

Edson Guilherme Vieira

**Investigação de Efeitos Genotóxicos do
Pesticida Amitraz em Linfócitos Humanos
Cultivados**



1910000536



EDSON GUILHERME VIEIRA

INVESTIGAÇÃO DE EFEITOS GENOTOXICOS DO PESTICIDA AMITRAZ
EM LINFOCITOS HUMANOS CULTIVADOS

Tese apresentada para obtenção do grau de
Doutor em Ciências 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 - UNESP.



536/91

ORIENTADA POR: Dra. Marileila Varella Garcia

São José do Rio Preto

1991

t575.24:632.

951

V657i

536/91



Este trabalho foi realizado no Laboratório de Citogenética Humana do Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto, Universidade Estadual Paulista - UNESP.

ORIENTADORA: Profa. Dra. Marileila Varella Garcia



Este trabalho foi realizado no Laboratório de Citogenética Humana do Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto, Universidade Estadual Paulista - UNESP.

A minha esposa, Marta Raquel, e à
minha filha, Mariel Beatriz, pelo
apoio, pelo amor e pelos sacrifícios.
Ao novo bebê, que ansiosamente
guardo, pela esperança no porvir.



ÍNDICE

I. INTRODUÇÃO

I.1. Carrapatos de interesse econômico no Brasil.	1
I.2. Oacaricidas e inseticidas.	3
I.3. Avaliação da potencialidade acaricida de oxicarbaz.	15
I.4. Objetivos.	23

II. MATERIAL E MÉTODOS

II.1. Boudados.	25
II.2. Amítraz técnico e concentrações utilizadas.	25
II.3. Ensaios.	26
II.4. Culturas de lisofóto e preparações cromossômicas	28
II.5. Análise citogenética.	29
II.6. Análise estatística.	31

III. RESULTADOS

III.1. Testes para escolha das concentrações de amítraz a termo seus efeitos acaricidas: Ensaios I a VI.	33
III.2. Avaliação dos efeitos do amítraz pelo índice mitótico e pela frequência. A minha esposa, Marta Raquel, e à minha filha, Mariel Beatriz, pelo apoio, pelo amor e pelos sacrifícios. Ao nosso bebê, que ansiosamente aguardamos, pela esperança no porvir.	40
III.3. Avaliação dos efeitos do amítraz pelo índice mitótico e pela frequência. Ensaios VII a XVI.	44
III.4. Avaliação dos efeitos do amítraz pelo índice mitótico e pela frequência. Ensaios XVII a XXV.	54

IV. DISCUSSÃO

V. RESUMO E CONCLUSÕES

VI. SUMMARY

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

VIII. AGRADECIMENTOS

INDICE

I. INTRODUÇÃO

I.1. Carrapatos de interesse econômico no Brasil.	1
I.2. O acaricida e inseticida amitraz.	3
I.3. Avaliação da potencialidade mutagênica do amitraz	15
I.4. Objetivos.	23

II. MATERIAL E METODOS

II.1. Doadores.	25
II.2. Amitraz técnico e concentrações utilizadas.	25
II.3. Ensaio.	26
II.4. Culturas de linfócitos e preparações cromossômicas	28
II.5. Análise citogenética.	29
II.6. Análise estatística.	31

III. RESULTADOS

III.1. Testes para escolha das concentrações de amitraz a terem seus efeitos analisados: Ensaio I a VI.	33
III.2. Avaliação dos efeitos do amitraz pelo índice mitótico e pela frequência de micronúcleos nos Ensaios VII a XVI.	40
III.3. Avaliação dos efeitos do amitraz pela frequência de anomalias cromossômicas nos Ensaios VII a XVI.	45
III.4. Avaliação dos efeitos do amitraz pela frequência de trocas entre cromátides-irmãs nos Ensaios VII a XVI..	64

IV. DISCUSSÃO	74
---------------------	----

V. RESUMO E CONCLUSÕES	90
------------------------------	----

VI. SUMMARY	94
-------------------	----

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	96
---------------------------------------	----

VIII. AGRADECIMENTOS	115
----------------------------	-----

I. INTRODUÇÃO

I.1. Carrapatos de interesse econômico no Brasil.

Os carrapatos são aracnídeos ectoparasitos de vertebrados. Seus principais hospedeiros são os mamíferos, mas aves, répteis e anfíbios podem também ser por eles parasitados (FLECHTMAN, 1985).

