

BASOFILIA E ANISOTROPIA NUCLEARES EM CÉLULAS DE CAMUNDONGO APÓS TRATAMENTO COM OXAMNIQUINE

Ivanira José BECHARA e Maria Luiza S. MELLO

RESUMO

Com o objetivo de se estudar a ação da oxamniquine, uma droga utilizada no tratamento da esquistossomose, sobre a cromatina de núcleos de células animais, foram estudados os padrões de basofilia e anisotropia nucleares em hepatócitos, em células do músculo cardíaco e em linfócitos de camundongos adultos jovens. A oxamniquine foi administrada por via oral (436 mg/kg) e preparados foram obtidos após diversos tempos de fornecimento da droga aos animais. Nos núcleos corados com azul de toluidina a pH 4,0, após digestão com RNase, não se encontrou diferença quanto aos padrões de basofilia e anisotropia comparando-se animais tratados com controles. Demonstrou-se assim que as moléculas de oxamniquine não se alojam no interior da dupla hélice do DNA, não alteram a sua conformação helicoidal nem se ligam aos grupos fosfatos livres desta macromolécula, diferindo, portanto, da atuação de outro esquistossomicida, o hycanthone.

INTRODUÇÃO

A oxamniquine (6-hidroxi-metil-2-isopropilaminometil-7-nitro-1, 2, 3, 4-tetrahydroquinoleína), droga usada com razoável eficiência no tratamento da esquistossomose, foi introduzida em 1969, por RICHARDS & FOSTER¹³. Estudos ao nível celular mostram que seu uso não acarreta aberrações cromossômicas *in vitro*⁴ nem tampouco em pacientes portadores de esquistossomose¹². No entanto, não foi ainda excluída a possibilidade da oxamniquine atuar nos cromossomas animais, ao nível do DNA, alterando a sua conformação e a sua complexação com proteínas como acontece, por exemplo, em larga escala, em células tratadas com hycanthone^{14,15}.

Pelo fato das moléculas de hycanthone penetrarem no interior da dupla hélice de DNA alterando a conformação deste e afetando a sua complexação com proteínas, cromossomos de material tratado com esta droga e a seguir corados com azul de toluidina a pH 4,0 exibem alterações em suas propriedades de basofilia e

birrefringência⁷. Os padrões de basofilia e anisotropia nucleares de material animal ou vegetal tratado com solução de azul de toluidina a pH 4,0 se devem à disposição das moléculas do corante ligadas aos grupos fosfatos disponíveis de DNA e RNA^{5,10,11}. Quanto menor for a disponibilidade em grupos fosfatos livres (não complexados a proteína) e a proximidade destes, no DNA, menor será a interação entre os elétrons ressonantes das moléculas do corante e a absorção resultante terá um máximo deslocado para comprimentos de onda longos (ao redor de 630nm)¹¹. Este é o padrão de basofilia da cromatina de alguns tipos de espermatozóides, em que a proteína complexada ao DNA é muito rica em resíduos de arginina^{6,9}, e de complexos DNA-proteína cujos fosfatos potencialmente disponíveis ao corante acham-se ligados a drogas⁷. Em outro extremo, DNA puro apresenta a maior disponibilidade em grupos fosfatos hábeis em prenderem o corante eletrostaticamente, resultando numa absorção má

xima próxima de $\lambda = 550\text{nm}$ (basofilia metacromática) ^{5,9,11}. No que se refere à birrefringência cromatínica, no último caso apresentará ela uma cor anômala amarelo-esverdeada, uma vez que devida à orientação dos pares de bases do DNA mais a orientação dos polímeros de moléculas de azul de toluidina helicoidalmente dispostos ao redor do DNA⁹. Quando poucas moléculas de corante se ligam ao DNA, como no primeiro caso, a birrefringência apresentada é causada apenas pelo arranjo orientado das bases do DNA e a cor anômala resultante é prateada⁹.

