

Edson Guilherme Vieira

**Efeitos Citogenéticos da Tintura de Thuya
Occidentalis em Culturas de Linfócitos
Humanos**



EDSON GUILHERME VIEIRA

EFEITOS CITOGENÉTICOS DA TINTURA DE *Thuya occidentalis*
EM CULTURAS 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".

Orientador: Profa. Dra. Marilene Varella-Garcia

SÃO JOSÉ DO RIO PRETO

1986



T. 315/86

550



Este trabalho foi realizado no Departamento de Biologia do
Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José
do Rio Preto, da Universidade Estadual Paulista "Júlio de
Meneses Filho", com auxílio do Conselho Nacional de Desenvolvimento
Científico e Tecnológico (CNPq).

Orientador: Profa. Dra. Marileila Varella-Garcia



Este trabalho foi realizado no Departamento de 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).



DEDICO

Aos meus pais, POR TUDO! (descrever esse TUDO,
por mais que me lembrasse, seria pouco)

Ao Criador, POR TUDO! (esse TUDO,
quem dera eu conhecer!)

*"Na sombra da sua mão me escondeu; fez-me como uma flecha poli-
da, e me guardou na sua aljava".*

(Isaías, 49: 2)



AGRADECIMENTOS

A Prof. Dr. Marilene Varella Camargo, mestre, orientadora e amiga, pelo exemplo e pelo carinho com que sempre buscou o melhor para mim.

A Maria Raquel, que com seu amor incentivou-me a todo momento durante a realização deste trabalho.

Aos professores do curso de Pós-Graduação, que com a transmissão de seus conhecimentos e experiências forneceram a chave para a vida profissional.

Ao Prof. Dr. Paulo Alberto Otto, pelas valiosas sugestões durante a análise da proposta desta Dissertação.

Aos companheiros do curso de Pós-Graduação, pela amizade e pelo ambiente harmonioso de trabalho.

Ao Prof. Dr. José Roberto Calmon, pela colaboração durante a redação do SUMÁRIO.

Ao senhor José Roberto Calmon, pela dedicação e interesse despendidos na orientação experimental e pelo auxílio nos serviços fotográficos.

A todos os que gentilmente colaboraram no laboratório e datilográficos.

André Luiz

Aos membros do grupo, colaboradores anônimos, mas imprescindíveis.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo auxílio financeiro.

Aos colegas do Departamento de Biologia Aplicada e Agropecuária, da Faculdade de Engenharia de Ilheus, UNESP, pelo apoio e interesse demonstrados desde o início de nossas relações profissionais.

A Direção do Instituto de Física, Letras e Ciências Exatas, de São José do Rio Preto, UNESP, pela disposição das condições materiais.

AGRADECIMENTOS

À Profª Drª Marileila Varella Garcia, mestre, orientadora e amiga, pelo exemplo e pelo carinho com que sempre buscou o melhor para mim.

À Marta Raquel, que com seu amor incentivou-me a todo momento, durante a realização deste trabalho.

Aos professores do curso de Pós-Graduação, que com a transmissão de seus conhecimentos e experiências forneceram-me a chave para a vida profissional.

Ao Prof. Dr. Paulo Alberto Otto, pelas valiosas sugestões durante a análise da proforma desta Dissertação.

Aos companheiros do curso de Pós-Graduação, pela amizade e pelo ambiente harmônico do dia-a-dia.

Ao Prof. Dr. James Robert Coleman, pela colaboração durante a redação do SUMMARY.

Ao senhor Josué Rodrigues dos Santos, pela amizade, dedicação e interesse despendidos durante a realização da parte experimental e pelo auxílio nos serviços fotográficos.

A todos os que gentilmente colaboraram nos serviços laboratoriais e datilográficos.

Aos doadores de sangue, colaboradores anônimos, mas imprescindíveis.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo auxílio financeiro.

Aos colegas do Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária, da Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira, UNESP, pelo apoio e interesse demonstrados desde o início de nossas relações profissionais.

À Direção do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, de São José do Rio Preto, UNESP, pela disposição das condições materiais.



ÍNDICE

I. INTRODUÇÃO	1
I.1. <i>Metodologia para avaliação da atividade cicloativa</i>	3
I.2. <i>Metodologia para avaliação de mutações cromossômicas</i>	6
I.3. <i>Trocas entre cromátides-irmãs (TCI)</i>	9
I.4. <i>Objetivos</i>	16
II. MATERIAIS E MÉTODOS	17
II.1. <i>Doadores</i>	17
II.2. <i>Tintura utilizada</i>	17
II.3. <i>Cultura de linfócitos</i>	17
II.4. <i>Estudo citogenético</i>	19
II.4.1. <i>Proliferação celular</i>	20
II.4.2. <i>Micronúcleos e aberrações cromossômicas</i> .	22
II.4.3. <i>Trocas entre cromátides-irmãs</i>	23
II.5. <i>Análise estatística</i>	24
III. RESULTADOS	25
III.1. <i>Proliferação celular</i>	25
III.2. <i>Micronúcleos e aberrações cromossômicas</i>	34
III.3. <i>Trocas entre cromátides-irmãs</i>	45
IV. DISCUSSÃO	54
IV.1. <i>Proliferação celular</i>	54
IV.2. <i>Aberrações cromossômicas</i>	58



IV.3. Trocas entre cromátides-irmãs	64
---	----

V. RESUMO E CONCLUSÕES	69
------------------------------	----

VI. SUMMARY	71
-------------------	----

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73
---------------------------------------	----

I. INTRODUÇÃO

Os produtos naturais, que são compostos originários do metabolismo secundário dos vegetais, vêm sendo utilizados como recurso terapêutico em escala cada vez maior, tanto popularmente como em medicina homeopática ou veterinária. O seu custo é mais baixo em relação aos dos medicamentos formulados por multinacionais ou pela indústria nacional a partir de matéria prima importada, cujos preços são sobrecarregados por taxas de importação e exploração de direitos. Esse fator, aliado à precariedade da situação sócio-econômica e cultural em nosso país, propicia o seu emprego de forma indiscriminada pela população. No entanto, a ocorrência de efeitos adversos nos usuários de quase a totalidade desses produtos é imprevisível, pela falta de controle de manifestações colaterais e, especialmente, pela escassez de informações de natureza científica sobre os seus mecanismos de ação no organismo humano ou de outros mamíferos.

Esses produtos podem ser obtidos a partir de vegetais frescos, na forma de um extrato, ou de vegetais dessecados, na forma de uma tintura. Um dos produtos naturais de uso corrente é a tintura da planta *Thuja occidentalis*. A tuia é uma árvore endêmica do leste da América do Norte, frequentemente cultivada na Europa e relativamente rara no Brasil (GRIPENBERG, 1949; GENTCHUJNICOV, 1976). Os compostos químicos característicos do óleo essencial, que é produzido pelas folhas dessa planta e é encontrado na sua tintura, são a tuiona, isotuiona, sabinena, fenchona, pinapicrina, α -, β - e γ -tuiaplicinas, ocidentalol, ocidiol, γ -eudesmol, β -sitosterol, n-nonacosanol e os ácidos tujê



tico, cáprico, láurico, mirístico, esteárico, oléico e, predominantemente, o ácido palmítico (NAKATSUKA & HIROSE, 1956; STECHER, 1960; VON RUDLOFF & NAIR, 1964; LAMER-ZARAWSKA, 1972; WITTE e col., 1983). Na tintura de tuia encontra-se, ainda, tanino (STECHER, 1960).

Alguns desses compostos têm seus efeitos sobre seres vivos já estudados, como a tuiona, uma cetona monoterpênica bicíclica (STECHER, 1960; BEZANGER-BEAUQUESNE e col., 1975), reconhecida como produto estupefaciente (TÉTAU & TÉTAU, 1960, cf. PLAZY, 1969) e psicotrópico (METZLER, 1977); as α -, β - e γ -tuiaplicinas, compostos muito semelhantes aos terpenóides (ERDTMAN & GRIPENBERG, 1948), com ação fungicida (GRIPENBERG, 1949; KHANA & CHANDRA, 1976); a β -sitosterol, utilizada na terapia de hipercolesterolemia (STECHER, 1960); os ácidos esteárico e palmítico, reconhecidos como inibidores da proliferação celular (WENZEL & HALE, 1978a; BUTTKE & CUCHENS, 1984); e o tanino, usado topicamente como adstringente e internamente como antídoto para venenos, especialmente alcalóides e metais pesados (STECHER, 1960).

Vários desses compostos também foram identificados em outros organismos. As tuiaplicinas e a tuiona são encontradas em outras espécies do gênero *Thuya*. Segundo BEZANGER-BEAUQUESNE e col. (1975), esse último composto é o princípio ativo das plantas *Artemisia absinthium*, *Artemisia vulgaris*, *Salvia officinalis* e *Tanacetum vulgare*, e o tanino é o de várias espécies do gênero *Aspergillus*, utilizadas em terapia moderna.

Antigamente, em medicina alopática, a tintura de tuia era indicada para uso interno em tratamento de enurese, cistite e desordens menstruais, e para uso externo em casos de irritações, sendo conhecidas situações de envenenamento e morte de

correntes do uso de seu óleo como abortivo (STECHER, 1960). Atualmente, a tintura de tuia é largamente aplicada na medicina homeopática, por exemplo, na terapia de úlceras, fendas, fístulas, blenorragia, reumatismo blenorrágico, espermatorréia, gota militar, balanite, pielite, hipertrofia da próstata, asma infantil, efeitos colaterais de vacinas, varíola, esclerite, nevralgias faciais, piorréia alveolar, acne facial, cancrs epiteliais, papilomas da laringe, vegetações adenóides, leucemia, excrescências esponjosas, condilomas, pólipos e verrugas (CAIRO, 1968). Em medicina veterinária é empregada principalmente na terapia de epiteliomatose contagiosa das aves. Além disso, o decocto de suas folhas tem sido usado, popularmente, como expectorante, diurético, anti-helmíntico e no tratamento de reumatismos (GENTCHUJNICOV, 1976).

Várias dessas aplicações sugerem que tal planta contenha compostos depressores de alguma etapa da divisão celular, como, por exemplo, da síntese de DNA ou da síntese de proteínas. Todavia, não se encontrou informações bibliográficas sobre os efeitos, ao nível celular, da tintura de tuia.

I.1. Metodologia para avaliação da atividade cicloativa

A atuação de um agente químico no ciclo celular pode processar-se de várias maneiras. De modo geral, tais agentes, denominados cicloativos, podem interferir nas reações de síntese dos nucleotídeos e das enzimas que participam dos processos de duplicação e transcrição, na própria molécula de DNA ou na formação do fuso mitótico, que promove a migração cromos-



sômica para os polos das células-filhas. Por isso, independente do mecanismo de ação, os agentes cicloativos inibem a proliferação celular, ou seja, impedem ou retardam a divisão celular.

A taxa de proliferação celular, em células cultivadas, pode ser investigada por meio do índice mitótico e pelas frequências de metáfases de primeira, segunda e terceira divisões celulares. O índice mitótico é um parâmetro amplamente utilizado para avaliar o grau de crescimento das células em cultura; entretanto, os critérios usados para a sua estimativa têm variado em diferentes trabalhos. Os autores utilizam como referência ora a frequência de células em metáfase, ora a frequência de células que apresentam cromossomos como filamentos identificáveis, o que já ocorre na prófase mediana, ora a taxa de síntese de DNA e de proteínas. Na tabela 1 são citados alguns estudos, na área de mutagênese química, com diferentes critérios para a estimativa do índice mitótico.

As frequências de metáfases de primeira, segunda e terceira divisões celulares, nas culturas de curta duração, podem ser investigadas pela aplicação de técnicas de coloração diferencial de cromátides-irmãs (LATT, 1974b). Dessa forma, é possível detectar agentes que retardam a cinética celular pela simples verificação de um aumento na frequência de metáfases de primeira divisão e diminuição das de segunda e terceira divisões nas culturas tratadas, quando comparadas com as não tratadas pelo agente.



Tabela 1. Exemplo de estudos com diferentes critérios para a estimativa do índice mitótico.

Critérios	Composto testado	Referência
I. nº de metáfases		
X células	Ziram	PILINSKAYA (1971)
	Cafeína	WEINSTEIN e col. (1972)
	Anticoncepcionais orais	FITZGERALD e col. (1973)
	Dapsone	BEIGUELMAN e col. (1975)
	Dioldrin	MAJUMDAR e col. (1976)
	Testosterona	MOREIRA-FILHO (1977)
	Ácido mercapto oxazolil carboxílico	SMITH (1978)
	Ciclofosfamida e Mitomicina C	DEKNUDT & KAMRA (1983)
II. nº de células em divisão		
X células	Cafeína	WEINSTEIN e col. (1973)
	Dietilnitrosamina	HITACHI e col. (1974)
	Difosfato de dietilestilbestrol	CHRISMAN & LASLEY (1975)
	Acetato de chumbo	BIJLSMA & DE FRANCE (1976)
	Frusemide	JAMEELA e col. (1979)
	Anticoncepcionais orais	KABARITY & MAZROOEI (1984)
III. nº de células com incorpo ração de timidina triciada	Lítio	DE LA TORRE & KRONPOTIC (1976)
X células	Ácido esteárico	BUTTKE & CUCHENS (1984)

1.2. Metodologia para avaliação de mutações cromossômicas

A potencialidade clastogênica de um agente, isto é, à sua capacidade de induzir aberrações cromossômicas estruturais, é comumente avaliada pelo teste de micronúcleos e pela análise cromossômica.

Os micronúcleos originam-se de fragmentos acêntricos, resultantes de deficiências cromossômicas, e de cromossomos dicêntricos ou em forma de anel, que não são capazes de participar normalmente do movimento anafásico da divisão celular (HEDDLE & CARRANO, 1977; HEDDLE e col., 1978a). Como consequência, não são incorporados nos núcleos-filhos e podem ser remanejados para o citoplasma na forma de núcleos pequenos, cada um contendo um ou mais cromossomos ou fragmentos cromossômicos. Assemelham-se aos núcleos normais em todos os aspectos, exceto pelo seu tamanho, e são facilmente reconhecidos na análise das células fixadas.

O teste de micronúcleos tem sido muito empregado na avaliação de mutagenicidade e de carcinogenicidade, tanto por agentes químicos, como a mitomicina C, a ciclofosfamida, o etilmetanosulfonato e o metilmetanosulfonato (FRANK e col., 1978; HEDDLE e col., 1978b; SALAMONE e col., 1980; YAMAMOTO & KIKUCHI, 1981; DEGRASSI & RIZZONI, 1982), quanto por agentes físicos, como os raios X (HEDDLE e col., 1978b; DEGRASSI & RIZZONI, 1982). Constitui-se em uma técnica auxiliar, econômica e rápida, de avaliação das aberrações cromossômicas no homem (COUNTRYMAN & HEDDLE, 1976; JENSEN & HÜTTEL, 1976; FRANK e col., 1978; HEDDLE e col., 1978a; HEDDLE e col., 1978b; HÖGSTEDT & MITELMAN, 1981; DEGRASSI & RIZZONI, 1982; HEDDLE e col., 1983; HEDDLE e col.,



1984) e, em alguns casos, mostrou-se até mais sensível que a análise dos cromossomos (JENSEN & HÜTTEL, 1976; JENSEN & NYFORS, 1979; DEGRASSI & RIZZONI, 1982). Tais vantagens também foram referidas em estudos desenvolvidos com outros mamíferos (FRANK e col., 1978; YAMAMOTO & KIKUCHI, 1981; WATANABE e col., 1982) e com plantas (DEGRASSI & RIZZONI, 1982).

A produção de micronúcleos reflete quantitativamente a ocorrência de quebras cromossômicas em culturas de células, exceto quando a dose do agente mutagênico é muito elevada e produz a morte celular (HEDDLE e col., 1978b). Contudo, esse teste não é útil na definição da natureza das anomalias produzidas, pois não se pode distinguir micronúcleos resultantes de aberrações cromossômicas diferentes. Por isso, apesar das vantagens que oferece, o teste de micronúcleos não deve substituir a análise cromossômica em qualquer situação, porque a observação das mudanças dos tipos de aberrações sob diferentes condições pode permitir conclusões importantes (COUNTRYMAN & HEDDLE, 1976).

Um outro aspecto importante em relação a esse teste é que diferentes agentes necessitam de tempos variáveis de contato com as células em cultura para a formação de micronúcleos (HEDDLE & SALAMONE, 1981), às vezes simplesmente porque alteram a duração das fases do ciclo celular. Desse modo, em experimentos conduzidos sem a preocupação de identificar os tempos adequados para o aparecimento desses elementos, têm-se uma probabilidade elevada de obter resultados falso-negativos.

Alguns dos tipos celulares já utilizados para a pesquisa de micronúcleos foram linfócitos (COUNTRYMAN & HEDDLE, 1976; HEDDLE e col., 1978a; HEDDLE e col., 1978b; JENSEN & NYFORS, 1979), eritrócitos policromáticos (EVANS, 1976; MACKEY



& MACGREGOR, 1979; SALAMONE e col., 1980; YAMAMOTO & KIKUCHI, 1981), fibroblastos (KREPINSKY e col., 1980), eritroblastos (EVANS, 1976; JENSEN & HÜTTEL, 1976), mielócitos e mieloblastos (EVANS, 1976). De acordo com HEDDLE e col., (1984) o teste de micronúcleos pode ser aplicado a praticamente qualquer população de células que esteja constantemente em divisão; contudo, a medula óssea de mamíferos é o material mais comumente utilizado, tendo sido usado para testar mais de 150 agentes químicos (HEDDLE e col., 1983).

