tratadas com hycanthone numa concentração de 10^{-3}M, nota-se uma basofilia de cor esverdeada, tanto nas porções eucromáticas como heterocromáticas (especialmente nestas últimas). Além disso, pode-se notar que os cromocentros mostram-se menos nítidos. (Fig. 13).

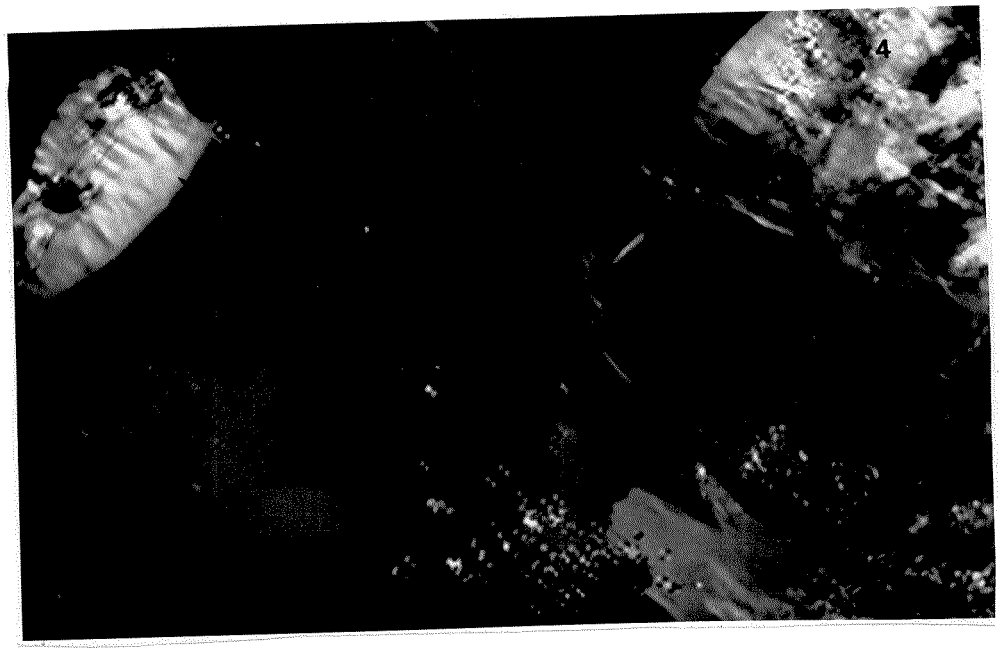
Quando estes preparados são examinados ao microscópio de polarização, os núcleos dos preparados controle mostram uma imagem de birrefringência cujo brilho exibe cor de interferência amarelada (Fig. 12)contrastando com o brilho prateado devido à birrefringência das paredes celulares.

No material tratado com a droga não foi detectada birrefringência nos núcleos, mas somente na parede celular (Fig. 14) e nos grãos de amido (Fig . 15) que se acham presentes em certos tipos de milho e que não foram detectados no material proveniente da cultivar PD (MS). Estes resultados acima descritos foram encontrados em todos os tratamentos com a droga e nos diferentes tempos de fixação.


