Nívea Dulce Tedeschi Conforti Froes

Investigação de Efeitos Induzidos por Euphorbia Tirucalli L. em Cromossomos de Linfócitos Humanos

unesp

1910000316

NÍVEA DULCE TEDESCHI CONFORTI FROES

INVESTIGAÇÃO DE EFEITOS INDUZIDOS POR *Euphorbia tirucalli* L. EM CROMOSSOMOS DE LINFÓCITOS HUMANOS

Dissertação apresentada para obtenção do grau de Mestre em Genética, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Área de Concentração em Genética, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".

SÃO JOSÉ DO RIO PRETO

1985

Inst. de Biociências, Letras e Ciências Exatas - UNESP
BIBLIOTECA
T. 316/86

Orientador: Profa. Dra. Marileila Varella-Garcia

Este trabalho foi realizado nos Departamentos de Botânica e Biologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto, da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", com auxílio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Comissão de Projetos Especiais (CPE, UNESP).

Dedico a

João e Mercedes, meus pais,
pelo desprendimento com que dedicaram
suas vidas à formação de seus filhos.

Paulo e João Paulo,
pela certeza do verdadeiro amor.

"Mire e veja: o importante e bonito, do mundo, é isto: que as pessoas não estão sempre iguais, ainda não foram terminadas - mas que elas vão sempre mudando. Afinam ou desafinam. Verdade maior. É o que a vida me ensinou."

Guimarães Rosa

"... Eu creio que o trabalho científico, juntamente com outras formas de trabalho criador, é o principal propulsor da evolução do espírito humano. A evolução do espírito humano dá significado à evolução humana e à evolução universal."

Theodosius Dobzhansky

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Marileila Varella-Garcia, exemplo de força e inteligência, que fez renascer em mim o sentido da vida científica.

Ao Prof. Dr. Celso Abbade Mourão e à Profa. Dra. Hermione Elly Melara de Campos Bicudo, mestres sempre prontos a transmitir-nos lições de dignidade e de dedicação à ciência.

Ao Prof. Dr. James Robert Coleman, amigo leal e responsável, como chefe do Departamento de Botânica, pelo ambiente solidário e pacífico necessário ao bom desenvolvimento do trabalho didático e científico.

Aos colegas do Departamento de Botânica, pelo interesse e incentivo demonstrados desde os primeiros momentos da minha vida profissional.

Aos meus professores na Pós-Graduação, que me possibilitaram crescimento e amadurecimento científico.

Aos queridos companheiros do curso de Pós-Graduação, pelo constante espírito de fraternidade e união.

Aos funcionários dos Departamentos de Botânica e Biologia, que me auxiliaram tão atenciosamente nos serviços laboratoriais, fotográficos e datilográficos do presente trabalho.

Aos doadores de sangue, que gentilmente se dispuseram a colaborar com este trabalho.

Ao Dr. Francisco Carvalho, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, e ao Dr. Bruno Mancini, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, responsáveis pela extração e pela análise espectrofotométrica, respectivamente, das frações do avelós utilizadas neste estudo.

À Comissão de Projetos Especiais (CPE) da UNESP e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo auxílio financeiro.

À Direção do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, pela disposição das condições materiais.

A José e Thereza Froes, meus sogros, por me amarem como sua verdadeira filha.

Ao Pai Maior, obrigada pela alegria de viver.

ÍNDICE

I. INTRODUÇÃO

I.1. Mutagênese e carcinogênese: considerações gerais..... 1

I.2. Natureza e relacionamento dos processos mutagênicos e carcinogênicos..... 6

I.3. Procedimentos experimentais para a avaliação da atividade mutagênica..... 8

I.3.1. Testes em sistemas bacterianos..... 9

I.3.2. Testes indiretos por meio de hospedeiros..... 10

I.3.3. Detecção de letais..... 11

I.3.4. Estudos citogenéticos..... 11

I.3.4.1. Micronúcleos..... 11

I.3.4.2. Índice mitótico e aberrações cromossômicas 13

I.3.4.3. Trocas entre cromátides-irmãs (TCI)..... 14

I.3.4.4. Associação de satélites..... 15

I.4. Produtos naturais de plantas da família Euphorbiaceae. 16

I.5. Objetivos..... 21

II. MATERIAL E MÉTODOS

II.1. Doadores..... 22

II.2. Planta estudada..... 22

II.3. Frações analisadas..... 24

II.4. Experimentos desenvolvidos..... 25

II.5. Estudo cromossômico..... 25

II.6. Análise estatística..... 29

III. RESULTADOS

III.1. Escolha das concentrações a serem testadas..... 31

III.2. Índice de proliferação celular..... 33
III.3. Freqüência de anomalias cromossômicas estruturais e numéricas..... 36
III.4. Freqüência de trocas entre cromátides-irmãs (TCI)... 51
III.5. Freqüência de associações entre os cromossomos acrocêntricos..... 61

IV. DISCUSSÃO

IV.1. Índice de proliferação celular e aberrações cromossômicas 68
IV.2. Trocas entre cromátides-irmãs (TCI)..... 79
IV.3. Associação de satélites..... 83

V. RESUMO E CONCLUSÕES..... 86

VI. SUMMARY..... 89

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 92

I. INTRODUÇÃO

I.1. Mutagênese e carcinogênese: considerações gerais

Nos últimos cinqüenta anos, os seres vivos têm sido amplamente expostos a uma grande variedade de novas substâncias, tais como medicamentos, pesticidas, corantes, aditivos alimentares, cosméticos e poluentes do ar e da água. Muitos desses compostos exercem sobre eles, de forma direta ou indireta, efeitos prejudiciais principalmente representados pela mutagênese e pela carcinogênese.

A mutagênese consiste no aparecimento de alterações transmissíveis da informação genética, as mutações, sendo designado mutagênico o agente que induz tais alterações.

Quando as mutações resultam da modificação de uma ou algumas bases nitrogenadas são classificadas como gênicas ou puntiformes. Nesse caso elas podem ser produzidas por mecanismos de substituição de bases, com a incorporação de seus análogos ao DNA, dando lugar ao desemparelhamento na replicação seguinte, ou pela inserção ou perda de bases, alterando a matriz de leitura do código genético. As mutações gênicas não são observadas citologicamente, mas geralmente exercem efeitos detectáveis no fenótipo do portador.

Quando ocorrem alterações microscopicamente visíveis da estrutura ou do número de cromossomos, abrangendo uma grande quantidade de bases nitrogenadas, as mutações são classificadas como cromossômicas, sendo comumente designadas por aberrações cromossômicas. As aberrações cromossômicas numéricas resultam de falha na disjunção dos cromossomos filhos, durante a migração anafásica, e as aberrações cromossômicas estruturais resultam de

quebras únicas ou múltiplas na cromatina, com perda de segmentos ou com posterior fusão dos pontos de quebra de forma irregular, originando cromossomos aberrantes, por exemplo, com inversões, com translocações ou em anel.

A carcinogênese consiste no aparecimento de tumores, formados por um conjunto de células que se dividem de modo irregular, por uma série de eventos consecutivos. A característica de multi-estadio do processo carcinogênico foi proposta independentemente por ROUS & KIDD (1941) e BERENBLUM (1941a;b) e até hoje tem sido aceita como um recurso operacional para explicar a seqüência dos eventos. As bases moleculares e biológicas dessa característica, que envolve as fases de iniciação e promoção, não estão claramente delineadas, mas tem se tornado cada vez mais claro que muitos eventos carcinogênicos envolvem essas duas fases. Ao nível molecular, a fase de iniciação parece ser o resultado da indução do dano às moléculas de DNA de células com capacidade de divisão, as quais agem como substratos para a produção de mutação (TROSKO & CHANG, 1980). O mecanismo molecular da promoção, ao contrário do de iniciação que altera irreversivelmente as moléculas de DNA, parece incluir uma variedade de modos de "ligar e desligar" vários genes, que dariam uma vantagem de crescimento seletivo a uma célula específica mutada (TROSKO *et alii*, 1982).

Inicialmente era considerado carcinogênico todo agente ou processo que aumentava significativamente a freqüência de neoplasmas malignos na população (CLAYSON, 1962). Posteriormente, verificou-se que o mecanismo de ação tóxica dos compostos carcinogênicos era variado e puderam ser diferenciados, de acordo com HELENE & SOMERA (1979) e BOUTWELL *et alii* (1982), quatro tipos de agentes: (1) os carcinogênicos primários, que têm ação direta, não requerem ativação metabólica e provocam câncer

no próprio ponto de aplicação; (2) os procarcinogênicos, carcinogênicos proximais ou secundários, que originam tumores em órgãos específicos e dependem de ativação metabólica; (3) os cocarcinogênicos, com pouca ou nenhuma atividade carcinogênica por si, mas que aumentam consideravelmente o efeito de um carcinogênico secundário por facilitar a ativação metabólica deste ou alterar os mecanismos de reparo do DNA e (4) os promotores de tumor, agentes que causam o aparecimento de poucos tumores quando aplicados sozinhos, mas que quando aplicados repetidamente, em uma mesma área, em seqüência à aplicação de uma dose não-carcinogênica de um agente carcinogênico, aumentam significativamente o aparecimento de tumores, no mínimo de três modos: influenciando a taxa de mutação, alterando o mecanismo de reparo, ou causando a desrepressão de um gene regulador vizinho (BERENBLUM & ARMUTH, 1981).

Os carcinogênicos primários são, principalmente, agentes alquilantes e acilantes (iminas, epóxidos, sulfatos, sulfonatos, mostardas, compostos halogenados, carbamatos, anidridos e lactonas) que apresentam um centro eletrofílico por meio do qual se ligam, por covalência, aos centros nucleofílicos de polinucleotídios e de proteínas celulares.

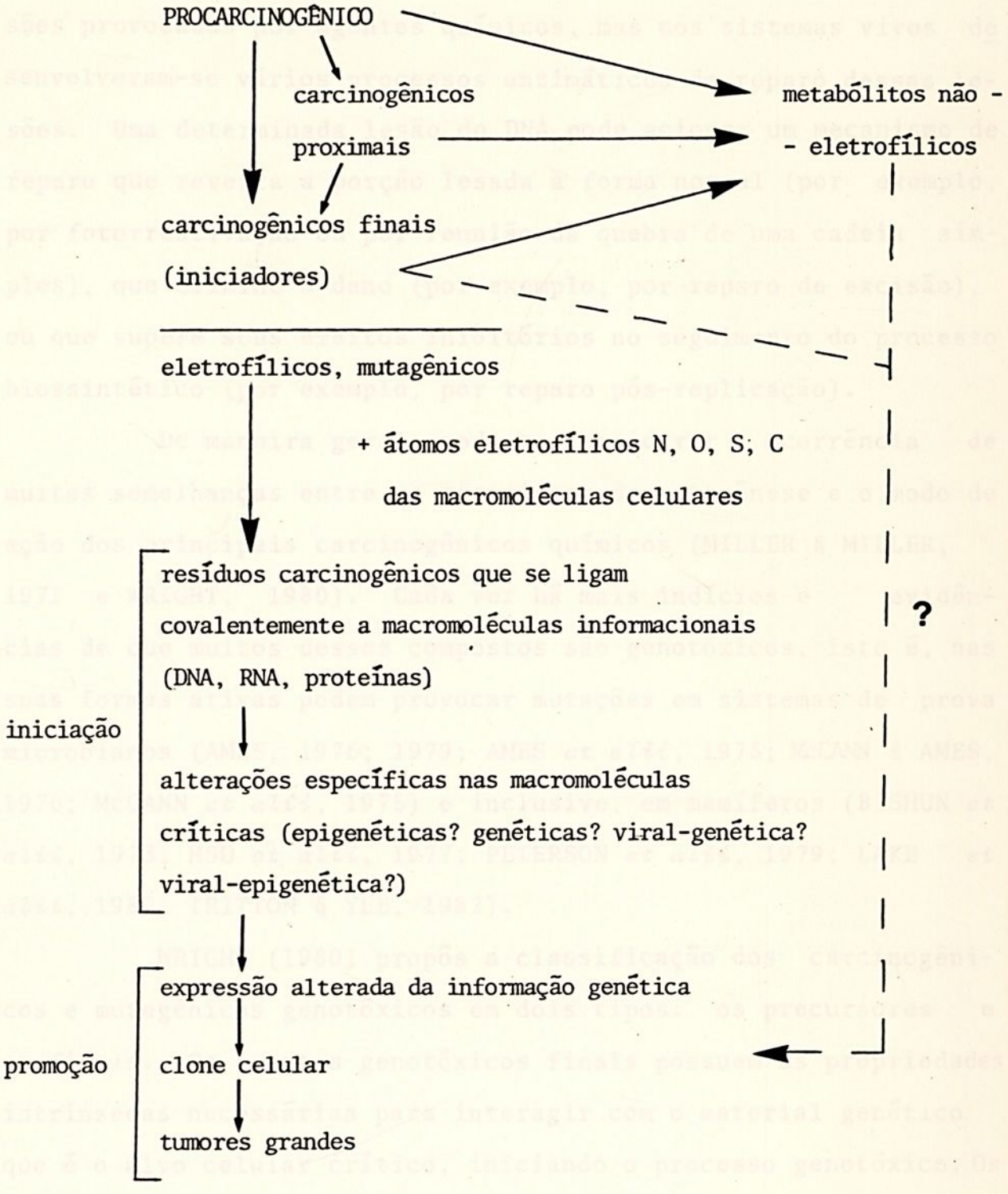
A classe dos procarcinogênicos inclui os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, certas aminas aromáticas, alquilnitrosaminas, compostos azóicos, alguns derivados halogenados e vários produtos naturais, como a aflatoxina B_1, o safrol, a cicasina, e outros, que durante a sua biotransformação originam compostos intermediários que vão reagir com os centros nucleofílicos celulares.

Os cocarcinogênicos são substâncias cuja importância passou a ser mais destacada recentemente, porque potenciam a ati

vidade de carcinogênicos secundários. O enxofre e seus compostos, aldeídos e fenóis são exemplos de cocarcinogênicos que estimulam a biotransformação dos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos.

Entre os promotores de tumor, o agente mais potente descrito é o éster de forbol 12-0-tetradecanoil-forbol-13-acetato (TPA), mas existem muitos outros ésteres de forbol com grau variado de propriedades promotoras, inflamatórias e iniciadoras (SLAGA *et alii*, 1974). Outros compostos específicos com atividade promotora são conhecidos, entre eles o ácido iodoacético, a antralina e um número de outros fenóis, como d-limoneno, certos ésteres de ácidos graxos e muitos agentes de superfície ativos (BOUTWELL, 1974).

A concepção de que as formas reativas de carcinogênicos químicos eram fortes agentes eletrofílicos foi primeiramente notada no metabolismo *in vitro* de N-metil-4-aminoazobenzeno e 2-acetilaminofluoreno (MILLER & MILLER, 1966), sendo posteriormente estendido esse conceito para as formas reativas de inúmeros carcinogênicos químicos (MILLER & MILLER, 1969, 1981; MILLER, 1970). Dessa forma, a maioria dos compostos deve ser metabolizada a uma forma eletrofílica comum, ou seja, a eletrófilos reativos, antes que eles possam reagir com componentes celulares e atuar como carcinogênicos. As ligações covalentes de carcinogênicos químicos *in vivo* são o resultado de reações entre esses eletrófilos reativos e sítios nucleofílicos de componentes celulares, especialmente as moléculas informacionais DNA, RNA e proteínas. Um bom esquema geral dos eventos moleculares e celulares na carcinogênese química foi apresentado por MILLER & MILLER (1982):


PROCARCINOGÊNICO
carcinogênicos
proximais
metabólitos não -
- eletrofílicos
carcinogênicos finais
(iniciadores)
eletrofílicos, mutagênicos
+ átomos eletrofílicos N, O, S, C
das macromoléculas celulares
?
resíduos carcinogênicos que se ligam
covalentemente a macromoléculas informacionais
(DNA, RNA, proteínas)
iniciação
alterações específicas nas macromoléculas
críticas (epigenéticas? genéticas? viral-genética?
viral-epigenética?)
expressão alterada da informação genética
promoção
clone celular
tumores grandes

I.2. Natureza e relacionamento dos processos mutagênicos e carcinogênicos

O DNA ou a cromatina nuclear são alvos de constantes lesões provocadas por agentes químicos, mas nos sistemas vivos desenvolveram-se vários processos enzimáticos de reparo dessas lesões. Uma determinada lesão do DNA pode acionar um mecanismo de reparo que reverta a porção lesada à forma normal (por exemplo, por fotorreativação ou por reunião da quebra de uma cadeia simples), que elimine o dano (por exemplo, por reparo de excisão), ou que supere seus efeitos inibitórios no seguimento do processo biossintético (por exemplo, por reparo pós-replicação).

De maneira geral, pode-se considerar a ocorrência de muitas semelhanças entre os mecanismos de mutagênese e o modo de ação dos principais carcinogênicos químicos (MILLER & MILLER, 1971 e WRIGHT, 1980). Cada vez há mais indícios e evidências de que muitos desses compostos são genotóxicos, isto é, nas suas formas ativas podem provocar mutações em sistemas de prova microbianos (AMES, 1976; 1979; AMES *et alii*, 1975; McCANN & AMES, 1976; McCANN *et alii*, 1975) e inclusive, em mamíferos (BISHUN *et alii*, 1973; HSU *et alii*, 1977; PETERSON *et alii*, 1979; LAKE *et alii*, 1980; TRITTON & YEE, 1982).

WRIGHT (1980) propôs a classificação dos carcinogênicos e mutagênicos genotóxicos em dois tipos: os precursores e os finais. Os agentes genotóxicos finais possuem as propriedades intrínsecas necessárias para interagir com o material genético que é o alvo celular crítico, iniciando o processo genotóxico. Os agentes genotóxicos precursores não possuem propriedades genotóxicas por si, mas são convertidos pelo metabolismo de organismos susceptíveis, em agentes genotóxicos finais. Em conseqüên-

cia, são inativos em sistemas biológicos nos quais faltam enzimas necessárias para convertê-los nas formas genotóxicas finais. Já a classificação proposta por CLAYSON (1981) identifica os carcinogênicos genotóxicos como agentes iniciais que aumentam significativamente a incidência de tumores na população e têm a capacidade de alterar a informação genética nos sistemas de testes, enquanto que os agentes promotores de carcinogênese são considerados não-genotóxicos e, embora aumentem significativamente a incidência de tumores na população, não têm a capacidade de alterar a informação genética em sistemas de testes.

Alguns exemplos interessantes sobre os mecanismos pelos quais os agentes genotóxicos podem atuar são encontrados nos trabalhos que mostram uma relação qualitativa entre a fidelidade da síntese do DNA e a carcinogênese. Entre esses pode-se citar o de LOEB *et alii* (1977) que estabeleceu o efeito de trinta e um metais, previamente identificados como carcinogênicos-mutagênicos, como possivelmente carcinogênicos-mutagênicos ou como não-carcinogênicos-mutagênicos. Dos oito metais tidos como carcinogênicos (prata, berílio, cádmio, cobalto, crômio, manganês, níquel e chumbo), todos provocaram uma diminuição na fidelidade da duplicação pela DNA-polimerase em pelo menos 30%; dos três possivelmente carcinogênicos, o cobre afetou significativamente a polimerização da molécula, enquanto o ferro e o zinco não a alteraram, semelhantemente ao que ocorreu com todos os compostos tidos como não-carcinogênicos. Esses autores concluíram pela validade da avaliação de alterações na fidelidade da síntese de DNA para a detecção de metais potencialmente mutagênicos ou carcinogênicos. Resultados similares em relação ao efeito sobre a replicação do DNA haviam sido obtidos por MAKINO & OKADA (1974) com vários compostos carcinogênicos, como nitrogênio mostarda, mitomicina C, óxido de 4-nitro-

quinalina (4NQO), N-metil-N'-nitrosoguanidina (MNNG), alguns dos quais já utilizados terapeuticamente como agentes anti-tumorais.

A estabilidade da ligação de compostos carcinogênicos ao DNA *in vivo* também sugere um mecanismo molecular para a iniciação tumoral. Essa interação pode ser mutagênica, afetando a exatidão com a qual o DNA modificado é copiado pela DNA-polimerase celular. SIROVER & LOEB (1974) mostraram que a modificação do molde sintético do polinucleotídio com β-propiolactona, um potente mutagênico e carcinogênico, aumentava a incorporação de nucleotídios não-complementares tanto em embriões de ouriço do mar, como em vírus do mieloblasto de aves. Quando o molde foi tratado com o carcinogênico, houve uma estimulação inicial na síntese, seguida por uma diminuição dessa com o aumento das modificações do molde, demonstrando uma relação entre o composto carcinogênico e os erros na replicação do DNA em células normais. Contudo, o DNA não foi identificado como o alvo primário de ação de todos os compostos carcinogênicos. A adriamicina, um dos mais importantes antibióticos usados no tratamento do câncer humano, e por si mesmo um agente carcinogênico potente, mostrou-se capaz de exercer sua atividade interagindo apenas com a superfície celular (TRITTON & YEE, 1982), podendo atuar, portanto, como um agente não-genotóxico.

I.3. Procedimentos experimentais para a avaliação da atividade mutagênica.

A similaridade química entre mutagênicos e carcinogênicos primários, aliada às evidências de que cerca de noventa por cento dos carcinogênicos são mutagênicos (MILLER & MILLER, 1971),

apóia a utilização de testes para avaliação de mutagenicidade de compostos que foram identificados ou sugeridos como carcinogênicos.

O grau de sobreposição das ações de substâncias carcinogênicas e mutagênicas depende muito do composto testado e do sistema de teste utilizado. Para agentes como aminas aromáticas e nitrosaminas a sobreposição das atividades carcinogênica e mutagênica é praticamente total, enquanto que com outros compostos, tais como ésteres, epóxidos e carbamatos, a sobreposição é quase nula (DE SERRES, 1976). É possível, no entanto, que muitos dos agentes considerados como não-genotóxicos não tenham sido avaliados corretamente pelos sistemas de testes utilizados, isto é, que o teste não fosse sensível para detectar as alterações genéticas induzidas (BARTSCH *et alii*, 1982).

Diversos procedimentos experimentais têm sido usados com o objetivo de avaliar a potencialidade mutagênica de substâncias. A seguir, resume-se os principais.

I.3.1. Testes em sistemas bacterianos

O teste em sistemas bacterianos mais conhecido foi desenvolvido por AMES *et alii* (1975), empregando principalmente linhagens de *Salmonella typhimurium*. As linhagens mais usadas apresentam mutações gênicas que conferem à bactéria um pré-requisito nutritivo, a histidina. Assim, as células não crescem se o meio de cultura não contiver esse aminoácido, a não ser que ocorra uma reversão ou supressão da mutação original. O teste pode ser feito com ou sem ativação metabólica. No primeiro caso, acrescenta-se ao meio de agar contendo as células e a substância a ser testada um extrato de enzimas ativadoras, as oxidases de função mista, conhecidas como fração S-9, obtidas do fígado de rato, com o objetivo de verificar se o composto em estudo é mu-

tagênico em sua forma original, ou se necessita ser metabolizado para se tornar mutagênico.