Buscando-se conhecer o efeito da oxamniquine ao nível do DNA em células animais, no presente trabalho foram estudados os padrões de basofilia e anisotropia de núcleos de hepatócitos, de células do músculo cardíaco e de linfócitos de camundongos tratados com tal droga.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 10 camundongos machos com 3 meses de idade e peso igual a $35,5\text{g} \pm 1,3$. 0,31ml de solução de xarope Mansil (Pfizer) contendo 15,5mg de oxamniquine (solução final $17,9 \times 10^{-2}\text{M}$), portanto, 436 mg/kg, foram administrados aos camundongos por via oral, pela técnica de entubação. A dose eficaz (DE_{99}) oral em camundongos é de 44mg/kg e a letal (DL_{50}) oral, 1300 mg/kg². Dois camundongos, considerados controle, receberam 0,31 ml de água. Os animais foram sacrificados, por decapitação, após diversos tempos de administração da droga (12h, 24h, 48h, 7 e 30 dias). No momento da decapitação, colheu-se sangue dos animais, efetuando se esfregaço do mesmo. Dos camundongos ainda, retiraram-se o fígado e o miocárdio, obtendo-se destes, decalques e esmagamentos, respectivamente. Dois animais experimentais foram sacrificados para cada tempo.

Os esfregaços e decalques foram fixados em etanol acético (3:1) por 2 min., a seguir lavados em etanol a 70% (1 min.) e então deixados secar. De cada animal foram preparadas 5 lâminas de esfregaço de sangue e 5 de decalques de fígado.

Quanto ao miocárdio, seu ápex³ foi removido e fixado em etanol acético (3:1) por 5 a 10 min. Pequenos fragmentos do músculo cardíaco (1mm) foram, então, colocados sobre as

lâminas, sobre as quais já havia sido depositada uma gota de ácido acético a 45%. Estes fragmentos foram dissociados e esmagados entre lâmina e lamínula. Após remoção das lamínulas, congelando-se os preparados em nitrogênio líquido, as lâminas foram mergulhadas em etanol a 70% por 1 min. e deixadas secar. De cada animal foram preparadas 5 lâminas.

Todas as lâminas foram coradas com solução a 0,025% de azul de toluidina a pH 4,0 por 15 min.⁵, após as mesmas terem sido mergulhadas em água destilada por 5 min. e tratadas por uma solução aquosa a 0,05% de RNase (Sigma) por 90 min. a 37°C. A seguir, foram lavadas com água destilada e postas para secar. Os preparados foram a seguir diafanizados em xilol por 15 min. e montados em bálsamo do Canadá.

De todas as lâminas foram feitas observações visuais da basofilia e anisotropia nucleares. As medidas fotométricas de absorbância foram efetuadas em fotomicroscópio Zeiss equipado com fotômetro 01 e fotomultiplicador EMI 6256. As condições operacionais de medida foram as seguintes: objetiva 63/0,9, optovar 2, diafragma de medida com diâmetro igual a 0,16 mm, diafragma de campo com diâmetro igual a 0,2mm, $\lambda = 500$ a 625nm e luz não polarizada. Com as medidas de absorbância foram determinadas curvas de basofilia a partir das quais se constatou o comprimento da onda (λ) do pico de absorção. Calculou-se também o valor dos índices metacromáticos (IM) a partir dos dados de absorbância (A) em $\lambda = 625\text{nm}$ e $\lambda = 555\text{nm}$ ($\text{IM} = A_{\lambda = 555\text{nm}}/A_{\lambda = 625\text{nm}}$). Para este cálculo foram utilizadas 5 medidas de absorbâncias para cada condição experimental. Os valores de IM foram depois comparados estatisticamente entre si.