A análise cromossômica é realizada em metáfases ou prometáfases e pode identificar as alterações estruturais não reparadas, que se expressam como quebras, falhas, fragmentos acêntricos, cromossomos dicêntricos, figuras trirradiais e quadrirradiais e outras, observáveis ao microscópio óptico. As aberrações cromatídicas, isto é, que afetam apenas uma das cromátides-irmãs, devem se originar após o período de duplicação do DNA, quando as cromátides-irmãs já estão separadas, ou podem ser produzidas imediatamente antes que a forquilha de duplicação atinja o local afetado, de modo que o mecanismo de reparo não seja acionado a tempo. Eventualmente, uma alteração no sistema de reparo pós-duplicação também poderia servir de base para o aparecimento da quebra cromatídica. As aberrações cromossômicas, isto é, que afetam concomitantemente as duas cromátides, mais provavelmente são produzidas por alterações pré-duplicacionais não reparadas, embora não se possa excluir a possibilidade de um agente afetar locos específicos, atingindo igualmente ambas as cromátides-irmãs após a duplicação.

A análise cromossômica permite também a detecção de alterações numéricas. As células hipodiplóides podem originar-



se por perdas de cromossomos com anomalias estruturais instáveis, do tipo anéis ou dicêntricos, ocasionados por distúrbios na anáfase da divisão celular anterior. Contudo, tais anomalias podem surgir também de mudanças na permeabilidade da membrana celular ou como eventos produzidos por artefatos nas técnicas de processamento do material para análise, como, por exemplo, na hipotonização. Já as células hiperdiplóides devem, muito provavelmente, originar-se em consequência de falha na disjunção dos cromossomos-filhos na divisão anterior, que podem ser provocadas por agentes que alteram a função do fuso ou do centrômero.

I.3. *Trocas entre cromátides-irmãs (TCI)*

As trocas entre cromátides-irmãs (TCI) são fenômenos que envolvem quebras em locos idênticos nas duas cromátides de um cromossomo, acompanhadas de intercâmbio e reparo (LATT, 1974a). Essas trocas somente são observadas em cromossomos submetidos a tratamentos especiais, cujas cromátides-irmãs são distinguidas uma da outra, e já foram detectadas em vegetais (SCHVARTZMAN & CORTÉS, 1977) e em vários grupos animais, tais como mamíferos, aves, peixes e insetos (referências em LATT e col., 1981), o que faz supor que tenham ocorrência universal em células eucarióticas.

TAYLOR e col. (1957) foram os primeiros a observar o fenômeno de TCI por meio de auto-radiografia, em células de *Vicia faba* marcadas com timidina triciada. Esses pesquisadores observaram que, em células que haviam passado por um ciclo de duplicação do DNA na presença de trício, seguido de um novo ci

clo na ausência desse radioisótopo, apenas uma das cromátides de cada cromossomo metafásico mostrava-se radioativa. Ocasionalmente, entretanto, apareciam cromátides que estavam marcadas ao longo de apenas uma parte de sua extensão, sendo que suas irmãs estavam marcadas em porções complementares. No entanto, as primeiras evidências da ocorrência de tais eventos surgiram em estudos realizados por MCCLINTOCK, em 1938, sobre a instabilidade de cromossomos em anel na mitose, e por SCHWARTZ, em 1953, sobre o comportamento de cromossomos em anel na meiose (referências em EVANS, 1977).

Pelo fato da técnica de auto-radiografia ser cara, despendendo muito tempo e apresentar uma precária resolução, a análise das TCI foi relegada ao esquecimento durante muitos anos. Somente em 1973, quando LATT descreveu uma nova técnica básica de diferenciação das cromátides-irmãs por coloração, é que o estudo das trocas cromatídicas chamou a atenção dos pesquisadores e passou a ser intensificado de maneira surpreendente.

As variantes das técnicas de coloração diferencial de cromátides-irmãs atualmente disponíveis implicam em crescimento celular, por um ou dois ciclos de duplicação do DNA, na presença de análogo halogenado da timidina, em geral a 5-bromodesoxiuridina (5-BrdU). A diferenciação das cromátides pode ser feita em função do número de cadeias do DNA que incorporaram 5-BrdU. Em células que passam um ciclo de duplicação em meio contendo esse composto, seguido por outro sem contato com ele, cada cromossomo apresenta incorporação desse análogo apenas em uma das cadeias polinucleotídicas de uma das cromátides. A incorporação de 5-BrdU altera o empacotamento da molécula, tornando-a menos condensada e reduzindo sua afinidade pelo corante, após



tratamentos especiais (KIHLMAN & KRONBORG, 1975). Em células que cresceram na presença desse composto por dois ciclos consecutivos, uma das cromátides incorpora-o nas duas cadeias, enquanto a sua irmã o faz em apenas uma das cadeias. Nesse caso, a cromátide duplamente afetada pode também manifestar uma redução na afinidade pelo corante, após tratamentos especiais (KORENBERG & FREEDLENDER, 1974).

As técnicas de coloração assimétrica de cromátides-irmãs podem ser reunidas, basicamente, em dois tipos: as que utilizam corantes fluorescentes (em geral, o Hoescht 33258), sua análise dependendo de microscópio de fluorescência (LATT, 1973; KATO, 1974; LIN & ALFI, 1976), e as que empregam seqüencialmente corantes fluorescentes e não fluorescentes (geralmente Giemsa), ou que empregam corantes não fluorescentes diretamente, com subsequente análise ao microscópio óptico (KORENBERG & FREEDLENDER, 1974; PERRY & WOLFF, 1974; GOTO e col., 1978). Esse último tipo proporciona preparações cromossômicas permanentes e com uma resolução muito boa, justificando seu uso predominante pelos pesquisadores.

Existem, ainda, algumas técnicas que proporcionam a coloração diferencial de cromátides-irmãs concomitantemente com outros padrões de bandamento cromossômico (referências em BLOCK, 1982), e outras que fornecem um padrão de coloração diferencial das cromátides-irmãs inverso ao mostrado pelas técnicas pioneiras (SCHERES e col., 1977; TAKAYAMA & SAKANISHI, 1978).

Os mecanismos moleculares envolvidos na formação de TCI ainda necessitam de uma melhor definição (PERRY & THOMSON, 1984), embora esteja bem estabelecido que as lesões causadas no DNA somente se expressam na forma de TCI após a du



plicação subsequente. Contudo, existem algumas hipóteses que tentam explicar como ocorre a formação de TCI. Destacam-se as que supõem a existência de mecanismos comuns para a TCI e a recombinação meiótica, a participação de certos mecanismos de reparo do DNA, a ocorrência de mecanismos especiais de duplicação induzidos por lesões do DNA ou problemas de atraso no deslocamento da forquilha de duplicação do DNA. Essa última hipótese, proposta por PAINTER (1982), tem sido a mais aceita, por ser consistente com as observações experimentais disponíveis sobre TCI (STETKA, 1982). A dificuldade em aceitar a hipótese de um mecanismo comum para TCI e recombinação meiótica deve-se à necessidade da formação do complexo sinaptonêmico para essa última, mas não para TCI. As indicações de que a ausência de reparo do DNA resultaria em um aumento nas frequências de TCI, dão pouca credibilidade às hipóteses de que mecanismos específicos de reparo do DNA sejam responsáveis pela formação das TCI. Do mesmo modo, os modelos de mecanismos induzidos por lesões do DNA são rejeitados, entre outras razões, porque poderiam explicar a origem das TCI induzidas por alguns agentes, mas não por muitos outros.

Uma questão ainda controversa é se as TCI são eventos espontâneos, de ocorrência normal nas células, principalmente porque o próprio análogo halogenado da timidina utilizado, a 5-BrdU, é conhecido como indutor de TCI. A correlação entre frequência de TCI e concentração de 5-BrdU foi demonstrada por LATT (1974b) em concentrações variando de $6 \cdot 10^{-6}$ a $9,4 \cdot 10^{-5} M$, e por LAMBERT e col. (1976), em concentrações de $2 \cdot 10^{-5}$ a $5 \cdot 10^{-4} M$. Por outro lado, MAZRIMAS & STETKA (1978) observaram que a frequência de TCI não estabelecia uma correlação precisa



com a concentração de 5-BrdU, mas era diretamente proporcional à porcentagem de substituição de timidina pela 5-BrdU e, extrapolando seus resultados para um nível zero de substituição, puderam concluir que o nível "espontâneo" de TCI é muito baixo, cerca de 0,045 por cromossomo.

Um outro aspecto interessante é a associação entre TCI, idade e sexo. GALLOWAY & EVANS (1975), MORGAN & CROSSEN (1977b) e CROSSEN (1982a) não encontraram influência da idade e do sexo na determinação da frequência de TCI, porém DE ARCE (1981) observou que pessoas de ambos os sexos, na faixa de 30 a 40 anos, apresentavam um número mais elevado de TCI por célula e HEDNER e col. (1982) referiram uma frequência maior de TCI no sexo feminino em relação ao masculino, independente da idade. A diferença entre os sexos foi confirmada por ROSA (1984) que, no entanto, também encontrou diferenças significativas entre homens normais de faixas etárias diversas e um discreto aumento de TCI com o aumento da idade nas mulheres. MORGOLIN & SHELBY (1985), revendo um grande número de publicações com dados de TCI em homens e mulheres de diferentes idades, concluíram que a média feminina é 0,5 TCI por célula maior que a média masculina, nos adultos normais. Portanto, deve-se levar em consideração essas informações no momento da escolha do universo amostral a ser utilizado nas pesquisas, procurando uniformizar as amostras em relação à faixa etária e sexo.

Uma das principais aplicações da análise de TCI tem sido na avaliação da atividade mutagênica, o primeiro trabalho no qual os efeitos de um agente mutagênico foram relacionados com a frequência de TCI foi realizado por LATT (1974b), que detectou a capacidade de mitomicina C para aumentar a frequência



de TCI em linfócitos humanos, em concentrações menores do que as necessárias para induzir quebras cromossômicas.

Logo após, PERRY & EVANS (1975) analisaram a frequência de TCI em células de hamster chinês submetidas *in vitro* à ação de várias doses de raios X e de quatorze agentes considerados mutagênicos e carcinogênicos. Com relação aos raios X, os autores concluíram que a contagem de trocas não constituía um sistema sensível para detectar o grau de exposição, porque a dose de aproximadamente 400 rad, que dobrava a incidência de TCI, induzia um aumento maior do que 20 vezes na frequência de aberrações cromossômicas. Entretanto, dos quatorze agentes químicos testados, somente dois não foram eficientes na produção de TCI e um deles, a ciclofosfamida, analisado posteriormente em condições que possibilitavam a sua ativação metabólica, demonstrouse um indutor de TCI muito potente (HUANG & FURAKAWA, 1978).

Assim como LATT (1974b), PERRY & EVANS (1975) identificaram agentes que produziam um aumento significativo de TCI, em condições nas quais exerciam apenas um pequeno efeito na incidência de aberrações cromossômicas. Tais observações levaram os autores a concluir que para se detectar, em células tratadas por esses compostos, o dobro de incidência de TCI das células não tratadas, não eram necessárias mais do que 10 a 20 células, o que tornava a análise de TCI um teste mais rápido do que a análise de aberrações cromossômicas.

Posteriormente, muitas substâncias químicas foram testadas com o intuito de avaliar a possibilidade da análise de TCI firmar-se como um teste para detecção de agentes mutagênicos. Revendo os resultados de 216 trabalhos envolvendo 162 agentes químicos, LATT e col. (1981) enquadraram-nos em três clas



ses, com relação à eficiência em induzir TCI: os verdadeiramente negativos ou inadequadamente testados, os capazes de elevar o número de TCI a um limite inferior a duas vezes o dos controles e os capazes de aumentar duas ou mais vezes a frequência de TCI em relação aos controles. Dos agentes estudados, 51 (25%) incluíam-se na primeira classe, 53 (26%) incluíam-se na segunda e 97 (49%) na última. Alguns compostos foram incluídos em mais de uma classe, devido a resultados conflitantes e não esclarecidos entre diferentes experimentos ou à utilização de diferentes sistemas de teste, como, por exemplo, com e sem ativação metabólica. Esses dados demonstram o efeito dos agentes químicos sobre a frequência de TCI e confirmam a utilidade da análise de TCI para testar mutagenicidade.

Reforços para tal proposta foram fornecidos por GEBHART (1981) e ABE & SASAKI (1982), analisando a concordância entre os efeitos de agentes químicos na indução *in vitro* de TCI e de aberrações cromossômicas. Das 215 substâncias consideradas por GEBHART (1981), 145 (68%) apresentavam uma correspondência qualitativa entre essas duas variáveis, 65 (30%) não manifestavam concordância entre os resultados dos dois parâmetros e 5 (2%) tinham resultados contraditórios. ABE & SASAKI (1982), considerando 219 agentes químicos, encontraram uma concordância entre os resultados de TCI e de aberrações cromossômicas em 77% dos casos. Além disso, com base no estudo de 69 desses agentes, os autores referem uma correlação positiva entre TCI e carcinogenicidade, em 80% dos casos.

O grau elevado de concordância entre as informações obtidas pela análise de TCI e de outros parâmetros utilizados na detecção de agentes mutagênicos, associado à verificação de que



a combinação desse sistema com outros praticamente elimina os resultados falso-negativos e a inexistência de exemplos convincentes de agentes indutores de TCI que não sejam mutagênicos ou carcinogênicos em pelo menos algum outro sistema de teste, assegura a utilidade da análise de TCI na avaliação da atividade mutagênica de compostos químicos. No entanto, as dúvidas em relação aos mecanismos de formação das TCI e às causas da não concordância entre seus resultados e os de outros sistemas, recomendam sua utilização em conjunto com outros testes.

1.4. Objetivos

Neste trabalho pretendeu-se investigar um possível efeito da tintura de tuia (*Thuya occidentalis*) sobre o ciclo celular e sobre os cromossomos, avaliados no processo de divisão de linfócitos humanos cultivados *in vitro*. Os parâmetros considerados para essa avaliação foram a intensidade da resposta ao estímulo mitogênico da fito-hemaglutinina, a indução de anormalias cromossômicas estruturais ou numéricas e a frequência de trocas entre cromátides-irmãs.



II. MATERIAIS E MÉTODOS

II.1. *Doadores*

Os linfócitos humanos cultivados foram obtidos do sangue de cinco indivíduos caucasóides do sexo masculino, adultos aparentando bom estado de saúde. Nenhum deles referiu ter sido exposto a agentes químicos, físicos ou biológicos que impedissem sua inclusão na amostra, ou ter tido contato com a tuia, nos seis meses que antecederam a coleta do sangue.

II.2. *Tintura utilizada*

A tintura utilizada neste projeto foi preparada pelo laboratório do Dr. J. Boiron (Paris, França), a partir de ramos dessecados da planta *Thuja occidentalis*, pertencente à família Cupressaceae, ordem Coniferae e subdivisão Gymnospermae.

II.3. *Cultura de linfócitos*

De cada doador colheu-se 10 ml de sangue periférico com seringa descartável heparinizada. Os linfócitos foram cultivados segundo a técnica de MOORHEAD e col. (1960), com modificações. Utilizou-se meio de cultura RPMI 1640 (Difco), enriquecido com 20% de soro AB filtrado. Cada frasco de cultura continha 5 ml do meio completo, 0,2 ml de solução de fito-hemaglutinina



(fornecida pela Prof^a Dr^a Iris Ferrari, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP) e cerca de 6 gotas de plasma sanguíneo rico em linfócitos. Após serem arrolhados, os frascos de cultura foram mantidos em estufa a 37°C, por cerca de 72 horas. Em algumas situações, a duração da cultura foi prolongada para 80, 88 ou 96 horas. Aproximadamente 80 minutos antes da colheita, adicionou-se, em cada frasco, 0,1 ml de solução de colquicina Hou-dé a 4.10^{-5} M, para a interrupção da divisão celular. Na sequência, processou-se a hipotonização com KCl a 0,075 M, a fixação do material com metanol-acético 3:1 e a montagem das lâminas. O material foi hidrolizado em HCl 1 N por 7 minutos a 60°C, corado com solução tamponada de Giemsa (Merck), pH 6,8, por 5 minutos e as lâminas foram codificadas para análise em teste cego.

Nos experimentos em que se pretendia a marcação diferencial de cromátides-irmãs introduziu-se 5-bromodesoxiuridina (5-BrdU, Sigma) no início da cultura, em uma concentração final de $3,25.10^{-5}$ M, e cobriu-se totalmente os frascos com papel alumínio, para impedir a fotólise. A obtenção das cromátides diferencialmente coradas seguiu a técnica proposta por KORENBERG & FREEDLENDER (1974), também com modificações. Após o preparo dos estendidos, as lâminas foram cobertas com um filme de bisbenzimide (Hoechst 33258, Sigma) em solução fisiológica de Hanks a $0,94.10^{-7}$ M e submetidas à luz UV (Philips UV-15W), a uma distância de 12 cm, por 12 minutos. Em seguida, foram lavadas rapidamente em água destilada e secas ao ar. Após um período de 3 a 8 dias, o material foi aquecido a temperaturas variáveis de 87°C a 89°C, em solução de NaH_2PO_4 1 M (pH 8,1 a 8,3), por cerca de 30 segundos, lavado rapidamente em água destilada e corado em solução de Giemsa (Merck) a 2%, por 5 minutos.