No Brasil, inúmeros hospedeiros de interesse econômico, como bovinos, equinos, ovinos, caprinos, suínos, cães, gatos e galináceos são parasitados por espécies de carrapatos pertencentes às famílias Argasidae e Ixodidae (Ixodida, Acari; Tabela 1). Algumas dessas espécies podem atacar seres humanos, de forma severa (*Amblyomma cajennense*, *Ornithodoros rostratus*) ou branda (*Otobius megnini*, *Rhipicephalus sanguineus*), porém não constituem um problema de saúde pública, pois são raros os relatos de ocorrência desse tipo de ataque.

Entre os animais parasitados por carrapatos, os bovinos são os economicamente mais importantes. O rebanho bovino brasileiro é estimado em 136 milhões de cabeças, das quais 21 milhões são de taurinos (*Bos taurus*) e o restante de zebuínos (*Bos indicus*) ou de híbridos taurino-zebuínos (BRASIL EM DADOS, 1990). Os taurinos, apesar de representarem em estado de pureza racial apenas uma pequena porcentagem do rebanho nacional (16%), são de grande importância porque reúnem as principais raças leiteiras e seus mestiços com zebuínos produzem quase todo o leite consumido no país. Todavia, eles são muito susceptíveis aos carrapatos (GONZALES, 1975), em especial à espécie *Boophilus microplus*, o ectoparasita de maior repercussão econômica em bovinos no Brasil. Acrescenta-se a isso que a resistência a essa ectoparasitose, até então uma das importantes características do gado zebu, parece estar sendo gradualmente reduzida, provavelmente em função da sua crescente miscigenação com o rebanho taurino.

Do ponto de vista médico-veterinário, os carrapatos constituem-se nos artrópodes de maior importância por produzirem injúrias de vários tipos aos seus hospedeiros, como a depreciação do couro, a inoculação de toxinas e a transmissão de agentes patogênicos, decorrentes de seu hábito hematofágico (FLECHTMAN, 1985). O parasitismo por *B. microplus* produz quatro tipos de ações sobre bovinos (HARRISON et alii, 1973; COELHO & SA, 1979): (a) uma ação mecânica, expressa por lesões originadas das picadas dos carrapatos

Tabela 1. Carrapatos que parasitam hospedeiros de interesse econômico no Brasil (adaptado de FLETCHMAN, 1985). Os nomes vulgares segundo ARAGÃO (1936) e FLETCHMAN (1985) são apresentados entre parêntesis.

=====		
Família	Espécie (nome vulgar)	Hospedeiro
=====		
Argasidae	Argas miniatus (carrapato dos galinheiros; carrapato sulamericano das aves)	galináceos
	Ornithodoros rostratus (carrapato do chão)	suínos
	Otobius megnini (carrapato espinhoso da orelha)	bovinos, equinos
Ixodidae	Amblyomma aureolatum (carrapato amarelo do cão)	bovinos, cães
	A. cajennense (adultos: carrapato estrela; carrapato rodoleiro; picaço; carrapato rodolego ninfas: micuim castanho; carrapato meio-chumbo; larvas: carrapato pólvora; carrapato fogo; carrapatinho)	bovinos, ovinos, equinos, cães, suínos, caprinos
	A. ovale (carrapato castanho brilhante do cão)	cães, gatos
	A. tigrinum (carrapato de listas brancas do cão)	cães
	Anocentor nitens (carrapato da orelha dos equinos)	bovinos, equinos, cães, caprinos
	Boophilus microplus (carrapato sulamericano do boi)	bovinos, ovinos, coelhos, cães, caprinos
	Haemaphysalis leporispalustris (carrapato do coelho do mato)	coelhos, galinhas
	Ixodes loricatus (carrapato de pernas pretas)	cães, gatos
	Rhipicephalus sanguineus (carrapato vermelho do cão)	coelhos, cães, gatos
	=====	

que permitem a invasão de bactérias e larvas de moscas bicheiras, podendo provocar a morte de animais jovens, supuração dos ouvidos, mastites, danos ao couro etc; (b) uma ação espoliadora, devido à sucção de sangue bovino durante sua curta vida parasitária (cerca de 20 dias); (c) uma ação tóxica, decorrente de substâncias inoculadas pelos carrapatos durante a sucção de sangue; e (d) uma ação infectante, pela transmissão de doenças provocadas por vírus, riquetsias e protozoários, como piroplasmose, anaplasmose etc.

1.2. O acaricida e inseticida amitraz.

Os malefícios causados por carrapatos têm sido combatidos com carrapaticidas químicos, cujos princípios ativos, de modo geral, são compostos arsenicais, clorados, fosforados, carbamatos, formamidinas e piretróides (SILVA, 1979; FLECHTMAN, 1985). Mais recentemente estão sendo desenvolvidas vacinas para a proteção do gado contra *B. microplus* (AGBEDE & KEMP, 1986; JOHNSTON *et alii*, 1986; OPDEBEECK *et alii*, 1988a; 1988b; WILLADSEN *et alii*, 1988), mas ainda é incerto se esses esforços obterão êxito.