As preparações são colocadas em placas de Petri com meio de cultura sem histidina, incubadas por dois dias a 37°C e após esse período, verifica-se se houve a formação de colônias revertentes. Um mutagênico potente produz um grande número de colônias por placa.

Esse teste apresenta vantagens, por ser rápido, de baixo custo, sensível e de boa reprodutibilidade (BARTSCH *et alii*, 1982).

I.3.2. Testes indiretos por meio de hospedeiros

Os testes com hospedeiros intermediários têm como principal característica a capacidade de detectar não só as alterações genéticas produzidas por compostos que são ativos por si mesmos, como pelos compostos que são ativados por enzimas dos tecidos ou pela flora intestinal do hospedeiro. Esses testes consistem no tratamento por via oral, intraperitonial ou por inalação, de um mamífero, em geral camundongo ou rato, com um mutagênico químico. Ao mesmo tempo em que esse mamífero é tratado, são introduzidos, intraperitonialmente, organismos indicadores como bactérias, fungos ou células de mamíferos, nos quais a freqüência de mutação gênica ou os efeitos citogenéticos podem ser medidos. Após um período de tempo adequado, esses organismos indicadores são retirados do hospedeiro e a indução de mutantes é estimada. A comparação entre a ação mutagênica do composto, diretamente sobre o organismo indicador, e indiretamente por intermédio do hospedeiro, pode demonstrar se esse teve capacidade para destoxificar o composto ou se formaram-se produtos mutagênicos como resultado do seu metabolismo (LEGATOR, 1976).

Em alguns casos pode-se usar também sangue ou produto de excreção (urina, por exemplo) de um animal tratado com a droga, para testar o efeito dos metabólitos em organismos indicadores, como *Salmonella typhimurium*, linhagens de fungos e *Drosophila*.

I.3.3. Detecção de letais

A detecção de mutagenicidade pelo sistema de letais pode ser feita com duas técnicas: pela estimativa da freqüência de letais recessivos autossômicos e ligados ao sexo, como ocorre, freqüentemente, com *Drosophila* e pelo teste dos dominantes letais. Em *Drosophila* são utilizadas técnicas de cruzamento dos indivíduos submetidos ao composto, com outros indivíduos de linhagens portadoras de genes marcadores, como letais dominantes balanceados, cromossomo X em anel ou de inversões responsáveis pela supressão da permutação genética. Os cromossomos selvagens são colocados em homozigose e pela análise da descendência pode-se detectar o efeito letal. A base genética da letalidade dominante, princípio do teste dos dominantes letais, é a indução de danos cromossômicos e rearranjos, tais como translocações, que resultam em zigotos inviáveis. Para esse teste, camundongos machos tratados são cruzados com um grupo de fêmeas virgens não-tratadas. Duas semanas após o cruzamento, as fêmeas são sacrificadas e avalia-se a incidência de mutações dominantes letais, produzidas nas células germinativas masculinas, contando-se os implantes embriônicos mortos (EPSTEIN & ROHRBORN, 1971).

I.3.4. Estudos citogenéticos

I.3.4.1. Micronúcleos

São chamados de micronúcleos os pequenos núcleos que aparecem ao lado de núcleos principais e que contêm fragmentos ou cromossomos inteiros que se retardam na migração anafásica e

não são incluídos no núcleo principal (NATARAJAN & OBE, 1982). A ocorrência de micronúcleos pode ser investigada *in vitro*, em culturas de linfócitos, e *in vivo*, em medula óssea e células meióticas animais e vegetais (SCHMID, 1975; COUNTRYMAN & HEDDLE, 1976; NATARAJAN & OBE, 1982).

O teste de micronúcleos em medula óssea é realizado com esfregaços de células hematopoéticas, após a aplicação sub-cutânea da substância a ser testada em pequenos mamíferos. Os micronúcleos podem ser encontrados em mieloblastos, mielócitos e eritroblastos, sendo esse último tipo celular o mais adequado para análise (SCHMID, 1975).

O teste de micronúcleos meiótico é baseado nos mesmos princípios do teste de micronúcleos em medula óssea. Em organismos animais, esse teste consiste na pesquisa de micronúcleos induzidos durante as divisões de redução meiótica, como resultado de quebras cromossômicas, e observados em células pós-meióticas jovens. Nos organismos vegetais, as espécies mais amplamente usadas pertencem ao gênero *Tradescantia*, cujos cromossomos são extremamente sensíveis aos mutagênicos e sujeitos a quebras, com produção subseqüente de fragmentos acêntricos que resultam em micronúcleos no estadio de tétrades.

O teste de micronúcleos permite a rápida obtenção de resultados e, por isso, é comumente utilizado em genética toxicológica. Contudo, detecta apenas alterações cromossômicas grosseiras e, portanto, seus resultados devem ser considerados como indícios para a execução de testes mais sensíveis.

I.3.4.2. Índice mitótico e aberrações cromossômicas estruturais e numéricas

Os testes citogenéticos *in vitro* consistem na adição do composto a ser testado, em várias concentrações, ao meio de cultura das células por diferentes períodos de tempo. Após esse período, as células (fibroblastos ou linfócitos, geralmente) são preparadas para análise cromossômica por pré-tratamento com inibidor de mitose (colquicina) e solução hipotônica.

A introdução do composto pode ser realizada *in vivo* em organismos tratados experimentalmente, em seres humanos profissionalmente expostos ou com intoxicação aguda. Ainda para estudo do efeito do composto *in vivo*, em mamíferos, podem ser analisadas preparações de testículos (para verificação da presença de translocações recíprocas nos espermatócitos) ou esfregaços de sêmen corados com corantes fluorescentes (para testar falha na disjunção do cromossomo Y).

Os testes citogenéticos *in vitro* e *in vivo* permitem detectar o índice de proliferação celular e a ocorrência de aberrações cromossômicas estruturais e numéricas. A proliferação celular pode ser estimada pelo índice mitótico, ou seja, pela proporção de células em divisão em um dado momento, sendo que esse parâmetro pode fornecer informações sobre a ocorrência de alterações na duração do ciclo celular em conseqüência à ação de determinado agente, que é, então, considerado cicloativo.

As aberrações cromossômicas estruturais, isto é, que causam anomalias na morfologia dos cromossomos constituem uma fração substancial das mutações produzidas por mutagênicos físicos ou químicos.

Para que se forme uma aberração estrutural é necessário que ocorram quebras nos cromossomos. SHAW (1970) pro-

pôs o termo clastogênico para designar todo agente capaz de produzir quebras cromossômicas.

As alterações numéricas implicam ganho ou perda de cromossomos. Ocorrem devido a falha na disjunção, isto é, erros na separação dos cromossomos na mitose ou na meiose e podem causar prejuízos severos para o portador.

I.3.4.3. Trocas entre cromátides-irmãs (TCI)

O fenômeno de TCI pode ser definido como a ocorrência de trocas recíprocas envolvendo porções simétricas do DNA de cromátides-irmãs. A análise da morfologia dos cromossomos que se replicavam na presença de 5-bromodesoxiuridina (BrdU) permitiu observar que, após o tempo equivalente a dois ciclos de replicação, um grande número de metáfases continha cromossomos em que as cromátides mostravam um padrão de desespiralização desigual. Estudos com auto-radiografia e BrdU triciado evidenciaram que a cromátide mais desespiralizada correspondia à que havia incorporado a BrdU radioativa nos dois filamentos da molécula de DNA, enquanto a outra mais espiralizada o havia incorporado em apenas um filamento. Coradas por Giemsa, uma das cromátides se apresentava mais pálida que a outra e, eventualmente, era possível observar trocas entre as cromátides-irmãs (ZAKHAROV & EGOLINA, 1972).

LATT (1974) foi o primeiro a descrever uma técnica de coloração diferencial dessas cromátides com fluorocromos, após a incorporação da BrdU. Uma técnica mais simples, que utiliza o processo de desnaturação seguido de coloração por Giemsa, foi desenvolvida logo após por KORENBERG & FREEDLENDER (1974) e tem sido amplamente usada por garantir um melhor nível de resolução [illegible] A técnica de marcação das TCI

foi considerada, desde o início, como um método sensível para testar mutagenicidade química (WOLFF, 1979). Apesar de não se conhecer muito sobre seu significado biológico, em certos casos, tem sido encontrado um número aumentado de trocas, mesmo quando a dose do composto está abaixo da concentração requerida para a detecção de aberrações cromossômicas clássicas (KUČEROVÁ, 1982). Por outro lado, alguns compostos sabidamente clastogênicos não se mostraram indutores de TCI (GEBHART, 1981), o que leva a considerar a marcação das TCI como uma técnica adicional, e não substituta, aos testes citogenéticos.

I.3.4.4. Associação de satélites

Nas preparações de cromossomos humanos, os cromossomos acrocêntricos dos grupos D e G freqüentemente encontram-se associados pelos seus satélites. Tal fenômeno de associação de satélites, parece ser o resultado da participação conjunta de cromossomos acrocêntricos na formação do nucléolo, ou seja, na transcrição e processamento dos precursores do RNA ribossômico (RNAr) 18S e 28S.

O processo de síntese celular do RNA pode ser perturbado por vários compostos químicos (CROOKE, 1979) que, portanto, alteram a freqüência com que os cromossomos acrocêntricos aparecem associados na placa metafásica, refletindo a sua participação na organização do nucléolo.

Apesar dos inúmeros sistemas de testes já disponíveis para se testar a mutagenicidade de compostos químicos, muitos fatores ainda se colocam contra a extrapolação dos resultados de sistemas unicelulares para os organismos de mamíferos e desses para o homem. A farmacocinética da absorção, distribuição e excreção do mutagênico administrado, a natureza e quantida

de de seus metabólitos e a atividade mutagênica desses metabólitos podem afetar profundamente a expressão da mutação. No entanto, a grande quantidade de novos compostos que entram no ambiente e a impossibilidade de testá-los em sistemas de testes de longa-duração, tornam necessário uma pré-seleção e o estabelecimento de prioridades para os testes de longa-duração. Os resultados positivos de testes para mutagenicidade em sistemas microbianos e de mamíferos não podem implicar automaticamente um efeito carcinogênico no homem, pois resultados positivos ou negativos desses testes não substituem testes de longa duração para carcinogenicidade em animais. Os ensaios para mutagenicidade mediados por tecidos são altamente efetivos para predizer o potencial carcinogênico, mas não dão indicação das espécies biológicas ou órgãos-alvo da ação carcinogênica do agente; além disso, a potência relativa do composto como mutagênico não pode ser correlacionada com sua potência como carcinogênico em experimentos em animais ou no homem (BARTSCH, 1976).

I.4. Produtos naturais de plantas da família Euphorbiaceae

A fotossíntese é o processo primário de síntese na natureza, pelo qual as plantas clorofiladas utilizam a energia solar para a produção de compostos orgânicos a partir de dióxido de carbono e água. Os produtos iniciais são carboidratos que originam, por uma série de reações, um conjunto de compostos orgânicos de baixo peso molecular e estrutura simples: açúcares, ácidos orgânicos e aminoácidos.

A partir desses produtos primários, por vias metabólicas específicas que compõem o metabolismo secundário, são formados os produtos secundários ou produtos naturais, dos quais os terpenóides, os fenóis ou compostos aromáticos, os flavonóides, e os alcalóides constituem os grupos mais importantes.

Entre os terpenóides produzidos pelas plantas, encontram-se os esteróis, amplamente distribuídos no reino vegetal e os carotenóides, que têm participação no processo fotossintético. A borracha é outro exemplo de terpenóide, contendo de 3000 a 6000 unidades de isopreno. Um outro grupo importante dentre os terpenóides são as giberelinas, fitohormônios essenciais para o desenvolvimento vegetal, tendo sido já descritas mais de cinquenta tipos diferentes, todos de ocorrência natural. Muitos terpenóides contendo de 10 a 15 carbonos estão presentes em óleos essenciais, de importância para a indústria de perfumaria e cosméticos. Quase todos os terpenóides são hidrocarbonetos de cadeia longa ou cíclica, formados por simples condensação cabeça-cauda de duas a quatro unidades de isopreno com subseqüente ciclização dos polímeros resultantes, dando mono, sesqui e diterpenos, ou dimerização de três e quatro unidades de polímeros pela condensação cauda-cauda, dando triterpenos, como os esteróis, e tetraterpenos, como os carotenóides.

As plantas da família Euphorbiaceae são conhecidas por provocarem reações dermatológicas alérgicas e irritantes no homem (HICKEY *et alii*, 1981) e inflamação na mucosa do nariz, boca e olhos (HECKER & SCHMIDT, 1974; EVANS & SCHMIDT, 1976). Há cerca de dez anos, tornou-se evidente que os princípios irritantes dessas euforbiáceas tóxicas são misturas complexas de ésteres dos álcoois diterpenos tetracíclicos polifuncionais, como o forbol e o ingenol e seus derivados (HERGENHAHN *et alii*, 1974;

OPFERKUCH & HECKER, 1974; KINGHORN & EVANS, 1975; UPADHYAY & HECKER, 1975; EVANS & SCHMIDT, 1976). Tais compostos estão presentes no látex, que é uma substância em geral de aparência branca-leitosa, produto dos tubos laticíferos não-articulados encontrados em diferentes órgãos dessas espécies, que exsuda da planta quando esta é injuriada.

Além dos diterpenos tetracíclicos, o látex das plantas euforbiáceas apresenta triterpenos tetracíclicos e pentacíclicos. Desses, são exemplos mais comuns os esteróis cicloartenol, uma mistura de β-amirina e germanicol, campesterol, estigmastesol e sitosterol. Recentemente foi citado que células cultivadas de *Euphorbia tirucalli* L. sintetizavam os esteróis eufol e tirucalol, que são característicos da planta intacta (BIESBOER & MAHLBERG, 1979). Os resultados de BIESBOER *et alii* (1982) com vários cultivares de *E. pulcherrima* mostraram que existe um alto nível de estabilidade para o modelo de síntese de esteróis e triterpenos no látex de espécies de *Euphorbia* que possuem tubos laticíferos não articulados.

Da família Euphorbiaceae, os gêneros *Croton* e *Euphorbia* são bem estudados, e representam a fonte de uma ou mais classes de diterpenos. O óleo da semente de *Croton tiglium* foi o primeiro composto das espécies dessa família a ser isolado no fim do século dezenove. Muitos investigadores atribuíram as propriedades vesicantes do óleo de *C. tiglium* a um ácido chamado de "crotonol". Acreditava-se que este ácido pudesse estar relacionado com o ácido oleico. Posteriormente, empregando a fração do óleo de *C. tiglium* solúvel em etanol, Dunstan & Boole (1895, em HECKER & SCHMIDT, 1973) extraíram uma resina neutra de comprovada ação tóxica.

Em 1914, Boehm (em HECKER & SCHMIDT, 1973), com um procedimento modificado na preparação da "resina do *Croton*", obteve

um composto cristalino, o qual denominou forbol, por ser originário de uma espécie da família Euphorbiaceae. Todavia, a estrutura do forbol só foi elucidada por HECKER (1967), como um álcool diterpeno tetracíclico. A partir daí os procedimentos de extração foram aperfeiçoados e atualmente, com técnicas de distribuição multiplicativa e cromatográficas, têm-se isolado e identificado novos compostos químicos de várias espécies de *Euphorbia*. Nesse gênero, o diterpeno mais comum é o ingenol, que ocorre no látex junto com um ou mais ésteres diterpenos como o ingol e latirol. Esses dois últimos, apesar de não irritantes, têm estruturas químicas particulares que sugerem um importante papel na biogênese de uma parte dos princípios ativos dos diterpenos (KINKHORN & EVANS, 1975; UPADHYAY & HECKER, 1975). É interessante notar que o látex das *Euphorbia* exibe, de modo similar ao óleo de *Croton*, atividade cocarcinogênica na epiderme de camundongo (ROE & PEIRCE, 1961; HERGENHAHN *et alii*, 1974; STENBACK, 1978).

O mais potente dos diésteres de forbol é o 12-0-tetradecanoil-forbol-13-acetato (TPA), inicialmente isolado do óleo de *Croton*, que tem sido um importante componente para explicar os vários estadios no mecanismo da carcinogênese (BOUTWELL, 1964; 1974; DIAMOND *et alii*, 1980 e BLUMBERG, 1980). A designação desse composto por TPA foi feita por HECKER (1968), mas ele é também conhecido por forbol miristato acetato (PMA), segundo proposto por VAN DUUREN (1969). É capaz de promover o aparecimento de tumores em doses de 0,5 a 10 nmol por aplicação em um volume de 0,2 ml de acetona, sendo o mais efetivo agente promotor de tumor, embora existam muitos outros ésteres de forbol com grau variado de propriedades promotoras, inflamatórias e irritantes (BOUTWELL *et alii*, 1982). Essa variação de intensidade pode ser devida, segundo HECKER (1968), à esterificação dos álcoois com

cadeias curtas ou longas de lipídios.

Cada álcool pode dar origem a muitos compostos irritantes com potência variada, dependendo da natureza dos componentes ácidos esterificados dos ésteres. Assim, BAIRD & BOUTWELL (1971) relacionaram a ação de promoção com a presença de uma cadeia lipídica, o que é consistente, portanto, com um aumento de solubilidade da membrana celular. Desse modo, os diésteres de cadeia longa, forbol-didecanoato e tetradecanoil-forbol-acetato, ambos com ácidos altamente lipofílicos presos à sua molécula, foram citados como fortes promotores de tumor, enquanto que o éster do ácido benzóico, forbol-dibenzoato, com grupos ácidos menos lipofílicos, foi citado como um promotor fraco, e o forbol e o forbol-diacetato, que são mais hidrofílicos, como promotores muito fracos.

BAIRD *et alii* (1971) concluíram que existe uma correlação entre a capacidade de promoção de tumor e a estimulação da síntese de DNA, RNA e proteína dos diésteres de forbol. Assim, os promotores de tumor 12-0-tetradecanoil-forbol-13-acetato e o forbol-12-13-didecanoato induziram uma rápida estimulação da incorporação de timidina triciada em DNA e RNA e leucina triciada em proteína, enquanto o forbol-12,13-dibenzoato, um promotor fraco, foi menos efetivo,e o forbol e o forbol-12,13-diacetato, promotores muito fracos, não induziram qualquer mudança na incorporação. A incorporação de precursores de RNA pode refletir um aumento de expressão gênica, sendo possível que o tratamento com ésteres de forbol também resulte na expressão de regiões do genoma que não são normalmente transcritas. Isto permitiria que uma célula iniciada, contendo uma alteração, fosse convertida em uma célula tumoral.

I.5. Objetivos

A *Euphorbia tirucalli* L. tem despertado o interesse de pesquisadores como fonte de produtos altamente energéticos, por apresentar em seu látex uma mistura de óleos de baixo peso molecular que poderiam ser utilizados como meio alternativo para obtenção de energia (PARCEVAUX & ALLIRAND, 1977), além de ter sido referida como portadora de princípios ativos de interesse farmacêutico (NEIVA, 1966).

Com este trabalho pretendeu-se testar a ação do extrato de *E. tirucalli* L. e algumas de suas frações (frações aquosas ricas em açúcares e ácidos orgânicos e frações acetônicas ricas em lipídios e forbol) em linfócitos humanos cultivados, com vistas a investigar seus efeitos sobre a duração do ciclo celular, detectar a indução de efeitos clastogênicos e verificar a ocorrência de alterações nas freqüências de trocas entre cromátides-irmãs e de associações de satélites entre cromossomos acrocêntricos.

II. MATERIAL E MÉTODOS

II.1. Doadores

Os linfócitos foram obtidos de quatro indivíduos do sexo feminino, com idade variando de 30 a 33 anos, que não tinham sido expostos a raios X ou a qualquer tratamento com agentes químicos nos últimos seis meses (com exceção do doador utilizado no Experimento II, que era fumante moderado) e nem tinham mantido contato direto com *Euphorbia tirucalli* L. Cada experimento foi desenvolvido com linfócitos de um determinado doador.

II.2. Planta estudada

A espécie utilizada no presente estudo, *Euphorbia tirucalli* L., pertence à classe Dicotiledoneae, Ordem Geraniales, família Euphorbiaceae, gênero *Euphorbia*. Sua origem é ainda controvertida e entre os inúmeros nomes populares atribuídos, o mais comum é avelós. Ela é descrita por CORREA (1931) como um arbusto de numerosos ramos verticilados, cilíndricos, estriados, verdes, lactescentes e áfilos (Figura 1). Não se sabe ainda se esta espécie é monóica, dióica ou hermafrodita, e parece que não existe flor masculina, nem, portanto, fruto no Brasil. Por outro lado, esta espécie frutifica em Marrocos e no Senegal e a floração parece depender das condições do meio (PARCEVAUX & ALLIRAND, 1977).

O avelós é uma planta espontânea nas regiões áridas do Nordeste do Brasil, perfeitamente adaptada àquelas condições, e subespontânea em outros Estados, como Amazonas, Pará, Rio de Ja-



Figura 1. *Euphorbia tirucalli* L. Aspecto geral da planta. Escala 1:10.

neiro e São Paulo, onde tem sido utilizada como planta ornamental, apesar de altamente tóxica. Os espécimes empregados neste estudo foram coletados em Jaboticabal, SP.

II.3. Frações analisadas

Estudaram-se cinco frações, isoladas de *E. tirucalli*, pelo Dr. Francisco Carvalho, no Laboratório de Fisiologia Vegetal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Campus de Jaboticabal, UNESP, que empregou a técnica de distribuição multiplicativa e cromatográfica descrita por HECKER & SCHMIDT (1974). As frações foram obtidas por meio do seguinte esquema de extração: 200g de ramos laterais, provenientes de quinze plantas, foram homogeneizados em liquidificador com 200 ml de acetona, sendo que esta quantia de acetona foi acrescentada mais quatro vezes, totalizando 1.000 ml. A seguir, fez-se a concentração a vácuo a 40°C, obtendo-se o extrato total hidroacetônico (ETH). Prosseguiu-se com a extração em clorofórmio, por ser esse o solvente que melhor separa os compostos presentes no extrato total. Nessa fase de separação foram utilizados 220 ml de clorofórmio (100 ml em uma primeira vez, 50 ml na segunda e finalmente 70 ml). Como produto, resultou um composto de cor amarela pálida. Em seguida, com um funil de separação, foram obtidas duas fases, sendo a primeira denominada fase aquosa combinada (133 ml) e uma segunda denominada fase clorofórmica (87 ml). A fase aquosa foi concentrada a vácuo a 60°C até atingir um volume de 92 ml, seguindo-se a precipitação dos ácidos orgânicos a 1°C por um período de mais ou menos quatro dias. Como produto, obteve-se um sobrenadante, que constituiu-se na fração aquosa rica em açúcares (FAA), e o precipitado, que após ser dissolvido em 100 ml de água, constituiu-se na fração aquosa rica em ácidos orgânicos (FAO). A fase clorofórmica, por sua vez, sofreu o processo de evaporação clorofórmi

ca, primeiro em jato de ar a 41°C até atingir um volume de 5 ml e depois à temperatura ambiente até a secagem, por um período de mais ou menos dois dias. Em seguida, fez-se a diluição em 40 ml de acetona, centrifugou-se, obtendo-se um precipitado contendo alguns polímeros de isoprenóide e o sobrenadante, que foi evaporado à temperatura ambiente, dissolvido em 25 ml de hexano e centrifugado. Desse passo resultaram o sobrenadante e o precipitado que foram evaporados à temperatura ambiente e dissolvidos em acetona. O sobrenadante constituiu-se na fração acetônica rica em lipídios (FAL), e o precipitado na fração acetônica rica em forbol (FAF).