II.4. *Estudo citogenético*

As diversas culturas celulares de cada experimento foram realizadas concomitantemente e em condições laboratoriais idênticas. A fito-hemaglutinina e o plasma rico em linfócitos foram adicionados ao meio de cultura completo antes dos grupos experimentais serem separados. Após o tratamento com o composto, na concentração desejada, foram separadas as réplicas de cada grupo. Cada experimento foi codificado por um algarismo romano, que correspondia ao doador dos linfócitos utilizados para a sua execução.

As análises foram feitas em microscópio Carl Zeiss, modelo WL ou modelo Laboval 3, utilizando-se óleo de imersão Zeiss ou Nujol (Schering).

Para documentação de eventos anômalos encontrados, e para esclarecimento de dúvidas, as células foram fotografadas em microscópio Carl Zeiss, modelo WL, com equipamento fotográfico MC 36, usando-se filtro de interferência verde (Carl Zeiss, ref. 467806). Utilizaram-se filmes Panatomic X (Kodak), revelados em solução Kodak D-72 por 2 minutos e meio, e tratados com solução fixadora ácida (Kodak), por 10 minutos. Os negativos foram copiados em papel fotográfico Kodabromide F3 ou F4 (Kodak).

Desenvolveram-se seis experimentos, nos quais a tintura de tuia, introduzida no início da cultura celular, foi testada em cinco concentrações finais: 20 (TM-20), 10 (TM-10), 5 (TM-5), 1 (TM-1) e 0,5 μ l/ml (TM-0,5). Culturas celulares não tratadas com a tintura foram utilizadas como controle (Co).

Os parâmetros analisados foram: taxa de proliferação celular, frequência de micronúcleos, frequência de células



com aberrações cromossômicas estruturais e numéricas, e frequência de trocas entre cromátides-irmãs. Na tabela 2 são apresentados os grupos experimentais de cada experimento e os parâmetros analisados.

II.4.1. Proliferação celular

A taxa de proliferação celular foi investigada por meio de índice mitótico (IM) e da proporção, nas culturas, de células em primeira, segunda e terceira divisões celulares. Essas análises foram feitas com aumento de 400 vezes.

O índice mitótico foi considerado como a frequência relativa de núcleos em divisão, ou seja, aqueles em prófase ou metáfase, nos quais os cromossomos aparecem como filamentos identificáveis, sobre o total de linfócitos ou linfoblastos, nos Experimentos IA, IB, II e III, ou sobre o total de linfoblastos, nos Experimentos IV e V. O índice mitótico relativo (IMR) foi tomado como a relação entre o IM do grupo experimental tratado e o IM de seu controle. Para a investigação do IM foram analisados pelo menos 400 núcleos por grupo experimental, no Experimento III, e pelo menos 2.000 núcleos por grupo experimental, nos demais experimentos.

A incidência de células em primeira, segunda e terceira divisões celulares foi investigada analisando-se pelo menos 400 metáfases de cada grupo experimental, em culturas desenvolvidas na presença de 5-BrdU. As metáfases de primeira divisão não demonstram qualquer diferenciação entre as cromátides-irmãs; as de segunda divisão possuem cromossomos com cromátides diferencialmente coradas, isto é, 50% fortemente e 50% fracamente coradas, e as metáfases de terceira divisão têm segmentos cro



Tabela 2. Parâmetros analisados e grupos experimentais (G.E.) de cada experimento.

Experimento	Parâmetros analisados	G.E.
IA	- Índice mitótico	Co
	- Micronúcleos	TM-20
	- Aberrações cromossômicas	
IB	- Índice mitótico	Co
	- Micronúcleos	TM-10
	- Aberrações cromossômicas	
II	- Índice mitótico	Co
	- Micronúcleos	TM-5
	- Aberrações cromossômicas	
III	- Índice mitótico	Co
	- Proporção de células em 1ª, 2ª e 3ª divisão	TM-5
IV	- Índice mitótico	Co
	- Proporção de células em 1ª, 2ª e 3ª divisão	TM-5
V	- Índice mitótico	Co
	- Proporção de células em 1ª, 2ª e 3ª divisão	TM-1
	- Trocas entre cromátides-irmãs	TM-0,5



moossômicos com ambas as cromátides coradas palidamente.

II.4.2. Micronúcleos e aberrações cromossômicas

A avaliação de clastogenicidade foi feita investi gando-se a incidência de micronúcleos e a frequência de aberra ções cromossômicas estruturais.

O teste de micronúcleos foi desenvolvido segundo descrição de COUNTRYMAN & HEDDLE (1976) e HEDDLE e col.(1978a). Foram considerados apenas os micronúcleos: (a) com diâmetro in ferior a um terço do núcleo principal, ou seja, do linfoblasto; (b) não refráteis, para excluir pequenas partículas coradas; (c) com coloração igual ou mais clara que a do linfoblasto, para excluir grandes partículas coradas; e (d) não ligados ao núcleo principal, porém estando a uma distância máxima equivalente a 4 vezes o diâmetro desse. Na hipótese de ocorrência de dois ou mais micronúcleos, esses somente foram considerados quando ha via um núcleo principal distinto, mais ou menos arredondado e não lobulado. Para a pesquisa de micronúcleos foram analisados, com 400 aumentos, cerca de 2.000 núcleos por grupo experimental.

A ocorrência de aberrações cromossômicas foi pesqui sada com aumento de 1.000 vezes, em 50 metáfases de cada grupo experimental. Foram escolhidas metáfases consideradas tecnicamen te boas, ou seja, sem grau acentuado de contração cromossômica e sem superposições que prejudicassem a classificação dos cromosomos.

As aberrações cromossômicas estruturais foram consi deradas, de acordo com o recomendado pelo ISCN (1978), como que bras, quando um segmento cromossômico estava separado do restan te por uma distância superior à largura da cromátide e desloca



do em relação ao cromossomo, e como falhas, quando a separação não ultrapassava a distância equivalente à largura da cromátide e o segmento apresentava-se em continuidade ao material cromossômico.

As quebras e falhas foram consideradas cromatídicas, quando afetavam apenas uma das cromátides, ou cromossômicas, quando ambas as cromátides eram afetadas. Além disso, a localização da descontinuidade no terço proximal (próximo ao centrômero), mediano ou distal e o braço cromossômico portador foram identificados sempre que possível.

Foi pesquisada também a ocorrência de anomalias numéricas e, nas células aneuplóides, foram identificados os grupos cromossômicos com elementos ausentes ou em excesso.

II.4.3. Trocas entre cromátides-irmãs

A frequência de trocas entre cromátides-irmãs foi investigada, com aumentos de 1.000 vezes, em células de segunda geração cultivadas na presença de 5-BrdU. Para cada grupo experimental analisaram-se 20 metáfases com 46 cromossomos, sem superposições ou grau acentuado de contração cromossômica. A descontinuidade terminal na coloração das cromátides-irmãs foi computada como uma TCI e a intersticial como duas TCI. Identificou-se, sempre que possível, a localização da troca no terço proximal, mediano ou distal e o braço cromossômico portador.



II.5. *Análise estatística*

O teste *t* de Student e a análise de variância com um critério de classificação foram utilizados para se verificar a significância da diferença entre grupos tratados e o controle, com relação às frequências médias de núcleos em divisão, metáfases de primeira divisão celular, núcleos com micronúcleos, metáfases com anomalias estruturais e células aneuplóides. Nas situações em que se detectou diferença significativa pela análise de variância, empregou-se o teste de Newman-Keuls, para localizar os grupos experimentais cujas médias diferiam. Todas as frequências foram submetidas à transformação arco-seno (SOKAL & ROHLF, 1969) para a realização desses testes estatísticos; esse procedimento garante que os dados transformados aderem melhor à uma distribuição normal que os dados originais, que seguem uma distribuição binomial.

O teste de qui-quadrado foi utilizado para testar a homogeneidade de distribuições de frequências observadas e esperadas de TCI por cromossomo ou grupo cromossômico, e de distribuições de frequências observadas e esperadas de TCI por região de braço cromossômico.

Aplicou-se o teste de Wilcoxon para comparação das frequências de TCI por célula (dados combinados) e das frequências médias de TCI por cromossomo ou grupo cromossômico (dados pareados) entre cada grupo experimental tratado e o controle.

Todos os testes estatísticos foram aplicados seguindo-se as recomendações de ZAR (1974) e LEHMANN (1975). Em todos os testes fixou-se em 5% o nível crítico de rejeição da hipótese de nulidade.



III. RESULTADOS

III.1. *Proliferação celular*

Na Tabela 3 encontram-se as frequências de células em divisão, o índice mitótico (IM) e o índice mitótico relativo (IMR) de cada grupo experimental dos Experimentos IA, IB, II e III. As frequências médias transformadas de células em divisão foram comparadas pelo teste t. Verifica-se que todos os grupos tratados pela tintura de tuia (TM-20, TM-10 e TM-5) diferiram significativamente dos controles, que apresentaram um índice mitótico sempre maior.

Face ao baixo índice mitótico dos grupos tratados, foram programados os Experimentos IV e V, nos quais foram desenvolvidas culturas com durações de 71, 72 e 73 horas, nos grupos Co e TM-5 do Experimento IV, e de 72, 80, 88 e 96 horas no grupo TM-1 do Experimento V. O objetivo desses ensaios era verificar a ocorrência de um possível atraso no ciclo celular, que estivesse se evidenciando como um índice mitótico mais baixo nas culturas incubadas por menos tempo.

As frequências de células em divisão nas culturas de diferentes durações dos Experimentos IV e V são apresentadas na Tabela 4 e os resultados dos testes estatísticos para comparação entre os diferentes tempos do mesmo tratamento são apresentados nas Tabelas 5 e 6. A comparação do IM pela análise de variância (Tabela 5) detectou uma diferença significativa entre as culturas de diferentes durações do grupo TM-1, o que não aconteceu com as culturas dos grupos Co e TM-5 do Experimento IV. As



comparações entre as frequências médias transformadas de núcleos em divisão das culturas do grupo TM-1, pelo teste de Newman-Keuls (Tabela 6), mostraram que TM-1/88 não difere de TM-1 /80, porém ambas diferem de TM-1/72 e TM-1/96, sendo que essas últimas também diferem entre si. A incidência de células em divisão foi sempre maior na cultura TM-1/72, havendo uma redução drástica em TM-1/80 e TM-1/88 e um aumento na TM-1/96 em relação às duas anteriores.

As frequências de células em primeiro, segundo e terceiro ciclos, nas culturas de 72 horas dos Experimentos III, IV e V, assim como nas culturas de 80, 88 e 96 horas do grupo TM-1 do Experimento V, são apresentadas na Tabela 7.

As tentativas de se obter a marcação diferencial de cromátides-irmãs, em células de segunda geração cultivadas na presença de 5-BrdU, foram infrutíferas nos grupos tratados dos Experimentos IA e IB e no grupo TM-5 dos Experimentos III e IV, nas mesmas condições em que se obteve êxito nos controles desses experimentos. Isso evidenciou a ausência de células em segunda e terceira divisões nesses grupos.

Na Tabela 8 encontram-se os resultados das análises de variância para comparação das frequências médias transformadas de células em primeira divisão entre as culturas de mesma duração dos diferentes grupos experimentais e entre culturas de diferentes durações do grupo TM-1, do Experimento V. Foram detectadas diferenças significativas tanto entre os grupos Co, TM-1/72 e TM-0,5, como entre as culturas de diferentes durações do grupo TM-1 (TM-1/72, TM-1/80, TM-1/88 e TM-1/96). As comparações dessas frequências, pelo teste de Newman-Keuls (Tabela 9), mostraram que todos os grupos experimentais (Co, TM-1/72 e TM-0,5)



Tabela 3. Índice mitótico (IM) e índice mitótico relativo (IMR) dos grupos experimentais (G.E.) dos Experimentos IA, IB, II e III e valores do teste t para comparação das frequências médias transformadas entre cada grupo tratado e seu controle. *: $P < 0,05$; GL: graus de liberdade.

Experi- mento	G.E.	Nº de células		IM (%)	IMR	GL	t	Signifi- cância
		Anali- sadas	Em di- visão					
IA	Co	2.004	91	45	100,0			
	TM-20	2.011	51	25	55,6	18	3,73	*
IB	Co	2.014	142	70	100,0			
	TM-10	2.002	21	10	14,3	18	6,86	*
II	Co	2.000	42	21	100,0			
	TM-5	2.002	28	14	66,7	18	3,07	*
III	Co	411	9	22	100,0			
	TM-5	810	6	7	31,8	4	3,14	*

Tabela 4. Índice mitótico (IM) e índice mitótico relativo (IMR) em culturas de diferentes durações dos Experimentos IV e V.

Experi- mento	G.E.	Duração da cultura (horas)	Nº de células		IM (‰)	IMR
			Anali- sadas	Em di- visão		
IV	Co	71	3.002	124	41	100,0
		72	3.001	72	24	58,5
		73	3.000	115	38	92,7
	TM-5	71	2.000	200	100	100,0
		72	2.500	239	96	96,0
		73	3.000	274	91	91,0
V	TM-1	72	2.002	348	174	100,0
		80	2.017	105	52	29,9
		88	2.004	97	48	27,6
		96	2.003	160	80	46,0

Tabela 5. Análises de variância das frequências médias transformadas de núcleos em divisão em culturas de diferentes durações dos Experimentos IV e V. GL: graus de liberdade; ns: $P > 0,05$; *: $P < 0,05$.

Experimento/G.E.	Fonte de variação	GL	SQ	QM	F	Significância
IV/Co	Total	8	27,88			
	grupos	2	16,63	8,32	4,43	ns
	erro	6	11,25	1,88		
IV/TM-5	Total	8	43,78			
	grupos	2	2,29	1,14	0,17	ns
	erro	6	41,49	6,92		
V/TM-1	Total	15	415,07			
	grupos	3	364,97	121,66	29,14	*
	erro	12	50,10	4,18		

Tabela 6. Valores do teste de Newman-Keuls para comparação das frequências médias transformadas de núcleos em divisão entre culturas de diferentes durações, do grupo TM-1 do Experimento V. $\mu_{\text{TM-1/72}} = \mu_4$; $\mu_{\text{TM-1/80}} = \mu_2$; $\mu_{\text{TM-1/88}} = \mu_1$; $\mu_{\text{TM-1/96}} = \mu_3$.

Médias comparadas	q	p	$q_{(0,05),12,p}$	Conclusão
4 X 1	20,179	4	4,199	$\mu_4 \neq \mu_1$
4 X 2	19,430	3	3,773	$\mu_4 \neq \mu_2$
4 X 3	14,042	2	3,082	$\mu_4 \neq \mu_3$
3 X 1	6,137	3	3,773	$\mu_3 \neq \mu_1$
3 X 2	5,388	2	3,082	$\mu_3 \neq \mu_2$
2 X 1	0,749	2	3,082	$\mu_2 = \mu_1$

Tabela 7. Frequências de células em primeira, segunda e terceira divisões em culturas de 72 horas dos Experimentos III, IV e V e em culturas de 80, 88 e 96 horas do grupo TM-1 do Experimento V.

Experi mento	G.E.	Nº de metáfases							
		Anali sadas	Em 1ª divisão		Em 2ª divisão		Em 3ª divisão		
			Nº	%	Nº	%	Nº	%	
III	Co	400	233	58,2	164	41,0	3	0,8	
	TM-5	400	400	100,0					
IV	Co	400	141	35,3	245	61,2	14	3,5	
	TM-5	400	400	100,0					
V	Co	800	344	43,0	374	46,8	82	10,2	
	TM-1/72	800	795	99,4	5	0,6			
	TM-1/80	400	396	99,0	4	1,0			
	TM-1/88	400	389	97,2	11	2,8			
	TM-1/96	400	381	95,2	18	4,5	1	0,3	
	TM-0,5	802	364	45,4	366	45,6	72	9,0	

Tabela 8. Análises de variância das frequências médias transformadas de células em primeira divisão de grupos experimentais e de culturas de diferentes durações do grupo TM-1, do Experimento V. GL: graus de liberdade; *: $P < 0,05$.

G.E. comparados	Fonte de variação	GL	SQ	QM	F	Signifi- cância
Co X TM-1/72 X TM-0,5	Total	12	4.926,73			
	grupos	2	4.772,13	2.386,06	154,33	*
	erro	10	154,60	15,46		
TM-1/72 X /80 X /88 X /96	Total	11	398,78			
	grupos	3	249,36	83,12	4,45	*
	erro	8	149,41	18,68		



Tabela 9. Valores do teste de Newman-Keuls para comparação das frequências médias transformadas de células em primeira divisão de grupos experimentais (A) e de culturas de diferentes durações do grupos TM-1 (B), do Experimento V. Para a comparação A: $\mu_{Co}=\mu_1$; $\mu_{TM-1/72}=\mu_3$; $\mu_{TM-0,5}=\mu_2$. Para a comparação B: $\mu_{TM-1/72}=\mu_3$; $\mu_{TM-1/80}=\mu_4$; $\mu_{TM-1/88}=\mu_2$; $\mu_{TM-1/96}=\mu_1$.