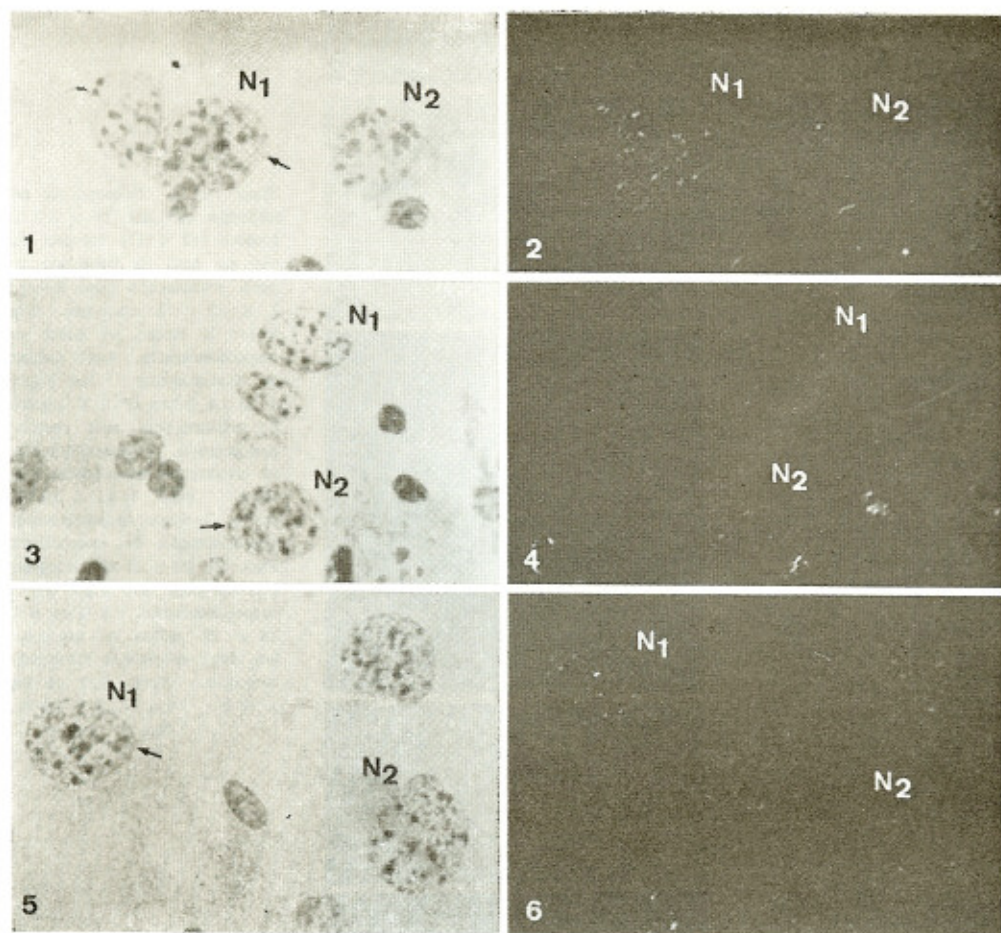
As observações de anisotropia foram feitas nos preparados corados com solução de azul de toluidina, em fotomicroscópio Pol-Zeiss, com objetiva Plan 40/0.65, optovar 1,25 e 1,6, compensador de Bräce-Köhler $\lambda/10$ e luz UV polarizada.

RESULTADOS

Os aspectos da basofilia e da anisotropia de núcleos de hepatócitos de camundongos tratados com RNase e corados com solução de azul de toluidina são mostrados nas Figs. 1 a 6. Tanto em termos de basofilia como de aniso-

tropia não foram encontradas diferenças em aspecto visual quando se compararam os núcleos de células de animais controle (Figs. 1, 2, 7, 8, 12, 13) com os provenientes de animais

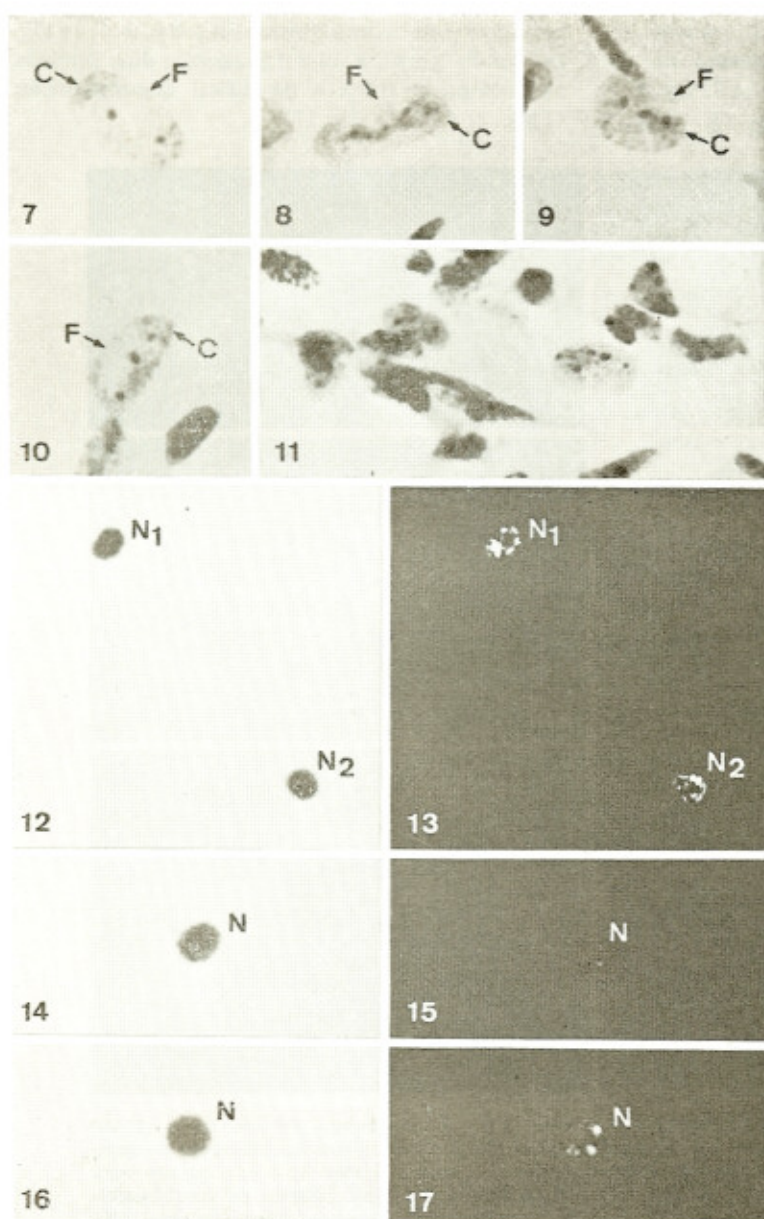
tratados com oxamniquine (Figs. 3, 6, 9-11, 14-17). De modo geral a birrefringência dos núcleos apresentou-se fraca e de difícil documentação (Figs. 2, 4, 6, 13, 15, 17).