II.4. Experimentos desenvolvidos

Foram feitos quatro Experimentos: I, II, IIIA e IIIB, sendo analisados 25 grupos experimentais. A discriminação desses grupos em relação à fração testada, à concentração utilizada do solvente e aos parâmetros estudados é apresentada na Tabela 1.

II.5. Estudo cromossômico

As culturas de linfócitos foram desenvolvidas em meio de cultura DIFCO RPMI 1640, suplementado com 20% de soro AB humano e estimuladas por fito-hemaglutinina fornecida pela Profa..Dra. Iris Ferrari, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP.

Cada grupo experimental foi preparado com 10 ml do

Tabela 1. Grupos experimentais e parâmetros analisados nos quatro experimentos.

Experimento	Grupo experimental		Concentração (µl/ml)		Parâmetros analisados no experimento
	Fração	Código	Composto	Solvente	
I	Extrato total hidroacetônico	ETH-20	20	2	- Índice mitótico
		ETH-10	10	2	
		ETH-5	5	2	- Freqüência de anomalias estruturais e numéricas
		ETH-1	1	2	
	Controle	CI	0	0	- Frequência de associação de satélites
	Controle acetona	CII	0	2	
II	Extrato total hidroacetônico	ETH-5	5	5	- Índice mitótico
	Fração aquosa rica em açúcares	FAA-5	5	5	- Freqüência de anomalias estruturais e numéricas
	Fração aquosa rica em ácidos orgânicos	FAO-5	5	5	
	Fração acetônica rica em lipídios	FAL-5	5	5	- Freqüência de associação de satélites
	Fração acetônica rica em forbol	FAF-5	5	5	
	Controle	CI	0	0	
	Controle acetona	CII	0	5	
III.A	Extrato total hidroacetônico	ETH-5	5	5	- Freqüência de trocas entre cromátides-irmãs
	Fração acetônica rica em lipídios	FAL-5	5	5	
	Fração acetônica rica em forbol	FAF-5	5	5	- Freqüência de associação de satélites
	Controle	CI	0	0	
	Controle acetona	CII	0	5	
III.B	Extrato total hidroacetônico	ETH-5	5	5	- Freqüência de células em 1ª, 2ª e 3ª divisão
		ETH-2	2	2	
	Fração acetônica rica em lipídios	FAL-2	2	2	- Freqüência de trocas entre cromátides-irmãs
	Fração acetônica rica em forbol	FAF-2	2	2	
	Controle	CI	0	0	- Freqüência de associação de satélites
	Controle acetona	CII-5	0	5	
		CII-2	0	2	

meio de cultura completo, 0,4 ml de fito-hemaglutinina e cerca de 15 gotas de suspensão de linfócitos, e dividido em duas réplicas. As culturas foram mantidas a 37°C por cerca de 70 horas, sendo que oitenta minutos antes da interrupção foi adicionado 0,1 ml de solução de colquicina a 1,67% em cada réplica. As suspensões celulares foram, a seguir, hipotonizadas em KCl a 0,075 M, por nove minutos, a 37°C, e fixadas em metanol acético 3:1. De cada réplica foram preparadas cinco lâminas, totalizando dez lâminas para cada grupo experimental. A coloração foi feita em solução tamponada de Giemsa a 2% (pH 6,8) após hidrólise em HCL a 1 N, por 7 minutos a 60°C.

Nos experimentos III.A e III.B, nos quais se objetivava o estudo das trocas entre cromátides-irmãs (TCI), no início da cultura adicionou-se 5-bromodesoxiuridina (BrdU), Sigma, obtendo-se uma concentração final de $3,25 \times 10^{-5}$M. Todos os frascos foram recobertos com papel alumínio, para evitar a fotólise da BrdU. Após a colheita da cultura, da maneira já descrita, as lâminas foram coradas pela técnica FPG (Fluorescência *plus* Giemsa), segundo KORENBERG & FREEDLENDER (1974). Inicialmente, cada lâmina foi coberta com um filme de solução de HOECHST 33258 (2-(2-(4-hydroxi-phenyl)-2-benzimidazolyl)-6-(1-methyl-4-piperazul)benzimidazole) na concentração de $0,94 \times 10^{-7}$M; em seguida foi exposta, sem lamínula, à luz ultra-violeta, por 12 minutos, a uma distância de 15 cm. Após lavadas e secas as lâminas foram incubadas em solução salina com pH 8 a 8,3 e temperatura de 87 a 89°C, por cerca de 1 minuto. A solução salina foi preparada com 137,99 g de sulfato ácido de sódio monohidratado (NaH_2PO_4), diluído em 900 ml de água destilada. Para se obter o pH entre 8,0 a 8,3 foram adicionados a esta solução salina, lentamente, cerca de 40,5 ml de hidróxido de sódio (NaOH) a 10 N. À medida que as lâminas

iam sendo retiradas dessa solução salina, eram imediatamente lavadas em água destilada e coradas do modo usual.

As lâminas foram codificadas e a seguir procedeu-se à análise em teste cego. Considerou-se como índice mitótico a freqüência de células em divisão em 1000 núcleos. A proporção percentual do índice mitótico de cada grupo, em relação ao do controle I, foi designada como índice mitótico relativo.

De cada grupo experimental dos Experimentos I e II procurou-se analisar 50 metáfases, assinalando as anomalias estruturais ou numéricas encontradas. Metáfases com eventos anômalos foram fotografadas e, em alguns casos, as fotos ajudaram na interpretação mais precisa das anomalias.

As anomalias estruturais encontradas foram falhas e quebras. Considerou-se como falha, quando a descontinuidade era menor que a largura da própria cromátide e o segmento distal permanecia em alinhamento. Quando a lesão ocorreu em uma só cromátide, a falha foi considerada cromatídica e nos casos em que ocorreu em ambas as cromátides, cromossômica. Quando a descontinuidade era maior que a largura da própria cromátide e havia o deslocamento do segmento, a anomalia estrutural foi considerada como quebra. Nesse caso, essas podiam ser cromatídicas ou cromossômicas, caso atingissem uma ou ambas as cromátides, respectivamente.

Nos Experimentos III.A e III.B procurou-se analisar, de cada grupo experimental, um mínimo de 20 metáfases. A análise de TCI foi executada em células de segunda geração *in vitro*. Quando se encontrava tal situação, e desde que a metáfase se apresentasse completa e sem superposições que impedissem a leitura, os cromossomos eram esquematizados, adotando-se o critério

de discriminar com cores as cromátides de cada cromossomo e os sete grupos cromossômicos. Os cromossomos do grupo A(1, 2 e 3) e o cromossomo 16 foram identificados individualmente.

A associação de satélites entre os cromossomos acrocêntricos dos grupos D e G foi investigada em todos os experimentos. Considerou-se os cromossomos associados quando a distância entre eles não excedia o comprimento do braço longo do maior cromossomo G da metáfase em estudo.

A análise cromossômica foi feita em microscópio composto marca Carl Zeiss, modelo standard WL, e em microscópio Carl Zeiss, modelo Laboval 3. Para a avaliação do índice mitótico utilizou-se 400 aumentos, para a investigação da ocorrência de anomalias cromossômicas, 1.250 aumentos e para a análise de TCI, 1.600 aumentos.

As fotomicrografias foram feitas com equipamento fotográfico MC63, marca Carl Zeiss, usando-se filme Kodak Panatomic X, de 32 ASA. Para a revelação do negativo usou-se o Revelador Kodak D-72, em diluição 1:1, por dois minutos e trinta segundos à 20°C, e as cópias foram feitas em papel Kodabromide F4.

II.6. Análise estatística

Para a análise estatística dos resultados foram utilizados os seguintes testes:

1. Teste G ou razão log-verossimilhança (SOKAL & ROHLF, 1969), para comparação das distribuições de freqüências de células em divisão (índice mitótico), de células com anomalias estruturais e numéricas e de associações de satélites por célula.

2. Teste de Qui-quadrado (SOKAL & ROHLF, 1969), para

comparação das freqüências observadas de TCI em relação às freqüências esperadas, de acordo com o tamanho dos cromossomos, para a comparação das freqüências de TCI entre o controle e os grupos tratados, e para a comparação do número de células com alta freqüência de TCI entre o controle e os grupos tratados, conforme recomendado por CARRANO & MOORE II (1982).

3. Teste *t* de Student (SOKAL & ROHLF, 1969) para comparação das freqüências médias de associações de satélites entre o controle e os grupos tratados.

4. Teste de Wilcoxon (LEHMANN, 1975), para comparação da freqüência de TCI em cada célula (dados combinados) e das freqüências médias de TCI por cromossomo ou grupo cromossômico (dados pareados) entre o controle e os grupos tratados.

Em todos os testes foi fixado em 0,05 ou 5% o nível de significância, sendo assinalados com um asterisco os valores que permitem a rejeição da hipótese de nulidade.

III. RESULTADOS

III.1. Escolha das concentrações a serem testadas

Para uma avaliação inicial das concentrações que deveriam ser utilizadas montou-se o Experimento I, no qual foram testadas quatro concentrações do extrato total hidroacetônico (ETH): 1, 5, 10 e 20 µl/ml.

Na Tabela 2 apresentam-se o índice mitótico (IM), o índice mitótico relativo (IMR) e a freqüência de anomalias cromossômicas estruturais nas metáfases analisadas nesse Experimento. Aplicando-se a estatística G, para comparação das freqüências de células em divisão entre o controle I (CI) e os demais grupos, verificou-se que, enquanto o controle II (CII) não diferia do CI, todos os grupos submetidos ao ETH foram significativamente diferentes do CI.

As culturas tratadas com 20 µl/ml de ETH não cresceram e a grande redução do IM nos grupos ETH-5 (cerca de 50%) e ETH-10 (cerca de 90%) dificultou a análise cromossômica pela escassez de material. Além disso, no grupo experimental ETH-10, os cromossomos apresentavam-se dobrados e muito contraídos, não se conseguindo 50 metáfases em condições de análise.

Considerando-se os resultados acima referidos, escolheu-se a concentração de 5 µl/ml como a conveniente para a avaliação do efeito das diferentes frações do avelós no ciclo celular e nos cromossomos de linfócitos humanos.

Tabela 2. Índice mitótico (IM), índice mitótico relativo (IMR) e freqüência de anomalias cromossômicas estruturais (quebras e falhas) nos grupos experimentais (G.E.) do Experimento I e valores de G (1 grau de liberdade) para números de núcleos em divisão nos tratamentos, em relação a CI. ns: não significativo; *: significativo ($P < 0,05$). Grupos experimentais conforme Tabela 1.

G.E.	IM (‰)	IMR (%)	Nº de metáfases		G
			Analisadas	Com anomalias (%)	
ETH-1	23,6	60	50	3 (6%)	3,91 *
ETH-5	15,7	46	50	11 (22%)	13,90 *
ETH-10	3,9	11	38	7 (18%)	55,48 *
ETH-20	0	0			
CII	29,2	85	50	1 (2%)	0,76 ns
CI	34,2	100	50	2 (4%)	

III.2. Índice de proliferação celular

O índice mitótico (IM) e o índice mitótico relativo (IMR) foram estimados para as cinco frações analisadas no Experimento II: ETH, FAA, FAO, FAL e FAF, cada uma delas introduzida nas culturas na concentração de 5 µl/ ml, e para as três frações analisadas no Experimento III.B: ETH, FAL e FAF, nas concentrações de 5 e 2 µl/ml na primeira fração e 2 µl/ml nas duas últimas. O CII recebeu uma alíquota de acetona equivalente, ou seja, 5 µl/ml no Experimento II e 5 e 2 µl/ml no Experimento III.B. Os resultados estão apresentados na Tabela 3, e da Tabela 4 constam os valores de G para comparação das freqüências de células em divisão entre o CI e os demais grupos experimentais. No Experimento II, três grupos experimentais (ETH-5, FAL-5 e FAF-5) manifestaram um índice mitótico reduzido em relação ao CI, sendo tal redução significativa nos grupos que receberam as frações acetônicas ricas em lipídios (FAL-5) e em forbol (FAF-5). No Experimento III.B, nenhum grupo experimental apresentou redução significativa do índice mitótico em relação ao CI.

Na Tabela 5 apresentam-se as freqüências de células que estão no primeiro, segundo ou terceiro ciclo de divisão celular nas culturas dos diferentes grupos experimentais do Experimento III.B. A identificação do ciclo de divisão celular foi possível pela introdução de bromodesoxiuridina por ocasião da semeadura das culturas. Os cromossomos que se replicam pela primeira vez na presença dessa substância não demonstram qualquer

Tabela 3. Índice mitótico (IM) e índice mitótico relativo (IMR) nos Experimentos II e III.B.

Experimento	G.E.	Nº de núcleos		IM	IMR
		Total	Em divisão	(‰)	(%)
II	ETH-5	2001	14	7,0	58
	FAA-5	2004	32	16,0	133
	FAO-5	2005	24	12,0	100
	FAL-5	2006	02	1,0	8
	FAF-5	2001	12	6,0	50
	CII-5	2031	20	9,8	82
	CI	2002	24	12,0	100
III.B	ETH-5	2000	32	16,0	71
	ETH-2	2000	35	17,5	78
	FAL-2	2000	52	26,0	116
	FAF-2	2000	57	28,5	124
	CII-5	2000	41	20,5	89
	CII-2	2000	51	25,5	113
	CI	2000	45	22,5	100

Tabela 4. Valores de G (1 grau de liberdade) para comparação das freqüências de células em divisão entre os grupos experimentais (G.E.) dos Experimentos II e III.B. ns: não-significativo (P > 0,05); *: significativo (P < 0,05).

Experimento	Grupos comparados	Estatística G	Significância
II	CI X ETH-5	2,68	ns
	CI X FAA-5	1,14	ns
	CI X FAO-5	0,02	ns
	CI X FAL-5	22,10	*
	CI X FAF-5	4,12	*
	CI X CII-5	0,42	ns
III.B	CI X ETH-5	2,20	ns
	CI X ETH-2	1,28	ns
	CI X FAL-2	0,52	ns
	CI X FAF-2	1,46	ns
	CI X CII-5	0,20	ns
	CI X CII-2	0,40	ns

diferenciação entre as cromátides-irmãs (Figura 2.A), enquanto que os que se replicam pela segunda vez revelam coloração diferencial entre as cromátides-irmãs, sendo a cromátide mais clara aquela que incorporou BrdU nos dois filamentos e a cromátide mais escura a que incorporou BrdU em apenas um filamento (Figura 2.B), e nas células do terceiro ciclo de replicação encontram-se cromossomos com segmentos cromatídicos irmãos claros (Figura 2.C).

De maneira geral, todos os grupos experimentais apresentaram uma freqüência maior de células em segunda divisão, sendo que tal situação só não foi observada no grupo experimental CII-5, que apresentou uma proporção mais elevada de células em primeira divisão, em comparação às de segunda e terceira. Os grupos experimentais ETH-5, FAL-2, CII-2 e CI apresentaram freqüências de células em primeira divisão superiores às de terceira, enquanto que situação inversa ocorreu nos grupos experimentais ETH-2 e FAF-2.

A distribuição das células em primeira, segunda e terceira divisões em CI diferiu significativamente da dos outros grupos experimentais, com exceção de CII-2 (Tabela 6).

III.3. Freqüência de anomalias cromossômicas estruturais e numéricas

As freqüências de anomalias cromossômicas estruturais e numéricas foram pesquisadas no Experimento II e os resultados referentes as anomalias estruturais são apresentados na Tabela 7. Em cada grupo experimental foram analisadas 50 metáfases, sendo que em FAL-5 foi registrada a maior proporção de anomalias estruturais, seguido por FAF-5 e ETH-5. As anomalias estruturais en-

Tabela 5. Freqüência de células em primeira, segunda e terceira divisões no Experimento III.B.

G.E.	1ª divisão		2ª divisão		3ª divisão		Total de células
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	
ETH-5	65	32	126	63	10	5	201
ETH-2	30	15	105	52	68	33	203
FAL-2	81	39	112	53	16	8	209
FAF-2	30	15	116	58	54	27	200
CII-5	102	51	81	40	17	9	200
CII-2	61	31	111	55	29	14	201
CI	52	25	112	54	44	21	208

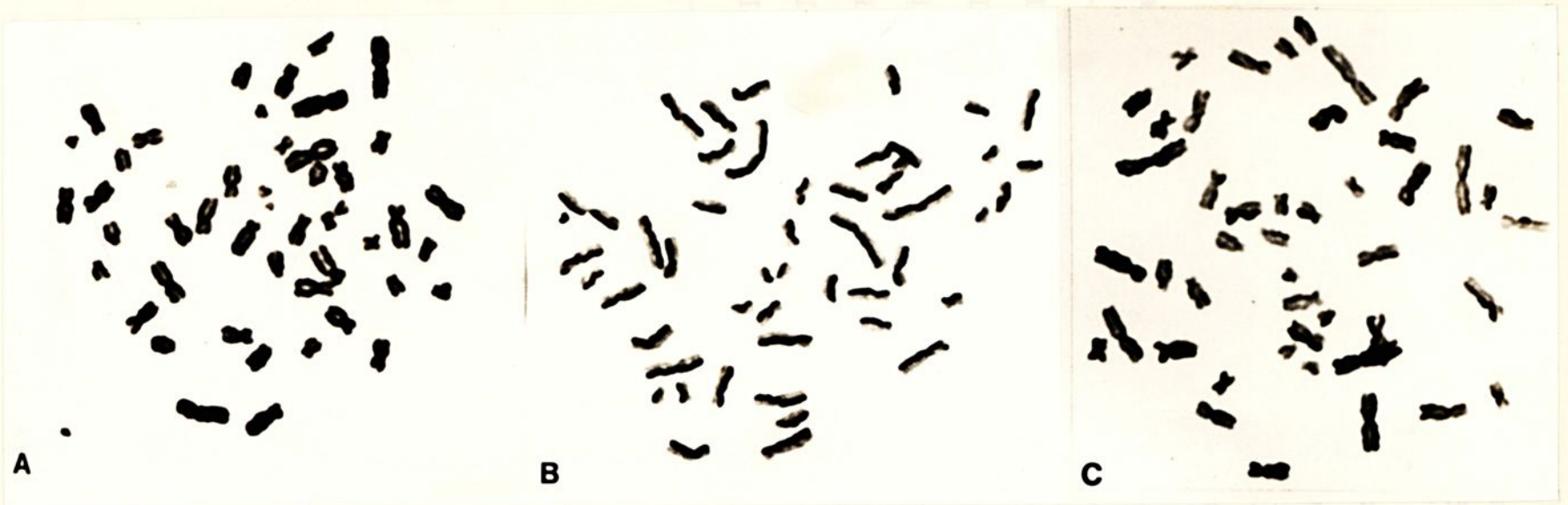


Figura 2. Metáfases de primeira (A), segunda (B) e terceira (C) divisões celulares.

Tabela 6. Valores de G para comparação das distribuições de células de primeira, segunda e terceira divisões entre o controle I e os outros grupos experimentais. Graus de liberdade = 2. ns: não-significativo ($P > 0,05$); *: significativo ($P < 0,05$).

Grupos experimentais comparados	Valores de G	Significância
CI X ETH-5	25,20	*
CI X ETH-2	11,28	*
CI X FAL-2	19,89	*
CI X FAF-2	6,90	*
CI X CII-5	33,71	*
CI X CII-2	3,69	ns

contradas foram aberrações instáveis, representadas por quebras ou falhas, cromatídicas ou cromossômicas (Figura 3A, B, C, D) e estavam presentes em todos os grupos experimentais, com exceção de CII-5. Outras anomalias estruturais, como fragmentos e anéis, não foram encontradas, mas observou-se eventos quadrirradiais em três células, sendo duas no grupo experimental FAL-5 (Figura 3E, F) e uma no grupo experimental FAF-5.

Na Tabela 8 apresentam-se as médias das freqüências das anomalias estruturais por metáfase analisada e por metáfase com anomalias e a discriminação dos tipos de eventos anômalos encontrados.

Entre os eventos anômalos observados pôde-se constatar que, de modo geral, as aberrações cromossômicas por quebras foram as mais freqüentes, a ocorrência de quebras cromatídicas e cromossômicas variando nos grupos experimentais FAL-5 e FAF-5, que apresentaram uma proporção bem maior de quebras cromossômicas. Nos grupos experimentais em que se observou a ocorrência de falhas, essas apareceram em proporções equivalentes entre os tipos cromatídico e cromossômico, com exceção do grupo experimental FAL-5, que só apresentou falhas cromatídicas. Geralmente cada metáfase apresentou um evento anômalo, fazendo exceção uma metáfase no grupo experimental ETH-5, duas no grupo experimental FAL-5 e uma no grupo experimental FAF-5, que apresentaram quatro eventos anômalos nos dois primeiros casos e dois eventos anômalos nos últimos.

Os resultados obtidos com a aplicação do teste G, com 1 grau de liberdade, para a comparação da freqüência de anomalias estruturais de cada um dos grupos experimentais com o controle I constam da Tabela 9. Os valores encontrados possibili-

Tabela 7. Freqüência de anomalias cromossômicas estruturais em 50 metáfases nos grupos experimentais (G.E.) do Experimento II.