Compa ração	Médias compa- radas	q	p	$q_{(0,05),12,p}$	Conclusão
A	3 X 1	38,278	3	3,877	$\mu_3 \neq \mu_1$
	3 X 2	34,426	2	3,151	$\mu_3 \neq \mu_2$
	2 X 1	3,853	2	3,151	$\mu_2 \neq \mu_1$
B	4 X 1	7,076	4	4,529	$\mu_4 \neq \mu_1$
	4 X 2	4,745	3	4,041	$\mu_4 \neq \mu_2$
	4 X 3	0,363	2	3,261	$\mu_4 = \mu_3$
	3 X 1	6,713	3	4,041	$\mu_3 \neq \mu_1$
	3 X 2	4,382	2	3,261	$\mu_3 \neq \mu_2$
	2 X 1	2,331	2	3,261	$\mu_2 = \mu_1$

diferem entre si. Por outro lado, não há diferença entre as culturas TM-1/72 e TM-1/80, nem entre as culturas TM-1/88 e TM-1/96, porém esses dois conjuntos diferem entre si. Portanto, um acréscimo de 16 horas ou, em algumas situações, de 8 horas, no período de incubação correspondeu a um aumento significativo na frequência de células de segunda e terceira gerações.

III.2. Micronúcleos e aberrações cromossômicas

As frequências de núcleos com micronúcleos, nos grupos experimentais dos Experimentos IA, IB e II, e os valores do teste t para comparação das frequências médias transformadas entre cada grupo tratado e seu controle, são apresentados na Tabela 10. O grupo TM-10 diferiu significativamente do controle, o que não ocorreu com os demais grupos tratados (TM-20 e TM-5). Com exceção do Experimento IA, o controle sempre foi o grupo experimental que apresentou a maior frequência de núcleos com micronúcleos.

Os micronúcleos geralmente associavam-se um a cada núcleo principal (Figura 1.A), mas em vários casos haviam dois micronúcleos associados a um único núcleo (Figura 1.B). Observou-se também situações nas quais o micronúcleo ligava-se por uma ponte de cromatina ao núcleo principal, às vezes bilobulado (Figura 1.C.). Esses casos, de acordo com os critérios já referidos, não podiam ser considerados na análise.

Na Tabela 11 encontram-se as frequências de metáfases analisadas, de metáfases com anomalias estruturais e de metáfases com diferentes números de eventos anômalos, em cada grupo



po experimental dos Experimentos IA, IB e II. Constam, ainda, dessa tabela, os valores do teste t para comparação de frequências médias transformadas entre cada grupo tratado e o seu controle. Nenhuma diferença significativa foi detectada nessas comparações.

Em alguns grupos experimentais não se totalizou 50 metáfases por ter ocorrido destruição do material, provavelmente provocada pela interação entre o óleo de imersão (Carl Zeiss) e o xilol (Merck) utilizado na limpeza das lâminas. Essa situação indesejável foi contornada nas análises posteriores, pela substituição do óleo de imersão por Nujol (Schering).

As anomalias cromossômicas eram falhas ou quebras, cromatídicas ou cromossômicas, sendo observado fragmento somente em uma metáfase do grupo TM-10, com cariótipo 46,XY,-C,+E,+ace. Essa metáfase foi considerada como portadora de quebra cromossômica em Cq. Exemplos de diferentes tipos de anomalias observadas encontram-se na Figura 2.

Na maior parte dos casos as metáfases com aberrações apresentavam um único evento, em poucas células havendo dois eventos anômalos. Em um grande número de metáfases, os cromossomos apresentavam-se com um aspecto incomum, caracterizado por uma acentuada contração cromossômica, que dificultava ou mesmo impossibilitava a análise (Figura 3).

Na Tabela 12 são apresentadas, para cada grupo experimental dos Experimentos IA, IB e II, as frequências de quebras e de falhas cromatídicas e cromossômicas. As quebras são mais frequentes que as falhas e, pelo pequeno número de eventos observados, não se pode comparar as frequências de anomalias cromatídicas e cromossômicas. Encontrou-se apenas uma quebra cen



tromérica, e não foram observadas falhas centroméricas.

Na Tabela 13 mostram-se os grupos cromossômicos envolvidos nas quebras e falhas e a sua localização em segmentos que correspondem aproximadamente aos terços proximal, mediano e distal, em cada grupo experimental dos Experimentos IA, IB e II, e em conjuntos de grupos experimentais que apresentam analogia (sem ou com tratamento). Essas frequências foram somadas em relação aos cromossomos grandes (grupos cromossômicos A e B) e pequenos (grupos cromossômicos D, E e F). Não foram encontradas anomalias em cromossomos do grupo G e a quebra centromérica ocorreu em um cromossomo do grupo E. Os dados dessa tabela não foram tratados estatisticamente porque o número reduzido de eventos anômalos, mesmo com as somatórias efetuadas, torna pouco confiáveis os resultados dos testes estatísticos. No entanto, não há sugestões de expressão preferencial de quebras em qualquer cromossomo ou região cromossômica.

Na Tabela 14 apresentam-se as frequências de células diplóides e aneuplóides (hipo e hiperdiplóides), os grupos cromossômicos envolvidos nas aneuploidias, especificadas em hipo e hiperdiploidias, e os valores do teste t para comparação das frequências médias transformadas entre cada grupo tratado e o seu controle, nos Experimentos IA, IB e II. Nenhum dos grupos tratados diferiu do seu controle. Observou-se apenas uma célula hiperdiplóide, com um cromossomo extra do grupo C+X, em TM-10. A hipótese de que a perda ou ganho de cromossomos nas aneuploíidias ocorreu ao acaso não pôde ser testada estatisticamente, devido ao número baixo de células aneuplóides, mesmo somando-se os grupos experimentais relacionados. Entretanto, não parece haver envolvimento preferencial de cromossomos nas aneuploidias.



Tabela 10. Frequências de núcleos com micronúcleos nos Experimentos IA, IB e II e valores do teste t (18 graus de liberdade) para comparação das frequências transformadas entre cada grupo tratado e seu controle. ns: $P > 0,05$; *: $P < 0,05$.

Experimento	G.E.	Núcleos analisados	Núcleos com micronúcleos		t	Significância
			Nº	%		
IA	Co	2.000	10	0,5		
	TM-20	2.000	12	0,6	0,08	ns
IB	Co	2.000	10	0,5		
	TM-10	2.000	2	0,1	3,07	*
II	Co	2.000	12	0,6		
	TM-5	2.002	4	0,2	1,94	ns

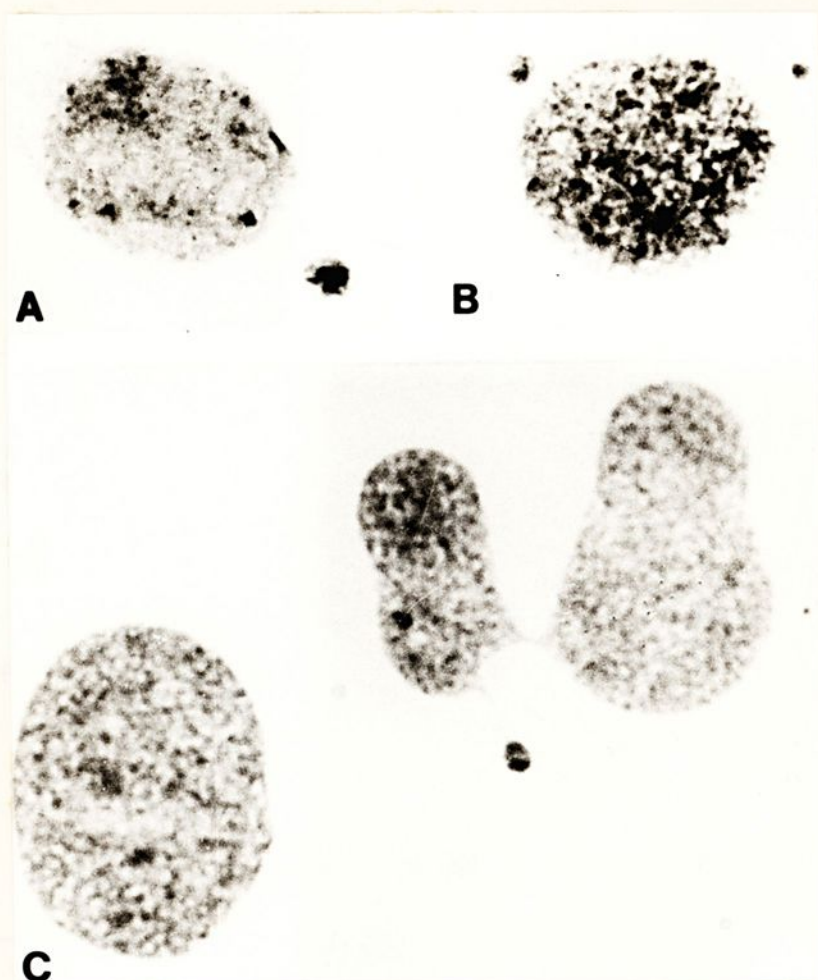


FIGURA 1. Núcleo principal associado a um (A) ou dois micronúcleos (B); núcleo bilobulado ligado a um micronúcleo por uma ponte de cromatina (C).

Tabela 11. Frequências de metáfases com anomalias estruturais nos Experimentos IA, IB e II e valores do teste t (18 graus de liberdade) para comparação de frequências médias transformadas entre cada grupo tratado e o seu controle. t crítico $(0,05)$, $18=2,10$.

Experi <u>i</u> mento	G.E.	Metáfases			t	Metáfases com dife <u>r</u> rentes números de eventos anômalos	
		Anali <u>i</u> sadas	Com ano <u>m</u> alias			1	2
			Nº	%			
IA	Co	50	4	8,0		4	
	TM-20	49	4	8,2	0	4	
IB	Co	49	2	4,1		2	
	TM-10	50	2	4,0	0,07	1	1
II	Co	50	2	4,0			2
	TM-5	50	6	12,0	1,90	5	1

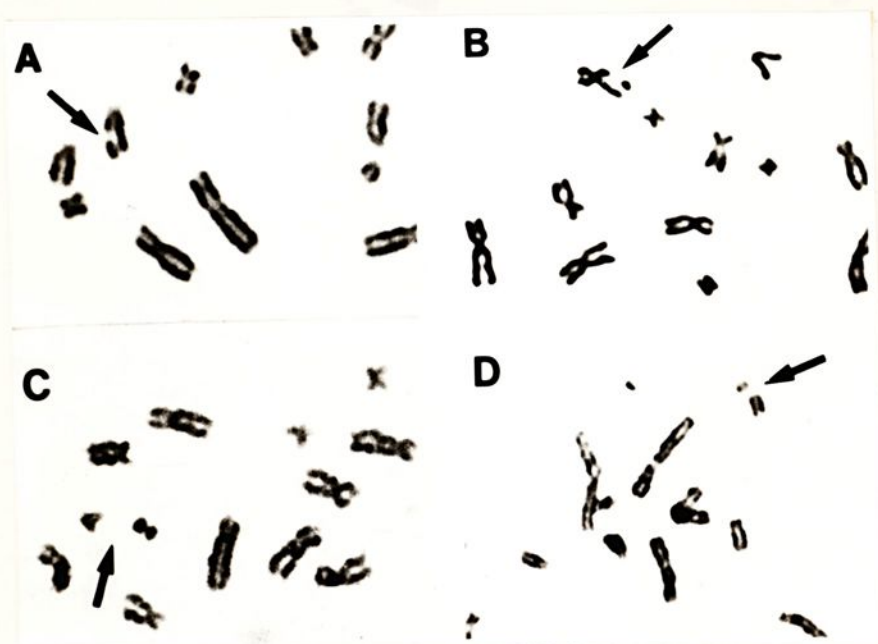


FIGURA 2. Metáfases parciais mostrando cromossomo do grupo D com falha cromatídica (A), cromossomo do grupo C com quebra cromatídica (B), cromossomo do grupo D com quebra cromossômica (C) e cromossomo do grupo E com quebra centromérica (D).



FIGURA 3. Metáfases dos grupos tratados com tintura de tuia, com aspecto incomum.

Tabela 12. Frequências dos diferentes tipos de quebras e falhas nos Experimentos IA, IB e II.

Experi- mento	G.E.	Total	Quebras						Falhas			
			Cromatí- dicas		Cromos- sômicas		Centro- méricas		Cromatí- dicas		Cromos- sômicas	
			Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
IA	Co	4	2	50,0	2	50,0						
	TM-20	4	3	75,0	1	25,0						
IB	Co	2			2	100,0						
	TM-10	3			3	100,0						
II	Co	4	1	33,3	1	33,3	1	33,3				
	TM-5	7	4	57,1	1	14,3			1	14,3	1	14,3

Tabela 13. Localização, em segmentos que compreendem aproximadamente um terço do braço cromossômico, das anomalias encontradas nos Experimentos IA, IB e II e somatória das frequências em grupos relacionados. pr = terço proximal; m = terço mediano; d = terço distal; c = centromérica.

G.E./Experimento	Grupos cromossômicos								
	A + B		C + X			D + E + F			
	pr	m	pr	m	d	pr	m	d	c
Co/IA	1	1				1	1		
TM-20/IA		1	1	1			1		
Co/IB						1	1		
TM-10/IB			3						
Co/II		1			1				1
TM-5/II	2	2	1	1				1	
Co/IA + /IB + /II	1	2			1	2	2		
TM-20/IA + 10/IB + 5/II	2	3	5	1	1		1	1	

Tabela 14. Frequências de células diplóides e aneuplóides, valores do teste t (18 graus de liberdade) para comparação das frequências médias transformadas de células aneuplóides entre cada grupo tratado e seu controle, e grupos cromossômicos envolvidos nas aneuploidias, nos Experimentos IA, IB e II. t crítico (0,05), 18 = 2,10.

Experi_ mento	G.E.	Nº de metáfases						t	Grupos cromossômicos							
		Anali_ sadas	Diplóides		Aneuplóides		Células hipodiplóides						Células hi- perdiplóides			
			Nº	%	Nº	%	A		C+X	D	E	F		G+Y	C + X	
IA	Co	50	45	90	5	10		1	1		2		1			
	TM-20	49	43	88	6	12	0,38		1	1	2	1	1			
IB	Co	49	45	92	4	8					1	3				
	TM-10	50	43	86	7	14	0,49	1	2	2	1			1		
II	Co	50	43	86	7	14		1	3	1			2			
	TM-5	50	44	88	6	12	0,17		2			2	2			

III.3. Trocas entre cromátides-irmãs

As frequências de TCI, excluídas as centroméricas, e a média e os valores limites de TCI por célula, nos grupos experimentais do Experimento V, são apresentados na Tabela 15. O número médio de TCI variou de $30,25 \pm 4,78$ (TM-1) a $32,95 \pm 4,94$ (TM-0,5). Foram encontradas várias células com mais de 40 TCI, uma das quais é apresentada na Figura 4. Na Tabela 15 apresentam-se também os valores do teste de Wilcoxon (dados combinados) para comparação das frequências de TCI por célula entre cada tratamento e seu controle. Nenhuma diferença significativa foi detectada em quaisquer dessas comparações.

Na Tabela 16 encontram-se as frequências de TCI computadas segundo três critérios: excluindo as trocas centroméricas (critério A) e incluindo-as, tendo a identificação sido feita diretamente ao microscópio óptico (critério B), ou sendo computadas as trocas pelas representações esquemáticas das metáfases (critério C). Portanto, nesse último critério, além das trocas centroméricas reais, foram computadas também os dobramentos cromatídicos que ocorriam ao nível dos centrômeros.

Constam, ainda, da Tabela 16, os valores do teste de Wilcoxon (dados combinados) para comparação das frequências de TCI obtidas por esses diferentes critérios de análise em cada um dos grupos experimentais. Em todos os grupos tratados, os resultados das análises pelos critérios B e C diferiram significativamente dos resultados da análise pelo critério A. Por outro lado, em nenhum grupo os resultados das análises pelos critérios B e C diferiram entre si.

Na Tabela 17 encontram-se as frequências de TCI por



cromossomo ou grupo cromossômico e a média de TCI por célula e por cromossomo, de cada grupo experimental. Essas distribuições foram comparadas entre cada grupo tratado e seu controle pelo teste de Wilcoxon (dados pareados), não tendo sido detectadas diferenças significativas.

As distribuições das TCI por cromossomo ou grupo cromossômico também foram comparadas com o esperado de acordo com o comprimento relativo dos cromossomos (segundo LUBS e col., Conferência de Paris, 1971) e os valores de qui-quadrado são apresentados na Tabela 18. Os valores de qui-quadrado obtidos são maiores que o crítico nas comparações dos grupos tratados. Em geral, os maiores desvios ocorrem nos cromossomos do grupo B, que têm frequências de TCI maiores que as esperadas, e nos cromossomos dos grupos E, F e G, que têm frequências menores que as esperadas.