Os compostos arsenicais, clorados, fosforados e carbamatos foram largamente utilizados até um passado recente, todavia caíram ou estão caindo em desuso devido à sua alta toxicidade para com o hospedeiro ou à resistência adquirida pelos carrapatos, provavelmente em consequência do emprego continuado de doses subefetivas (STONE, 1972; HARRISON *et alii*, 1973; SCHUNTNER & THOMPSON, 1978a; STONE & YOULTON, 1982). Os piretróides são pouco tóxicos e altamente eficazes (NOLAN *et alii*, 1979), porém linhagens resistentes de *B. microplus*, produtoras de esterases que hidrolisam esses compostos, já foram identificadas por DE JERSEY *et alii* (1985).

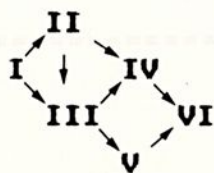
Atualmente, um dos compostos mais utilizados no combate aos carrapatos de bovinos é uma formamidina, o amitraz [N-metilbis (2,4-xililiminometil)amina], que é encontrado na forma de concentrado emulsionável de 125g do ingrediente ativo por litro em cinco formulações comerciais no Brasil (COMPENDIO VETERINÁRIO, 1989): Triatox (Cooper-Wellcome), Amitraz Centralsul (Defensa), Ectox (Imeve), Amitox (Laboratório Leivas Leite S.A.) e Amitracid (Laboratórios Alfa do Brasil S.A.). Esse composto tem se mostrado efetivo contra linhagens resistentes a outras classes de carrapaticidas, persistindo no pêlo e no couro durante um período suficiente para

controlar todos os estádios do parasita (WORTHING, 1983; GUPTA *et alii*, 1988).

As propriedades acaricidas do amitraz foram descritas pela primeira vez por PALMER *et alii* (1971), que estudaram sua atividade contra o *B. microplus*. Posteriormente, esse composto mostrou ser altamente eficaz contra uma grande variedade de espécies economicamente importantes de carrapatos, discriminadas na Tabela 2. Além de *B. microplus*, duas outras dessas espécies, *Amblyomma cajennense* e *Rhipicephalus sanguineus*, também ocorrem no Brasil, enquanto as demais pertencem a gêneros aqui representados, como pode ser constatado na Tabela 1.

No Brasil, o uso do amitraz tem se restringido ao combate de carrapatos. Todavia, ele também é usado com grande eficiência em 44 diferentes países (FAO/WHO, 1980), como Estados Unidos, Inglaterra, Japão, Alemanha, Itália, Argentina, Austrália, França e África do Sul, no controle de um grande número de espécies de ácaros e insetos de importância agrícola ou veterinária (Tabelas 3 e 4).

A via de degradação do amitraz *in vivo* já é bem conhecida em diferentes espécies. Segundo SCHUNTNER & THOMPSON (1978b), após a absorção do amitraz (composto I) pela larva de *B. microplus*, são produzidos os metabólitos derivados N-2,4-dimetilfenil-N'-metilformamida (composto II), 2,4-dimetilformanilida (composto III), 2,4-dimetilanilina (composto IV) e um composto apolar não identificado. Desses, somente os compostos I e II exercem ação tóxica sobre *B. microplus*. Essa ação carrapaticida parece ser devida à inibição de oxidases de função mista (SCHUNTNER & THOMPSON, 1976). Em mamíferos, o amitraz degrada-se nos compostos II, III e IV, e também em ácido 4-formamino-3-metilbenzôico (V), ácido 4-amino-3-metilbenzôico (VI) e vários outros derivados desconhecidos, provavelmente segundo a seguinte sequência (FAO/WHO, 1980; KNOWLES & BENEZET, 1981):



A via metabólica do amitraz em plantas termina no composto III, seguindo a mesma sequência proposta para os animais. Em bactérias, no entanto, a via de transformação difere da observada em

Tabela 2. Espécies de carrapatos controladas pelo amitraz, excluindo-se as espécies de carrapatos, e seus respectivos hospedeiros.