Figs. 1-6 — Núcleos de hepatócitos de camundongo corados com solução de azul de toluidina a pH 4,0 após tratamento com RNase. Figs. 1 e 2: controle. Figs. 3 e 4: 12 horas após administração de oxamniquine. Figs. 5 e 6: 7 dias após administração da droga. As setas nas Figs. 1, 3 e 5 indicam tipos de núcleos utilizados para as medidas citofotométricas. As Figs. 2, 4 e 6 são imagens de birrefringência das Figs. 1, 3 e 5, respectivamente. A letra N nas Figs. 1 e 2 indica o mesmo núcleo em duas diferentes situações de observação. Idem para as Figs. 3-4 e 5-6. 672 \times

Partindo-se da observação visual de semelhança da basofilia nas várias condições experimentais utilizadas neste trabalho, foram determinadas curvas espectrais de absorção apenas para os animais controle e para aqueles cujo tempo de administração da droga havia sido de 12 horas e 7 dias. No caso das células musculares cardíacas foram também determinadas curvas para animais que haviam recebido a droga 30 dias antes de serem sacrificados. As curvas de absorção para os hepatócitos fo-

ram sempre determinadas em áreas nucleares de cromatina mais frouxa, não abrangendo cromocentros e afastando-se, portanto, a possibilidade de introdução de erros distribucionais nas medidas, devido à estrutura cromatínica. Os cromocentros não puderam ter medidas efetuadas unicamente sobre sua área, pois esta é reduzida demais para tal. De preferência foram escolhidos para análise núcleos como os apontados na Fig. 1 (provavelmente 8n), com áreas ideais para medida citofotométrica. Quan-



Figs. 7-17 — Núcleos de células do músculo cardíaco (7 a 11) e de linfócitos (12 a 17) corados com solução de azul de toluidina a pH 4,0 após tratamento com RNase. Figs. 7, 8, 12 e 13: controle. Figs. 9, 10 e 11: 12 horas, 48 horas e 7 dias, respectivamente, após administração de oxamniquine. Nas Figs. 7, 8, 9 e 10 as letras F e C mostram área de eucromatina mais frouxa e mais compactada, respectivamente, onde se efetuaram as medidas citofotométricas. Figs. 14-15 e 16-17: 24 horas e 7 dias, respectivamente, após administração de oxamniquine. As Figs. 13, 15 e 17 são imagens de birrefringências das Figs. 12, 14 e 16, respectivamente. A letra N nas Figs. 12 e 13 indica os mesmos núcleos em duas diferentes situações de observação. Idem para as Figs. 14-15 e 16-17. Figs. 7, 8 e 10-17, 860 \times ; Fig. 9, 670 \times

to às células do músculo cardíaco, foram medidas absorbâncias em duas regiões eucromáticas que diferiam em compactação (Figs. 7 a 10).

Quando se compararam as curvas de absorção de material controle versus experimental, não foram encontradas diferenças quanto à localização do pico de absorção e ao valor dos índices metacromáticos (Tabelas I e II).

As pequenas diferenças em localização do λ do pico de absorção no caso das células mus-

culares do miocárdio e dos linfócitos não são significantes, pois são menores que 20 nm⁸.