As representações gráficas das frequências observadas e esperadas de TCI por cromossomo ou grupo cromossômico encontram-se na Figura 5. Nessas representações pode-se verificar que, geralmente, as frequências observadas são maiores que as esperadas nos cromossomos grandes (grupos A, B e C) e menores nos cromossomos pequenos (grupos D, E, F e G).

As frequências de TCI por segmentos que compreendem aproximadamente um terço do braço cromossômico, e os valores de qui-quadrado para comparação das distribuições observadas e esperadas de TCI por esses segmentos, são apresentados na Tabela 19. As distribuições das TCI por essas regiões diferiram significativamente das esperadas casualmente, havendo uma incidência maior de TCI no terço distal e menor no terço mediano, em todos os grupos experimentais.



Tabela 15. Frequência de trocas entre cromátides-irmãs (TCI), exclu^ídas as centroméricas, em 20 metáfases de cada grupo experimental do Experimento V e valores do teste de Wilcoxon (dados combinados) para comparação entre os grupos trata^{dos} e o respectivo controle (valor crítico = 471).

G.E.	Frequência de TCI					Teste de Wilcoxon	
	Total	Por célula				Valor calculado	Signifi ^c ância
		$\bar{X}$	$\pm$	s	Mínima Máxima		
Co	644	32,20	8,13	21	45		
TM-1	605	30,25	4,78	17	38	383	ns
TM-0,5	659	32,95	4,94	25	41	422	ns





FIGURA 4. Metáfase de segunda divisão celular apresentando 43 TCI.

Tabela 16. Frequência total de TCI em 20 metáfases de cada grupo experimental do Experimento V, excluindo (A) e incluindo as trocas centroméricas computadas diretamente ao microscópio óptico (B) ou a partir das representações esquemáticas das metáfases (C), e valores do teste de Wilcoxon (dados combinados) para comparação entre os resultados obtidos pelos diferentes critérios de cada grupo experimental. ns: $P > 0,05$; *: $P < 0,05$; Valor crítico = 471.

G.E.	Número de TCI			Comparação entre diferentes critérios pelo teste de Wilcoxon					
	Critérios para análise			A X B		A X C		B X C	
	A	B	C	Valor	Signifi	Valor	Signifi	Valor	Signifi
				calculado	cância	calculado	cância	calculado	cância
Co	644	696	706	449	ns	452	ns	419	ns
TM-1	605	667	702	485	*	523	*	458	ns
TM-0,5	659	718	732	473	*	485	*	423	ns



tabela 17. Frequências de TCI por cromossomo ou grupo cromossômico, em 20 metáfases de cada grupo experimental do Experimento V, e valores do teste de Wilcoxon (dados pareados) para comparação das distribuições entre cada grupo tratado e o controle. ns: $P > 0,05$.

Grp.	TCI	Cromossomos ou grupos cromossômicos										Teste de Wilcoxon		
		1	2	3	B	C+X	D	16	17+18	F	G+Y	Valor calculado	Valor crítico	Significância
C	Nº	62	56	43	84	237	61	26	33	20	22			
	$\bar{X}$ /células	3,10	2,80	2,15	4,20	11,85	3,05	1,30	1,65	1,00	1,10			
	s	1,68	1,67	1,93	2,61	3,99	2,04	1,13	0,99	1,02	0,91			
	$\bar{X}$ /cromossomos	1,55	1,40	1,08	1,05	0,79	0,51	0,65	0,41	0,25	0,22			
M-1	Nº	54	56	46	85	230	58	12	27	16	21	14,0	5,0	ns
	$\bar{X}$ /células	2,70	2,80	2,30	4,25	11,50	2,90	0,60	1,35	0,80	1,05			
	s	1,72	1,61	1,38	1,33	3,50	1,65	0,82	0,81	0,77	0,94			
	$\bar{X}$ /cromossomos	1,35	1,40	1,15	1,06	0,77	0,48	0,30	0,34	0,20	0,21			
M-0,5	Nº	57	56	43	114	235	56	12	42	21	23	27,0	3,0	ns
	$\bar{X}$ /células	2,85	2,80	2,15	5,70	11,75	2,80	0,60	2,10	1,05	1,15			
	s	1,46	1,51	1,69	2,05	3,71	1,54	0,82	1,74	1,28	1,31			
	$\bar{X}$ /cromossomos	1,42	1,40	1,08	1,42	0,78	0,47	0,30	0,52	0,26	0,23			
C	Nº	62	56	43	84	237	61	26	33	20	22			
	$\bar{X}$ /células	3,10	2,80	2,15	4,20	11,85	3,05	1,30	1,65	1,00	1,10			
	s	1,68	1,67	1,93	2,61	3,99	2,04	1,13	0,99	1,02	0,91			
	$\bar{X}$ /cromossomos	1,55	1,40	1,08	1,05	0,79	0,51	0,65	0,41	0,25	0,22			

Tabela 18. Valores de qui-quadrado (9 graus de liberdade) para comparação das distribuições de TCI em relação ao tamanho relativo dos cromossomos metafásicos, no Experimento V. O = Observada; E = esperada; ns: $P > 0,05$; *: $P < 0,05$.

G.E.	Distribuição	Cromossomos ou grupos cromossômicos											χ^2	Significância
		1	2	3	B	C+X	D	16	17+18	F	G+Y	Total		
Co	O	62	56	43	84	237	61	26	33	20	22	644		
	E	52	50	42	77	233	67	21	38	33	31	644	13,49	ns
TM-1	O	54	56	46	85	230	58	12	27	16	21	605		
	E	49	47	40	72	218	63	20	36	31	29	605	21,46	*
TM-0,5	O	57	56	43	114	235	56	12	42	21	23	659		
	E	54	51	43	79	239	68	21	39	33	32	659	29,34	*

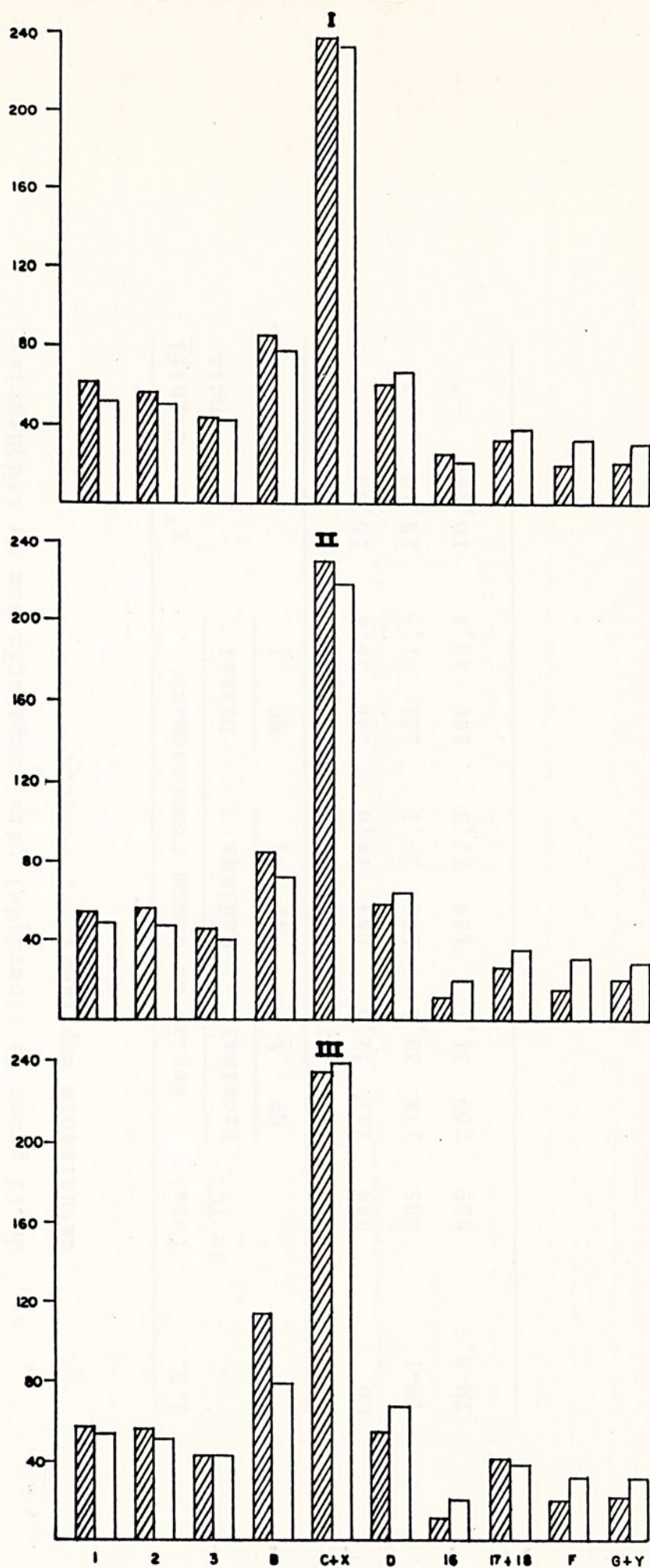


FIGURA 5. Frequências observadas (▨) e esperadas (□) de TCI por cromossomo ou grupo cromossômico dos grupos experimentais controle (I), TM-1 (II) e TM-0,5 (III), no Experimento V. Abscissa: cromossomo ou grupo cromossômico; ordenada: frequência de TCI.

Tabela 19. Distribuição de TCI por terço proximal, mediano ou distal do braço cromossômico, no Experimento V, e valores de qui-quadrado (2 graus de liberdade) para comparação com as frequências casualmente esperadas. *: $P < 0,05$.

G.E.	Total de TCI	Região do braço cromossômico						χ^2	Signifi- cância
		Proximal		Mediana		Distal			
		Nº	%	Nº	%	Nº	%		
Co	644	210	32,6	184	28,6	250	38,8	10,30	*
TM-1	605	178	29,4	176	29,1	251	41,5	18,12	*
TM-0,5	659	209	31,7	184	27,9	266	40,4	16,09	*

IV. DISCUSSÃO

IV.1. Proliferação celular

A tintura de tuia em concentração igual ou superior a 5 μ l/ml (TM-5, TM-10 e TM-20) provocou uma redução drástica no índice mitótico (IM).

A redução do IM pode representar o bloqueio completo da divisão de um certo número de células, embora outras possam não ser afetadas e se dividir normalmente, ou decorrer de um atraso da resposta celular ao estímulo mitogênico da fito-hemaglutinina. Além disso, pode refletir um aumento na duração do ciclo celular em consequência da interferência de algum agente sobre um dos processos metabólicos inerentes à divisão celular como, por exemplo, a síntese de DNA.

Se os compostos presentes na tintura de tuia agissem atrasando a resposta celular ou prolongando a duração do ciclo, esperar-se-ia encontrar, ao aumentar o período de incubação das culturas tratadas, um número maior de células em divisão. Tal situação não foi observada quando a duração das culturas foi aumentada por 1 ou 2 horas, no Experimento IV, e por 8, 16 e 24 horas, no grupo TM-1 do Experimento V, ou seja, não houve aumento do IM em correspondência ao aumento da duração da cultura. Ao contrário, de maneira geral, observou-se uma ligeira diminuição do IM com um pequeno aumento no período de incubação (Experimento IV) e uma acentuada redução com incubações por períodos bem maiores (Experimento V).

Esses resultados concordam com os encontrados por CROSSEN & MORGAN (1977), que analisando culturas de linfócitos



com 48, 72 e 96 horas de duração, estimuladas por fito-hemaglutinina e com adição de 5-BrdU, observaram uma relação inversa entre o IM e a duração da cultura e sugeriram que a diminuição do IM seria devido à incorporação contínua de 5-BrdU, que estaria desempenhando um efeito tóxico. A presença da tintura de tuia nas culturas poderia, também, produzir um efeito citotóxico que se associaria à diminuição dos nutrientes disponíveis e ao acúmulo de excretos ao longo do desenvolvimento da cultura, contribuindo para a redução do IM.

Um aspecto interessante a ressaltar é que o grupo controle do Experimento IV apresentou um IM menor que o do grupo TM-5. Esse achado pode sugerir que em culturas com células que tenham sido pouco sensíveis ao estímulo mitogênico, por efeito da tuia, por exemplo, as células que se desdiferenciaram passaram por um processo seletivo. Isso poderia levar a um índice mitótico mais elevado, em relação às culturas sensíveis ao estímulo mitogênico, quando se consideram na análise apenas os linfoblastos.

As variações observadas entre os controles quanto ao índice mitótico de culturas de 72 horas são plenamente justificáveis. Uma das causas mais prováveis é que os linfócitos humanos cultivados *in vitro* podem demorar, após o estímulo da fito-hemaglutinina, de 24 a 48 horas para iniciar a síntese de DNA e, independente do tempo gasto entre o estímulo e a resposta celular, a duração do ciclo pode variar de 12 a 48 horas (CROSSEN & MORGAN, 1977, 1979). Em consequência, quando se padroniza o tempo de cultivo, pode-se encontrar situações muito variadas por ocasião da interrupção das culturas de diferentes indivíduos. Por outro lado, culturas celulares de um mesmo indivíduo, reali-

zadas em ocasiões diferentes, também podem diferir quanto ao IM, tal como ocorreu para o doador I. Isso pode ser consequência de outros fatores como, por exemplo, estímulos antigênicos fornecidos por componentes do soro utilizado para suplementação do meio de cultura basal.

O efeito cicloativo da tintura de tuia foi confirmado pelos resultados da investigação da frequência de células em primeira, segunda e terceira divisões em culturas. De fato, não foram observadas células de segundo ou terceiro ciclos nos grupos TM-20, TM-10 e TM-5, e o grupo TM-1, em culturas de 72 horas, apresentou uma frequência de metáfases de segunda divisão muito menor que a do controle e nenhuma de terceira divisão, em 800 analisadas. Essa diferença também foi observada entre as culturas do grupo TM-1 com 80, 88 e 96 horas de duração (1,0, 2,8, e 4,8% de células em segunda ou terceira divisões, respectivamente) e as culturas de 72 horas do controle (57%), indicando uma drástica alteração do ciclo celular nesse tratamento.

As culturas de 72 horas do grupo TM-1 apresentaram o maior índice mitótico e quase a totalidade das células estavam em primeira divisão. No controle do Experimento V, assim como nos controles dos demais experimentos, as frequências de metáfases de primeira divisão variaram de 35% a 58%, as de segunda divisão de 41% a 61% e as de terceira divisão, de 1% a 10%. Tais resultados assemelham-se aos referidos por outros autores em culturas de linfócitos de indivíduos normais estimuladas por fito-hemaglutinina (CROSSEN & MORGAN, 1977; GIULOTTO e col., 1980).

Nas culturas de 80 e 88 horas do Experimento V, tanto o IM como a proporção de metáfases de segunda divisão são baixas. As culturas de 96 horas têm IM maior que essas duas an



teriores, mas só 5% de suas metáfases são de segunda ou terceira divisão, de modo que parece haver uma subpopulação de linfócitos com resposta tardia ao estímulo mitogênico ou com acentuação do aumento na duração do ciclo celular. CROSSEN & MORGAN (1977) e GIULOTTO e col. (1980) encontraram, em linfócitos cultivados por 4 dias, cerca de 40% de metáfases de segunda divisão e 30% de terceira divisão ou etapas posteriores, o que reforça a hipótese de que a tuia tenha sido responsável pela significativa redução determinada.

De modo geral, a análise da frequência de células de diferentes gerações foi tão sensível quanto a avaliação do índice mitótico na detecção de efeitos cicloativos pela tintura de tuia. Entretanto, a utilização exclusiva da proporção de células de diferentes gerações para a avaliação da ação de agentes químicos sobre o índice de multiplicação celular não é recomendável, desde que há possibilidade de modificação de efeitos por associação do composto testado com a 5-BrdU, o que poderia induzir resultados falso-positivos ou falso-negativos.

Um aspecto que demanda maiores investigações é o referente à identificação dos compostos que sejam responsáveis pela ação cicloativa da tintura de tuia nos linfócitos dos indivíduos estudados neste trabalho. Alguns ácidos graxos presentes nessa tintura já foram referidos como compostos citotóxicos, como os ácidos palmítico e esteárico, que reduziram a viabilidade de células endoteliais e do músculo cardíaco de rato em culturas (WENZEL & HALE, 1978a) e esse último sendo também reconhecido como inibidor da proliferação de linfócitos T de camundongos (BUTTKE & CUCHENS, 1984). Entretanto, outros ácidos graxos, como os ácidos cáprico, láurico e mirístico (WENZEL & HALE, 1978a)

e o ácido oléico (WENZEL & HALE, 1978b), não apresentaram tais efeitos. Não se obteve informações sobre a atividade cicloativa dos demais compostos encontrados na tintura de tuia.

IV.2. *Aberrações cromossômicas*

O teste de micronúcleos, nas condições experimentais em que foi empregado, não foi sensível para detectar a indução de aberrações cromossômicas. Inclusive, o grupo experimental TM-10 apresentou uma frequência de micronúcleos significativamente diferente, e menor, que a encontrada no controle.