11


12
DEZ.83




4

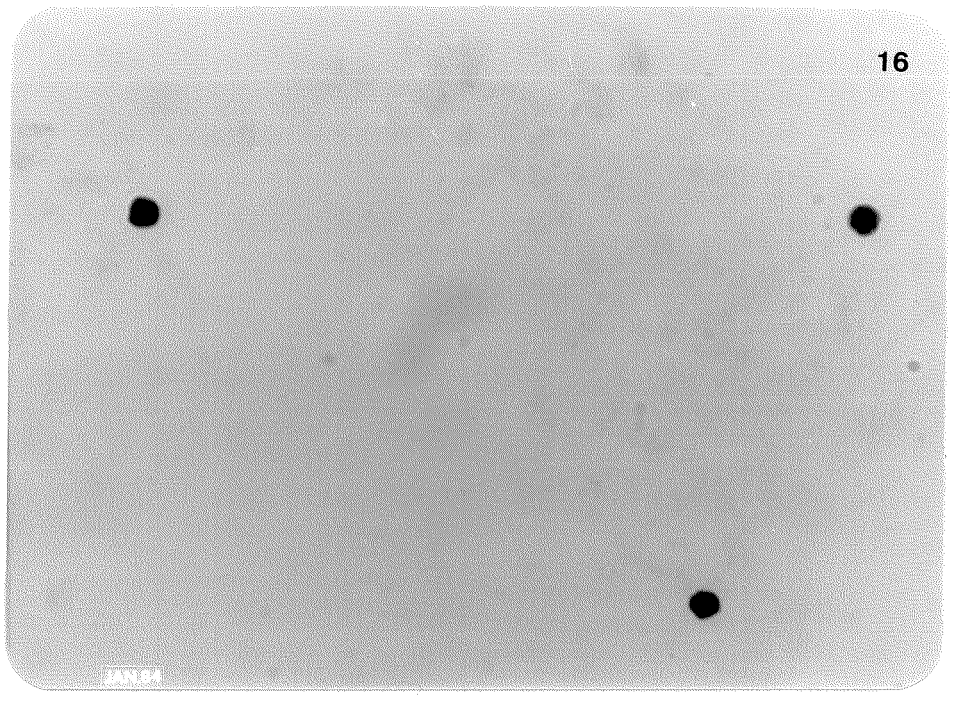
15

4. Núcleos De linfócitos de camundongos.

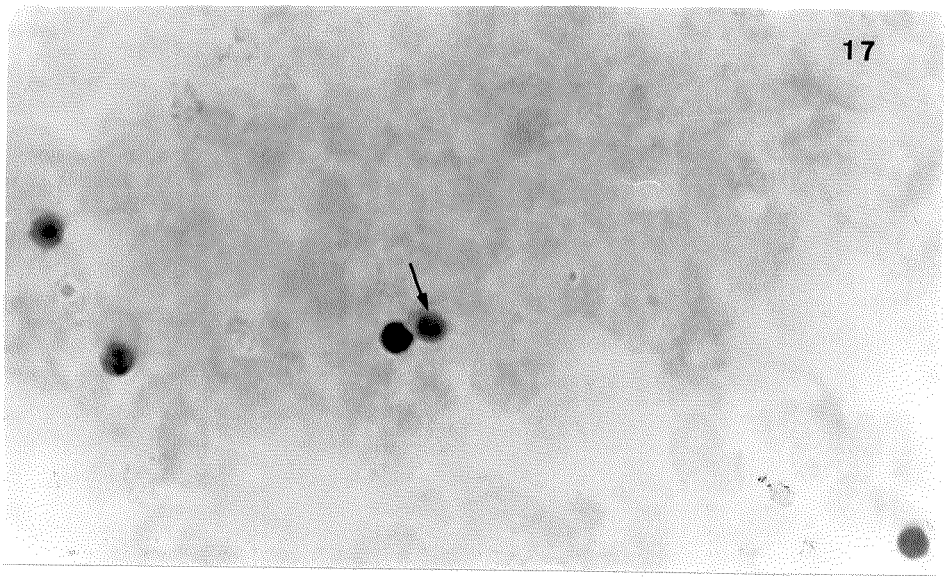
Nas Figs. 16 a 18 observamos os núcleos de linfócitos de camundongo que foram corados com azul de toluidina a pH 4,0. Os núcleos do material controle (Fig. 16) apresentam-se metacromáticos em contraposição aos núcleos do material tratado (Figs. 17) , que exibem uma basofilia esverdeada e azulada.

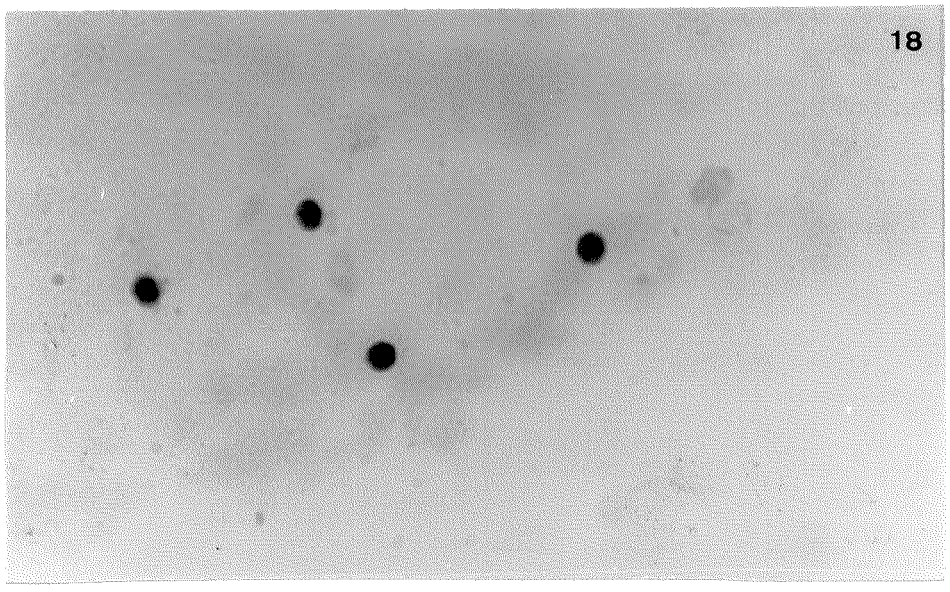
Na Fig. 17 são observados núcleos do material tratado com a droga e que sofreu uma fixação após 20 minutos. Podemos notar que estes núcleos se mostram muito mais esverdeados do que os núcleos da Fig. 18 . Estes últimos foram imediatamente fixados e mostram-se levemente azulados, sendo alguns deles muito semelhantes aos do controle.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL



16


17


18

IV - DISCUSSÃO

Levando-se em conta o significado da basofilia nuclear (BERGERON & SINGER, 1958 ; MIURA & OHBA, 1967; TOEPFER, 1970) e as propriedades intercalantes das moléculas de hycanthone em relação ao DNA (WARING, 1970; MELLO *et alii.*, 1978; ONG, 1978), é de se esperar que nas regiões onde a droga penetrar significamente e se ligar aos grupos fosfatos do ácido nucleico , a basofilia se apresentará de cor esverdeada (MELLO *et alii.*,1978).

Além disso, com a perda do estaqueamento dos pares de bases do DNA e da distribuição orientada das moléculas de azul de toluidina, a birrefringência deverá diminuir intensamente ou desaparecer (MELLO *et alii.*, 1978).

Com base nos dados deste trabalho há indicação de uma ligação preferencial das moléculas de hycanthone à heterocromatina nos túbulos de Malpighi de *T. infestans*. Entretanto, nos outros materiais analisados, isto é, nas células IB-RB-25(2) e de raiz de milho, a droga penetrou e permaneceu tanto na eucromatina como nas porcões heterocromáticas. O mesmo se deu em muitos núcleos de linfócitos de camundongo, que contêm grande parte da eucromatina na forma compactada, além da própria heterocromatina. Mesmo nos túbulos de Malpighi de *T. infestans*, algumas variações com relação ao padrão de basofilia foram

constatadas, por exemplo, uns poucos núcleos totalmente verdes ou totalmente metacromáticos. Casos foram observa - dos em que numa mesma célula epitelial binucleada , apenas um dos núcleos permitiu o alojamento da droga na hetero - cromatina, enquanto que o outro núcleo permaneceu inteira- mente metacromático. Tais tipos de variações, talvez sejam devidos a diferentes condições de metabolismo celular e mesmo nuclear, que afetem diferentemente as estruturas dos tipos cromatínicos considerados, bem como a sua composição em termos de complexos DNA-proteína. Neste mesmo material de *T. infestans* variações em afinidade por íons Mg^{++} , re- fletindo diferenças em interação DNA-proteína foram já re- latadas em heterocromatinas de núcleos de uma mesma célula (MELLO & VIDAL, 1983). Foi também encontrada neste mate- rial descompactação de heterocromatina em apenas um dos núcleos da célula binucleada, pela ação do composto Hoech- st 33258, sugerindo uma assincronia da fase S , para dois núcleos de uma mesma célula (MELLO, 1983 - informação pes soal).

No caso dos linfócitos o fato dos preparados que foram imediatamente fixados, estarem seme - lhantes ao controle, enquanto que nas outras lâminas que foram fixadas após 20 minutos terem a maioria dos núcleos esverdeados, poderia estar relacionado a uma alteração da estrutura de complexo DNP durante esses 20 minutos, que provavelmente favoreceu a estabilização da ligação do hy - canthone na cromatina.

Além disso, é importante lembrar

que os presentes resultados foram obtidos em material fixado com ácido acético, este fixador remove proteínas, como histonas ricas em lisina, do complexo deoxiribonucleoproteico (DICK & JOHNS , 1967). Pelo menos no caso dos núcleos dos túbulos de Malpighi de *T. infestans* que exibiam metacromasia na eucromatina após tratamento com o hycanthone, há possibilidade de haver ocorrido remoção da droga nessa eucromatina, pela ação do fixador. Para que drogas intercalantes, como no caso do hycanthone, se prendam fortemente nas fitas do DNA, há necessidade de que ocorram fortes interações hidrofóbicas com o mesmo (WARING , 1970), além da ligação eletrostática com os grupos fosfatos deste último (MELLO *et. alii.*, 1978). Possivelmente, isto não ocorra na eucromatina da maioria dos núcleos das células epiteliais dos túbulos de Malpighi,ao contrário do que se verifica na heterocromatina do mesmo sistema. Dada a atividade de transcrição dessa eucromatina é mesmo de se sperar menor oportunidade para intercalação da droga e para forte interação dessa com o DNA (CHITRE & KORGAONKAR , 1979). Isto certamente também pode ocorrer,mesmo em áreas eurocromáticas que não estejam transcrevendo , dada a observação de metacromasia e birrefringência em larga extensão nas mesmas.