G.E.	Freqüência de metáfases com anomalias estruturais					
	Total		Quebras ou falhas		Quadrirradiais	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
ETH-5	9	18	9	18	0	
FAA-5	1	2	1	2	0	
FAO-5	3	6	3	6	0	
FAL-5	13	26	11	22	2	4
FAF-5	12	24	11	22	1	2
CII-5	0		0		0	
CI	1	2	1	2	0	

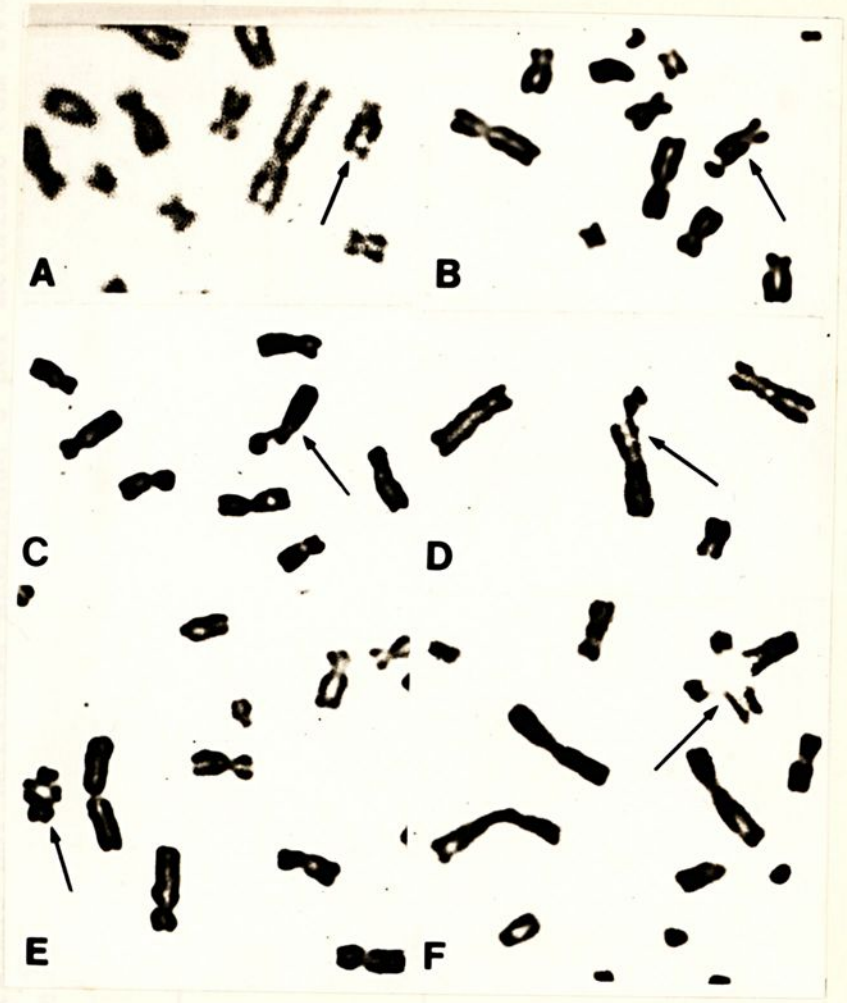


Figura 3. Metáfases parciais mostrando: (A) cromossomo do grupo D com falha cromatídica; (B) cromossomo do grupo B com falha cromossômica; (C) cromossomo 2 com quebra cromatídica; (D) cromossomo 3 com quebra cromossômica; (E) figura quadrirradial envolvendo um cromossomo do grupo E e um cromossomo do grupo F; (F) figura quadrirradial envolvendo dois cromossomos do grupo C.

Tabela 8. Freqüência de anomalias estruturais por metáfase analisada e por metáfase com eventos anômalos, e discriminação dos eventos anômalos nos grupos experimentais (G.E.) do Experimento II.

G.E.	Anomalias/ metáfase analisada		Anomalias/ metáfases anômalas		Quebras				Falhas				Quadrirradiais	
					Cromat.		Cromos.		Cromat.		Cromos.			
	$\bar{x}$	± s	$\bar{x}$	± s	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
ETH-5	0,24	0,43	1,33	1,0	5	41,6	5	41,6	1	8,3	1	8,3		
FAA-5	0,02	0,14	1,00	0							1	100		
FAO-5	0,06	0,24	1,00	0	1	33,3			1	33,3	1	33,3		
FAL-5	0,40	0,49	1,54	1,1	3	16,6	11	61,1	4	22,2			2	11,1
FAF-5	0,26	0,44	1,08	0,3	4	33,3	8	66,6					1	8,3
CI	0,02	0,14	1,00	0			1	100						

Tabela 9. Valores da Estatística G (1 grau de liberdade) para comparação das freqüências de anomalias estruturais entre o Controle I e os outros grupos experimentais, no Experimento II. ns: não-significativo; (P > 0,05); *: significativo (P < 0,05).

Grupos comparados	Estatística G	Significância
CI X ETH-5	12,40	*
CI X FAA-5	0,12	ns
CI X FAO-5	1,11	ns
CI X FAL-5	323,12	*
CI X FAF-5	12,41	*
CI X CII-5	1,40	ns

tam a rejeição de hipótese de igualdade, ou seja, acusam uma diferença entre as populações de células do CI e dos grupos experimentais ETH-5, FAL-5 e FAF-5.

Nos grupos experimentais com maior freqüência de eventos anômalos, quase todos os grupos cromossômicos foram afetados, como pode ser observado na Tabela 10. Em tais grupos experimentais foi feita uma análise da distribuição dos eventos anômalos, considerando-se, como referência, a participação dos componentes de cada lote cromossômico no conteúdo total do genoma. Os dados da Tabela 11 mostram que nenhum valor da estatística G indicou diferença significativa ao nível de 5%, significando que o número de quebras observado em cada grupo cromossômico não diferiu do esperado teoricamente. Os valores do comprimento relativo de cada cromossomo em relação ao lote autossômico haplóide, empregado neste cálculo, são dados de Lubs *et alii* (Paris Conference, 1971).

Além das aberrações cromossômicas estruturais, foram registradas células com aberrações cromossômicas numéricas, apresentando hipodiploidia (45 cromossomos) ou hiperdiploidia (47 cromossomos). Pelos dados da Tabela 12, verifica-se que todos os grupos experimentais apresentaram células hipodiplóides em proporções mais ou menos semelhantes(menos de 10% das células analisadas), com exceção do grupo experimental FAL-5 que apresentou um índice mais elevado (20%), além de ter sido o único a apresentar uma célula hiperdiplóide, com um cromossomo extra do grupo D.

Os valores da estatística G para comparação das distribuições das freqüências de células aneuplóides em CI e nos outros grupos experimentais acusaram diferença significativa entre CI e FAL-5 (Tabela 13).

Vários grupos cromossômicos estão envolvidos nas perdas em células hipodiplóides (Tabela 14). A comparação da dis-

Tabela 10. Distribuição das quebras e falhas pelos grupos cromossômicos e por áreas cromossômicas nos grupos experimentais (G.E.) do Experimento II. p = braço curto; q = braço longo; c = região centromérica.

G.E.	Grupos cromossômicos envolvidos nas quebras ou falhas											
	A1	A2		A3	B			C+X		Dq	E	
		p	q		p	c	q	p	q		p	q
ETH-5	1		1	1	1		4		4			
FAA-5						1						
FAO-5			1				2					
FAL-5	1	1	1	3			1		7			4
FAF-5			1		1		1	2	4	1	1	1
CII-5												
CI		1										

Tabela 11. Valores da estatística G para comparação da distribuição de aberrações cromossômicas estruturais pelos grupos cromossômicos considerando a sua participação no conteúdo total do genoma. Graus de liberdade = 6. ns: não-significativo (P > 0,05).

Grupo experimental	Estatística G	Significância
ETH-5	7,82	ns
FAL-5	3,80	ns
FAF-5	2,60	ns

Tabela 12. Freqüência de células diplóides, hipodiplóides (com 45 cromossomos) e hiperdiplóides (com 47 cromossomos), em 50 metáfases de cada grupo experimental (G.E.) do Experimento II.

G.E.	Freqüência de metáfases					
	diplóides		hipodiplóides		hiperdiplóides	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
ETH-5	47	94	3	6		
FAA-5	46	92	4	8		
FAO-5	47	94	3	6		
FAL-5	39	78	10	20	1	2
FAF-5	47	94	3	6		
CII-5	47	94	3	6		
CI	48	96	2	4		

Tabela 13. Valores da estatística G para comparação das freqüências de células euplóides e aneuplóides entre o controle I e os outros grupos experimentais do Experimento II. Grau de liberdade = 1. ns: não-significativo; ($P > 0,05$); *: significativo ($P < 0.05$).

Grupos comparados	G	Significância
CI X ETH-5	0,22	ns
CI X FAA-5	0,72	ns
CI X FAO-5	0,22	ns
CI X FAL-5	6,56	*
CI X FAF-5	0,72	ns
CI X CII-5	0,22	ns

Tabela 14. Cromossomos ausentes nas células hipodiplóides nos grupos experimentais (G.E.) do Experimento II.

G.E.	Grupos cromossômicos						
	A	B	C + X	D	E	F	G
ETH-5	1		1		1		
FAA-5	1		2		1		
FAO-5		1	1			1	
FAL-5	1	1	3		3		2
FAF-5		1	1	2			
CII-5			2		1		
CI			1		1		

Tabela 15. Valores da estatística G para comparação da distribuição de perdas observadas por grupos cromossômicos com as esperadas casualmente com base na quantidade de cromossomos de cada grupo, nos grupos experimentais (G.E.) do Experimento II. Graus de liberdade = 6. ns: não-significativo (P > 0,05).

G.E.	Estatística G	Significância
(FAA-5) + (FAO-5)	5,60	ns
FAL-5	5,20	ns
(FAL-5) + (FAF-5)	3,98	ns
(ETH-5) + (FAA-5) + (FAO-5) + (FAL-5) + (FAF-5)	2,10	ns

tribuição de perdas observadas por grupo cromossômico, com a esperada com base na quantidade de cromossomos de cada grupo no lote diplóide, está apresentada na Tabela 15. Não há diferença significativa no grupo experimental FAL-5, nas combinações dos grupos experimentais tratados com as frações aquosas (FAA-5 e FAO-5) e com as frações acetônicas (FAL-5 e FAF-5), ou na combinação de todos os grupos submetidos ao tratamento (ETH-5, FAA-5, FAO-5, FAL-5 e FAF-5).

III.4. Freqüência de trocas entre cromátides-irmãs (TCI)

A análise da freqüência de trocas entre cromátides-irmãs foi efetuada no Experimento III, que foi subdividido em III.A, no qual foram testadas as frações na concentração de 5 µl/ml, e III.B, no qual foram testadas duas concentrações das frações, ou seja, 5 µl/ml e 2 µl/ml.

A Tabela 16 mostra as médias das freqüências e os valores máximo e mínimo de TCI por célula nos diferentes grupos experimentais dos Experimentos III.A e III.B. O número médio de TCI por célula variou, no Experimento III.A, de 10,8 $\pm$ 2,7 (FAF-5) a 15,1 $\pm$ 6,0 (ETH-5) e no Experimento III.B, desenvolvido com linfócitos de outro doador, de 14,3 $\pm$ 5,1 (CII-2) a 24,5 $\pm$ 4,4 (ETH-5).

Na Tabela 16 não foram computadas as TCI centroméricas. No Experimento III.B computou-se também as TCI centroméricas e os valores do teste de Wilcoxon para comparação das freqüências de TCI nos dois tipos de análises estão na Tabela 17. Todos os grupos experimentais mostraram uma diferença significativa na freqüência de TCI, quando se incluiu as TCI centroméricas.

A comparação das freqüências de TCI por metáfase, pelo teste de Wilcoxon (Tabela 18), não acusou diferença entre os grupos tratados e o controle do Experimento III.A. No entanto, no Experimento III.B, todos os grupos tratados com as diferentes frações do avelós diferiram significativamente do controle.

Na Tabela 19 são apresentados os valores de qui-quadrado da comparação das freqüências de TCI observadas no controle e nos outros grupos experimentais. Nesse caso, no Experimento III.A o controle diferiu significativamente do FAF-5, que apresentou uma freqüência média mais baixa. No Experimento III.B foram detectadas diferenças significativas entre o controle e os grupos ETH-5, ETH-2 e FAL-2, todos com freqüências médias superiores às do controle.

Para comparação das distribuições de TCI por cromossomo ou grupo cromossômico entre o controle e os demais grupos, utilizou-se o teste de Wilcoxon para dados pareados, sendo os resultados também apresentados na Tabela 19. Só diferiram significativamente do controle os grupos FAF-5, do Experimento III.A, e ETH-5, do Experimento III.B.

As freqüências de TCI por grupos cromossômicos, ou pelos cromossomos que puderam ser identificados, estão apresentados nas Tabelas 20 (Experimento III.A) e 21 (Experimento III.B). Os valores médios mais elevados de TCI por cromossomo são encontrados nos cromossomos dos grupos A e B e os mais baixos nos dos grupos F e G. A comparação das freqüências observadas de TCI por cromossomo ou grupo cromossômico e as esperadas com base nos seus tamanhos relativos ao genoma total (dados de LUBS *et alii*, em Paris Conference, 1971) é apresentada nas Tabelas 22 (Experimento III.A) e 23 (Experimento III.B). Enquanto

Tabela 16. Freqüências de TCI nos Experimentos III.A e III.B.

Experimento	G.E.	Nº de células	Nº de TCI	TCI/célula (excluindo as centroméricas) $\bar{x}$ ± s		Limites das freqüências de TCI/célula Mínimo	Máximo
III.A	ETH-5	10	151	15,1	6,0	7	29
	FAL-5	20	283	14,1	3,6	6	19
	FAF-5	20	217	10,8	2,7	6	16
	CI	20	289	14,4	3,6	9	20
III.B	ETH-5	20	490	24,5	4,4	19	33
	ETH-2	28	538	19,2	5,1	10	30
	FAL-2	32	583	18,2	6,2	8	32
	FAF-2	36	566	15,7	5,0	8	30
	CII-5	20	307	15,4	3,9	9	22
	CII-2	20	286	14,3	5,1	6	26
	CI	20	297	14,8	4,8	7	28

Tabela 17. Comparação das médias das freqüências de TCI incluindo ou não as trocas centroméricas nos diferentes grupos experimentais (G.E.) do Experimento III.B.
*: significativo ($P < 0,05$).

G.E.	Nº de células	TCI/célula incluindo as centroméricas $\bar{x} \pm s$	TCI/célula excluindo as centroméricas $\bar{x} \pm s$	Teste de Wilcoxon (dados combinados) Valor calculado	Valor crítico	Significância
ETH-5	20	31,3 5,5	24,5 4,4	543,0	471,0	*
ETH-2	28	25,6 5,7	19,2 5,1	1035,5	898,6	*
FAL-2	32	24,2 6,8	18,2 6,2	1284,5	1162,8	*
FAF-2	36	20,5 5,8	15,7 5,0	1590,0	1460,5	*
CII-5	20	19,6 4,4	15,4 3,9	510,5	471,0	*
CII-2	20	19,0 5,3	14,3 5,1	505,5	471,0	*
CI	20	18,4 5,4	14,8 4,8	492,5	471,0	*

Tabela 18. Resultados do teste de Wilcoxon para comparação entre os grupos tratados e CI (dados combinados), no Experimento III.B.

Experimento	Grupos comparados	Tamanho da amostra		Valor calculado	Valor crítico	Significância
		controle n	tratada m			
III.A	CIxETH	20	10	147,5	347,5	ns
	CIxFAL-5	20	20	412,5	471,0	ns
	CIxFAF-5	20	20	306,5	471,0	ns
III.B	CIxETH-5	20	20	585,5	471,0	*
	CIxETH-2	20	28	821,0	568,9	*
	CIxFAL-2	20	32	937,5	617,7	*
	CIxFAF-2	20	36	1068,5	666,5	*
	CIxCII-5	20	20	424,0	471,0	ns
	CIxCII-2	20	20	400,0	471,0	ns

Tabela 19. Comparação, pelo teste de qui-quadrado, das freqüências de TCI observadas no controle I, e nos outros grupos experimentais (G1=1) e, pelo teste de Wilcoxon para dados pareados, da distribuição dos TCI por cromossomo ou grupo cromossômico entre o controle e cada grupo tratado.
ns: não-significativo (P > 0,05); *: significativo (P < 0,05)

Experimento	Grupos comparados	Teste de qui-quadrado		Teste de Wilcoxon		Significância
		χ^2	Significância	Valor calculado	Valor crítico	
III.A	CIxETH-5	0,17	ns	13,5	8	ns
	CIxFAL-5	0,06	ns	21,5	5	ns
	CIxFAF-5	10,24	*	7,5	8	*
III.B	CIxETH-5	47,20	*	0	5	*
	CIxETH-2	12,81	*	10,0	8	ns
	CIxFAL-2	8,10	*	13,0	8	ns
	CIxFAF-2	0,60	ns	22,0	8	ns
	CIxCII-5	0,16	ns	21,5	8	ns
	CIxCII-2	0,21	ns	21,0	5	ns

Tabela 20: Freqüências de TCI por cromossomo ou grupo cromossômico nos grupos experimentais (G.E.) do Experimento III.A.

G.E.	Nº de metá-fases		Cromossomo ou grupo cromossômico										
			1	2	3	B	C+X	D	16	17+18	F	G	Total
ETH-5	10	Nº	11	14	10	26	59	20	4	3	4	0	151
		$\bar{x}$	0,55	0,70	0,50	0,65	0,36	0,33	0,20	0,07	0,10	0	
		s	0,68	0,73	0,68	0,73	0,62	0,50	0,52	0,27	0,37	0	
FAL-5	20	Nº	16	35	19	37	108	38	11	12	2	5	283
		$\bar{x}$	0,37	0,87	0,47	0,47	0,33	0,32	0,27	0,15	0,025	0,06	
		s	0,66	0,91	0,67	0,59	0,58	0,53	0,50	0,35	0,15	0,24	
FAF-5	20	Nº	25	23	20	33	82	20	1	9	2	2	217
		$\bar{x}$	0,62	0,57	0,50	0,41	0,25	0,16	0,02	0,11	0,02	0,02	
		s	0,80	0,67	0,67	0,56	0,49	0,43	0,15	0,38	0,15	0,15	
CI	20	Nº	34	25	17	46	105	27	7	17	6	5	289
		$\bar{x}$	0,85	0,62	0,42	0,61	0,32	0,22	0,16	0,23	0,07	0,06	
		s	0,89	0,80	0,59	0,66	0,56	0,43	0,44	0,48	0,26	0,24	

Tabela 21. Freqüência de TCI por cromossomo ou grupo cromossômico nos grupos experimentais (G.E.) do Experimento III.B.

G.E.	Nº de metá-fases		Cromossomo ou grupo cromossômico										
			1	2	3	B	C+X	D	16	17-18	F	G	Total
ETH-5	20	Nº	41	44	35	87	192	46	15	14	07	09	490
		$\bar{x}$	1,02	1,10	0,87	1,08	0,60	0,38	0,37	0,17	0,08	0,11	
		s	0,99	1,19	0,75	1,02	0,80	0,53	0,58	0,38	0,28	0,31	
ETH-2	28	Nº	55	50	43	90	198	56	11	19	11	05	538
		$\bar{x}$	0,98	0,89	0,76	0,80	0,44	0,33	0,19	0,16	0,09	0,04	
		s	0,86	0,86	0,89	0,88	0,65	0,57	0,44	0,40	0,32	0,20	
FAL-2	32	Nº	62	47	39	89	227	64	21	18	04	12	583
		$\bar{x}$	0,96	0,73	0,60	0,69	0,44	0,33	0,32	0,14	0,03	0,09	
		s	1,03	0,85	0,76	0,82	0,67	0,62	0,59	0,41	0,17	0,29	
FAF-2	36	Nº	46	55	46	107	207	51	19	17	11	07	566
		$\bar{x}$	0,63	0,76	0,63	0,74	0,35	0,23	0,26	0,11	0,07	0,04	
		s	0,86	0,77	0,71	0,84	0,56	0,45	0,55	0,34	0,29	0,24	
CII-5	20	Nº	27	27	22	45	131	28	04	09	08	06	307
		$\bar{x}$	0,67	0,67	0,55	0,56	0,40	0,23	0,10	0,11	0,10	0,07	
		s	0,88	0,82	0,63	0,67	0,62	0,49	0,30	0,32	0,34	0,26	
CII-2	20	Nº	24	28	17	53	110	25	06	12	06	05	286
		$\bar{x}$	0,60	0,70	0,42	0,66	0,34	0,20	0,15	0,15	0,07	0,06	
		s	0,74	0,84	0,67	0,81	0,60	0,42	0,42	0,39	0,30	0,24	
CI	20	Nº	19	25	25	42	119	39	06	11	07	04	297
		$\bar{x}$	0,47	0,62	0,62	0,52	0,37	0,32	0,15	0,14	0,08	0,05	
		s	0,75	0,74	0,84	0,69	0,58	0,48	0,42	0,34	0,32	0,21	

Tabela 22: Valores de χ^2 para comparação das distribuições de TCI em relação ao tamanho relativo dos cromossomos metafásicos, no Experimento III.A. Graus de liberdade = 9; ns: não-significativo (P > 0,05).

G.E.		Cromossomos ou grupos cromossômicos											
		1	2	3	B	C+X	D	16	17-18	F	G	Total	χ^2_9
ETH-5	Ob.	5,5	7,0	5,0	13,0	29,5	10,0	2,0	1,5	2,0	0	75,5	8,62 ns
	Esp.	6,1	5,8	4,9	8,8	28,7	7,6	2,4	4,4	3,8	2,8	75,2	
FAL-5	Ob.	8,0	17,5	9,5	18,5	54,0	19,0	5,5	6,0	1,0	2,5	141,5	14,24 ns
	Esp.	11,4	10,8	9,2	16,6	53,8	14,4	4,5	8,3	7,0	5,3	141,3	
FAF-5	Ob.	12,5	11,5	10,0	16,5	41,0	10,0	0,5	4,5	1,0	1,0	108,5	14,38 ns
	Esp.	8,6	8,2	7,0	12,8	41,2	11,1	3,4	6,4	5,4	4,0	108,1	
CI	Ob.	17,0	12,5	8,5	23,0	52,5	13,5	3,5	8,5	3,0	2,5	144,5	10,30 ns
	Esp.	11,6	11,02	9,4	17,0	55,0	14,8	4,6	8,5	7,2	5,4	144,5	
Tamanho relativo do lote (LUBS *et alii*, 1971)	*n*	8,44	8,02	6,83	12,38	39,97	10,76	3,36	6,18	5,23	3,94	105,11	

Tabela 23: Valores de χ^2 para comparação das distribuições de TCI em relação ao tamanho relativo dos cromossomos metafásicos, no Experimento III.B. Graus de liberdade = 9; ns: não-significativo (P > 0,05); *: significativo (P < 0,05). Tamanho relativo do lote *n* conforme tabela anterior.