Vários fatores podem ter contribuído para tais resultados. Segundo HEDDLE e col. (1984), a frequência de micronúcleos em uma população de células, em determinado momento após o tratamento com um agente clastogênico, depende de vários fatores, como a taxa de divisão celular, a variação na frequência de fragmentos acêntricos ao longo do tempo, a fração desses fragmentos que originam micronúcleos e a pressão de seleção contra células com micronúcleos. Sendo os micronúcleos mantidos nas gerações celulares, as células de segunda geração ou gerações posteriores devem apresentar mais micronúcleos, acumulados no transcorrer das divisões celulares, que as células de primeira geração. De fato, LASNE e col. (1984) encontraram uma incidência muito maior de micronúcleos em células que haviam se dividido duas ou mais vezes, em relação as que se dividiram apenas uma vez, em culturas celulares com incorporação de 5-BrdU e tratadas com agentes mutagênicos. Por isso, considerando-se o baixo índice mitótico da maioria dos grupos tratados e a proporção elevada de metáfases de primeira divisão após tratamento, mesmo nas

culturas incubadas por mais do que 72 horas, pode-se justificar os resultados do teste de micronúcleos.

Tais considerações também podem esclarecer a incidência maior de micronúcleos no controle que no grupo TM-10, pois enquanto o primeiro tem um grande número de metáfases de segunda divisão, no último as metáfases encontradas são de primeira divisão. No caso, esperar-se-ia que, se as células tivessem entrado em novo ciclo mitótico, fosse observada uma frequência de micronúcleos semelhante à do controle. Esse achado demonstra que o teste de micronúcleos, apesar da fácil execução e eficiência comprovada em muitas situações, deve ser utilizado em associação com outros testes para a avaliação clastogênica, a fim de se evitar resultados falso-negativos.

Os grupos experimentais tratados com a tintura de tuia apresentaram grande proporção de metáfases com cromossomos muito contraídos. Uma hipótese que pode ser formulada na tentativa de interpretação desses resultados, dada a semelhança da morfologia dos cromossomos observada neste trabalho com a encontrada em células submetidas à colquicina por um tempo prolongado e a ocorrência quase que exclusiva de metáfases de primeira divisão celular nos grupos tratados, é a de que compostos presentes na tintura de tuia também atuariam por um mecanismo de ação semelhante ao da colquicina.

A colquicina interrompe a divisão celular por associar-se fortemente, pelo anel tropolona de sua molécula, aos dímeros de tubulina (METZLER, 1977; ALBERTS e col., 1983). Desse modo, não se processa a formação de microtúbulos devido à impossibilidade desses dímeros se polimerizarem. Em consequência, o fuso mitótico, que é constituído de microtúbulos, não se forma



e a divisão celular permanece bloqueada em metáfase. Além disso, a colquicina é capaz de condensar as fibras cromatídicas, aumentando seu diâmetro em até 22% após exposição por algumas horas (GILLY e col., 1976).

A hipótese referida é reforçada pelo fato da molécula de colquicina assemelhar-se às tuiaplicinas presentes nas folhas de *Thuya occidentalis*, quanto à sua estrutura ciclooptatrielonona ("tropolona") (DEWAR, 1945, conforme ERDTMAN & GRIPENBERG, 1948). Portanto, seria muito interessante o emprego de tuiaplicinas isoladas, nas mesmas condições em que a colquicina é utilizada em culturas celulares, para a obtenção de informações que confirmem ou não tal hipótese.

No experimento IA o grupo tratado com a tintura de tuia (TM-20) não diferiu do controle. Entretanto, a frequência de metáfases com aberrações cromossômicas nesse controle é inesperadamente alta. As frequências de células anômalas em culturas de linfócitos de indivíduos normais variam de 0,36 a 5% (ZAVALA e col., 1979; PATHAK e col., 1982; GUNDY & VARGA, 1983). As frequências observadas nos controles dos Experimentos IB (4,1%) e II (4%) estão de acordo com os dados acima referidos; todavia, a do controle do Experimento IA é bem maior, correspondendo aproximadamente ao dobro das frequências consideradas como espontâneas. Essa situação indesejável pode ter sido consequência de artefatos técnicos, como a presença de resíduos de detergente nos frascos ou de contaminação biológica nas culturas.

Os demais grupos tratados (TM-10 e TM-5) também não diferiram do controle, indicando que a tintura de tuia não exerce atividade clastogênica em tais concentrações.

Neste trabalho, as quebras são mais frequentes que



as falhas, em todos os grupos experimentais. A proporção de falhas e quebras espontâneas encontradas na literatura é variável, ora as quebras sendo mais frequentes, ora ocorrendo a situação inversa. Os próprios critérios de análise dessas anomalias cromossômicas parecem contribuir para tal variação. A definição de falha, como uma descontinuidade que não ultrapassa a largura da cromátide, é arbitrária e deve reunir eventos distintos, como a extração das proteínas que se associam ao DNA sem afetá-lo, ou quebras verdadeiras, incluindo o rompimento da molécula de DNA. Segundo SATYA-PRAKASH e col. (1981), há pouca concordância entre citogeneticistas na distinção entre quebras e falhas, a menos que as lesões sejam tão óbvias que dispensem um julgamento subjetivo. Além disso, a grande maioria das falhas analisadas com a técnica de coloração pela prata compreende descontinuidades da estrutura central da cromátide. Por isso, não há dúvidas de que as falhas devem ser computadas na avaliação da clastogenicidade.

Todavia, não é fácil explicar porque alguns agentes induzem mais falhas que quebras, enquanto outros agem de maneira inversa. RICHARDSON e col. (1984), por exemplo, encontraram uma frequência de falhas maior que a de quebras, em uma análise de cerca de 10.000 linfócitos humanos do grupo experimental não tratado. Esses autores observaram que em culturas tratadas com algumas substâncias químicas (solução salina e dimetilsulfóxido, DMSO, com ou sem ativação metabólica, e etanol ativado) apareciam mais falhas que quebras, o que também ocorria no controle; porém, outras substâncias (etanol e mitomicina não ativados e ciclofosfamida ativada) induziam mais quebras que falhas.

Em outros estudos para avaliação do efeito clastogê



nico de drogas encontraram-se nos controles frequências de quebras maiores (FROES, 1985), iguais (VICENTINI, 1984) ou menores (YODER e col., 1973; SINHA e col., 1984) que as de falhas. Em células tratadas com diferentes frações do extrato de avelós (*Euphorbia tirucalli*), FROES (1985) referiu incidência maior de quebras, similarmente ao controle, entretanto, VICENTINI (1984) observou frequência maior de falhas entre as anomalias induzi das pelo extrato de sementes de barbatimão (*Stryphnodendron obovatum*), divergindo do controle.

Pode-se supor, com base nessas informações, que independente da proporção de quebras e falhas encontrada nas anomalias cromossômicas estruturais que ocorrem espontaneamente, a situação pode ser invertida quando um agente químico adicionado à cultura induz preferencialmente aberrações do tipo menos fre quentemente observado entre as aberrações espontâneas.

Neste trabalho, a proporção de eventos cromatídicos e cromossômicos foi muito variável entre os diferentes grupos experimentais (Tabela 12). Nos controles dos Experimentos IA e II as frequências se equivaleram, nos grupos controle e TM-10, do Experimento IB, os eventos cromossômicos foram mais frequen tes e nos grupos TM-20 e TM-5 ocorreu o inverso. No entanto, as frequências com que tais eventos aparecem são muito pequenas pa ra que sejam tiradas conclusões a este respeito. Das anomalias cromossômicas espontâneas, observadas em estudos populacionais ou em controles de experimentos para avaliação de atividade mu tagênica, os eventos do tipo cromatídico são mais frequêntes (PILINSKAYA, 1971; YODER e col., 1973; BIANCHI e col., 1974; VAN BAO e col., 1974; KECK & EMERIT, 1979; MATTEI e col., 1979; MEY NE e col., 1979; BÖHLKE e col., 1983; SINHA e col., 1984), o



mesmo acontecendo em relação aos eventos induzidos por substâncias químicas (PILINSKAYA, 1971; YODER e col., 1973; GEBHART, 1974; VAN BAO e col., 1974; TAMURA e col., 1974; RABELLO e col., 1975; JAMEELA e col., 1979; KECK & EMERIT, 1979; MEYNE e col., 1979; BÖHLKE e col., 1983; SINHA e col., 1984).

Neste trabalho não foi possível analisar a distribuição intercromossômica das anomalias, devido ao número reduzido de eventos por grupo cromossômico. No entanto, já foram observadas distribuições não casuais tanto de anomalias estruturais espontâneas (AYRAUD e col., 1976; MATTEI e col., 1979; BARNABEI e col., 1982) como induzidas. Nesses casos, os eventos preferenciais parecem variar em função do agente indutor. Por exemplo, as anomalias induzidas por raios X afetam preferencialmente os cromossomos 9, 21 e 22 (SEABRIGHT, 1973), enquanto os cromossomos 1, 2, 3, 5 e 7 mostram uma maior susceptibilidade à ação de arabinosil citosina, ara-C (AYRAUD e col., 1976).

A distribuição intracromossômica de anomalias também é variável. MEYNE e col. (1979) investigaram a ação de dicloreto de diamino-platina II (PDD), ara-C e trietilenomelanina (TEM) e observaram que as bandas podem ser: afetadas preferencialmente pelos três agentes, como a banda 9ql2, que corresponde a uma região de constrição secundária; não afetadas por qualquer dos agentes; afetadas conforme o casualmente esperado; ou afetadas especificamente por um dos agentes. Segundo FUNES-CRAVIOTO e col. (1974), as propriedades específicas do agente mutagênico, o estado fisiológico das células no momento da exposição ao agente e as propriedades biológicas do sistema de teste utilizado são responsáveis pelas diferenças nos padrões de distribuição das anomalias estruturais induzidas. Entretanto, as re

giões de constrição secundária são preferencialmente afetadas por grande parte dos agentes clastogênicos, evidenciando que a heterocromatina é mais susceptível à danos que a eucromatina (FUNES-CRAVIOTO e col., 1974; MEYNE e col., 1979; SCHUBERT & RIEGER, 1981).

Os grupos tratados não diferiram dos controles em relação à frequência de células aneuplóides. Além disso, a hipótese de que a perda ou ganho de cromossomos nas aneuploidias ocorreu por acaso também não pôde ser testada, devido ao pequeno número de células anômalas. Entretanto, em um estudo desenvolvido por WENGER e col. (1984), sobre perdas e ganhos cromossômicos em células cultivadas de 1.500 pacientes jovens, foi verificado que o ganho cromossômico é casual e não está relacionado com o tamanho do cromossomo, com exceção do cromossomo X, do qual o ganho é maior que o esperado. Por sua vez, a perda cromossômica está altamente correlacionada com o tamanho do cromossomo, sendo os menores mais frequentemente perdidos.

IV.3. Trocas entre cromátides-irmãs

Conforme já referido, as concentrações da tintura de tuia superiores a 1 μ l/ml perturbaram drasticamente a proliferação celular, impedindo as células de atingirem a segunda metáfase *in vitro*, o que é imprescindível para a análise de TCI. Nas culturas tratadas com concentrações de 1 e 0,5 μ l/ml da tintura (TM-1 e TM-0,5), essa análise pôde ser feita e não houve alteração nos valores médios de TCI por célula, em relação ao controle.



Uma observação interessante é a elevada frequência de TCI por célula do controle do Experimento V. As frequências médias de TCI por célula variam amplamente entre diferentes indivíduos. Os valores extremos referidos por MORGAN & CROSSEN (1977b) são 4,1 e 27,3 TCI/célula; todavia, o valor mais elevado foi encontrado em culturas tratadas com concentrações muito altas de 5-BrdU (200 µg/ml, DUTRILLAUX e col., 1974).

As variações nas frequências de TCI podem ser devidas a diferenças individuais em relação à linha basal de TCI, em resposta à 5-BrdU (EVANS, 1977; MAZRIMAS & STETKA, 1978; LAMBERTI e col., 1983), em resposta aos agentes que lesam o DNA ou à sua associação com a 5-BrdU (CROSSEN, 1982a). No entanto, a diversidade de resultados constantes da literatura não deve ser atribuída somente à variação individual. Outros fatores interferentes são, segundo CROSSEN (1982b), as diferenças na resolução apresentadas pelas várias técnicas de coloração diferencial de cromátides-irmãs, os critérios de análise empregados, o tipo de meio de cultura utilizado, a ocorrência de infecções virais ou vacinas e o efeito do tabagismo ou drogas terapêuticas. Citam-se ainda o número de flashes de luz a que as células são expostas durante o cultivo (IKUSHIMA & WOLFF, 1974), a variação da temperatura do meio onde as células se encontram (PANDITA, 1983), a linhagem celular considerada (BECHER e col., 1979; LINDBLAD & LAMBERT, 1981), o tipo de soro adicionado ao meio de cultura (GOSH & NAND, 1979), a natureza do experimento, *in vivo* ou *in vitro* (KRAM e col., 1979) e o tipo de agente mitogênico utilizado (DEKNUDT & KAMRA, 1983).

A contribuição das TCI centroméricas para a frequência total de TCI em cada célula não foi considerada impor

tante em células de segunda divisão (GALLOWAY & EVANS, 1975; SMYTH & EVANS, 1976). Essa conclusão, no entanto, pode ser conseqüência dos critérios utilizados na análise, pois, em células de terceira divisão, nas quais podem ser identificadas com segurança as TCI centroméricas ocorridas na segunda divisão, TICE e col. (1975) observaram que essas contribuem com 18% do total de TCI.

Nesse projeto, as TCI centroméricas, computadas ao microscópio óptico ou pelas representações esquemáticas das metáfases, alteraram de modo significativo a freqüência total de TCI. Entretanto, os resultados das análises pelos critérios B (diretamente ao microscópio óptico) e C (pelas representações esquemáticas) não diferiram entre si, indicando que a inclusão dos dobramentos pericentroméricos entre as TCI centroméricas verdadeiras não apresenta outros inconvenientes, senão o de superestimar a freqüência real de TCI. No entanto, considerando que mesmo ao microscópio óptico é difícil distinguir inequivocamente as TCI centroméricas dos dobramentos pericentroméricos, em células de segunda geração, excluíram-se as TCI centroméricas na comparação dos resultados dos diferentes grupos experimentais.

O padrão de distribuição das TCI espontâneas pelos cromossomos humanos é um aspecto ainda controvertido. Alguns pesquisadores observaram uma distribuição casual em relação ao comprimento cromossômico (DUTRILLAUX e col., 1974; IKUSHIMA & WOLFF, 1974; SMYTH & EVANS, 1976; HOO E PARSLow, 1979), enquanto outros encontraram uma incidência de TCI maior que a esperada nos cromossomos maiores, principalmente os do grupo cromossômico B, e menor nos pequenos cromossomos dos grupos E, F e G, incluindo o Y (LATT, 1974a; MORGAN & CROSSEN, 1977a; MUTCHINICK e



col., 1979; GRANATA e col., 1981; NEWMAN e col., 1982; MCNALLY & RAY, 1983). Não há concordância, também, em relação à distribuição das TCI induzidas, que ora são casuais (LATT, 1974b; LAMBERT e col., 1976), ora não casuais (IKUSHIMA & WOLFF, 1974; NEWMAN e col., 1982; MCNALLY & RAY, 1983; FROES, 1985).

Neste trabalho a distribuição de TCI espontânea pode ser considerada casual, embora os cromossomos dos grupos F e G tenham apresentado uma baixa frequência de TCI. Por outro lado, nos grupos experimentais tratados com a tuia, a distribuição de TCI diferiu do esperado, em consequência da alta incidência no grupo cromossômico B e da frequência reduzida nos cromossomos dos grupos E, F e G+Y.

O número elevado de TCI em cromossomos do grupo B tem sido relacionado a uma susceptibilidade preferencial à ação da 5-BrdU (MORGAN & CROSSEN, 1977a) e a escassez de TCI em cromossomos pequenos à frequência relativamente baixa de TCI na região pericentromérica, que constitui uma grande parte desses cromossomos (LATT, 1974a).

Os padrões de distribuição intracromossômica de TCI, encontrados na literatura, também são conflitantes. SCHUBERT & RIEGER (1981) reviram inúmeros trabalhos de distribuição intracromossômica das TCI espontâneas, induzidas ou que ocorrem "espontaneamente" em síndromes de instabilidade cromossômica e concluíram que, ao contrário do observado para as aberrações cromossômicas, não há localização preferencial desse fenômeno ao nível de heterocromatina ou ela é muito menos pronunciada.

Os cromossomos analisados neste trabalho não foram submetidos a técnicas de bandamento que possibilitassem a investigação da distribuição de TCI nas regiões de eucromatina e he



terocromatina. Entretanto, a análise da distribuição de TCI por segmentos correspondentes a aproximadamente um terço do braço cromossômico permitiu a verificação de que em todos os grupos experimentais, o terço cromossômico distal apresentou uma frequência maior de TCI. Além disso, a frequência de TCI no terço mediano foi menor que no terço proximal. Tais resultados discordam dos observados por GALLOWAY & EVANS (1975), que encontraram maior frequência de TCI geralmente nas regiões medianas dos braços cromossômicos, e por GRANATA e col. (1981), que também observaram uma frequência maior de TCI na região mediana, mas só analisaram os cromossomos 1 e 2.