Verificamos, além disso , que os cromocentros, especialmente das células de rim bovino e , em menos intensidade, nos cromocentros dos núcleos de raiz de milho e na cromatina condensada dos linfócitos, tornam-se mais difusos, descompactados, relaxados, pela ação da

droga. Com base nessas observações e nos nossos dados de ausência de anisotropia nesses sistemas, consideramos que, ao se alojar entre os pares de bases do DNA dos cromocentros, a droga promove um afrouxamento das fibras cromatínicas aí localizadas. Estas alterações na conformação do DNA por diversas drogas intercalantes foram, inclusive, demonstradas recentemente por NISHIO & UYEKI (1982) e explicam as quebras no DNA introduzidas por tais tipos de substâncias (ROSS *et. alli.*, 1979). Quanto aos núcleos dos túbulos de Malpighi, não se pode afirmar que tenha ocorrido uma descompactação do cromocentro pela presença da droga . Neste caso os cromocentros são corpos geralmente heterocromáticos individuais que se combinam entre si (MELLO,1978). O que, possivelmente, não permitiria o relaxamento da estrutura em questão, seria a presença de complexos proteicos mais estáveis, principalmente com relação à presença da histona H1 (KARAWAJEW *et alli.*, 1982), e talvez proteínas não histônicas, estruturais.

De certa forma os resultados indicando interação do hycanthone com heterocromatina e com a eucromatina compactada de linfócitos, estão de acordo com o relato de HOFF & MAcINNIS (1981) ao nível de microscopia eletrônica, muito embora o acerto da definição de áreas nucleares heterocromáticas nesse caso possa ter sido casual. Ainda mais, tais áreas poderiam representar eucromatina compactada, mas mesmo assim terem afinidade especial pelo hycanthone no sistema utilizado por esses autores. No entanto, a retenção de moléculas de hycanthone na eucroma-

tina, como em alguns dos tipos celulares estudados neste trabalho não foi verificada nas preparações de HOFF & MAcINNIS (1981), talvez por se tratar de material diferente.

Em se considerando o arranjo supra estrutural da eucromatina e da heterocromatina, é difícil imaginar o mecanismo que permite a penetração da droga especialmente no interior do DNA da heterocromatina. Embora sem esclarecer tal mecanismo, existem na literatura relatos de que outras drogas de caracter intercalante podem também apresentar uma preferência por heterocromatina (LERMAN, 1971; SIEGER *et alii.*, 1971). A constatação de ligação da actinomicina D à heterocromatina tipo constitutiva, comparada com a de tipo facultativa (SIEGER *et alii.* , 1971) ou também a ligação do brometo de etidium a uma cromatina compactada(LERMAN, 1971), podem indicar que a composição da cromatina, mais até do que uma simples condensação cromatínica, esteja envolvida no mecanismo de retenção de moléculas intercalantes no interior do DNA. Relatos de alguns autores (WEINSTEIN & HIRSCHBERG, 1971; ISONO & YOURNO, 1974) indicam que o hycanthone tem uma certa afinidade em se ligar nas regiões de DNA altamente repetitivo tanto em resíduos adenílicos (WEINSTEIN & HIRSCHBERG , 1971) como em sequências repetitivas com riqueza em C-G-C-G (ISONO & YOURNO, 1974). Nos casos estudados neste trabalho a composição das regiões heterocromáticas continha DNA repetitivo (SCHNEDL, 1972; MELLO, 1978 ; VIDAL *et alii.*, 1984), concordando com as proposições de WEINSTEIN

& HIRSCHBERG (1971) e ISONO & YOURNO (1974). Não se sabe, porém, se é significativa a participação desses tipos de DNA na eucromatina de linfócitos, das células em culturas e das células de milho.

A preferência de ligação da droga a áreas cromatínicas específicas, muitas vezes heterocromáticas, possivelmente explique a quebra de cromossomos e perda dos mesmos durante sua migração na anáfase (GREEN *et alii.*, 1973; ROCHA & KATZ, 1973; MELLO *et alii.*,1978). Isto, se considerarmos que em cromossomos com centrômero localizado, como na maioria dos materiais em que se detectaram perdas e quebras cromossômicas, a heterocromatina é de localização centromérica.