Espécie	Hospedeiro	Referência
Tabela 2. Espécies de carrapatos controladas pelo amitraz. 1986		
<i>Amblyomma cajennense</i>	porco espinho	FAO/WHO, 1980
<i>A. hebraeum</i>		FAO/WHO, 1980; HARRISON et alii , 1972a
<i>Anocentor viriabilis</i>	galus	FOLZ et alii , 1986
<i>Boophilus annulatus</i>		AHRENS et alii , 1989
<i>B. decoloratus</i>		FAO/WHO, 1980; HARRISON et alii , 1972a
<i>B. microplus</i>	camundongos	PALMER et alii , 1971
<i>Haemaphysalis bispinosa</i>	galináceos	FAO/WHO, 1980
<i>H. longicornis</i>	frutas, plantas	FAO/WHO, 1980
<i>Hyaloma</i> spp	ruínas, crisânteos	GUPTA et alii , 1988
<i>Ixodes holocyclus</i>	citros	FAO/WHO, 1980
<i>I. persulcatus</i>	bovinos, caprinos	FAO/WHO, 1980
<i>I. ricinus</i>	ovinos, suínos	FAO/WHO, 1980
<i>Rhipicephalus appendiculatus</i>	bovinos, caprinos, suínos	HARRISON et alii , 1972a
<i>R. evertsi</i>	bovinos, caprinos, suínos	FAO/WHO, 1980; HARRISON et alii , 1972a
<i>R. sanguineus</i>	bovinos, caprinos, suínos	FOLZ et alii , 1986
<i>Tetranychus</i> spp	frutas, algodão, hortaliças, legumes	HARRISON et alii , 1972a; b; FAO/WHO, 1980; GILDMEE & PRINGLE, 1985
<i>Varron jacobsoni</i>	Apis sp	DELANITTE & MAURITZ, 1987; FAUCON & FLECH, 1988; HEBERT et alii , 1988; 1989

Tabela 3. Espécies de ácaros combatidas pelo amitraz, excetuando-se as espécies de carrapatos, e seus respectivos hospedeiros.

Espécie	Hospedeiro	Referência
Acarapsis woodi	Apis sp	EISCHEN et alii , 1986
Aculus schlectendali	frutas	FAO/WHO, 1980
Chorioptes spp	bovinos, caprinos, ovinos, suínos, porco espinho	FAO/WHO, 1980; CURTIS, 1985; LECHTER, 1988; WRIGHT et alii , 1988
Demodex spp	bovinos, caprinos, ovinos, suínos, cães, gatos	FARMER & SEAWRIGHT, 1980; FAO/WHO, 1980; CANNON, 1983; DAVIS, 1985; COWAN & CAMPBELL, 1988
Dermanyssus gallinae	galináceos	FAO/WHO, 1980
Epitrimerus pyri	frutas	FAO/WHO, 1980
Myocoptes musculinus	camundongos	WIKERHAUSER et alii , 1978
Ornithonyssus sylviarum	galináceos	COLLISSON et alii , 1981
Panonychus spp	frutas, plantas envasadas (cravos, rosas, crisântemos)	FAO/WHO, 1980; HARRISON et alii , 1972a;b
Phyllocoptura oleivora	citros	FAO/WHO, 1980
Psorergates spp	bovinos, caprinos, ovinos, suínos	FAO/WHO, 1980
Psoroptes spp	bovinos, caprinos, ovinos, suínos	FAO/WHO, 1980; CURTIS, 1985
Sarcoptes spp	bovinos, caprinos, ovinos, suínos, cães, koalas	FAO/WHO, 1980; BROWN et alii , 1982; CURTIS, 1985; FOLZ et alii , 1984a;b
Tetranychus spp	frutas, algodão, hortaliças, legumes	HARRISON et alii , 1972a;b; FAO/WHO, 1980; GILIOME & PRINGLE, 1985
Varroa jacobsoni	Apis sp	DELAHITTE & HAVRILECK, 1987; FAUCON & FLECHÉ, 1988; HERBERT et alii , 1988; 1989

Tabela 4. Espécies de insetos combatidas pelo amitraz e seus respectivos hospedeiros.