G.E.		Cromossomos ou grupos cromossômicos											
		1	2	3	B	C+X	D	16	17+18	F	G	Total	χ^2_9
ETH-5	Ob.	20,5	22,0	17,5	43,5	96,0	23,0	7,5	7,0	3,5	4,5	245,0	20,97*
	Esp.	19,6	18,6	15,8	28,8	93,2	25,0	7,8	14,4	12,2	9,2	244,6	
ETH-2	Ob.	27,5	25,0	21,5	45,0	99,0	28,0	5,5	9,5	5,5	2,5	269,0	22,80*
	Esp.	21,6	20,5	17,4	31,6	102,2	27,5	8,5	15,8	13,4	10,0	268,5	
FAL-2	Ob.	31,0	23,5	19,5	44,5	113,5	32,0	10,5	9,0	2,0	6,0	291,5	22,59*
	Esp.	23,4	22,2	18,8	34,3	110,8	29,8	9,3	17,1	14,5	10,8	291,0	
FAF-2	Ob.	23,0	27,5	23,0	53,5	103,5	25,5	9,5	8,5	5,5	3,5	283,0	29,37*
	Esp.	22,6	21,6	18,4	33,3	107,6	28,9	9,0	16,6	14,0	10,6	282,6	
CII-5	Ob.	12,0	14,0	8,5	26,5	55,0	12,5	3,0	6,0	3,0	2,5	143,0	11,80ns
	Esp.	11,4	10,9	9,2	16,8	54,4	14,6	4,6	8,4	7,1	5,4	142,8	
CII-2	Ob.	13,5	13,5	11,0	22,5	65,5	14,0	2,0	4,5	4,0	3,0	153,5	9,30ns
	Esp.	12,3	11,6	9,9	18,0	58,4	15,8	4,9	9,0	7,6	5,8	153,3	
CI	Ob.	9,5	12,5	12,5	21,0	59,5	19,5	3,0	5,5	3,5	2,0	148,5	9,20ns
	Esp.	11,9	11,3	9,6	17,4	56,4	15,2	4,6	8,6	7,4	5,6	148,0	

no Experimento III.A não se detectou diferença significativa em relação ao esperado, no Experimento III.B só os controles mostraram distribuição de TCI relacionada com o tamanho dos cromossomos; nos demais grupos experimentais (ETH-5, ETH-2, FAL-2 e FAF-2)houve diferença significativa, principalmente devida a freqüência de TCI maior que o esperado nos cromossomos do grupo B, e menor que o esperado nos grupos F e G.

III.5. Freqüência de associações entre os cromossomos acrocêntricos

As associações entre os satélites dos cromossomos acrocêntricos dos grupos D e G foram pesquisadas nos grupos experimentais de todos os experimentos. A Tabela 24 resume os achados, apresentando as freqüências de associações totais e por célula, dos tipos de associações, de cromossomos por associação e de cromossomos associados por metáfase.

As freqüências de associações por célula não manifestaram diferenças nas distribuições dos controles e dos outros grupos experimentais dos quatro experimentos (valores de G na Tabela 25), com exceção de FAF-5, do Experimento III.A. As freqüências dos tipos de associações também se distribuíram sem diferença entre os controles e a maior parte dos grupos experimentais de cada experimento (valores de G na Tabela 25), fazendo exceção o ETH-10, do Experimento I, e o ETH-5 do Experimentos II.

Os valores de t para comparação das médias de associações por célula, de cromossomos por associação e de cromossomos associados por célula são apresentados na Tabela 26. O único grupo que diferiu do controle com relação ao número de associações

por célula e de cromossomos associados por célula foi o FAL-5, do Experimento II, com valores mais baixos que o controle. Com relação ao número de cromossomos por associação, só ETH-5 do Experimento III.B diferiu significativamente do controle, que apresentou um valor mais elevado.

Os quatro cromossomos do grupo G contribuíram com uma parcela menor que os seis cromossomos do grupo D para o total de cromossomos associados por metáfase, nos Experimentos I, III.A e III.B, mas no Experimento II a freqüência de participação em associações dos cromossomos desses dois grupos foi semelhante.

Os valores do teste G para comparação das distribuições das freqüências de associações por célula e dos tipos de associações entre os controles dos vários experimentos (Tabela 27) mostraram uma diferença significativa quanto ao primeiro parâmetro entre os controles dos Experimentos I e II e entre os controles dos Experimentos II e III.B. Todavia, os controles dos diferentes experimentos não diferiram entre si quanto aos tipos de associações.

Quando os controles I dos diferentes experimentos foram comparados pelo teste *t* (Tabela 28), observou-se que os dos Experimentos I e II diferiram significativamente quanto às médias de associações por célula e de cromossomos associados por células, mas não diferiram quanto ao número médio de cromossomos por associação. O mesmo resultado pôde ser observado quando da comparação dos controles dos Experimentos II e III.A, e II e III.B. Os controles dos Experimentos I, III.A e III.B não diferiram entre si com relação aos três parâmetros considerados.

Tabela 24: Distribuição das associações cromossômicas em metáfases dos quatro experimentos.

Experimento	G.E.	Nº de metáfases	Nº de associações	Associações por célula						Tipos de associações								Cromossomos por associação	Cromossomos associados por metáfase		
				0	1	2	3	4	$\bar{x} \pm s$	DD	DG	GG	DDD	DDG	DGG	GGG	outros	$\bar{x} \pm s$	Grupo D $\bar{x} \pm s$	Grupo G $\bar{x} \pm s$	D+G $\bar{x} \pm s$
I	ETH-10	38	49	7	15	14	2		1,3 0,8	13	17	3	5	6	3		2	2,4 0,6	2,1 1,4	0,9 0,9	3,0 2,0
	ETH-5	50	62	12	16	20	2		1,2 0,8	29	20	4		5	2		2	2,2 0,4	1,9 1,5	0,8 0,9	2,7 1,9
	ETH-1	50	69	5	24	18	3		1,4 0,7	22	25	9	3	5	3		2	2,2 0,5	1,9 1,3	1,1 0,9	3,0 1,8
	CII	50	75	5	20	20	5		1,5 0,8	29	31	5	1	6	2		1	2,2 0,5	2,2 1,2	1,0 1,0	3,2 1,8
	CI	50	68	9	20	15	6		1,4 0,9	22	20	7	7	6	4		2	2,3 0,5	2,1 1,4	1,0 1,0	3,1 2,1
II	ETH-S	50	90	5	11	23	11		1,8 0,9	17	43	12	1	6	10	1		2,2 0,4	2,0 1,1	1,9 1,2	3,9 1,9
	FAA-S	50	85	3	17	22	8		1,7 0,8	16	34	12		7	11	3	2	2,3 0,5	1,9 1,1	2,0 1,1	3,9 2,0
	FAO-S	50	80	4	19	20	7		1,6 0,8	13	28	16	2	8	5	3	5	2,3 0,6	1,8 1,2	1,9 1,2	3,7 2,0
	FAL-S	49	68	8	21	13	7		1,4 0,9	12	28	10	1	5	10		2	2,3 0,5	1,6 1,3	1,6 1,1	3,2 2,2
	FAF-S	50	85	6	13	21	10		1,7 0,9	17	35	11	2	8	7	2	3	2,3 0,5	2,0 1,4	1,9 1,2	3,9 2,3
	CII-S	50	84	3	17	23	7		1,7 0,8	16	37	10	2	7	4	2	6	2,3 0,7	2,1 1,1	1,8 1,2	3,9 1,8
	CI	50	92	2	16	21	10	1	1,8 0,8	26	35	8	3	8	5	2	5	2,3 0,6	2,6 1,4	1,6 1,1	4,2 2,1
III.A	ETH-S	10	12	2	5	2	1		1,2 0,9	6	4	1				1		2,1 0,4	1,6 1,3	0,9 1,1	2,5 1,8
	FAL-S	20	21	5	9	6	..		1,0 0,7	7	8	1		3	1		1	2,3 0,6	1,6 1,3	0,8 0,8	2,4 1,7
	FAF-S	20	20	9	3	7	1		1,0 1,0	7	7	3		1	2			2,1 0,4	1,2 1,4	0,9 1,0	2,1 2,2
	CI	20	26	2	11	6	1		1,3 0,7	4	10	5	2	3	1	1		2,3 0,4	1,5 1,0	1,4 1,2	2,9 1,7
III.B	ETH-S	20	20	7	8	3	2		1,0 1,0	8	12							2,0 0,0	1,4 1,5	0,6 0,8	2,0 1,9
	ETH-2	28	32	7	12	7	2		1,1 0,9	7	18	4		1	2			2,1 0,3	1,3 0,9	1,1 1,1	2,4 1,8
	FAL-2	32	37	7	14	10	1		1,1 0,8	9	14	4	2	4	2	1	1	2,3 0,5	1,6 1,2	1,0 1,0	2,6 1,8
	FAF-2	36	32	13	16	6		1	0,9 0,9	10	14	6			1	1		2,1 0,2	1,0 1,1	0,8 0,9	1,8 1,8
	CII-S	20	20	6	8	6			1,0 0,8	7	4	7		1	1			2,1 0,3	1,0 1,0	1,0 1,0	2,1 1,6
	CII-2	20	29	2	10	5	3		1,4 0,9	6	11	7	3	2				2,2 0,4	1,8 1,3	1,3 1,0	3,1 1,9
	CI	20	22	4	11	4	1		1,1 0,8	5	10	2	1	1	1	1	1	2,3 0,5	1,4 1,3	1,0 0,9	2,5 1,7

Tabela 25: Valores de G para comparação das distribuições das freqüências de associações por célula e tipos de associações entre o controle e os grupos experimentais. Gl = Graus de liberdade; ns: não-significativo ($P > 0,05$); *: significativo ($P < 0,05$).

Experimentos	Grupo comparado com CI	Nº de associações por célula			Tipos de associações		
		G	Gl	Significância	G	Gl	Significância
I	ETH-10	1,40	3	ns	19,60	6	ns
	ETH-5	3,60	3	ns	11,60	6	ns
	ETH-1	2,60	3	ns	3,00	6	*
	CII	1,80	3	ns	9,20	6	ns
II	ETH-5	2,20	4	ns	14,66	6	*
	FAA-5	0,60	3	ns	10,00	7	ns
	FAO-5	1,80	3	ns	7,40	7	ns
	FAL-5	7,20	3	ns	10,66	6	ns
	FAF-5	2,40	3	ns	3,00	7	ns
	CII-5	1,20	3	ns	2,80	7	ns
III.A.	ETH-5	1,00	3	ns	5,58	3	ns
	FAL-5	3,00	2	ns	6,00	6	ns
	FAF-5	9,80	3	*	6,60	5	ns
III.B.	ETH-5	1,80	3	ns	1,46	1	*
	ETH-2	0,60	3	ns	6,00	6	ns
	FAL-2	1,20	3	ns	1,40	7	ns
	FAF-2	1,80	3	ns	5,60	4	ns
	CII-5	2,40	2	ns	8,28	5	ns
	CII-2	1,60	3	ns	7,60	5	ns

Tabela 26: Valores de *t* para comparação entre o controle e os grupos experimentais. ns: não-significativo (P > 0,05); *: significativo (P < 0,05); Gl = Graus de liberdade.

Experimento	Grupo comparado com CI	$\bar{x}$ de assoc./cél.			$\bar{x}$ de cromos./assoc.			$\bar{x}$ cromos.assoc./cél.		
		t	Gl	Significância	*t*	Gl	Significância	*t*	Gl	Significância
I	ETH-10	0,54	98	ns	1,00	115	ns	0,23	98	ns
	ETH-5	1,16	98	ns	1,21	127	ns	1,00	98	ns
	ETH-1	0,24	86	ns	1,30	136	ns	0,26	86	ns
	CII	0,60	98	ns	1,30	141	ns	0,26	98	ns
II	ETH-5	0,23	98	ns	1,58	179	ns	0,76	98	ns
	FAA-5	0,62	98	ns	0,13	175	ns	0,76	98	ns
	FAO-5	1,20	98	ns	0,55	170	ns	1,23	98	ns
	FAL-5	2,35	97	*	0,12	158	ns	2,38	97	*
	FAF-5	0,58	98	ns	0,13	175	ns	0,68	98	ns
	CII-5	0,62	98	ns	0,46	174	ns	0,76	98	ns
III.A	ETH-5	0,34	28	ns	1,54	38	ns	0,60	28	ns
	FAL-5	1,29	38	ns	0,11	45	ns	0,94	38	ns
	FAF-5	1,10	38	ns	1,75	44	ns	1,31	38	ns
III.B	ETH-5	0,37	38	ns	2,54	40	*	0,87	38	ns
	ETH-2	0,06	46	ns	1,75	52	ns	0,19	46	ns
	FAL-2	0,24	50	ns	0,18	57	ns	0,20	50	ns
	FAF-2	0,85	54	ns	1,75	52	ns	1,44	54	ns
	CII-5	0,41	38	ns	1,46	40	ns	0,77	38	ns
	CII-2	1,14	38	ns	0,85	49	ns	1,05	38	ns

Tabela 27: Valores de G para comparação das distribuições dos números de associações por célula (3 graus de liberdade) e tipos de associações (6 graus de liberdade) entre os controles. ns: não-significativo ($P > 0,05$); *: significativo ($P < 0,05$).

Grupos comparados	Nº de associações por célula		Tipos de associações	
	G	Significância	G	Significância
CI(I) X CI(II)	7,80	*	5,92	ns
CI(I) X CI(III.A)	2,20	ns	4,40	ns
CI(I) X CI(III.B)	2,00	ns	4,00	ns
CI(II) X CI(III.A)	6,20	ns	4,80	ns
CI(II) X CI(III.B)	10,80	*	1,00	ns
CI(III.A) X CI(III.B)	0,80	ns	2,80	ns

Tabela 28: Teste t para comparação das médias entre controles dos diferentes experimentos. Gl = Graus de liberdade; ns: não-significativo (P > 0,05); *: significativo (P < 0,05).

Grupos comparados	$\bar{x}$ de assoc./cél.			$\bar{x}$ de cromos./ass.			$\bar{x}$ de cromos.ass./cél.		
	t	Gl	Significância	t	Gl	Significância	t	Gl	Significância
CI(I) X CI(II)	2,31	98	*	0,05	158	ns	2,66	98	*
CI(I) X CI(III.A)	0,45	68	ns	0,36	92	ns	0,38	68	ns
CI(I) X CI(III.B)	1,33	68	ns	0,28	88	ns	1,15	68	ns
CI(II) X CI(III.A)	2,39	68	*	0,30	116	ns	2,50	68	*
CI(II) X CI(III.B)	3,28	68	*	0,25	112	ns	3,27	68	*
CI(III.A) X CI(III.B)	0,86	38	ns	0,02	46	ns	0,76	38	ns

IV. DISCUSSÃO

IV.1. Índice de proliferação celular e aberrações cromossômicas

Duas das cinco frações estudadas, a fração aquosa rica em açúcares (FAA) e a fração aquosa rica em ácidos orgânicos (FAO) não manifestaram efeitos quanto aos parâmetros estudados. Segundo CARVALHO *et alii* (1981) os açúcares encontrados na fração FAA são mutáveis e de fermentação alcoólica, enquanto que os ácidos orgânicos da fração FAO parecem ter como principais componentes os ácidos cítrico e málico, uma vez que esses acumulam-se em plantas que possuem fotossíntese do tipo CAM (metabolismo ácido das crassuláceas), como a *E. tirucalli*. Esse processo metabólico mantém um balanço positivo de carbono nos tecidos, constituindo-se em um eficiente mecanismo de economia de água, fato esse observado no avelós por PARCEVAUX & ALLIRAND (1977).

Nas culturas em que foi adicionado BrdU, foi possível identificar as células do primeiro, segundo e terceiro ciclo de divisão celular, sendo que todos os grupos experimentais apresentaram uma distribuição dessas células significativamente diferente de CI e CII-2. Os grupos experimentais ETH-5 e FAL-2 apresentaram uma freqüência maior de células em primeira divisão em comparação com a de células de terceira divisão, enquanto situação inversa foi observada nos grupos experimentais ETH-2, FAF-2 e CII-5. Pode-se supor que nos grupos que apresentaram menor freqüência de células em terceira divisão (ETH-5 e FAL-2) houve um retardamento do ciclo celular e em ETH-2, FAF-2 e CII-5 tenha havido uma inibição da resposta mitogênica, resultando na diminuição do número de células que se transformariam em blastos. Nes-

ses casos, nas poucas células que sofreram diferenciação, a divisão processou-se mais rapidamente, tendo maior número de células atingido os três estadios do ciclo.

A falta de correlação, entre a taxa de proliferação celular e índice mitótico, também foi observada por CROSSEN & MORGAN (1977) em linfócitos de dez indivíduos normais. A grande variação individual observada foi atribuída a uma estimulação diferencial das células B e T, com crescimento mais pronunciado das últimas.

Ao contrário das frações aquosas, o extrato total hidroacetônico (ETH) e as frações acetônicas ricas em lipídios (FAL) e em forbol (FAF) mostraram efeitos cicloativos e clastogênicos na concentração de 5 µl/ml. O extrato total hidroacetônico é o primeiro composto obtido pelo processo de extração, sendo, portanto, uma mistura de todos os componentes das outras frações, não se podendo descartar uma ação sinergística desses diferentes compostos retardando o ciclo celular e causando danos ao material genético. Além disso, a acetona é um composto sabidamente citotóxico, isto é, que altera as funções celulares vitais, podendo ter auxiliado nesses efeitos.

O efeito mais drástico no índice mitótico e a maior freqüência de aberrações cromossômicas foram registrados no grupo experimental contendo a fração FAL-5. Dentre essas, a incidência maior foi de anomalias estruturais. Entre os lipídios presentes na fração FAL, encontram-se os triterpenos eufol e tirucalol, identificados em *E. tirucalli* por BIESBOER & MAHLBERG (1979), sendo que o eufol ocorre em grande quantidade no látex, e o tirucalol se acumula em outras células, além dos tubos laticíferos. Os ácidos lipídicos de ocorrência natural são citados como tendo fraca atividade promotora de tumor (DIAMOND *et alii*, 1980) e, em comparação com os ésteres de diterpenos, só são promotores

em doses muito mais elevadas. No entanto, estudos epidemiológicos em seres humanos, têm demonstrado uma clara associação entre o alto consumo de lipídios na dieta e os cânceres de cólon, seio e próstata (REDDY, 1982; BRENTANI, 1982), o que está de acordo com o achado de que, em animais, a gordura é um promotor de carcinogênese e presumivelmente um carcinogênico (AMES, 1983). As gorduras insaturadas e o colesterol são facilmente oxidados e a reação de peroxidação da cadeia lipídica produz uma variedade de compostos mutagênicos e carcinogênicos, tais como hidroperóxidos lipídicos e hidroperóxidos do colesterol, endoperóxidos, enóis, aldeídos, alqueóxidos e radicais hidroperóxidos (AMES, 1982; 1983). Uma grande proporção dos lipídios provenientes da dieta alimentar é oxidada nos peroxissomos, onde cada remoção de duas unidades de carbono gera uma molécula de peróxido de hidrogênio, que é um agente mutagênico, promotor e carcinogênico (REDDY *et alii*, 1980). Provavelmente, o efeito tóxico dos lipídios seja decorrente do mecanismo de geração de radicais de oxigênio, afetando todos os aspectos da organização celular, incluindo a estrutura da membrana celular e o aparelho mitótico (AMES, 1982).

Para que ocorra absorção no intestino dos ácidos lipídicos ingeridos é necessária a existência de um mecanismo especial. Sabe-se que essas substâncias são capazes, em virtude de sua solubilidade na porção lipídica das membranas celulares, de se difundirem. Todavia, para que haja a rápida entrada dos lipídios na célula, eles devem se encontrar sob uma forma hidrossolúvel e livremente difusível. Em relação a esse aspecto, a bile desempenha um papel fundamental na preparação dos lipídios, facilitando sua absorção pelo intestino delgado (SELKURT, 1979). Desse modo, pode-se entender porque os hábitos alimentares de povos do Ocidente, caracterizado por altos níveis de gorduras, resultam em altas

concentrações de ácidos biliares no intestino, em contraposição aos hábitos alimentares de japoneses e africanos, pobres em gorduras e ricos em fibras vegetais que são consideradas como de baixo risco para incidência de neoplasias. Realmente, testes em mamíferos mostraram que os ácidos biliares possuem grande ação promotora da carcinogênese intestinal. No caso, uma dieta rica em fibras exerceria uma influência oposta em relação à concentração de estímulos promotores dos lipídios (WEISBURGER *et alii*, 1982).

Outro grupo experimental que apresentou redução no índice mitótico e alta freqüência de anomalias cromossômicas estruturais foi o FAF-5. Os ésteres de forbol são compostos de ocorrência natural, não-carcinogênicos por si, embora alguns apresentem propriedades promotoras de tumor; desse modo, têm sido extensivamente empregados *in vitro* como fatores de crescimento, mitogênicos e reguladores da diferenciação celular, na tentativa de esclarecer o mecanismo multi-estadio da carcinogênese (BERENBLUM, 1954; VAN DUUREN & SIVAK, 1968; VAN DUUREN, 1969; BOUTWELL, 1964, 1974; BOUTWELL *et alii*, 1982).

Muitos diésteres de forbol foram isolados de diferentes espécies de *Euphorbia*, sendo que esses compostos variam em suas atividades irritantes e promotoras. ROE & PEIRCE (1961) demonstraram que o extrato acetônico de *Euphorbia tirucalli* foi o mais potente na promoção de tumores em ratos, comparado aos de outras nove espécies de *Euphorbia*, quando aplicado após uma dose única de 9,10-dimetil-1,2-benzantraceno (DMBA). Tal atividade promotora não foi confirmada posteriormente por outros autores (FÜRSTENBERGER & HECKER, 1972; HECKER, 1978; KINGHORN, 1979b; HICKEY *et alii*, 1981; MARKS *et alii*, 1982) que, contudo, detectaram no extrato de *E. tirucalli* efeitos tóxicos e irritantes tão potentes como os do TPA. KINGHORN (1979b) isolou a fração res-

ponsável pela atividade irritante do extrato acetônico de *E. tirucalli*, por concentração em éter, identificando o composto 12-0-2Z-4E-octadienoil-4-deoxiforbol-13-acetato por cromatografia em coluna, seguida por cromatografia em camada fina. No entanto, além deste composto, um substituto da longa cadeia éster foi encontrado nessa espécie por FÜRSTENBERGER & HECKER (1977), como parte de um éster de outro álcool diterpeno.

Esses autores isolaram, do extrato acetônico dessa espécie, duas frações ésteres (I e II) altamente irritantes, sendo que a fração I caracterizava-se pela presença de forbol e ingenol, identificados como 12, 13, 20-tri-O-acetilforbol e 3, 5, 20-tri-0-acetilingenol, respectivamente. A fração II caracterizava-se pela presença de forbol, de onde foram isolados quatro fatores (Ti_5 a Ti_8). O fator Ti_5 foi identificado como 13-0-acetil-12-0-[(2Z,4E)-2,4-octadienoil] forbol, o Ti_6 como 13-0-acetil-12-[(2Z,4E)-2,4,6-decatrienoil] forbol, o Ti_7 como 13-0-acetil-12-0-(2,4,6,8,10-tetradecapentaenoil) forbol e o Ti_8 como 13-0-acetil-12-0-(2,4,6,8-tetradecatetraenoil) forbol. Similarmente, da fração I foi isolado o fator Ti_9, identificado como 12-0-acetil-13-0-(2,4,6,8,10-tetradecapentaenoil) forbol. Tais resultados confirmam a ocorrência de diferentes tipos de diterpenos nessa espécie (KINGHORN, 1979b).