É também de interesse neste trabalho, ter-se verificado que núcleos de traquéias e tecido conjuntivo, presentes nos mesmos preparados dos túbulos de Malpighi e submetidos a um mesmo tempo de exposição à droga, quase nunca terem sido afetados pela mesma.Possivelmente a penetração e interação de hycanthone tenha ocorrido em larga escala nos túbulos de Malpighi, facilitadas pelo próprio mecanismo fisiológico das células envolvidas . Os túbulos de Malpighi destes insetos são, primordialmente , órgãos excretores, filtrando as substâncias da hemolinfa (WIGGESWORTH, 1965). É a partir da hemolinfa, ou, experimentalmente, de um meio de cultura que banhe os túbulos , que a droga transitará para as células dos mesmos.

As características de basofilia e desaparecimento de birrefringência cromatínica constatados nos materiais tratados com hycanthone diferem de resulta -

dos obtidos em materiais tratados com oxamníquine (BECHARA & MELLO, 1984). Esta droga vem sendo atualmente utilizada com muito sucesso no Brasil para o tratamento da esquistossomose. Aparentemente não se liga ao DNA como o hycanthone, e seus efeitos colaterais não são tão drásticos como os promovidos pela última. Por isso mesmo veio substituir em larga escala o uso do hycanthone, pelo menos neste país. No entanto sabe-se que na África o hycanthone é ainda utilizado no tratamento da esquistossomose apesar dos seus riscos.

VI - CONCLUSÕES

Com base nos dados desta tese , pode-se concluir que:

1. O hycanthone se liga preferencialmente à heterocromatina (se comparada à eurocromatina) de núcleos de órgãos excretores, de *T. infestans*. Isto já não se verifica em outros sistemas estudados (células animais isoladas e em cultura e células vegetais). Nestes não foi constatada tal tipo de preferência.

2. Variações dentro dos mesmos preparados, ou, em preparados de diferentes tipos celulares, no comportamento de ligação da droga ao DNA, possivelmente se devam:

   . a diferentes condições de metabolismo celular e/ou nuclear que afetem os tipos de complexos DNA proteína em termos de composição , arranjo e estabilidade.

   . à variação na remoção da droga pela fixação.

3. Com exceção do material de *T. infestans*, a penetração da droga causa efeitos drásticos em relação ao organizado arranjo supra estrutural da heterocromatina tendo, como consequência imediata, o seu afrouxamento, o que talvez facilite quebras no DNA dessas regiões. No caso do *Triatoma infestans* este fenômeno de relaxamento não ocorreu porque, provavelmente, a estrutura dos cromocentros apresente complexos DNA mais estáveis.

4. Uma vez que a heterocromatina é rica em DNA repetitivo, ao contrário da eurocromatina é possível admitir-se que a ligação do hycanthone a certos tipos de cromatina se deva mais a sua composição do que a seu próprio estado de condensação.

VII- RESUMO

A ligação do hycanthone, droga utilizada no tratamento da esquistossomose, a conhecida pela sua capacidade de penetração na molécula do DNA e de indução de quebras cromossômicas, foi investigada em áreas cromatínicas diferentes em termos de compactação, composição e fisiologia.

Com base na observação visual de características de basofilia e de anisotropia nucleares , pode-se demonstrar uma ligação preferencial do hycanthone pela heterocromatina em núcleos dos túbulos de Malpighi de *T. infestans* klug. Entretanto, em outros sistemas (Linfócitos de camundongo, células renais em culturas e células vegetais) a droga também pode se ligar à eucromatina, compactada ou não. A droga, ao penetrar nos vários tipos de heterocromatina (exceto na do *T. infestans*), promove o seu afrouxamento, o que certamente favoreça aí maior incidência de quebras. As variações de ligação do hycanthone ao DNA nos tipos celulares estudados possivelmente se relacionam a diferenças em composição, arranjo e estabilidade dos complexos DNA-proteína envolvidos.

VIII-SUMMARY

Hycanthone is a drug used for the clinical trials of schistossomiasis, although inducing chromosome breaks when it enters the DNA double helix . In this work the binding of hycanthone to chromatin areas differing in terms of composition and phisyology, was investigated.

Based on visual observation of nuclear basophilia and anisotropy a preferential binding of hycanthone to heterochromatin could be demonstrated in the nuclei of the Malpighian tubules of *T. infestans* Klug. However, in other cellular systems (mouse lymphocytes, Kidney cells in culture and plant cells), the drug can also bind to euchromatin irrespective of its compactness level.

When penetrating the various heterochromatin types (except in the case of *T. infestans* heterochromatin), the drug induces chromatin loosening,that certainly favors incidence of chromatin breaks. The variation of hycanthone binding to the DNA in the cell types studied in this work are possibly related to differences in composition, arrangement and stability of DNA-protein complexes involved.