V. RESUMO E CONCLUSÕES

A tintura de tuia (*Thuya occidentalis*) é um produto natural que vem sendo muito utilizado, tanto popularmente como em medicina homeopática ou veterinária, na terapia de excrescências esponjosas, condilomas, pólipos e verrugas. Tais aplicações sugerem fortemente que ela contenha compostos que exerçam uma atividade citotóxica. O objetivo deste estudo foi investigar os efeitos da tintura de tuia sobre o ciclo celular e sobre os cromossomos, avaliados no processo de divisão de linfócitos humanos cultivados *in vitro*, em relação à resposta ao estímulo mitogênico da fito-hemaglutinina, à indução de anomalias cromossômicas e de trocas entre cromátides-irmãs.

A tintura de tuia (TM) foi testada em cinco concentrações finais: 20 (TM-20), 10 (TM-10), 5 (TM-5), 1 (TM-1) e 0,5 μ l/ml (TM-0,5). Culturas celulares não tratadas com a tintura de tuia foram utilizadas como controle (Co).

Todos os grupos tratados apresentaram efeitos ciclotativos, quer reduzindo o índice mitótico, quer retendo uma parte significativa das células cultivadas no seu primeiro ciclo de divisão.

Houve diminuição na frequência de micronúcleos no tratamento TM-10. Isso provavelmente ocorreu devido à ação ciclotativa sobre os linfócitos em cultura, que impedia que as células atingissem o segundo ciclo ou ciclos subsequentes de divisão e, conseqüentemente, que as anomalias estruturais instáveis dessem origem aos micronúcleos. Nos demais tratamentos (TM-20 e TM-5) não houve alteração da frequência de núcleos com micronúcleos em relação à do controle.



Os grupos tratados não diferiram significativamente dos controles em relação às frequências de células com aberrações cromossômicas estruturais ou numéricas, não ficando evidenciado a manifestação de um efeito clastogênico pelo composto. Todavia, nas culturas tratadas observou-se uma contração cromossômica intensa. As anomalias estruturais detectadas foram quebras e falhas, dos tipos cromatídico e cromossômico. As quebras foram mais frequentes que as falhas; contudo, a proporção de eventos cromossômicos e cromatídicos foi variável.

Os estudo de trocas entre cromátides-irmãs (TCI) somente foi possível nos grupos experimentais TM-1 e TM-0,5, os únicos a apresentarem células em segunda divisão adequadas para a análise, sendo que em nenhum deles a frequência celular de TCI diferiu do controle. Nesses grupos, as frequências de TCI por cromossomo ou grupo cromossômico diferiram das esperadas com base no tamanho dos cromossomos, principalmente devido a um aumento na frequência de TCI nos cromossomos do grupo B e uma diminuição nos cromossomos dos grupos E, F e G.

Os resultados sugerem que na tintura de tuia encontram-se compostos que, mesmo em concentrações muito baixas, têm efeitos cicloativos. Contudo, em ensaios com concentrações maiores, ainda não se detectou lesões ao nível cromossômico, o que possibilita especulações no sentido de que a citotoxicidade não se manifesta por interações dos compostos com o DNA, ou que haja indução de alterações nesta molécula que inviabilizem a sobrevivência celular ou o início do processo de divisão celular, impedindo a expressão dos efeitos clastogênicos.



VI. SUMMARY

Thuja tincture (*Thuja occidentalis*) is a natural product with popular, veterinary and homoeopathic applications in the treatment of spongy excrescences, condylomas, polyps and warts. Such uses strongly suggest that this tincture contains compounds which exercise a cytotoxic activity. The objective of this study was to investigate the effects of thuja tincture on the cell cycle and on chromosomes. This was done by evaluating the division process in human lymphocytes cultivated *in vitro*, in relation to the reaction to the mitogenic stimulus of the phytohemagglutinin, the induction of chromosome anomalies and sister chromatid exchanges.

The cell cultures were exposed to five TM dosages: 20 (TM-20), 10 (TM-10), 5 (TM-5), 1 (TM-1) and 0.5 $\mu\text{l/ml}$ (TM-0.5). Cell cultures without treatment were used as controls (Co).

All experimental groups showed an effect on the cell cycle expressed by decreased mitotic index and blockage of a significant fraction of the cultured cells in their first division cycle.

There was a decreased frequency of micronuclei in treatment TM-10. This probably was due to the cycloactive effect on the cultured lymphocytes which prevented the cells from reaching the second or subsequent division cycles and, consequently, also prevented the unstable structural anomalies from giving origin to micronuclei. In the other treatments (TM-20 and TM-5) there was no alteration in the frequency of nuclei with micronuclei, as compared to the control.

The treated groups did not differ significantly from the controls as to frequency of cells with structural or numerical chromosome aberrations, no evidence of a clastogenic effect being detected. However, in the treated cultures a marked chromosome contraction was observed. The detected structural anomalies were breaks and gaps, of either the chromatid or chromosome types. Breaks were more frequent than gaps; however, the proportion of the chromatid and chromosome events was variable.

Sister chromatid exchange (SCE) frequencies were analyzed in the TM-1 and TM-0.5 experimental groups, the only ones with second cycle cells. None of these differed from their controls in the cellular frequency of SCE. The SCE frequency per chromosome group in all analyzed experimental groups differed from the expected on the basis of relative mitotic chromosome length. This difference is mainly due to an increased frequency of SCE in the B chromosome group and a decreased frequency in the E, F and G chromosome groups.

The results suggest that there are some compounds in thuja tincture with cytotoxic effects, even in very low dosages. However, chromosome aberrations were not observed with higher concentrations. This permits speculations to the effect that the cytotoxicity is not manifested in consequence of an interaction of these compounds with DNA, or that there occurs alterations in this molecule which prevent the survival of the cell or the initiation of the division process, thereby blocking the expression of the clastogenic effects.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE, S. & SASAKI, M. SCE as an index mutagenesis and/or carcinogenesis. In: SANDBERG, A.A. (Ed.). *Sister Chromatid Exchange*, New York, Allan R. Liss, Inc., 1982.
- ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J.D. *Molecular Biology of the Cell*. New York, Garland Publishing, Inc., 1983.
- AYRAUD, N.; CANTRELLE, C.; LLOYD, M. Distribution des points de cassure chromosomique induits par l'arabinosyl cytosine sur des lymphocytes humains in vitro. *Ann. Génét.*, 19: 29-35, 1976.
- BARNABEI, V.M.; SAKAMOTO, K.; SEELEY, J.K.; PURTILO, D.T. Chromosomal breakage and sister chromatid exchange in peripheral blood lymphocytes and lymphoblastoid cell lines in the X-linked lymphoproliferative syndrome. *Cancer Genet. Cytogenet.*, 6: 313-321, 1982.
- BECHER, R.; SCHMIDT, C.G.; THEIS, G.; HOSSFELD, D.K. The rate of sister chromatid exchange in normal human bone marrow cells. *Hum. Genet.*, 50: 213-216, 1979.
- BEIGUELMAN, B.; PISANI, R.C.B.; EL GUINDY, M.M. *In vitro* effect of dapsone on human chromosomes. *Int. J. Leprosy*, 43: 41-44, 1975.
- BEZANGER-BEAUQUESNE, L.; PINKAS, M.; TORCK, M. *Les Plantes dans la Thérapeutique Moderne*. Maloine S.A. Editeur, 1975.
- BIANCHI, D.W.; DONALDSON, C.H.; MOORHEAD, P.S. Absence of damage to human chromosomes by spray adhesives. *Mutat. Res.* 26: 545-551, 1974.



- BIJLSMA, J.B. & DE FRANCE, H.F. Cytogenetic investigations in volunteers ingesting inorganic lead. *Int. Arch. Occup. Environ. Hlth.*, 38: 145-148, 1976.
- BLOCK, A.W. Sister chromatid exchange methodology. In: SANDBERG, A.A. (Ed.). *Sister Chromatid Exchange*. New York, Allan R. Liss, Inc., 1982.
- BOHLKE, J.U.; SINGH, S.; GOEDD, H.W. Cytogenetic effects of acetaldehyde in lymphocytes of germans and japanese: SCE, clastogenic activity, and cell cycle delay. *Hum. Genet.*, 63: 285-289, 1983.
- BUTTKE, T.M. & CUCHENS, M.A. Inhibition of lymphocyte proliferation by free fatty acids. II. Toxicity of stearic acid towards phytohaemagglutinin-activated T cells. *Immunology*, 53: 507-514, 1984.
- CAIRO, N. *Guia de Medicina Homeopática*. São Paulo, Livraria Teixeira, 21. ed., 1968.
- CHRISMAN, C.L. & LASLEY, J.F. Effect of diethylstilbestrol diphosphate on mitotic activity in bovine lymphocyte cultures. *Cytologia*, 40: 817-821, 1975.
- COUNTRYMAN, P.I. & HEDDLE, J.A. The production of micronucleic from chromosome aberrations in irradiated cultures of human lymphocytes. *Mutat. Res.*, 41: 321-332, 1976.
- CROSSEN, P.E. Variation in the sensitivity of human lymphocytes to DNA-damaging agents measured by sister chromatid exchange frequency. *Hum. Genet.*, 60: 19-23, 1982a.
- CROSSEN, P.E. SCE in lymphocytes. In: SANDBERG, A.A. (Ed.). *Sister Chromatid Exchange*. New York, Allan R. Liss Inc., 1982b.



- CROSSEN, P.E. & MORGAN, W.F. Proliferation of PHA- and PWM-stimulated lymphocytes measured by sister chromatid differential staining. *Cell. Immunol.*, 32: 432-438, 1977.
- CROSSEN, P.E. & MORGAN, W.F. Proliferation of PHA-stimulated lymphocytes measured by combined autoradiography and sister chromatid differential staining. *Exp. Cell. Res.*, 118: 423-427, 1979.
- DE ARCE, M.A. The effect of donor sex and age on the number of sister chromatid exchanges in human lymphocytes growing *in vitro*. *Hum. Genet.*, 57: 83-85, 1981.
- DE LA TORRE, R. & KROMPOTIC, E. The *in vivo* and *in vitro* effects of lithium on human chromosomes and cell replication. *Teratology*, 13: 131-138, 1976.
- DEGRASSI, F. & RIZZONI, M. Micronucleus test in *Vicia faba* root tips to detect mutagen damage in fresh-water pollution. *Mutat. Res.*, 97: 19-33, 1982.
- DEKNUDT, G. & KAMRA, O. Influence of various mitogens on the yield of sister-chromatid exchanges, induced by chemicals, in human lymphocytes. *Mutat. Res.*, 111: 161-170, 1983.
- DUTRILLAUX, B.; FOSSE, A.M.; PRIEUR, M.; LEJEUNE, J. Analyse des échanges de chromatides dans les cellules somatiques humaines. *Chromosoma*, 48: 327-340, 1974.
- ERDTMAN, H. & GRIPENBERG, J. Antibiotic substances from the heart wood of *Thuja plicata* D. Don. II. The constitution of γ -thujaplicin. *Acta Chem. Scand.*, 2: 625-638, 1948.
- EVANS, H.J. Cytological methods for detecting chemical mutagens. In: HOLLAENDER, A. (Ed.). *Chemical Mutagens*. New

York, Plenum Publishing Corporation, 1976.

EVANS, H.J. What are sister chromatid exchanges? In: DE LA CHAPELLE, A. & SORSA, M. (Eds.). *Chromosomes Today*.

Amsterdam, Elsevier/North-Holland Biomedical Press, 1977.

FITZGERALD, P.H.; PICKERING, A.F.; FERGUSON, D.N.; HAMER, J.W.

Long-term use of oral contraceptives: a study of chromosomes and lymphocyte transformation. *Aust. N. Z. J. Med.*, 3: 572-575, 1973.

FRANK, D.W.; TRZOS, R.J.; GOOD, P.I. A comparison of two

methods for evaluating drug-induced chromosome alterations.

Mutat. Res., 56: 311-317, 1978.

FROES, N.D.T.C. *Investigação de Efeitos Induzidos por*

Euphorbia tirucalli L. em Cromossomos de Linfócitos Humanos. Dissertação de Mestrado. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", 1985.

FUNES-CRAVIOTO, F.; YAKOVIENKO, K.N.; KULESHOV, N.P.; ZHURKOV,

V.S. Localization of chemically induced breaks in chromosomes of human leucocytes. *Mutat. Res.*, 23: 87-105, 1974.

GALLOWAY, S.M. & EVANS, H.J. Sister chromatid exchange in

human chromosomes from normal individuals and patients with ataxia telangiectasia. *Cytogenet. Cell Genet.*, 15: 17-29, 1975.

GEBHART, E. Comparative studies on the distribution of

aberrations on human chromosomes treated with busulphan *in vivo* and *in vitro*. *Humangenetik*, 21: 263-272, 1974.

GEBHART, E. Sister chromatid exchange (SCE) and structural

chromosome aberration in mutagenicity testing. *Hum. Genet.*,

58: 235-254, 1981.

GENTCHUJNICOV, I.D. *Manual de Taxonomia Vegetal*. São Paulo, Editora Agronômica Ceres, 1976.

GILLY, C.; MOURIQUAND, C.; JEUNET, E. Effects de la colchicine et de l'etatement sur le diamètre de la fibre chromatidienne. *Ann. Génét.*, 19: 103-109, 1976.

GIULOTTO, E.; MOTTURA, A.; GIORGI, R.; DE CARLI, L.; NUZZO, F. Frequencies of sister-chromatid exchanges in relation to cell kinetics in lymphocyte cultures. *Mutat. Res.*, 70: 343-350, 1980.

GOSH, P.K. & NAND, R. Reduced frequency of sister chromatid exchanges in human lymphocytes cultured with autologous serum. *Hum. Genet.*, 51: 167-170, 1979.

GOTO, K.; MAEDA, S.; KANO, Y.; SUGIYAMA, T. Factors involved in differential giemsa-staining of sister chromatids. *Chromosoma*, 66: 351-359, 1978.

GRANATA, G.; CARBONE, P.; MARGIOTTA, G.; BARBATA, G.; CARONIA, F. Sister chromatid exchanges in bone marrow cells from a patient with Fanconi's anemia. *Haematologica*, 66: 18-24, 1981.

GRIPENBERG, J. The constituents of the wood of *Thuja occidentalis* L. *Acta Chem. Scand.*, 3: 782, 1949.

GUNDY, S. & VARGA, L.P. Chromosomal aberrations in healthy persons. *Mutat. Res.*, 120: 187-191, 1983.

HEDDLE, J.A. & CARRANO, A.V. The DNA content of micronuclei induced in mouse bone marrow by γ -irradiation: evidence that micronuclei arise from acentric chromosomal fragments. *Mutat. Res.*, 44: 63-69, 1977.

HEDDLE, J.A. & SALAMONE, M.F. Chromosomal Aberrations and bone marrow toxicity. *Environ. Health Perspect.*, 39: 23-27, 1981.



- HEDDLE, J.A.; BENZ, R.D.; COUNTRYMAN, P.I. Measurement of chromosomal breakage in cultured cells by the micronucleus technique. In: EVANS, H.J. & LLOYD, M. (Eds.). *Mutagen-induced Chromosome Damage in Man*. Edinburgh, Edinburgh University Press, 1978a.
- HEDDLE, J.A.; STUART, E.; SALAMONE, M.F. The bone marrow micronucleus test. In: KILBEY, B.J.; LEGATOR, M.; NICHOLS, W.; RAMEL, C. (Eds.). *Handbook of Mutagenicity Test Procedures*. Elsevier Science Publishers, s.l., 2 ed., 1984.
- HEDDLE, J.A.; LUE, C.B.; SAUNDERS, E.F.; BENZ, R.D. Sensitivity to five mutagens in Fanconi's anemia as measured by the micronucleus method. *Cancer Res.*, 38: 2983-2988, 1978b.
- HEDDLE, J.A.; HITE, M.; KIRKHART, B.; MAVOURNIN, K.; MACGREGOR, J.T.; NEWELL, G.W.; SALAMONE, M.F. The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. A report of U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutat. Res.*, 123: 61-118, 1983.
- HEDNER, K.; HÖGSTEDT, B.; KOLNIG, A.-M.; MARK-VENDEL, E. STROMBECK, B.; MITELMAN, F. Sister chromatid exchanges and structural chromosome aberrations in relation to age and sex. *Hum. Genet.*, 62: 305-309, 1982.
- HITACHI, P.M.; YAMADA, K.; TAKAYAMA, S. Diethylnitrosamine induced chromosome changes in rat liver cells. *J. Nat. Cancer Inst.*, 53: 507-516, 1974.
- HÖGSTEDT, B. & MITELMAN, F. The interrelations of micronuclei, chromosomal instability, and mutational activity in acute non-lymphocytic leukemia - A hypothesis. *Hereditas*, 95: 165-167, 1981.
- HOO, J.J. & PARLOW, M.I. Relation between the SCE points and the DNA replication bands. *Chromosoma*, 73: 67-74, 1979.