A análise espectrofotométrica da fração FAF que foi testada no presente trabalho revelou a presença de compostos com comportamento semelhante ao dos padrões 4-beta-forbol-13-alfa-20 diacetato e 4-beta-forbol-12-beta-20-triacetato. No entanto, torna-se difícil identificar os fatores que estariam presentes na fração FAF, principalmente porque se trata de uma fração impura, ao contrário do extrato acetônico empregado por HECKER & SCHMIDT (1974). Pode-se concluir, contudo, que os ésteres de forbol pre-

sentes na fração FAF causam efeitos danosos ao material genético, na concentração de 5 ppm. Essa mesma concentração provocou redução do índice mitótico, sendo que um efeito comitogênico pode ter sido responsável pelo aumento no índice mitótico verificado na concentração de 2 ppm.

O mesmo efeito comitogênico, ou seja, a ação sinergística dos ésteres de forbol com compostos sabidamente mitogênicos, como a fito-hemaglutinina e insulina, foi descrito por MASTRO & MULLER (1974) em linfócitos de bovinos e por DICKER & ROZENGURT (1978) em células da linhagem de roedores Swiss 3T3. Sobre os efeitos dos ésteres de forbol de *Euphorbia tirucalli* no ciclo celular, são apenas conhecidos os achados de MARKS & FÜRSTENBERGER (1980) que encontraram efeito mitogênico, em baixas concentrações, empregando um dos fatores, o Ti_8, na epiderme de camundongo. No entanto, não são conhecidos seus efeitos em outros sistemas.

Os dados de literatura sobre a ação de outros diésteres de forbol na síntese de DNA *in vitro* são contraditórios e parecem depender do tipo de linhagem celular, assim como do estado de crescimento da cultura. Para LOTEM & SACHS (1979) o TPA é considerado um agente perturbador da regulação normal de diferenciação e proliferação celular, enquanto que outros autores mostram que esse diester pode tanto aumentar a atividade do ciclo celular de células quiescentes cultivadas (DIAMOND *et alii*, 1974; YUSPA *et alii*, 1976; DICKER & ROZENGURT, 1978), como inibir a síntese do DNA (ABB *et alii*, 1979; ROVERA *et alii*, 1980; TOMEI & WENNER, 1979), ou inibir a síntese inicialmente, mas a seguir aumentar a incorporação de DNA (FUSENIG & SAMSEL, 1978; SUSS *et alii*, 1972).

Existem diferentes interpretações para a diversidade

de respostas dos diésteres de forbol no ciclo celular. SUSS *et alii* (1972) mostraram que a incorporação de timidina em células HeLa é deprimida por doses baixas de certos derivados de ésteres de forbol promotores, mas não por derivados não-promotores desses ésteres. Observações similares, em epiderme de camundongo, foram feitas por SLAGA *et alii* (1974) e por PETERSON *et alii* (1977) que descreveram a inibição transitória da síntese de DNA como requisito básico para o processo de promoção. Posteriormente, KINZEL *et alii* (1981) evidenciaram que o decréscimo na incorporação de timidina, causado pelo TPA em células HeLa, relacionava-se com as mudanças que ocorriam no ciclo celular, existindo uma sensibilidade diferencial das células nas diferentes fases do ciclo. Entretanto, para TOMEI *et alii* (1981), a sensibilidade ou não aos efeitos proliferativos do TPA reside nos estados farmacológicos cineticamente distintos da fase G1.

Em resumo, a capacidade do TPA em agir sinergisticamente com doses subótimas de mitogênicos, seus efeitos sobre os macrófagos, assim como sua atividade semelhante à da interleucina 1 (fator de ativação de linfócitos) poderiam explicar as diferenças nas suas atividades mitogênicas e comitogênicas em células de várias espécies (por exemplo: homem, camundongo, bovinos), nos vários tecidos (sangue periférico, gânglios linfáticos, timo e medula) e sob várias condições de cultura. Em casos em que o TPA parece ser mitogênico, é possível que as células já tenham sido parcialmente ativadas *in vitro* ou que, alternativamente, exista uma dose subótima do material mitogênico no soro ou meio de cultura. O fato de que, em certos tipos de células, o TPA não tenha sido mitogênico, mas tenha agido de forma sinergística ou tornado as células mais sensíveis a outros fatores de crescimento, é uma boa razão para suspeitar que o TPA não seja um mitogê-

nico puro para linfócitos (MASTRO, 1982).

Existem vários trabalhos que enfocam a atividade mutagênica dos ésteres de forbol. BAIRD *et alii* (1971) analisaram o efeito de uma única aplicação com a mesma dose molar de 12-0-TPA; forbol-12-13-didecanoato (potentes promotores de tumor); forbol-12-13-dibenzoato (fraco promotor); forbol e forbol-12-13-diacetato (promotores muito fracos) da incorporação precursora de DNA, RNA e proteína na epiderme de camundongo, relatando que suas capacidades de promover tumorização estão correlacionadas com suas capacidades de estimular a síntese de DNA, RNA e proteína.

Embora, segundo McCANN *et alii* (1975), o TPA não tenha sido mutagênico no teste de Ames, LANKAS *et alii* (1977) mostraram que o forbol e o TPA causaram um aumento na freqüência de mutações dominantes *in vitro* e aparecimento de tumores *in vivo*, em células de hamster chinês. Esses dados estão de acordo com os de TROSKO *et alii* (1977), que demonstraram um aumento na freqüência de mutações induzidas por esses promotores. Entretanto, nem todos os pesquisadores detectaram tal efeito. THOMPSON *et alii* (1980) não encontraram um aumento significativo na indução de mutações em células de hamster chinês pelo TPA. Segundo esses autores, a promoção feita pelo TPA não provém de mecanismos envolvendo recombinação genética ou expressão alterada de alelos recentemente mutados. Tal aparente discrepância poderia ser explicada se a mutagênese induzida pelo TPA ocorresse sob condições de ensaio, nas quais houvesse cooperação metabólica. A cooperação metabólica reduziria a expressão de mutação e a sua inibição pelo TPA provocaria, em conseqüência, um aparente aumento de mutações. Todavia, ensaios realizados em condições nas quais não havia cooperação metabólica não confirmaram tal efeito do TPA na freqüência de mutações (KINSELLA, 1981).

Em vista de tais dados conflitantes, EMERIT & CERUTTI (1981) testaram a hipótese de que o TPA induziria dano cromossômico por via indireta, por meio da formação de uma espécie de oxigênio intermediário ativo. Eles concluíram que o TPA induzia freqüências aumentadas de aberrações cromossômicas (fragmentos acêntricos, figuras tri e quadrirradiais, quebras e falhas cromatídicas e cromossômicas) em linfócitos humanos estimulados por fito-hemaglutinina, com produção baixa de trocas entre cromátides-irmãs. Esses dados estão de acordo com os de FUSENIG & DZARLIEVA (1982) e com os de DZARLIEVA & FUSENIG (1982), que, além de aberrações cromossômicas e numéricas, encontraram um moderado aumento de trocas entre cromátides-irmãs em células epidérmicas de camundongos recém-nascidos. Segundo esses autores, o aumento na freqüência de aberrações cromossômicas representa um novo aspecto do mecanismo de ação de ésteres de forbol.

Muitos estudos biológicos e bioquímicos têm evidenciado que o sítio inicial de ação dos ésteres de forbol parece ser a membrana das células-alvo (VAN DUUREN & SIVAK, 1968; WEISSMANN *et alii*, 1968; SIVAK *et alii*, 1969; VAN DUUREN, 1969). FRANTZ *et alii* (1979) levantaram a hipótese de que os efeitos mitogênicos dos ésteres de forbol seriam exercidos através de uma via hormonal específica, em vez de serem uma resposta celular realçada por outros mitogênicos. Tais achados permitiram levantar a hipótese de que os ésteres de forbol agem via receptores análogos àqueles de muitos hormônios (PECAR *et alii*, 1982), que se ligam à membrana de modo específico (BLUMBERG *et alii*, 1982 e DI PAOLO *et alii*, 1982). COLLINS & ROZENGURT (1982) analisaram a relação entre concentração do ligador, ocupação do receptor e respostas celulares em culturas de células quiescentes da linhagem Swiss 3T3 e outros tipos de células murine, demonstrando que o nível de ocupação de uma única classe

de sítios de ligação de alta afinidade pelo forbol-12-13-dibutirato triciado [(^{3}H)-PDBu] está correlacionado com a grandeza da resposta proliferativa apresentada pelo forbol-12-13-dibutirato (PDBu), indicando que a alta afinidade de sítios de ligação detectada em células 3T3 media efeitos mitogênicos dos ésteres de forbol nessas células.

Essas suposições foram reforçadas pelos resultados de SHOYAB & TODARO (1982) que demonstraram a existência, no soro de mamíferos, de uma proteína ligadora que interage especificamente com ésteres de forbol e ingenol biologicamente ativos, sendo, portanto, receptores específicos para tais compostos.

Estudos sobre o efeito de ésteres de forbol em linfócitos humanos mostraram que o forbol 12,13-dibutirato, em concentrações nanomolares, afetou a morfologia dessas células, alterando a composição bioquímica da membrana plasmática, induzindo agregação dos linfócitos em poucos minutos (PATARROYO *et alii*, 1982). Esta ligação foi interpretada como um reconhecimento intercelular entre elementos do sistema imune, mediado por próteínas da superfície celular (PATARROYO *et alii*, 1983).

No entanto, para DELEERS & MALAISSE (1982), os sítios primários de ação dos ésteres de forbol não estão totalmente elucidados. A ligação desses ésteres com receptores específicos tem sido encontrada em culturas de fibroblastos de embrião de galinha (DRIEDGER & BLUMBERG, 1980), em epiderme de camundongo (ASHENDEL & BOUTWELL, 1981; SOLANSKI & SLAGA, 1981) e em linfócitos humanos (SANDO *et alii*, 1981), sendo que a alta afinidade entre o éster de forbol e o receptor estaria envolvida na resposta biológica desses agentes.

A interação dos ésteres de forbol com fosfolipídios em membranas artificiais, com uma ou duas camadas lipídicas,

foi demonstrada pelos trabalhos de DELEERS *et alii* (1981; 1982) e DELEERS & MALAISSE (1982). Esses autores concluíram que a inserção de ésteres de forbol no domínio fosfolipídico de membranas vivas representa o evento primário na resposta biológica desses agentes, e que a relativa capacidade de ligação de cada um dos diferentes ésteres de forbol não diferia de sua capacidade de atuar como promotor de tumor. Em seqüência decrescente de atividade promotora classifica-se o: 12-0-tetradecanoil-forbol-13-acetato (TPA) ou forbol-12-miristato-13-acetato (PMA), o forbol 12, 13-didecanoato (PDD), o 4α-forbol 12, 13-didecanoato (4α-PDD) e o forbol 12,13-diacetato (PDA). As diferenças nas ligações estão relacionadas com a configuração de cada éster de forbol. Pela análise da estrutura, os autores mostraram que a configuração espacial dos ésteres de forbol promotores de tumor como o PDD é mais adequada do que a de agentes biologicamente inativos, como o 4α-PDD, para a inserção no domínio fosfolipídico. Além disso, deve-se levar em conta que a atividade dos ésteres de forbol está altamente relacionada com o comprimento da cadeia lipídica (HECKER, 1978), com a posição e comprimento dos substitutos dos ésteres (DELCLOS *et alii*, 1980) e com a conformação tridimensional da molécula (BRASSEUR *et alii*, 1982).

De modo geral, pode-se atribuir a freqüência aumentada de quebras, no grupo experimental contendo a fração FAL, à elevada presença de compostos lipídicos, que devem ter uma afinidade com a membrana celular maior do que os compostos presentes na fração FAF. Provavelmente, os ésteres de forbol presentes nessa última fração contenham pequeno número de ácidos lipídicos em sua molécula, garantindo-lhe a característica de composto menos potente. Por sua vez, a fração ETH contém os compostos presentes nas outras quatro frações testadas, entre eles os lipídios e ésteres de forbol, que manifestaram um efeito clastogênico mais acentuado nas frações isoladas (FAL e FAF) nas quais havia maior concentração do princípio ativo, enquanto que na fração ETH eles estão mais diluídos e misturados aos compostos presentes em FAA e FAO.

Em relação às aberrações cromossômicas numéricas, a hipodiploidia

observada nos grupos experimentais ETH-5, FAA-5, FAO-5, FAF-5, CII-5 e CI, parece estar relacionada com a metodologia empregada. No entanto, o grupo experimental FAL-5 apresentou uma freqüência de células hipodiplóides significativamente diferente do CI, o que sugere o envolvimento de outros fatores. Há indicações de compostos que atuam modificando as propriedades das membranas, ou de elementos do aparelho mitótico ou, ainda, alterando o controle da disjunção dos cromossomos durante o processo de divisão celular, de modo a favorecer o aparecimento de células aneuplóides. ZIMMERMANN *et alii* (1984), por exemplo, demonstraram que o oncodazol, um anti-neoplásico, interage com a tubulina dos microtúbulos, induzindo aneuploidia em culturas de leveduras e de células de bovinos. Por conseguinte, pode-se supor que na fração FAL-5 se encontrem, em concentração suficiente para atuar, agentes químicos capazes de ocasionar tais alterações, justificando a freqüência maior de células aneuploides.

IV.2. Trocas entre cromátides-irmãs (TCI)

Embora o mecanismo exato e o significado das TCI não estejam ainda bem entendidos, está claro que elas refletem um reparo dependente da fase S, em seguida a uma quebra cromossômica. A idade do doador, a ocorrência de tabagismo e as condições das culturas de linfócitos, especialmente a concentração de BrdU no meio, a quantidade e o tipo do soro empregado parecem exercer influência na freqüência de TCI (NATARAJAN *et alii*, 1982). Um outro fator importante é a capacidade que alguns compostos têm de interferir no ciclo celular. Como as trocas entre cromátides-irmãs ocorrem durante a fase S do ciclo celular, é provável que agentes que alonguem essa fase, também aumentem a freqüência básica de TCI (KINZEL *et alii*, 1981). Não se observou, no presente estudo, relação entre a freqüência de células em primeira, segunda e terceira divisões e a freqüência de TCI, à semelhança do encontrado por HEEREMA *et alii* (1982). Uma correlação positiva entre essas variáveis foi citada por LINDBLAD & LAMBERT (1981).

De maneira geral, a freqüência de TCI, no presente estudo, apresentou-se associada à concentração do composto no grupo experimental ETH, mas

não nos tratados com as frações FAL e FAF. Na concentração de 5 µl/ml, essas frações aumentaram significativamente a freqüência de aberrações cromossômicas, sem se mostrarem efetivas na indução de TCI, coincidindo com resultados de estudos com outros compostos, como o estireno (HANSTEEN *et alii*, 1978; UGGLA *et alii*, 1979), o cloreto de vinila (MERETOJA *et alii*, 1978) e compostos sabidamente carcinogênicos, como o metapirileno e nitrosodietanolamina (RAY-CHAUDHURI *et alii*, 1982). No grupo experimental FAF, foi observada, na concentração de 5 µl/ml, uma diminuição na freqüência de TCI. Nesse caso, não se pode descartar a possibilidade de um erro de análise, pois a acentuada contração cromossômica pode ter dificultado a detecção das TCI localizadas nas posições distais dos braços cromossômicos. Além disso, deve-se considerar a hipótese de variação individual à resposta de indução de TCI, uma vez que as concentrações de 2 e 5 µl/ml das frações FAL e FAF foram testadas em células de indivíduos diferentes.

A freqüência de TCI foi significativamente maior em todos os grupos experimentais do Experimento III.B, quando incluiu se no cômputo as TCI centroméricas. Isso indica a necessidade de padronização dos critérios de análise para possibilitar a comparação dos resultados.

Os diferentes testes estatísticos aplicados, qui-quadrado e duas modalidades do teste de Wilcoxon, mostraram boa correlação em alguns resultados. No Experimento III.A, houve coincidência de resposta nos três testes, que demonstraram não haver diferença entre as freqüências de TCI do controle e os grupos ETH-5 e FAL-5. Entretanto, a freqüência de TCI encontrada no grupo FAF-5 diferiu significativamente da do controle, pelos testes de Wilcoxon por dados pareados e de qui-quadrado, mas não o fez pelo teste de Wilcoxon por dados combinados. No Experimento III.B, todos os grupos tratados (ETH-5, ETH-2, FAL-2 e FAF-2)

apresentaram freqüências diferentes das do controle pelo teste de Wilcoxon (dados combinados), havendo confirmação dessa diferença para os três primeiros grupos experimentais pelo teste de qui-quadrado e apenas para o primeiro grupo experimental pelo teste de Wilcoxon (dados pareados).

Os diferentes resultados encontrados pelos testes estatísticos de qui-quadrado e as duas modalidades de Wilcoxon em relação às TCI podem ser perfeitamente explicáveis, porque as hipóteses testadas são diferentes. Com o teste de qui-quadrado foram comparados os valores totais de cada grupo experimental, enquanto que com o teste de Wilcoxon, com dados combinados, foram comparados os valores de TCI por célula, situação em que a variabilidade intragrupal pode alterar o significado da variabilidade intergrupal. Por outro lado, para o teste de Wilcoxon com dados pareados, foram empregadas as médias de TCI por cromossomo ou grupo cromossômico.

A comparação da distribuição de TCI, tendo como parâmetro os valores esperados em relação ao tamanho relativo dos cromossomos, foi calculada em cada grupo experimental pelo teste de qui-quadrado e os resultados mostram concordância com os encontrados no teste de Wilcoxon por dados combinados. Desse modo, não houve diferença entre as freqüências de TCI entre o controle e os grupos experimentais do Experimento III.A; todavia, no Experimento III.B, todos os grupos tratados diferiram do controle I, que apresentava freqüências de TCI menores nos cromossomos do grupo B e maiores nos grupos F e G. MORGAN & CROSSEN (1977) já haviam encontrado resultados similares em indivíduos normais. O aumento na freqüência de TCI nos cromossomos do grupo B pode ser devido a uma maior susceptibilidade desses cromossomos à BrdU, já tendo sido observada por ENGEL *et alii* (1967) uma alta freqüência de quebras nos cromossomos do grupo B causa-

da por essa droga. A menor freqüência de trocas em cromossomos pequenos já foi observada por LATT (1974a), CHAGANTI *et alii* (1974) e GALLOWAY & EVANS (1975) e, talvez, seja devida a uma baixa incidência de TCI na região centromérica que constitui grande porção desses cromossomos.

A indução de TCI por ésteres de forbol é um evento de ocorrência discutida. KINSELLA & RADMAN (1978) relacionaram o aumento na incidência de TCI em culturas de fibroblastos de pulmão de hamster chinês, tratadas com TPA na concentração de 1 ppm, com a segregação mitótica anormal envolvida no processo de promoção de tumor do seguinte modo: os agentes promotores agiriam induzindo as enzimas necessárias para a recombinação genética, que levaria aos eventos de segregação, permitindo a expressão de mudanças cromossômicas genéticas ou epigenéticas recessivas, presentes na célula iniciada. No entanto, THOMPSON *et alii* (1980) não encontraram segregação mitótica ou aumento na incidência de TCI em células de hamster chinês.

Quando a fração FAF foi estudada em uma concentração de 2 µl/ml observou-se um aumento na freqüência de TCI. Há de se ressaltar que todos os trabalhos que citam a indução desse efeito pelo TPA empregaram concentrações do composto variáveis de 0,1 a 2 µl/ml.

As causas das diferenças entre os resultados dos trabalhos que confirmam o aumento de TCI induzida pelo TPA (KINSELLA & RADMAN, 1978; NAGASAWA & LITTLE, 1979; GENTIL *et alii*, 1980; DZARLIEVA & FUSENIG, 1982), em contraposição aos que negam tal afirmação (LOVEDAY & LATT, 1979; POPESCU *et alii*, 1980; THOMPSON *et alii*, 1980; HSUEH *et alii*, 1981), assim como o modo de ação do TPA em células normais e transformadas, não são conhecidos. No entanto, há indicações de que os radicais livres atuem como

importantes intermediários na indução de TCI por TPA (EMERIT & CERUTTI, 1981; NAGASAWA & LITTLE, 1981), assim como sugestões de que a alteração da permeabilidade celular e a redução da ligação dos fatores de crescimento da epiderme (SHOYAB *et alii*, 1979) sejam, mesmo que parcialmente, responsáveis pelo aumento de TCI.

IV.3. Associação de satélites

A associação de satélites é um fenômeno biológico característico de cada indivíduo (MATTEI *et alii*, 1981), sendo que a freqüência de associações não parece ser casual (PATIL & LUBS, 1971; COOKE, 1972; MATTEI *et alii*, 1981) e varia dentro da população (HOUGHTON & HOUGHTON, 1978). Os cromossomos que participam desse tipo de associação são facilmente distinguidos do restante do genoma, por apresentarem regiões de constrições secundárias, reconhecidas como sítios de organização do nucléolo ou regiões organizadoras nucleolares (RONs). HENDERSON *et alii* (1972) e EVANS *et alii* (1974) demonstraram, por hibridização *in situ*, que as RONs representam as localizações cromossômicas dos genes que codificam para o RNA ribossômico 18S e 28S. No homem, essas regiões estão presentes nos braços curtos dos cinco pares de cromossomos acrocêntricos 13, 14, 15, 21 e 22 (OHNO *et alii*, 1961a).

Os resultados do presente estudo, em relação à freqüência de associação de satélites, mostraram variação entre os diferentes doadores, o CI do Experimento II diferindo dos CI do Experimento I e do Experimento III.B, devido à distribuição do número de associações por célula. O doador do Experimento II apresentou uma freqüência maior de cromossomos associados por célula, não porque cada associação tivesse mais cromossomos envolvidos,

mas sim pela maior freqüência do número de associações por célula.

Não houve diferença quanto à distribuição do número de associações por célula entre o controle e os grupos tratados dos quatro indivíduos, com exceção do grupo FAF-5 do Experimento III.A, que tinha freqüência menor de associações que o controle. No entanto, a diferença detectada nesse grupo não parece ser devida à ação dos compostos presentes na fração forbol, pois não se repetiu com os outros doadores.

Em relação à comparação dos grupos tratados com seus respectivos controles, em cada indivíduo, observou-se que o grupo FAL-5 do Experimento II diferiu do seu controle por apresentar uma freqüência menor de cromossomos associados por célula devido a uma menor freqüência de associações por metáfase. Outro grupo que diferiu do seu controle foi o ETH-5 do Experimento III.B, que apresentou um menor número de cromossomos por associação, contudo, sem que isto chegasse a interferir na freqüência de associações por célula e no número médio de cromossomos associados por célula.

Dos numerosos alvos potenciais para a ação de drogas no núcleo celular, somente alguns têm sido estudados em detalhe, entre os quais estão o nucléolo, os poros nucleares, a cromatina metafásica e o aparelho mitótico (DASKAL, 1979).