IX - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, Z.A. SANTOS, H.A.; Borojevic, R & GRIMAUD, - J.Á. Lesões hepáticas produzidas por hycanthone (Etrenol). *Rev Inst.Med. Trop.16*;160-70,1974.

BECHARA, I.J. & Mello, M.L.S. - Basofilia e anisotropia nucleares em células de camundongo após tratamento com oxamniquine. *Rev. Inst. Med. - Trop.* (no prelo), 1984.

BERGERON, J.A. & SINGER, M. Metachromasy: an experi - mental and theoretical reevaluation.*J.Biophys. Biochem. Cytol*, *4*:433-57, 1958.

BRUTLAG, D.L. Molecular arrangement and evolution of heterochromatic DNA. *Ann. Rev. Genet. 14*:121 - 44, 1980.

CASTRO, M.P. de Clonal variation in the swine kidney - cell line, IB-RS-2 in relation to morphology , karyotype and susceptibility to the foot-and -

mouth disease virus (FMDV) *Archos Inst.Biol.* (São Paulo) *37* (2):103-27, 1970.

CHITRE, A.V. & KORGAONKAR, K.S. Binding of ethidium - bromide and quinacrine hydrochloride to nu - cleic acids and reconstituted nucleohistones . *Biochem. J. 179*: 213-9, 1979.

CLIVE, D.; FLAMM, W.G.; MACHESCKO, M.R. & BERNHEIN , N.J. A mutational assay system using the thy - midine kinase locus in mouse lymphoma cells . *Mutat. Res. 16*: 77-78, 1972.

COMINGS, D.E. The structure and function of chroma - tin. *Adv. Humangen. 3*: 273-431, 1972.

COUTINHO, A.D. & BARRETO, V.S. - Nossa experiência - com o hycanthone (Etrenol) na esquistossomo- se mansônica. *Rev. Inst. Med. Trop. 13*: 57-70, 1971.

CUNHA, A.S.; Carvalho, D.G.; CAMBRAIA, J.N.S. & Can - çado, J.R. - Manifestações de intolerância ao

hycanthone no tratamento da esquistossomose - mansoni. *Rev. Inst. Med. Trop. 13*: 213-22,1971.

DAVIS, A. - Management of the patient with schistosomiasis. In: JORDAN, P. & WEBBE, G. " *Schistosomiasis. Epidemiology, treatment and control* ". London, Willian Heinemann Medical - Books, 1982 - cap. 9, p 184-226.

DICK, C. and Johns, E.W. - The removal of histones - from calf thymus deoxyribonucleo-protein and calf thymus tissue with acetic acid containing fixatives. *Biochem J. 105*:46 p, 1967.

FRENSTER, J.H. Biochemistry and molecular biophysice- of heterochromatin and euchromatin In: LIMA-DE-FARIA, A, ed. HANDBOOK OF MOLECULAR CYTOLOGY , Amsterdam, North-Holland Publishing, 1969 pt . IV, cap. 12, p. 252-76.

GREEN, S.; SAURO, F.M. & LEGATOR, M.S. Cytogenetic effects of hycanthone in the rat. *Mutat. Res* . 17: 239-44, 1973.

HARTMAN, P.E.; BERGER, H. & HARTMAN, Z. Comparison of hycanthone (Etrenol), some hycanthone ana - logs, myxin and 4-nitroquinoline616oxide as frameschift mutagens. *J. Pharmac. Exp. Ther. 186*: 390-8, 1973.

HEITZ, E. Das Heterochromatin der moose. *Jb. Wiss.Bot. 69*: 762-818, 1928.

HOFF, S.F. & MAcINNIS, A. High-resolution localiza - tion of drug binding sites. *J. Ultrastruct. Res. 74*: 205-16, 1981.

HSU, T.C. & ARRICHI, F.E. Distribution of constitutive heterochromatin in mammalian chromosomes. *Chromosoma, 34*: 243-53, 1971.

ISONO, K. & YOURNO, J. Chemical carcinogens as fra - meshift mutagens: Salmonela DNA sequence sensitive to mutagenesis by polycyclic carcinogens. *Proc. Natn. Acad. Sci. 71*:1612-7, 1974.

KARAWAJEW, L.; BOETTGER, M.; H., HEYMANN, S.;BEHCKE , J. & LINDIGKEIT, R. Etidium bromide induces - chromatin aggregation. The role of histone Hl. *Stud. Biophys*, 87: 1 - 9, 1982.