DISCUSSÃO

Conforme constatado no presente trabalho, em células de animais sadios tratados com oxamniquine, os padrões de basofilia e anisotropia nucleares após coloração com solução de azul de toluidina a pH 4,0 não se alteram, quando comparados aos do controle. Diferem, portanto, de resultados descritos para células

T A B E L A I
 Picos de absorção e índices metacromáticos de núcleos de camundongos tratados com oxamniquine. Os preparados foram submetidos à digestão com RNase e corados com azul de toluidina a pH 4,0

Tipos celulares	Condições experimentais	λ do pico de absorção (nm)	Índices metacromáticos ($\bar{X} \pm S$) (n=5)	Tipos celulares	Condições experimentais	λ do pico de absorção (nm)	Índices metacromáticos ($\bar{X} \pm S$) (n=5)
Hepatócitos	Controle *	580	1,348 \pm 0,229	Células musculares cardíacas	Controle *	590 (F)	0,863 \pm 0,071
	12 hs após administração de oxamniquine	580	1,291 \pm 0,071		580-590 (C)	1,177 \pm 0,089	
	7 dias após administração de oxamniquine	580	1,154 \pm 0,105		590 (F)	0,876 \pm 0,110	
Linfócitos	Controle *	590	1,221 \pm 0,118	Células musculares cardíacas	Controle **	580 (C)	1,154 \pm 0,105
	12 hs após administração de oxamniquine	580	1,261 \pm 0,089		12 hs após administração de oxamniquine	590 (F)	0,851 \pm 0,100
	7 dias após administração de oxamniquine	580	1,410 \pm 0,155		590 (C)	1,146 \pm 0,105	
Linfócitos	Controle *	590	1,221 \pm 0,118	Células musculares cardíacas	7 dias após administração de oxamniquine	580-590 (F)	0,805 \pm 0,095
	12 hs após administração de oxamniquine	580	1,261 \pm 0,089		580 (C)	1,144 \pm 0,089	
	7 dias após administração de oxamniquine	580	1,410 \pm 0,155		590 (F)	0,771 \pm 0,141	
					30 dias após administração de oxamniquine	590 (C)	1,177 \pm 0,063

* = animais com 3 meses de idade; ** = animais com 4 meses de idade;
 C = eucromatina compacta; F = eucromatina frouxa

T A B E L A II
Análise de variância calculada para os índices metacromáticos de núcleos de hepatócitos, de células musculares cardíacas e de linfócitos (controle vs. experimental)

Material	FV	G.L.	SQ	QM	F
Hepatócitos	Entre	2	0,101	0,050	1,923 < $F_{0,05} = 4,10$
	Dentro	12	0,307	0,026	
	Total	14	0,408	0,029	
Células musculares cardíacas (eucromatina frouxa)	Entre	4	0,038	0,010	0,909 < $F_{0,05} = 5,80$
	Dentro	20	0,226	0,011	
	Total	24	0,264	0,011	
Células musculares cardíacas (eucromatina compacta)	Entre	4	0,005	0,001	0,125 < $F_{0,05} = 5,80$
	Dentro	20	0,168	0,008	
	Total	24	0,173	0,007	
Linfócitos	Entre	2	0,100	0,050	3,125 < $F_{0,05} = 4,10$
	Dentro	12	0,186	0,016	
	Total	14	0,286	0,020	

tratadas com hycanthone. Neste último caso, os núcleos exibem alterações nos seus padrões da basofilia (pico de absorção se desloca para $\lambda = 630\text{nm}$) e, sob certas concentrações da droga, surgem sérias alterações da birrefringência da cromatina (inclusive desaparecimento desse fenômeno)⁷. Isto indica haver diminuição no número de moléculas de azul de toluidina ligadas ao substrato corado bem como, desorientação molecular do DNA, promovidas pelas moléculas de hycanthone que se intercalam entre pares de bases adjacentes do DNA^{14,15} e se prendem a alguns dos grupos fosfatos do DNA⁷. Portanto, o DNA assim tratado apresenta alterações em sua conformação bem como, possivelmente, na sua complexação com proteínas.

Com base nesses resultados, deduz-se, por conseguinte, que as moléculas de oxamniquine não penetram no DNA em células animais, não alteram sua conformação molecular nem se ligam aos seus grupos fosfatos. Resultados semelhantes haviam sido já por nós encontrados em material vegetal (raízes de *Allium cepa*)¹.

No entanto, uma vez que se desconhecia a necessidade ou não de uma metabolização da droga no organismo animal, os dados para vegetais não podiam ser extrapolados para animais, incluindo o homem.