O nucléolo interfásico normal é formado por elementos fibrilares e granulares, que representam a cromatina nucleolar e partículas pré-ribossômicas, respectivamente. Quando as células são tratadas com antimetabólitos capazes de se ligar ou se intercalar no DNA e, portanto, interferir em sua atividade de síntese de RNA, ocorre a segregação nucleolar e os componentes indivi-

duais tornam-se distintos e fisicamente separados. Isto é uma manifestação ultra-estrutural da inibição da síntese de RNA ribossômico. Como exemplo de drogas que atuam desse modo pode-se citar actinomicina D, antraciclina, nogalomicina, brometo de etídio e agentes alquilantes, tais como mitomicina C e cis-platina, em concentrações elevadas (CROOKE, 1979).

Outros fatores, tais como infecções, subnutrição e radioatividade também parecem atuar ao nível do nucléolo, nele provocando alterações morfológicas e fisiológicas. Lesões nucleolares, caracterizadas por aumento na quantidade de cromatina intranucleolar e pelo aparecimento de densas condensações dentro do nucléolo (GRANBOULAN *et alii*, 1963), e por um aumento no tamanho do nucléolo (LOVE *et alii*, 1964) foram encontradas em células de mamíferos, infectadas por vírus de DNA que se duplicam no núcleo dessas células. Por outro lado, vírus de DNA e RNA que se duplicam no citoplasma aparentemente não afetaram o nucléolo (LOVE *et alii*, 1964). Alterações no regime protéico podem acarretar mudanças na morfologia do nucléolo. SVOBODA & HIGGINSON (1964) estudando a ultraestrutura de células de fígado de ratos, submetidos a alimentação com proteínas, destacaram, entre outros efeitos, um aumento do volume nucleolar. Em relação aos efeitos das radiações sobre o nucléolo, os trabalhos de NIX *et alii* (1965) e MIRONESCU & DRAGOMIR (1967) mostraram que houve alteração no número de nucléolos, na sua estrutura, no volume e no grau de vacuolização. SINGH & GHOSH (1978) relataram um aumento na freqüência de associação de satélite causado por radiação, no entanto, esses resultados não foram confirmados por HOUGHTON (1979).

No presente estudo não se pôde detectar a ocorrência de alterações funcionais das regiões organizadoras do nucléolo, ou mesmo dessa organela, que se refletissem em variações no padrão de associação dos cromossomos portadores de RONs.

V. RESUMO E CONCLUSÕES

Este estudo teve por objetivo investigar a ação, em linfócitos humanos cultivados, de cinco frações obtidas de *Euphorbia tirucalli* L. (avelós), com vistas a detectar alterações na duração do ciclo celular, indução de aberrações cromossômicas e mudanças nas freqüências de trocas entre cromátides-irmãs (TCI) e nas associações de satélites entre cromossomos acrocêntricos.

As frações, obtidas pela técnica de distribuição multiplicativa, foram extrato total hidroacetônico (ETH), fração aquosa rica em açúcares (FAA), fração aquosa rica em ácidos orgânicos (FAO), fração acetônica rica em lipídios (FAL) e fração acetônica rica em forbol (FAF).

Foram realizados quatro experimentos: I, II, III.A e III.B, cada um utilizando linfócitos de um determinado doador.

Das cinco frações testadas na concentração de 5 µl/ml, três (ETH-5, FAL-5 e FAF-5) apresentaram efeitos cicloativos, com redução do índice mitótico nas culturas com elas tratadas. Tal resultado não foi verificado em avaliação posterior, quando tais frações foram empregadas na concentração de 2 µl/ml.

A maior freqüência de aberrações cromossômicas foi encontrada nas metáfases tratadas com as frações ETH-5, FAL-5 e FAF-5, evidenciando a atividade clastogênica dos compostos presentes nessas frações. As anomalias estruturais registradas foram aberrações cromossômicas instáveis, representadas por quebras ou falhas, cromatídicas ou cromossômicas e eventos quadrirradiais. De modo geral, as aberrações cromossômicas por quebras foram as mais freqüentes, sendo que a distribuição das quebras nos cromossomos ou grupos cromossômicos parece ter sido casual. As anomalias numéricas ocorreram em proporções semelhantes em todos os grupos experimentais, com exceção do grupo experimental FAL-5, que apresentou uma incidência maior de células hipodiplói

des.

As frações que apresentaram atividade cicloativa e clastogênica foram estudadas, em duas concentrações (2 e 5 µl/ml), quanto à freqüência de trocas entre cromátides-irmãs (TCI). Os controles apresentaram em torno de 14 TCI por célula. Nos grupos experimentais tratados com as duas concentrações do extrato total hidroacetônico (ETH-2 e ETH-5) a freqüência de TCI diferiu significativamente da dos controles, sendo os valores mais elevados encontrados na maior concentração. Ao contrário, os grupos experimentais tratados com as frações acetônicas ricas em lipídios e em forbol não foram efetivos como indutores de TCI na concentração de 5 µl/ml, mas apresentaram uma freqüência de TCI maior na concentração de 2 µl/ml. A redução na freqüência de TCI no grupo experimental FAF-5 e a não detecção de aumento no grupo experimental FAL-5 podem ter sido devidas à toxicidade dos compostos presentes nessas frações, que teria induzido uma contração cromossômica acentuada. Assim, não pode ser negligenciada a possibilidade de ter ocorrido uma subestimativa na avaliação das freqüências de TCI, principalmente das localizadas na posição distal dos braços cromossômicos.

A freqüência observada de TCI por cromossomo diferiu da esperada com base no tamanho dos cromossomos nos grupos tratados com as frações ETH-5, ETH-2, FAL-2 e FAF-2; os cromossomos do grupo B apresentando freqüência de TCI maior do que a esperada e os dos grupos F e G freqüências menores do que as esperadas.

Não houve diferença nas freqüências de associações de satélites dos cromossomos acrocêntricos entre os controles e os outros grupos experimentais de cada experimento, com exceção de FAF-5 (do Experimento III.A), com diferença na distribuição de

freqüências de associações por célula, e de FAL-5 (do Experimento III.A), com diferença na freqüência média de associações por célula. De modo geral, não houve diferença em relação aos tipos de associações, destacando-se somente o ETH-5 do Experimento III.B, com um número menor de cromossomos por associação, e o FAL-5 do Experimento II, com um número menor de cromossomos associados por célula, devido à redução de associações por célula já referida. No entanto, foi encontrada diferença significativa entre o controle do Experimento II e os dos Experimentos I e III.B em relação à freqüência de cromossomos associados por célula, devido ao fato de haver, no primeiro, uma freqüência média de associações mais elevada que nos últimos. Esses achados reforçam observações anteriores sobre a existência de variação individual nas freqüências de associações de satélites dos cromossomos acrocêntricos, mas não fornecem indícios de alteração no processo de síntese do RNA celular.

Em conclusão, os resultados sugerem que os compostos presentes no extrato total hidroacetônico (ETH) e nas frações acetônicas ricas em lipídios e forbol de *Euphorbia tirucalli* L. são cicloativos e clastogênicos na concentração de 5 µl/ml, são efetivos na indução de TCI na concentração de 2 µl/ml e não alteram o processo de síntese de RNA pela célula de modo a refletir-se no padrão de associação de satélites.

VI. SUMMARY

The effects of chemical fractions of *Euphorbia tirucalli* L. (aveloz) on chromosomes of cultured human lymphocytes were investigated with the objectives of detecting changes of cell cycle length, induction of chromosomal anomalies and influence on the frequencies of sister chromatid exchanges (SCE) and satellite associations of acrocentric chromosomes.

Five fractions were obtained by the multiplicative distribution method: total hidroacetonic extract (ETH), aqueous sugar-rich fraction (FAA), aqueous organic acids-rich fraction (FAO), acetonic lipids-rich fraction (FAL) and acetonic phorbol-rich fraction (FAF).

Four experiments were performed I, II, III.A and III.B, each of which utilized lymphocytes of a specific donor.

Of the five fractions tested at 5 µl/ml dosages, three (ETH-5, FAL-5 and FAF-5) demonstrated cycloactive effects, with reduced mitotic indices. However these results were not confirmed with treatments using 2 µl/ml dosages.

The highest frequencies of chromosome aberrations were observed in metaphases treated with ETH-5, FAL-5 and FAF-5 fractions, which demonstrates the clastogenic activity of components of these fractions. Unstable chromosome aberrations, such as breaks or gaps, of both chromatid and chromosome types, and quadriradial figures were observed. The breaks occurred in a higher frequency and revealed an apparently randon distribution for the different chromosomes or chromosome groups. With the exception of FAL-5, which showed a higher frequency of hypodiploid cells, the numerical anomalies were registered at similar proportions in all treated groups.

The fractions with cycloactive and clastogenic effects were studied as to the frequency of sister chromatid exchange

(SCE) using two dosage levels, 2 and 5 µl/ml. The controls presented about 14 SCE/cell. SCE frequency of ETH treated groups were significantly higher than the control, with the highest value being related with the higher dosage level. On the other hand, lipid - and phorbol - rich acetonic fractions were ineffetive as SCE inductors at 5 µl/ml concentrations, but showed higher SCE frequencies at 2 µl/ml. The decreased SCE frequency observed in FAF-5 treated cells and the failure of increase with FAL-5 could be due to the toxicity of compounds included in these fractions which, would have induced a pronounced chromosome contraction. Consequently, the possibility of an under estimation of SCE frequency can not be discounted, especially as regards SCE occurring distally on the chromosome arms.

The observed frequency of TCI per chromosome differed from the expected in the cells treated with ETH-5, ETH-2, FAL-2 and FAF-2 fractions on the basis of chromosome length. The B group chromosomes presented SCE frequencies higher than expected and the F and G groups smaller than expected.

The frequency of satellite associations of acrocentric chromosomes does not differ among the controls and the different experimental groups, with the exceptions of FAF-5 of Experiment III.A, which showed a difference in the distribution of associations per cell and FAL-5 of Experiment III.A, which showed a difference in the mean frequency of associations per cell. In general, there was no difference as to the types of associations, with the exceptions of ETH-5 of Experiment III.B, with a smaller number of chromosomes per association, and FAL-5 of Experiment II, with a smaller number of chromosomes associated per cell, as a consequence of the reduction of associations per cell.

However, significant differences were observed between the control of Experiment II and those of Experiments I and III.B as regards the frequency of chromosomes associated per cell. This was due to the control of Experiment II having a higher mean frequency of associations than was observed in the controls of the other experiments. These findings reinforce earlier observations of the existence of individual variation in the frequency of associations of satellites of acrocentric chromosomes, but do not provide evidence of an alteration in the synthesis of celular RNA.

In conclusion, the results suggest that the ETH, FAL and FAF fractions are cycloactive and clastogenic at 5 µl/ml concentrations and induce SCE at 2 µl/ml concentrations. However, they do not alter the process of RNA synthesis in the cell in a manner which has consequences in the satellite association pattern.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABB, J.; BAYLISS, G. & DEINHARDT, F. Lymphocyte activation by the tumor-promoting agent 12-0-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA). *The Journal of Immunology, 122*:1639-42, 1979.

AMES, B. Carcinogenicity tests. *Science, 191*:241-45, 1976.

AMES, B. Identifying environmental chemicals causing mutations and cancer. *Science, 204*:587-93, 1979.

AMES, B. Carcinogens and anti-carcinogens. In: SORSA, M. & VAINIO, H. (eds). *Mutagens in our environmental*: p. 3-19. Alan R. Liss. 1982.

AMES, B. Dietary carcinogens and anticarcinogens. *Science, 221*:1256-64, 1983.

AMES, B.; McCANN, J. & YAMASAKI, E. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella* / mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutation Res., 31*:347-364, 1975.

ASHENDEL, C. & BOUTWELL, R. Direct measurement of specific binding of highly lipophilic phorbol diester to mouse epidermal membranes using cold acetone. *Biochem Biophys. Res. Commun., 99*:543-49, 1981.

AUERBACH, C. The dilemma of testing: Is the medium of our test the message of our conclusions? N.E. *Mutagen Soc., 4*:12-20, 1971.

BAIRD, W. & BOUTWELL, R. Tumor - promoting activity of phorbol and four diesters of phorbol in mouse skin. *Cancer Research, 31*:1074-79, 1971.

BAIRD, W.; SEDGWICH, J. & BOUTWELL, R. Effects of phorbol and four diesters of phorbol on the incorporation of tritiated precursors into DNA, RNA, and protein in mouse epidermis. *Cancer Research, 31*:1434-39, 1971.

BARTSCH, H. Predictive value of mutagenicity tests in chemical carcinogenesis. *Mutation Research, 38*, 1976.

BARTSCH, H.; TOMATIS, L. & MALAVEILLE, C. Qualitative and quantitative comparisons between mutagenic and carcinogenic activities of chemicals. In: HEDDLE, J. ed. *Mutagenicity: new horizons in genetic toxicology*. New York, Academic Press, 1982. p. 35-72.

BERENBLUM, I. The cocarcinogenic action of croton resin. *Cancer Res., 1*:44-48, 1941a.

BERENBLUM, I. The mechanism of carcinogenesis. *Cancer Res., 1*: 807-14, 1941b.

BERENBLUM, I. A speculative review: the probable nature of promoting action and its significance in the understanding of the mechanism of carcinogenesis. *Cancer Res., 14*:471-77, 1954.

BERENBLUM, I. & ARMUTH, V. Two independent aspects of tumor promotion. *Biochimica et Biophysica Acta, 651*:51-63, 1981.

BIESBOER, D. & MAHLBERG, P. The effect of medium modification and selected precursors on sterol production by short-term callus cultures of *Euphorbia tirucalli*. *Journal Nat. Prod., 42*:648-57, 1979.

BIESBOER, D.; D'AMOUR, P.; WILSON, S. & MAHLBERG, P. Sterols and triterpenols in latex and cultured tissues of *Euphorbia pulcherrima*. *Phytochemistry, 21*:1115-18, 1982.

BISHUN, N.; WILLIAMS, D.; MILLS, J.; LLOYD, N.; RAVEN, R. & PARKE, V. Chromosome damage induced by chemicals. *Chem. Biol. Interactions, 6*:375-392, 1973.

BLUMBERG, P. *In vitro* studies on the mode of action of the phorbol esters, potent tumor promoters. Part I. *CRC Crit. Rev. Toxicol., 8*:153-97, 1980.

BLUMBERG, P.; DELCLOS, K.; DUNPHY, W. & JAKEN, S. Specific binding of phorbol ester tumor promoters to mouse tissues and cultured cells. In: *Cocarcinogenesis and biological effects of tumor promoters*. HECKER, E.; FUSENIG, N.; KUNZ, W.; MARKS, F. & THIELMANN, W. (eds)p.510-35, 1982.

BOUTWELL, R. Some biological aspects of skin carcinogenesis. *Prog. Exp. Tumor Res. 4*:207, 1964.

BOUTWELL, R. The function and mechanism of promoters of carcinogenesis. *CRC. Rev. Toxicol., 2*:419, 1974.

BOUTWELL, R.; VERMA, A.; ASHENDEL, C.; ASTRUP, E. Mouse skin: a useful model system for studying the mechanism of chemical carcinogenesis. In: *Cocarcinogenesis and biological effects of tumor promoters*. HECKER, E.; FUSENIG, E.; KUNZ, W.; MARKS, F. & THIELMANN, H. (eds). p. 1-12. Raven Press. 1982.

BRASSEUR, R.; DELEERS, M.; RUYSSCHAERT, J. & MALAISSE, W. Conformational analysis of phorbol esters monolayers. *Biochemistry International, 5*:659-67, 1982.

BRENTANI, R. Metabolic disorders. *Cancer Detection and*

Prevention, vol. *5*:003. Alan R. Liss Inc., New York, 1982.

CHAGANTI, R.; SCHONBERG, S. & GERMAN, J. A manyfold increase in sister chromatid exchanges in Bloom's syndrome lymphocytes. *Proc. Nat. Acad. Sci., 71*:4508-12, 1974.

CLAYSON, D. *Chemical carcinogenesis*. Churchill, London, 1962.

CLAYSON, D. Carcinogens and carcinogens enhancers. *Mutation Research, 86*:217-229, 1981.

CARRANO, A. & MOORE II, D. Quantifying sister chromatid exchange in humans. In: HEDDLE, J. ed. *Mutagenicity: new horizons in genetic toxicology*. Academic Press, 1982. p. 282-304.

CARVALHO, F.; BENINCASA, M. & LEITE, I. Estudos preliminares sobre a produtividade de hidrocarbonetos pelo avelós (*Euphorbia tirucalli*) - *34ª Reunião da SBPC*, 1981.

COLLINS, M. & ROZENGURT, E. Binding of phorbol esters to high affinity sites on murine fibroblastic cells elicits a mitogenic response. *Journal of Cellular Physiology, 112*: 42-50, 1982.

COOKE, P. Patterns os secondary association between the autosomes of man. *Chromosoma, 36*:221-40, 1972.

CORREA, M. *Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas*. Rio de Janeiro, Ministério da Agricultura. p. 408, 1931.

CROOKE, S. Biochemical effects of drugs on the cell nucleus. In: BUSCH, H.; CROOKE, S. & DASKAL, Y. eds. *Effects of drugs on the cell nucleus*. New York, Academic Press, 1979. p. 127-43.

CROSSEN, P. & MORGAN, W. Proliferation of PHA-and PWM-stimulated lymphocytes measured by sister chromatid differential staining. *Cellular Immunology, 32*:432-38, 1977.

COUNTRYMAN, P. & HEDDLE, J. The production of micronuclei from chromosome aberrations in irradiated cultures of human lymphocytes. *Mutation Research, 41*:321-332, 1976.

DASKAL, Y. Drug effects on nucleolar and extranucleolar chromatin. In: BUSCH, H.; CROOKE, S. & DASKAL, Y. eds. *Effects of drugs on the cell nucleus*. New York, Academic Press, 1979. p. 107-125.

DE SERRES, F. Mutagenicity of chemical carcinogens. *Mutation Research, 41*:43-50, 1976.

DELCLOS, B.; NAGLE, D. & BLUMBERG, P. Specific binding of phorbol ester tumor promoters to mouse skin. *Cell, 19*:1025-32, 1980.

DELEERS, M. & MALAISSE, W. Binding of tumor-promoting and biologically inactive phorbol esters to artificial membranes. *Cancer Letters, 17*:135-140, 1982.

DELEERS, M.; CASTAGNA, M. & MALAISSE, W. Phorbol esters parallel efects on tumor promotion, insulin release and calcium ionophoresis. *Cancer Letters, 14*:109-14, 1981.

DELEERS, M.; RUYSSCHAERT, J. & MALAISSE, W. Interaction between phorbol esters and phospholipid in a monolayer model membrane. *Chem. Biol. Interactions, 42*:2271-78, 1982.

DIAMOND, L.; O'BRIEN, T. & BAIRD, W. Tumor promoters and the mechanism of tumor promotion. *Adv. Cancer Res., 32*:1-74, 1980.

DIAMOND, L.; O'BRIEN, S.; DONALDSON, C. & SHIMIZU, Y. Growth stimulation of human diploid fibroblasts by the tumor promoter, 12-0-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Int. J. Cancer, 13*:721-30, 1974.

DICKER, P. & ROZENGURT, E. Stimulation of DNA synthesis by tumor promoter and pure mitogenic factors. *Nature, 276:* 723-26, 1978.

DI PAOLO, J.; EVANS, G.; DE MARINIS, A. & DONIGER, J. Phytohemagglutinin inhibits phorbol diester promotions of UV-irradiation initiated transformation in syrian hamster embryo cells. *Int. J. Cancer, 30*:781-85, 1982.

DRIEDGER, P. & BLUMBERG, P. Different biological targets for resiniferatoxin and phorbol 12-myristate-13-acetate. *Cancer Research, 40*:1400-404, 1980.

DZARLIEVA, R. & FUSENIG, N. Tumor promoter 12-0-tetradecanoyl-forbol-13-acetate enhances sister chromatid exchanges and numerical and structural chromosome aberrations in primary mouse epidermal cell cultures. *Cancer Letters, 16*:7-17, 1982.

EMERIT, I. & CERUTTI, P. Tumour-promoter phorbol-12-myristate-13-acetate induces chromosomal damage via indirect action. *Nature, 293*:144-46, 1981.

ENGEL, W.; KRONE, W. & WOLF, U. Die wrikung von thioguanin, hydroxylamin, und 5-bromodesoxyuridin auf menschliche chromosomen *in vitro*. *Mut. Res., 4*:353-68, 1967.

EPSTEIN, S. & RÜHRBORN, G. Recommended procedures for testing genetic hazards from chemicals, based on the induction of

dominant lethal mutation in mammals. *Nature, 230*:459-460, 1971.

EVANS, H.; BUCKLAND, R. & PARDUE, M. Location of genes coding for 18S and 28S ribosomal RNA in the human genome. *Chromosoma, 48*:405-26, 1974.

EVANS, F. & SCHIMIDT, R. Two new toxins from the latex of *Euphorbia poisonii*. *Phytochemistry, 15*:333-35, 1976.

FRANTZ, C.; STILES, C. & SCHER, C. The tumor promoters 12-0-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate enhances the proliferative response of Balb/c-3T3 cells to hormonal growth factors. *J. Cell Physiol., 100*:413-24, 1979.

FÜRSTENBERGER, G. & HECKER, E. Zun wirkungsmechanismus carcinogener. Pflanzenhalfstofle. *Planta Medica, 22*:241, 1972.

FÜRSTENBERGER, G. & HECKER, E. New highly irritant euphorbia factors from latex of *Euphorbia tirucalli* L. *Experientia, 33*:986-88, 1977.

FUSENIG, N. & DZARLIEVA, R. Phenotypic and chromosomal alterations in cell cultures as indicators of tumor-promoting activity., In: HECKER, E.; FUSENIG, N.; KUNZ, W. & THIELMANN, H. eds. *Cocarcinogenesis and biological effects of tumor promoters*. New York, Raven Press, 1982. p. 201-16.

FUSENIG, N. & SAMSEL, W. Growth promoting activity of phorbol ester TPA on cultured mouse skin heratinocytes, fibroblasts and carcinoma cells. In: SLAGA, T.; SIVAK, A. & BOUTWELL, R. eds. *Carcinogenesis*. New York, Raven Press, 1978. p. 203-20.

GALLOWAY, S. & EVANS, H. Sister chromatid exchange in human chromosomes from normal individuals and patients with ataxia telangiectasia. *Cytogenet. Cell Genet., 15*:17-29, 1975.

GEBHART, E. Sister chromatid exchange and structural chromosome aberration in mutagenicity testing. *Hum. Genet., 58*:235-54, 1981.

GENTIL, A.; RENAULT, G. & MARGOT, A. The effect of the tumour promoter 12-0-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate on UV-and MNNG-induced sister chromatid exchanges in mammalian cells. *Int. J. Cancer, 26*:517-21, 1980.