KATZ, N.; PELLEGRINO, J. & OLIVEIRA, C.A. Further Clinical trials with hycanthone, a new anti-schistossomal agent. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.18* : - 924-9, 1969.

KOSEKI, T. & ABUHAB, T.G. Isolamento de linhagens celulares bovinas e suscetibilidade ao vírus da febre aftosa. *Archos. Inst. Biol.* (São Paulo) *46*:45-54, 1979.

LEA. M.A.; MULLER, S.; MACKALF I.; HIRSCHBERG, E. & - MORRIS, H.P. Action of Miracil D and related compound on DNA and RNA. Synthesis in regenerating liver and hepatomas.*Int.J.Cancer 9*:484-9,1979 .

LERMAN, L.S. Intercalability, the $\Psi^{\cdot}$ transition, and the state of DNA in nature. *Progr. Mel.Subcell Biol. 2*: 381-91, 1971.

LEVI, G.C.; Tratamento das parasitoses intestinais . *Rev. Ass. Med. Brasil 28*: 20-4, 1982.

LISON, L.; Histochimie et cytochimie animales . *Gauthier - Villars*, Paris, 1960.

MARINHO, R.P.; GODOY, P.; RASO, P. & NEVES, J.; Hepatopatia pós-tratamento da esquistossomose mansoni pelo hycanthone. III - registro de um novo caso de atrofia amarela aguda. *Rev. Inst . Med. Trop. 16*: 354-61, 1974.

MELLO. M.L.S. Nuclear behavior in the Malpighian tubes of *Triatoma infestans* (Reduv.Hemiptera) . *Cytologia 36*: 42-9, 1971.

MELLO, M.L.S. Feulgen-DNA values and ploidy degrees in the Malpighian tubes of some triatomids . *Revta. Bras. de Pesquisa Med.e Biol. 8*:101-7, 1975.

MELLO, M.L.S. Heterocromatina,*Ciênc.Cult.*(São Paulo)*30*: 290-303, 1978a.

MELLO, M.L.S. Computer analysis of stained chroma - tin on Malpighian tubes of *Triatoma infestans* klug (Hemiptera, Reduviidae). *Mikroskopie 34*: 285-99, 1978b.

MELLO. M.L.S. Toluidine blue binding capacity of hete rochromatin and euchromatin of *Triatoma infes- tans*klug. *Histochemisty 69*: 181-7, 1980.

MELLO, M.L.S. Cytochemical properties of euchromatin and heterochromatin.*Histochem, J. 15*: 739-51 , 1983.

MELLO, M.L.S.; RAYMUNDO, H.H. & PRETTI, M.C.M. Action of hycanthone methanesulfonate on chromatin ba sofilia and anisotropy in oniom meristems. *Cy- tologia 43*: 397-404, 1978.

MELLO, M.L.S. & VIDAL, B.C. Changes in anisotropic - properties and nuclear stainability during sper matogenesis in the grasshoper *Staurorhectus lon gicornis* Gigliotoss. *Adv.Invertebr.Reprod. 1* : 75-83, 1977.

MELLO, M.L.S. & VIDAL, B.C. Práticas de Biologia Celular, Campinas Edgard Blucher, 1980, 71p.

MELLO,M.L.M. & VIDAL, B.C. Basofilia nuclear em heterocromatina e eurocromatina de *Triatoma infestans* In:SIMPÓSIO ANUAL DA ACADEMIA DE CIÊNCIAS DO ESTADO DE SÃO PAULO, 8, São Paulo,1983. *Resumos dos trabalhos* S.n.t. p. 17.

MIURA, A. & OHBA, Y. Structure of nucleohistone. III. Interaction with toluidine blue.*Biochim. Biophys. Acta* 145: 436-45, 1967.

MORGAN, D.T.Jr. The formation of chromocenters in interkinetic nuclei of Maize. *J. Heredity* 34:195-8, 1943.

NISHIO, A. & UYEKI, E.M. Nuclease sensitivity of methylated DNA as a probe for chromatin reconstitution by genotoxicants. *Biochem. Biophys. Res. Commum.* 107: 485-91, 1982.

ONG, T.M. & SERRES, F.J. Mutagenic evaluation of antischistosomal drugs and their derivatives in *Neurospora crassa J. Toxicol. Environ.Health*, 1: 271-9, 1975.

ONG, T.M. Genetic activities of hycanthone and some other antischistosomal drugs. *Mutat. Res.* 55 : 43-70, 1978.

PIMPINELLI, S.; GATTI, M. & MARCO, A. de Evidence for heterogeneity in heterochromatin of *Drosophila melanogaster*. *Nature* 256: 335-7, 1975.