SUMMARY

Nuclear basophilia and anisotropy in cells of mice treated with oxamniquine

With the aim of evaluating the effect of oxamniquine, a drug used in the clinical trials of schistosomiasis mansoni, on chromatin of animal cell nuclei, the patterns of nuclear basophilia and anisotropy were determined for hepatocytes, cardiac myocytes, and lymphocytes of young adult mice. The animals received the oxamniquine orally in a single dose of 436 mg/kg. Cell preparations were obtained at various times after the administration of the drug. The nuclei were subjected to RNase digestion and stained with a toluidine blue solution at pH 4.0. No difference was found when compar-

ing the patterns of nuclear basophilia and anisotropy of treated animals with those of untreated controls. It was demonstrated that the oxamniquine molecules do not penetrate the interior of the DNA double helix, neither do they alter the helical conformation of this nucleic acid. Furthermore, the oxamniquine molecules do not attach themselves to the free phosphate groups of the DNA. Therefore, this drug does not affect the DNA of the animal chromatin, differing from another schistosomicide, hycanthonone.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho configurou parte da dissertação de Mestrado de I. J. Bechara e contou com o financiamento do CNPq. As autoras agradecem aos Drs. Luiz C. S. Dias e Dídimo Napoleão Jr. pelo fornecimento da droga Mansil.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BECHARA, I. J. & MELLO, M. L. S. — Estrutura cromossômica e ciclo celular após tratamentos com oxamniquine. IV Congresso da Sociedade Brasileira de Parasitologia. Resumos dos trabalhos apresentados na sessão de painéis (Campinas, São Paulo, 1 a 4 de fevereiro de 1979, p. 119).
2. FOSTER, R. — The preclinical development of oxamniquine. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 6: 1-9, 1973.
3. GRANT, J. C. B. — *Atlas de Anatomia*. Rio de Janeiro, Editora Guanabara, 1946.
4. HOLDEN, H. E.; RAY, V. A.; WAHRENBURG, N. G. & FLORIO, J. R. — A cytogenetic survey of schistosomicides. *Somatic Cell Genetics Conference*, Isla de Sto. Thomas, Virgin Islands, p. 10, 1974.
5. LISON, L. — *Histochimie et Cytochimie Animales*. Paris, Gauthier-Villars, 1960.
6. MELLO, M. L. S. — Induced metachromasia in bull spermatozoa. *Histochemistry* 74: 387-391, 1982.
7. MELLO, M. L. S.; RAYMUNDO, H. H. & PRETTI, M. C. M. — Action of hycanthonone methanesulfonate on chromatin basophilia and anisotropy in onion meristems. *Cytologia* 43: 397-404, 1978.
8. MELLO, M. L. S. & VIDAL, B. C. — Anisotropic properties of toluidine blue-stained collagen. *Ann. Histochem.* 18: 103-122, 1973.
9. MELLO, M. L. S. & VIDAL, B. C. — Changes in anisotropic properties and nuclear stainability during spermatogenesis in the Grasshopper, *Staurorhectus longicornis* Giglio-Toss. *Adv. Invert. Reprod.* 1: 75-83, 1977.
10. MELLO, M. L. S. & VIDAL, B. C. — Optical properties of plant chromosomes during mitosis. *Cytologia* 39: 315-320, 1974.
11. MIURA, A. & OHBA, Y. — Structure of nucleohistone. III. Interaction with toluidine blue. *Biochim. Biophys. Acta* 145: 436-445, 1967.
12. MONSALVE, M. V.; PESSOA, O. F.; CAMPOS, A. M. G. & SETTE, H. — A study of chromosomes of schistosomiasis patients under oxamniquine (UK 4271) treatment. *J. Toxicol. Envir. Health* 1: 1023-1026, 1976.
13. RICHARDS, H. C. & FOSTER, R. — A new series of 2-aminomethyltetrahydroquinoline derivative displaying schistosomicidal activity in rodents and primates. *Nature* 222: 581-582, 1969.
14. WARING, M. — Binding of drugs to supercoiled circular DNA: evidence for and against intercalation. *Progr. Mol. Subcell. Biol.* 2: 216-231, 1971.
15. WARING, M. — Variation of the supercoils in closed circular DNA by binding of antibiotics and drugs: evidence for molecular models involving intercalation. *J. Mol. Biol.* 54: 247-279, 1970.

Recebido para publicação em 8/2/1983.