GRANBOULAN, N.; TOURNIER, P.; WICHER, C. & BERNHARD, W. An electron microscope study of the development of SV40 virus. *J. Cell Biol., 17*:423-26, 1963.

HANSTEEN, I.; HILLESTAD, L.; THIIS-EVENSEN HELDAAS, S. Effects of vinyl chloride man. A cytogenetic follow-up study. *Mut. Res.*, *51*:271-78, 1978.

HECKER, E. Phorbol esters from *Croton* oil. Chemic nature and Biological Activities. *Naturwissenschaften*, *54*:282-84, 1967.

HECKER, E. Cocarcinogenic principles from the seed oil of *Croton tiglium* and from other Euphorbiaceae. *Cancer Res.*, *28*:2338-48, 1968.

HECKER, E. Structure - activity relationships in diterpene esters irritant and cocarcinogenic to mouse skin. In: SLAGA, T.; SIVAK, A. & BOUTWELL. R. eds. *Carcinogenesis*, Vol. 2. New York, Raven Press, 1978. p. 11.

HECKER, E. & SCHMIDT, H. *Phorbolesters - the irritants and cocarcinogens of Croton tiglium* L.: 458-67, 1973.

HECKER, E. & SCHMIDT, R. Phorbolesters - the irritants and cocarcinogens of *Croton tiglium* L. *Fortschr them org. Nat Stoffe*, *31*:377-86,1974.

HEDDLE, J.A. A rapid *in vivo* test for chromosomal damage. *Mutation Res.*, *18*:187-190, 1973.

HEEREMA, N.; PALMER, C. & BAEHNER, R. Elevated sister chromatid exchange and cell cycle analysis in bone marrow in childhood ALL. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, *6*:323-30, 1982.

HELENE, M. & SOMERA, N. Segurança no laboratório - carcinógenos químicos. *Ciência e Cultura*, *31*:1243-1250, 1979.

HENDERSON, A.; WARBURTON, D.; ATWOOD, K. Location of ribosomal DNA in the human chromosome complement. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, *69*:3394-98, 1972.

HERGENHAHN, M.; KUSUMOTO, S. & HECKER, E. Diterpene esters from Euphorbium and their irritant and cocarcinogenic activity. *Experientia*, *30*:1438-40, 1974.

HICKEY, T.; WOROBEC, S.; WEST, D. & KINGHORN, A. Irritant contact dermatitis in humans from phorbol and related esters. *Toxicon*, *19*:841-850, 1981.

HOUGHTON, J. Relationships between satellite association and the occurrence of non-disjunction in man. *Mutation Research*, *61*:103-14, 1979.

HOUGHTON, J. & HOUGHTON, S. Satellite associations of human chromosomes. *Sci. Prog.* Oxf., *65*:331-41, 1978.

HSU, T.; COLLIE, C.; LUSBY, A. & JOHNSTON, D. Cytogenetic assays of chemical clastogens using mammalian cells in culture. *Mutation Research, 45*:233-47, 1977.

HSUEH, J.; CHEN, H. & HUANG, C. Effect of tumor promoter 12-0-tetradecanoyl - phorbol 13-acetate on induction of sister-chromatid exchanges in chinese hamster V79 cells treated with mutagens. *Mutation Research, 81*:387-94, 1981.

KINGHORN, A. Characterization of an irritant 4-desoxyphorbol diester from *Euphorbia tirucalli*. *J. Nat. Prod., 42*:112, 1979.

KINGHORN, A. & EVANS, F. A quantitative gas-liquid chromatographic method for Forbol and related Diterpenes as their acetates. *J. Pharm. Pharmac., 26*:408-412, 1974.

KINGHORN, A. & EVANS, F. Isolation of phorbol from *Euphorbia franckiana*. *Phytochemistry, 14*:585-586, 1975.

KINSELLA, A. Investigation of the effects of the phorbol ester TPA on carcinogen-induced forward mutagenesis to 6-thioguanine-resistance in V-79 Chinese hamster cells. *Carcinogenesis, 2*:43-47, 1981.

KINSELLA, A. & RADMAN, M. Tumor promoter induces sister-chomatid exchanges: Relevance to mechanisms of carcinogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci., 75*:6149-53, 1978.

KINZEL, V.; RICHARDS, J. & STÖHR, M. Effects of the tumor-promoting phorbol ester 12-0-tetradecanoylphorbol 13-acetate on the cell cycle traverse of asynchromous Hela cells. *Cancer Res., 41*:300-305, 1981.

KORENBERG, J. & FREEDLENDER, E. Giemsa technique of the detection of sister chromatid exchanges. *Chromosoma, 48*: 355-60, 1974.

KŮCEROVÁ, M. Chromosomal aberrations induced in occupationally exposed persons. In: HEDDLE, J. ed. *Mutagenicity: New horizons in genetic toxicology*. New York, Academic Press, 1982. p. 241-66.

LAKE, R.; KROPKO, M.; McLACHLAN, S.; PEZZUTTI, M.; SHOEMAKER, R. & IGEL, H. Chemical carcinogen induction of DNA - repair synthesis in human peripheral blood monocytes. *Mutation Research, 74*:357-77, 1980.

LANKAS, G.; BAXTER, S. & CHRISTIAN, R. Effect of tumor promoting agents on mutation frequencies in cultured V79 chinese hamster cells. *Mutation Research, 45*:153-56, 1977.

LATT, S. Sister chromatid exchange indices of human chromosome

damage and repair. Detection by fluorescence and induction by mitomycin C. *Proc. Natl. Acad. Sci., 71*:3162-65, 1974.

LATT, S. Localization of sister chromatid exchanges in human chromosomes. *Science, 185*:74-76, 1974a.

LEGATOR, M.S. Host Mediated Assay. In: *First Annual Course in the Principles and Practices of Genetic Toxicology*. Galveston, Texas, 1976.

LEHMANN, E. *Nonparametrics statistics methods based on ranks*. p. 408-20. McGraw-Hill. 1975.

LINDBLAD, A. & LAMBERT, B. Relation between sister chromatid exchange, cell proliferation and proportion of B and T cells in human lymphocyte cultures. *Hum. Genet., 57*:31-34, 1981.

LOEB, L.; SIROVER, M.; WEYMOUTH, L.; DUBE, D.; SEAL, G.; AGARWAL, S. & KATZ, E. Infidelyty of DNA synthesis as related to mutagenesis and carcinogenesis. *Journal of Toxicology and Environmental Health, 2*:1297-1304, 1977.

LOTEM, J. & SACHS, L. Regulation of normal differentiation in mouse and human myeloid leukemic cells by phorbol esters and mechanism of tumor promotion. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA, *76*:5158-62, 1979.

LOVE, R.; RABSON, A. & WILDY, P. Changes in the nucleolus of normal and neoplastic cells infected with riboviruses and deoxyriboviruses. *Acta Unio Intern. Contra Cancrum, 20*:1384-87, 1964.

LOVEDAY, K. & LATT, S. The effect of a tumor promoter 12-0-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate on sister-chromatid exchange formation in cultured chinese hamster cells. *Mut. Research, 67*:343-48, 1979.

MAKINO, F. & OKADA, S. Comparative studies of the effects of carcinogenic and antitumor agents on the DNA replication of cultured mammalian cells. *Mutation Research, 23*:387-94, 1974.

MARKS, F. & FÜRSTENBERGER, G. Effect of phorbol ester application and other mitogenic treatments on 3',5'-cyclic-nucleotide phosphodiesterase activity in mouse epidermis *in vivo*. *Physiol. Chem. Bd, 361*:1641-50, 1980.

MARKS, F.; BERRY, D.; BERTSCH, S.; FÜRSTENBERGER, G. & RICHTER, H. On the relationship between epidermal hyperproliferation and skin tumor promotion. In: HECKER, E.; FUSENIG, N.; KUNZ,

W.; MARKS, F.; THIELMANN, H. eds. *Cocarcinogenesis and biological effects of tumor promoters*. New York, Raven Press, 1982. p. 331-46.

MASTRO, A. Phorbol esters: tumor promotion, cell regulation, and the immune response. In: *Lymphoxines*, vol. *6*:263-313. Academic Press, 1982.

MASTRO, A. & MUELLER, G. Synergistic action of phorbol esters in mitogen-activated bovine lymphocytes. *Exp. Cell Res., 88:* 40-46, 1974.

MATTEI, M.; SOUIAN, N.; AYMÉ, S.; MATTEI, J. & GIRAUD, F. Variabilité interindividuelle des associations entre chromosomes acrocentriques. *J. Génét. Hum., 29*:181-89, 1981.

McCANN, J. & AMES, B. Detection of carcinogens in the *Salmonella*/microsome test: assay of 300 chemicals. Discussion. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA, *73*:950-954, 1976.

McCANN, J.; CHOI, E.; YAMASAKI, E. & AMES, B. Detection of carcinogens as mutagens in the *Salmonella* microsome test: Assay of 300 chemicals. *Proc. Natl. Acad. Sci., 72*:5135-39, 1975.

MERETOJA, T.; JARVENTAUS, H.; SORSA, M. & VAINIGH. Chromosome aberrations in lymphocytes of workers exposed to styrene. *Scand. J. work environ. & health, 4*: suppl. 2:259-64, 1978.

MILLER, E. & MILLER, J. Mechanisms of chemical carcinogenesis: nature of proximate carcinogens and interactions with macromulecules. *Pharmacol. Rev., 18*:805, 1966.

MILLER, E. & MILLER, J. The mutagenicity of chemical carcinogens: correlations, problems and interpretations. In: A Hollaender (Ed.). *Chemical mutagens*. Plenum. New York, p. 83-119, 1971.

MILLER, E. & MILLER, J. Searches for ultimate chemical carcinogens and their reactions with cellular macromolecules. *Cancer, 47*:2327, 1981.

MILLER, J. Carcinogenesis by chemicals: an overview - GHA clowes memorial lecture. *Cancer Res., 30*:559, 1970.

MILLER, J. & MILLER, E. The metabolic activation of carcinogenic aromatic amines and amides. *Progr. exp. Tumor Res., 11*:273-301, 1969.

MILLER, J. & MILLER, E. The initiation stage of chemical carcinogenesis: an introductory overview. In: *Prostaglandins and Cancer*: 81-96. Alan R. Liss, Inc. New York, 1982.

MIRONESCU, S. & DRAGOMIR, C. Nucleolar behavior in regenerating liver of normal and whole-body-irradiated rats. *Cancer Res.*, *27*:1819-30, 1967.

MORGAN, W. & CROSSEN, P. The frequency and distribution of sister chromatid exchanges in human chromosomes. *Hum. Genet.*, *38*:271-78, 1977.

NAGASAWA, H. & LITTLE, J. Effect of tumor promoters, protease inhibitors, and repair process on x-ray-induced sister chromatid exchanges in mouse cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, *76*:1943-47, 1979.

NAGASAWA, H. & LITTLE, J. Factors influencing the induction of sister chromatid exchange in mammalian cells by 12-0-tetradecanoyl phorbol-13-acetate. *Carcinogenesis*, *2*:601-607, 1981.

NATARAJAN, A. & OBE, G. Mutagenicity testing with cultured mammalian cells: cytogenetic assays. In: HEDDLE, J. ed. *Mutagenicity. New horizons in genetic toxicology*. New York, Academic Press, 1982. p. 171-213.

NATARAJAN, A.; MEIJERS, M. & RIJN, J. Individual variability of human cells in induction of chromosomal alterations by mutagens. In: ALAN R. LISS, Inc. *Mutagens in our environmental*. New York, 1982. p. 75-88.

NEIVA, L. *Avelós, a planta que cura o câncer*. Rio de Janeiro, Gráfica Muniz, 70 p., 1966.

NIX, T.; NORDQUIST, R.; SCOTT, J. & EVERETT, M. An ultrastructural study of nucleolar enlargement following ultraviolet irradiation of human epidermis. *J. Invest. Dermat.*, *45*:114-18, 1965.

OHNO, A.; TRUJILLO, J.; KAPLAN, D. & KINOSITA, R. Nucleolus-organizers in the causation of chromosomal anomalies in man. *Lancet*, *II*:123-26, 1961a.

OPFERKUCH, H. & HECKER, E. New diterpenoid irritants from *Euphorbia ingens*. *Tetrahedron Letters*, *3*:261-64, 1974.

PARCEVAUX, S. & ALLIRAND, J. Primeiros estudos sobre possibilidades de utilização do avelós. Apresentado no 1º Simpósio sobre produção de álcool no Nordeste, 1977.

PARIS CONFERENCE (1971): *Standardization in human genetics*. *Birth Defects:* original article Series, VIII: 7, 1972. The National Foundation, New York.

PATARROYO, M.; JONDAL, M.; GORDON, J. & KLEIN, E. Characterization of the phorbol 12,13-dibutyrate ($P(Bu)_2$)

induced binding between human lymphocytes. *Cellular Immunology, 81*:373-83, 1983.

PATARROYO, M.; YOGEESWARAN, G.; BIBERFELD, P.; KLEIN, E.; KLEIN, G. Morphological changes, cell aggregation and cell membrane alterations caused bu phorbol 12,13-dibutyrate in human blood lymphocytes. *Int. J. Cancer, 30*:707-17, 1982.

PATIL, S. & LUBS, H. Non-random association of human acrocentric chromosome. *Human Genetic, 13*:157-59, 1971.

PECAR, S.; SENTJURC, M.; SCHARA, M.; NEMEC, M.; SORG, B. & HECKER, E. Spin-labeled phorbol esters and their interaction with cellular membranes. In: HECKER, E.; FUSENIG, N. eds. *Cocarcinogenesis and biological effects of tumor promoters*. New York, Raven Press, 1982. p. 541-53.

PETERSON, A.; MONDAL, S.; BRANKOW, D.; THON, W. & HEIDELBERGER, C. Effects of promoters on DNA synthesis in C3H/10T 1/2 mouse fibroblasts. *Cancer Res., 37*:3223-27, 1977.

PETERSON, A.; PETERSON, H. & HEIDELBERGER, C. Oncogenesis, mutagenesis, DNA damage, and cytotoxicity in cultured mammalian cells treated with alkylating agents. *Cancer Research, 39*:131-38, 1979.

POPESCU, N.; AMSBAUGH, S. & DI PAOLO, J. Enhancement of N-methyl- N'-nitro-N-nitrosoguanidine transformation of Syrian hamster cells by a phorbol diester is independent of sisters chromatid exchanges and chromosome aberrations. *Proc. Natl. Acad. Sci., 77*:7282-7286, 1980.

RAY-CHAUDHURI, R.; CURRENS, M.; GIYPE, P. Enhancement of sister-chromatid exchanges by tumour promoters. *Br. J. Cancer, 45*:769-76, 1982.

REDDY, B. Nutritional influences in carcinogenesis. *Cancer Detection and Prevention*, vol. 5:003. Alan R. Liss IUc., New York, 1982.

REDDY, B.; McCOY, G.; COHEN, L.; HILL, P.; WEISBURGER, J. & WYNDER, E. Nutrition and its relationships to cancer. *Adv. Cancer Res., 32*:237-345, 1980.

ROE, F. & PEIRCE, W. Tumor promotion by *Euphorbia* latices. *Cancer Res., 21*:338-44, 1961.

ROUS, P. & KIDD, J. Conditional neoplasms and subthreshold

—— neoplastic stages: a study of the tar tumors of rabbits. *J. Exp. Med.*, *73*:365, 1941.

ROVERA, G.; OLASHAN, N. & MEO, P. Terminal differentiation in human promyelocytic leukemic cells in the absence of DNA synthesis. *Nature*, *284*:69-70, 1980.

SANDO, J.; HILFIKER, M.; SALOMON, D. & FARRAR, J. Specific receptors for phorbol esters in lymphoid cell populations: role in enhanced production of T-cell growth factor. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, *78*:1189-93, 1981.

SCHMID, W. The micronucleous test. *Mutation Res.*, *31*:9-15, 1975.

SELKURT, E. *Fisiologia*. Editora Guanabara. p. 504-409, 1979.

SHAW, M.M. Human chromosome damage by chemical agents. *Ann. Rev. Medicine*, *21*:409-32, 1970.

SHOYAB, M. & TODARO, G. Partial purification and characterization of a binding protein for biologically active phorbol and ingenol esters from murine sera. *The Journal of Biological Chemistry*, *257*:439-45, 1982.

SHOYAB, M.; DE LARCO, J. & TODARO, G. Biologically active phorbol esters specifically alter affinity of epidermal growth factor membrane receptors. *Nature*, *279*:387-91, 1979.

SINGH, I. & GHOSH. P. Effect of radiation on the nucleolar organizing ability of human acrocentric chromosomes. *Proc. 14th Int. Congr. Genet.* 342, 1978.

SIROVER, M. & LOEB, L. Erroneous base-pairing induced by a chemical carcinogen during DNA synthesis. *Nature*, *252*:414-416, 1974.

SIVAK, A.; RAY, F. & VAN DUUREN, B. Phorbol ester tumor-promoting agents and membrane stability. *Cancer Res.*, *29*: 624-30, 1969.

SLAGA, T.; BOWDEN, G.; SHAPAS, B. & BOUTWELL, R. Macromolecular synthesis following a single application of polycyclic hidrocarbons used as iniciators of mouse skin tumorigenesis. *Cancer Res.*, *34*:771-77, 1974.

SOKAL, R. & ROHLF, J. *Biometry. The principles and practice of statistics in biological research*. Freeman and Company, 776 p. 1969.

SOLANKI, I. & SLAGA, T. Specific binding of phorbol ester tumor promoters to intact primary epidermal cells from Sencar mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, *78*:2549-53, 1981.

STENBACK, F. Tumor persistence and regression in skin carcinogenesis. *Z. Krebsforsch, 91*:249-259, 1978.

SÜSS, R.; KREIBICH, G. & KINZEL, V. Phorbol esters is a tool in cell research? *Eur. J. Cancer, 8*:299-304, 1972.

SÜSS, R. & SCHUSTER, A. Tumor-promoting croton oil factor tetradecanoyl-phorbol acetate stimulates thymidine incorporation into normal and Con A stimulated lymphocytes. *Experientia, 30*:81, 1974.

SVOBODA, D. & HIGGINSON, J. Ultrastructural changes produced by protein and related deficiencies in the rat liver. *Amer. J. Pathol., 45*:353-68, 1964.

THOMPSON, L.; BACKER, R.; CARRANO, A. & BROOKMAN, K. Failure of the phorbol ester 12-0-tetradecansylphorbol-13-acetate to enhance sister chromatid exchange, mitotic segregation, or expression of mutations in chinese hamster cells. *Cancer Research, 40*:3245-51, 1980.

TOMEI, L. & WENNER, C. Comparison of TPA and PGF22 modification of the kinetics of 3H-TdR incorporation into DNA by 3T3 mouse embryonic fibroblasts. *Proc. Am. Ass. Cancer Res., 20*: 275, 1979.

TOMEI, L.; CHENEY, J. & WENNER, C. The effect of phorbol esters on the proliferation of C3H-10TV2 mouse fibroblasts: consideration of both stimulatory and inhibitory effects. *Journal of Cellular Physiol, 107*:385-89, 1981.

TRITTON, T. & YEE, G. The anticancer agent adriamycin can be actively cytotoxic without entering cells. *Science, 217*: 4556 , 1982.

TROSKO, J. & CHANG, C. An integrative hypothesis linking cancer, diabetes, and atherosclerosis: the role of mutations and epigenetic changes. *Med. Hypoth., 6*:455-68, 1980.

TROSKO, J.; CHANG, C.; YOTTI, L. & CHU, E. Effect of phorbol myristate acetate on the recovery os spontaneous and ultraviolet light-induced 6-thioguanine and ouabain-resistant chinese hamster cells. *Cancer Research, 37*:188-193, 1977.

TROSKO, J.; YOTTI, L.; WARREN, S.; TSUSHIMOTO, G. & CHANG, C. Inhibition of cell-cell communication by tumor promoters. In: HECKER, E.; FUSENIG, E.; KUNZ, W.; MARKS, F. & THIELMANN, H. eds. *Cocarcinogenesis and biological effects of tumor promoters*. New York, Raven Press, 1982. p. 565-79.

UGGLA, A.; ANDERSSON, H.; TRANBERG, A. & ZETTERBERG, L. Correlation between exposure to styrene and the frequency of chromosomal aberrations and sister-chromatid exchanges in lymphocytes of workers in a plastic boat factory. *Mut. Res.*, *74*:199, 1979.

UPADHYAY, R. & HECKER, R. Dieterpene esters of the irritant and carcinogenesis latex of *Euphorbia lactea*. *Phytochemistry*, *14*:2514-2515, 1975.

VAN DUUREN, B. Tumor promoting agents in two-stage carcinogenesis. *Progr. Exp. Tumor Res.*, *11*:31-68, 1969.

VAN DUUREN, B. & SIVAK, A. Tumor-promoting agents from *Croton tiglium* L. and their mode of action. *Cancer Res.*, *28*:2349-56, 1968.

WEISBURGER, J.; REDDY, B.; COHEN, L.; HILL, P. & WYNDER, E. Mechanisms of promotion in nutritional carcinogenesis. In: HECKER, E.; FUSENIG, N.; KINZ, W.; MARKS, F. & THIELMANN, H. eds. *Cocarcinogenesis and biological effects of tumor promotion*. New York, Raven Press, 1982. p. 175-82.

WEISSMANN, G.; TROLL, W. & VAN DUUREN, B. Studies on lysosomes X. Effects of tumor-promoting agents upon biological and artificial membrane systems. *Biochem. Pharmacol.*, *17*:2421-34, 1968.

WENNER, C.; HACKNEY, J.; KIMELBERG, H. & MAYHEW, E. Membrane effects of phorbol esters. *Cancer Research*, *34*:1731-37, 1974.

WOLFF, S. Sister chromatid exchange: the most sensitive mammalian system for determining the effects of mutagenic carcinogens. In: *Genetic damage in man caused by environmental agents*. Kare Berg (ed.):229-46. Academic Press, 1979.

WRIGHT, A. The role of metabolism in chemical mutagenesis and chemical carcinogenesis. *Mut. Res.*, *75*:215-41, 1980.

YUSPA, S.; BEN, T.; PATTERSON, E.; MICHAEL, D.; ELGJO, K. & HENNINGS, H. Stimulated DNA synthesis in mouse epidermal cell cultures treated with 12-0-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Cancer Res.*, *36*:4062-68, 1976.

ZAKHAROV, A. & EGOLINA, N. Differential spiralization along mammalian mitotic chromosomes. *Chromosoma*, *38*:341-65, 1972.

ZIMMERMANN, F.; MAYER, V. & SCHEEL, I. Induction of aneuploidy by oncodazole, an anti-tubulin agent, and acetone. *Mutation Research*, *141*:15-18, 1984.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 1 12 13 14 15 16 17 18