PETERSON, N.E. & BELL, S. Effect of hycanthone on root tips of *Vicia Faba*. *Cytologia* 39: 515 - 24 , 1974.

RAY, V.A.; HOLDEN, H.E.; ELLIS, J.H. Jr. & HYNECK, M. L. A comparative study on the genetic effects of hycanthone and oxamniquine.*J. Toxicol. Environ. Health.* 1: 211-27, 1975.

ROCHA, L.R.S.C. & KATZ, N. Action of hycanthone on onion meristems. *Ciênc. Cult.* (São Paulo).25: 348-50, 1973.

ROMHANYI, G. Submicroscopic structure of interphase - nucleic as revealed by topooptical staining

reactions. *Acta Morph.Hung.* 15: 131-45, 1967 .

ROSI, D.; PERUZZOTTI, G.; DENNIS, E.W.; BERBERIAN, D. A.; FREELE, H. & ARCHER, S. A new, active me - tabolite of " Miracil D ". *Nature 208*: 1005-6, 1965.

ROSS, W.E.; GLAUBIGER, D. & KOHN, K.W. Qualitative - and quantitative aspects of intercalator-indu- ced DNA strand breaks. *Biochim. Biophys. Acta 562*: 41-50, 1979.

SCHNEDL, W. Giemsa banding, quinacrine fluorescente - and DNA replication in chromosomes of cattle (*Bos taurus*) *Chromosoma 38*: 319-28, 1972.

SIEBER , S.M.; WHANG-PENG, J.; JOHNS, D.G. & ADAMSON, R.H. Effects of hycanthone on rapidly prolife- rating cells. *Biochem. Pharmacol. 22*:1253-62 , 1973.

SIEBER, S.M.; WHANG-PENG, J. & ADAMSOM, R.H. Terato - genic and cytogenic effects of hycanthone in

mice and rabbits. *Teratology 10*:227-36, 1974 .

SIEBER, S.M. & ADAMSON, R.H.Evaluation of the teratogenic activity of hycanthone in mice and rabbits.*J. Toxicol. Environ. Health. 1*: 309-22 , 1975.

SIEGER, M.; GARWEG, G. & SCHWARZACHER, H.G. Constitutive e heterochromatin in *Microtus agrestis* : binding of actinomycin D and transcriptional inactivity. *Chromossoma 35*: 84-98, 1971.

SUMNER, A.T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exp.Cell.Res.* 75 : 304-6, 1972.

TOEPPER, K. Die thiazinfarhstoffe. *Progr.Histochem.Cytochem, 1*:277-354.

VIDAL, B.C., Doppelbrechungsdispersion und Linear_dichroismus von Eu- und Heterochromatin nach Färbung mit Toluidinblau- Nach_weis eines cotton - Effektes. *Beitr. Pathol. 145*:269-85, 1972.

5432 | BC

VIDAL, B.C. The effect os clupein on anisotropy and basophilia of polytene chromosomes. *Histochem.* *60*: 309-16, 1979.

VIDAL, B.C.; SILVA, W.J. & STRIKIS, P.C. Nuclear Phenotypes and DNA content of root cells of *Zea mays*, *Zea diploperennis*, and a mazoid hybrid . *Cell. and Molecular Biol. 29*: (no prelo) , 1984.

WARING, M.J. Drugs and DNA: Uncoiling of the DNA double helix as evidence of intercalation. *Humangenetik* 9: 234-6, 1970.

WEINSTEIN, B. & HIRSCHBERG, E. Mode of action of miracil D. *Prog. Mol. Subcell. Biol.* 2: 232-46 , 1971.

WHITE, J.C. & ELMES, P.C. Fibres of humam sodium deoxyribonucleate and nucleoprotein studies in polarized light by simple method. *Nature 169* : 151-2, 1952.

WIGGLESWORTH, V.B. The principle of insect physiology. *Methuen* & Co. Ltd., London, 1965.

WILSON, R.G.; CHURCH, J.A. & SYLVAIN, N.P. The effect of Miracil D upon the template properties of polynucleotides for a bacterial RNA polymerase. *Biochim. Biophys. Acta* 277: 546-6, 1972.

WILSON, R.G.; BODNER, R.H. & MACWHORTER, G.E. Inhibition of macromolecular synthesis in L1210 mouse leukemia ascites cell by hycanthone. *Biochem Biophys. Acta* 378: 260-8, 1975.

WITTNER, M.; TANOWITZ, H. & ROSENBAUM, R.M. Studies with the schistosomicide hycanthone; Inhibition of macromolecular synthesis and its reversal. *Expl. Mol. Pathol* 14: 124-33, 1971.