- HUANG, C.C. & FURUKAWA, M. Sister chromatid exchanges in human lymphoid cell lines cultured in diffusion chambers in mice. A host-mediated assay system for mutagenicity. *Exp. Cell. Res.*, 111: 458-461, 1978.
- IKUSHIMA, T. & WOLFF, S. Sister chromatid exchanges induced by light flashes to 5-bromodeoxyuridine- and 5-iododeoxyuridine substituted chinese hamster chromosomes. *Exp. Cell. Res.*, 87: 15-19, 1974.
- ISCN (1978): *An International System for Human Cytogenetic Nomenclature*. *Cytogenet. Cell Genet.*, 21: 309-404, 1978.
- JAMEELA, M.; SUBRAMANYAM, S.; SADASIVAN, G. Clastogenic effects of frusemide on human leukocytes in culture. *Mutat. Res.*, 66: 69-74, 1979.
- JENSEN, M.K. & HÜTTEL, M.S. Assessment of the effect of azathioprine on human bone marrow cells in vivo, combining chromosome studies and the micronucleus test. *Dan. Med. Bul.*, 23: 152-155, 1976.
- JENSEN, M.K. & NYFORS, A. Cytogenetic effect of methotrexate on human cells *in vivo*. Comparison between results obtained by chromosome studies on bone-marrow cells and blood lymphocytes and by micronucleus test. *Mutat. Res.*, 64: 339-343, 1979.
- KABARITY, A. & MAZROOEI, S. Further investigations on the cytological effects of some contraceptives. *Mutat. Res.*, 135: 181-188, 1984.
- KATO, H. Spontaneous sister chromatid exchanges detected by a BUdR-labeling method. *Nature*, 251: 70-72, 1974.
- KECK, M. & EMERIT, I. The influence of culture medium composition on the incidence of chromosomal breakage. *Hum.*

- Genet.*, 50: 277-283, 1979.
- KHANNA, K.K. & CHANDRA, S. Effect of some homeopathic drugs on the spore germination of four isolates of *Alternaria alternata*. *Indian Phytopathol.*, 29: 195-197, 1976.
- KIHLMAN, B.A. & KRONBORG, D. Sister chromatid exchanges in *Vicia faba*. I. Demonstration by a modified fluorescent plus giemsa (FPG) technique. *Chromosoma*, 51: 1-10, 1975.
- KORENBERG, J.R. & FREEDLENDER, E.F. Giemsa technique for the detection of sister chromatid exchanges. *Chromosoma*, 48: 355-360, 1974.
- KRAM, D.; SCHNEIDER, E.L.; SENULA, G.C.; NAKANISHI, Y. Induced sister-chromatid exchanges. Comparison of *in vivo* and *in vitro* systems. *Mutat. Res.*, 60: 339-347, 1979.
- KREPINSKY, A.B.; RAINBOW, A.J.; HEDDLE, J.A. Studies on the ultraviolet light sensitivity of Bloom's syndrome fibroblasts. *Mutat. Res.*, 69: 357-368, 1980.
- LAMBERT, B.; HANSSON, K.; LINDSTEN, J.; STEN, M.; WERELIUS, B. Bromodeoxyuridine-induced sister chromatid exchanges in human lymphocytes. *Hereditas*, 83: 163-174, 1976.
- LAMBERTI, L.; PONZETTO, P.B.; ARDITO, G. Cell kinetics and sister-chromatid-exchange frequency in human lymphocytes. *Mutat. Res.*, 120: 193-199, 1983.
- LAMER-ZARAWSKA, E. Compounds of benzene fraction from leaves of some species of cupressaceae family. *Dissert. Pharm. Pharmacol.*, 4: 401-405, 1972.
- LASNE, C.; GU, Z.W.; VENEGAS, W.; CHOUROULINKOV, I. The *in vitro* micronucleus assay for detection of cytogenetic effects induced by mutagen-chromatid exchange assay. *Mutat. Res.*, 130: 273-282, 1984.



- LATT, S.A. Microfluorometric detection of deoxyribonucleic acid replication in human metaphase chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 70: 3395-3399, 1973.
- LATT, S.A. Localization of sister chromatid exchanges in human chromosomes. *Science*, 185: 74-76, 1974a.
- LATT, S.A. Sister chromatid exchanges, indices of human chromosome damage and repair: detection by fluorescence and induction by mitomycin C. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 71: 3162-3166, 1974b.
- LATT, S.A.; ALLEN, J.; BLOOM, S.E.; CARRANO, A.; FALK, E.; KRAM, D.; SCHNEIDER, E.; SCHRECK, R.; TICE, R.; WHITFIELD, B.; WOLFF, S. Sister-chromatid exchanges: a report of the genetox program. *Mutat. Res.*, 87: 17-62, 1981.
- LEHMANN, E.L. *Nonparametrics Statistics Methods Based on Ranks*. McGraw-Hill, 1975.
- LIN, M.S. & ALFI, O.S. Detection of sister chromatid exchanges by 4'-6-diamidino-2-phenylindole fluorescence. *Chromosoma*, 57: 219-225, 1976.
- LINDBLAD, A. & LAMBERT, B. Relation between sister chromatid exchange, cell proliferation and proportion of B and T cells in human lymphocytes cultures. *Hum. Genet.*, 57: 31-34, 1981.
- MACKEY, B.E. & MACGREGOR, J.T. The micronucleus test: statistical design and analysis. *Mutat. Res.*, 64: 195-204, 1979.
- MAJUMDAR, S.K.; KOPELMAN, H.A.; SCHNITMAN, M.J. Dieldrin-induced chromosome damage in mouse bone-marrow and WI-38 human lung cells. *J. Hered.*, 67: 303-307, 1976.
- MATTEI, M.G.; AYME, S.; MATTEI, J.F.; AURRAN, Y.; GIRAUD, F. Distribution of spontaneous chromosomes breaks in man.

- Cytogenetic. Cell Genet.*, 23: 95-102, 1979.
- MAZRIMAS, J.A. & STETKA, D.G. Direct evidence for the role of incorporated BUdR in the induction of sister chromatid exchanges. *Exp. Cell Res.*, 117: 23-30, 1978.
- MCNALLY, A. & RAY, M. Sister chromatid exchange distribution in various human tissues exposed to MMC and BrdU. *Ann. Génét.*, 26: 225-228, 1983.
- METZLER, D.E. *Biochemistry. The Chemical Reactions of Living Cells*. New York, Academic Press, 1977.
- MEYNE, J.; LOCKHART, L.H.; ARRIGHI, F.E. Nonrandom distribution of chromosomal aberrations induced by three chemicals. *Mutat. on Res.*, 63: 201-209, 1979.
- MOORHEAD, P.S.; NOWELL, P.C.; MELLMAN, W.J.; BATIPPS, D.M.; HUNGERFORD, D.A. Chromosome preparation of leukocytes cultured from human peripheral blood. *Exp. Cell Res.*, 20: 613-616, 1960.
- MOREIRA-FILHO, C.A. *Ação da Testosterona em Linfócitos PHA-estimulados: Estudo na Síndrome de Feminização Testicular*. Dissertação de Mestrado. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, 1977.
- MORGAN, W.F. & CROSSEN, P.E. The frequency and distribution of sister chromatid exchanges in human chromosomes. *Hum. Genet.*, 38: 271-278, 1977a.
- MORGAN, W.F. & CROSSEN, P.E. The incidence of sister chromatid exchanges in cultured human lymphocytes. *Mutat. Res.*, 42: 305-312, 1977b.



- MORGOLIN, B.H. & SHELBY, M.D. Sister chromatid exchanges: a reexamination of the evidence for sex and race differences in humans. *Environ. Mutagen.*, 7: 63-72, 1985.
- MUTCHINICK, O.; LISKE, R.; RUZ, L.; SALAMANCA, F.; ARMENDARES, S. Frequency of sister chromatid exchanges in severe protein calorie malnutrition. *Ann. Génét.*, 22: 129-132, 1979.
- MUTCHINICK, O.; RUZ, L.; GONSEBATT, M.E.; MAULEÓN, P.; LISKE, R.; GARCIA, G. Frequency and types of induced and spontaneous chromosome aberrations in relation to cell kinetics. *Hum. Genet.*, 59: 137-140, 1981.
- NAKATSUKA, T. & HIROSE, Y. Terpenoids. Part I. The structure of occidentalol, a new sesquiterpene alcohol from *Thuya occidentalis* L. *Bull. Chem. Soc. Japan*, 20: 215-218, 1956.
- NEWMAN, S.M.; SUMMITT, R.L.; NUNEZ, L.J. Incidence of nickel-induced sister-chromatid exchange. *Mutat. Res.*, 101: 67-75, 1982.
- PAINTER, R.B. A replication model for sister chromatid exchange. In: SANDBERG, A.A. (Ed.). *Sister Chromatid Exchange*. New York, Alan R. Liss, Inc., 1982.
- PANDITA, T.K. Effect of temperature variation on sister chromatid exchange frequency in cultured human lymphocytes. *Hum. Genet.*, 63: 189-190, 1983.
- Paris Conference (1971): *Standardization in Human Genetics. Cytogenetics*, 11: 313-456, 1972.
- PATHAK, S.; HSU, T.C.; SAMAN, N.; HICKEY, R.C.; GIESLER, C.F. Chromosome instability in humans: a heritable trait? *Rev. Brasil. Genet.*, V: 577-586, 1982.
- PERRY, P. & EVANS, H.J. Cytological detection of mutagen-



carcinogen exposure by sister chromatid exchange. *Nature*, 258: 121-125, 1975.

PERRY, P.E.; & THOMSON, E.J. The methodology of sister chromatid exchanges. In: KILBEY, B.J.; LEGATOR, M.; NICHOLS, W.; RAMEL, C. (Eds.). *Handbook of Mutagenicity Test Procedures*. Amsterdam, Elsevier Science Publishers BV, 2 ed., 1984.

PERRY, P. & WOLFF, S. New giemsa method for the differential staining of sister chromatids. *Nature*, 251: 156-158, 1974.

PILINSKAYA, M.A. Cytogenetic action of the fungicide ziram in a culture of human lymphocytes in vitro. *Genetika*, 7: 138-143, 1971.

PLAZY, M. *Pesquisa Experimental Moderna em Homeopatia*. Rio de Janeiro, Editorial Homeopática Brasileira, 1969.

RABELLO, M.N.; BEÇAK, W.; ALMEIDA, W.F.; PIGATI, P.; UNGARO, M. T.; MURATA, T.; PEREIRA, C.A.B. Cytogenetic study on individuals occupationally exposed to DDT. *Mutat. Res.*, 28: 449-454, 1975.

RICHARDSON, C.R.; HOWARD, C.A.; SHELDON, T.; WILDGOOSE, J.; THOMAS, M.G. The human lymphocyte in vitro cytogenetic assay: positive and negative control observations on a ~ 3000 cells. *Mutat. Res.*, 141: 59-64, 1984.

ROSA, V.A.D. *Frequência de Trocas entre Cromátides-irmãs (TCIS) na Síndrome de Down, em Comparação com Normais do mesmo Grupo Etário*. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 1984.

SALAMONE, M.; HEDDLE, J.; STUART, E.; KATZ, M. Towards and improved micronucleus test. Studies on 3 model agents, mitomycin C, cyclophosphamide and dimethylbenzanthracene.



Mutat. Res., 74: 347-356, 1980.

SATYA-PRAKASH, K.L.; HSU, T.C.; PATHAK, S. Chromatid lesions and chromatid core morphology. *Cytogenet. Cell Genet.*, 30: 248-252, 1981.

SCHERES, J.M.J.C.; HUSTINX, Th. W.J.; RUTTEN, F.J.; MERKX, F.M. "Reverse" differential staining of sister chromatids. *Exp. cell Res.*, 109: 466-467, 1977.

SCHUBERT, I. & RIEGER, R. Sister chromatid exchanges and heterocromatin. *Hum. Genet.*, 57: 119-130, 1981.

SCHVARTZMAN, J.B. & CORTÉS, F. Sister chromatid exchanges in *Allium cepa*. *Chromosoma*, 62: 119-131, 1977.

SEABRIGHT, M. High resolution studies on the pattern of induced exchanges in the human kariotype. *Chromosoma*, 40: 333-346, 1973.

SINHA, A.K.; LINScombe, V.A.; GOLLAPUDI, B.B.; MCCLINTOCK, M. L.; FLAKE, R.E.; BODNER, K.M. The incidence of spontaneous cytogenetic aberrations in lymphocytes cultured from normal humans for 48 and 72h. *Can. J. Genet. Cytol.*, 26: 528-531, 1984.

SMITH, M.A.C. *Estudo Citogenético do Efeito do Ácido Mercapto Oxazolil Carboxílico (EMD 26644) em Linfócitos Humanos*. Tese de Doutorado. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, 1978.

SMYTH, D.R. & EVANS, H.J. Mapping of sister-chromatid exchanges in human chromosomes using G-banding and



- autoradiography. *Mutat. Res.*, 35: 139-154, 1976.
- SOKAL, R.R. & ROHLF, F.J. *Biometry*. San Francisco, W.H. Freeman and Company, 1969.
- STECHER, P.G. *The Merck Index of Chemicals and Drugs*. New Jersey, Merck & Co., Inc., 1960.
- STETKA, D.G., Jr. Operative and non-operative mechanisms of sister chromatid exchange. In: SANDBERG, A.A. (Ed.). *Sister Chromatid Exchange*. New York, Alan R. Liss, Inc., 1982.
- TAKAYAMA, S. & SAKANISHI, S. Reverse pattern in differential giemsa staining of sister chromatids. *Jpn. J. Genet.*, 53: 111-116, 1978.
- TAMURA, H.; SUGIYAMA, Y.; SUGAHARA, R. Effect of bleomycin on the chromosomes of human lymphocytes at various cell phases. *Gann.*, 65: 103-107, 1974.
- TAYLOR, J.H.; WOODS, P.S.; HUGHES, M.L. The organization and duplication of chromosomes as revealed by autoradiographic studies using tritium-labeled thymidine. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 43: 122-127, 1957.
- TICE, R.; CHAILLET, J.; SCHNEIDER, E.L. Evidence derived from sister chromatid exchanges of restricted rejoining of chromatid subunits. *Nature*, 256: 642-644, 1975.
- VAN BAO, T.; SZABÓ, I.; RUZICKSKA, P.; CZEIZEL, A. Chromosome aberrations in patients suffering acute organic phosphate insecticide intoxication. *Humangenetik*, 24: 33-57, 1974.
- VICENTINI, V.E.P. *Ação do Extrato de Sementes de Stryphnodendron obovatum Benth sobre Raiz de Cebola, Medula Óssea de Rato e Linfócito Humano (TCIs)*. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, 1984.
- VON RUDLOFF, E. & NAIR, G.V. The sesquiterpene alcohols of



- the heartwood of *Thuya occidentalis* L. *Can. J. Chem.*, 42: 421-425, 1964.
- WATANABE, M.; HONDA, S.; HAYASHI, M.; MATSUDA, T. Mutagenic effects of combinations of chemical carcinogens and environmental pollutants in mice as shown by the micronucleus test. *Mutat. Res.*, 97: 43-48, 1982.
- WEINSTEIN, D.; MAUER, I.; SOLOMON, H.M. The effect of caffeine on chromosomes of human lymphocytes. *Mutat. Res.*, 16: 391-399, 1972.
- WEINSTEIN, D.; MAUER, I.; KATZ, M.L.; KAZNER, S. The effect of caffeine on chromosomes of human lymphocytes: a search for the mechanism of action. *Mutat. Res.*, 20: 115-125, 1973.
- WENGER, S.L.; GOLDEN, W.L.; DENNIS, S.P.; STEELE, M.W. Are the occasional aneuploid cells in peripheral blood cultures significant? *Amer. J. Med. Genet.*, 19: 715-719, 1984.
- WENZEL, D.G. & HALE, T.W. Toxicity of free fatty acids for cultured rat heart muscle and endothelioid cells. I. Saturated long-chain fatty acids. *Toxicology*, 11: 109-117, 1978a.
- WENZEL, D.G. & HALE, T.W. Toxicity of free fatty acids for cultured rat heart muscle and endothelioid cells. II. Unsaturated long-chain fatty acids. *Toxicology*, 11: 119-125, 1978b.
- WITTE, L.; BERLIN, J.; WRAY, V.; SCHUBERT, W.; KOHL, W.; HÖFLE, G.; HAMMER, J. Mono- and diterpenes from cell cultures of *Thuya occidentalis*. *Planta Med.*, 49: 216-221, 1983.
- YAMAMOTO, K.I. & KIKUCHI, Y. Studies on micronuclei time response and on the effects of multiple treatments of mutagens on induction of micronuclei. *Mutat. Res.*, 90: 163-



173, 1981.

YODER, J.; WATSON, M.; BENSON, W.W. Lymphocyte chromosome analysis of agricultural workers during extensive occupational exposure to pesticides. *Mutat. Res.*, 21: 335-340, 1973.

ZAR, J.H. *Bioestatistical Analysis*. Englewood chiffs, Prentice-Hall, 1974.

ZAVALA, C.; ARROYO, P.; LISKER, R.; CARNEVALE, A.; SALAMANCA, F.; NAVARRETE, J.I.; JIMÉNEZ, F.M.; BLANCO, B.; VÁSQUEZ, V.; SÁNCHEZ, J.; CANÚN, S. Variability between and whitin laboratories in the analysis of structural chromosomal abnormalities. *Clin. Genet.*, 15: 377-381, 1979.