Espécie	Hospedeiro	Referência	Espécie	Hospedeiro	Referência
<i>Acyrtosiphon pisii</i>		HARRISON et alii, 1972b	<i>Leucoptera scitella</i>	maçã	FAO/WHO, 1980
<i>Aonidiella aurantii</i>		HARRISON et alii, 1972b	<i>Lionnathus</i> spp	ovinos	FAO/WHO, 1980
<i>Aphis gossypii</i>	frutas	FAO/WHO, 1980	<i>Lysaphis pyri</i>	frutas	FAO/WHO, 1980
<i>Aphis</i> spp	algodão, frutas	HARRISON et alii, 1972b; FAO/WHO, 1980	<i>Macrosiphum</i> spp	frutas	FAO/WHO, 1980
<i>Aulocorthum</i> spp	frutas	FAO/WHO, 1980	<i>Metaphagus ovinus</i>	ovinos	FAO/WHO, 1980
<i>Bemisia tabaci</i>	algodão	FAO/WHO, 1980; WORTHING, 1983; PEREGRINI & LEHON, 1986	<i>Megoura viciae</i>		HARRISON et alii, 1972b
<i>Bucculatrix thurberiella</i>	algodão	FAO/WHO, 1980	<i>Myzus persicae</i>	frutas	HARRISON et alii, 1972b; FAO/WHO, 1980
<i>Ceroplastea</i> spp	citrus	FAO/WHO, 1980	<i>Phorodopa humuli</i>	frutas	FAO/WHO, 1980
<i>Conotrachelus nenuphar</i>	frutas	FAO/WHO, 1980	<i>Psylla pyricola</i>	pêra	FAO/WHO, 1980
<i>Cydia pomonella</i>	frutas	FAO/WHO, 1980	<i>Phylloxera</i> blancardella	maçã	FAO/WHO, 1980; WORTHING, 1983
<i>Damalima</i> spp	bovinos, ovinos	FAO/WHO, 1980	<i>Quadraspidiotus perniciosus</i>	frutas	HARRISON et alii, 1972b; FAO/WHO, 1980
<i>Diparopsis castanea</i>	algodão	FAO/WHO, 1980	<i>Rhagoletis pomonella</i>	frutas	FAO/WHO, 1980
<i>Lysaphis plantanifera</i>	frutas	FAO/WHO, 1980	<i>Saissetia</i> spp	frutas	FAO/WHO, 1980
<i>Earias</i> spp	algodão	FAO/WHO, 1980	<i>Solenoptes capillatus</i>		FAO/WHO, 1980
<i>Eumecurus</i> spp	algodão	FAO/WHO, 1980	<i>Spodoptera</i> spp	algodão	FAO/WHO, 1980; WORTHING, 1983
<i>Eriosoma lanigerum</i>	frutas	FAO/WHO, 1980	<i>Thrips</i> spp	algodão	FAO/WHO, 1980
<i>Haemalopinus suis</i>	suínos	FAO/WHO, 1980	<i>Trieblochya pomaria</i>	frutas	FAO/WHO, 1980
<i>Heliothis</i> spp	algodão	FAO/WHO, 1980; WORTHING, 1983; KNOWLES & HAMED, 1989			

animais e vegetais: o composto **I** é convertido diretamente no composto **IV**, que é estável e se acumula nas culturas bacterianas (ALLCOCK *et alii*, 1978). Uma via secundária mais lenta envolve a conversão de amitraz no composto **IV**, através dos intermediários **II** e **III**. A presença do derivado terminal **VI** na urina de homens envolvidos na produção de amitraz e em voluntários expostos a esse composto sugere que a via metabólica em humanos seja semelhante à verificada em animais (SHIRLEY, 1975, 1976 e HUGHES, 1975, *cf.* FAO/WHO, 1980). Apesar da identificação de derivados do amitraz sob condições *in vivo*, a clivagem do amitraz que dá origem aos compostos **II** e **III** parece não ser enzimática (SCHUNTNER & THOMPSON, 1978b), provavelmente ocorrendo por hidrólise. O amitraz, embora não seja higroscópico, sofre hidrólise na presença de água, em processo que é mais rápido em pH ácido (HARRISON *et alii*, 1972b). As fórmulas estruturais do amitraz e de seus derivados encontram-se representadas na Figura 1.

A rota e os produtos de excreção de amitraz administrado oralmente são semelhantes em diferentes espécies de mamíferos, como ratos, camundongos, cães, gatos, bovinos, babuínos e humanos (FAO/WHO, 1980 e 1984). Após 24 horas de tratamento, cerca de 85% do composto é excretado, e aproximadamente 62% da excreção ocorre através da urina. Em animais, os picos de amitraz no sangue são atingidos após seis horas nos casos de administração oral, porém somente após 24 a 72 horas nos casos de administração dérmica. Esses dados demonstram que a absorção desse agente por via dérmica é bem mais lenta que por via oral.

Resíduos do amitraz no fígado, rins, baço, bile, músculos, olhos e glândulas adrenais foram detectados até sete dias após o tratamento, em diferentes espécies. MCDOUGALL *et alii* (1979) encontraram 0,02mg de resíduos de amitraz por quilograma de tecidos de novilhos, abatidos 24 e 48 horas após o mergulho em uma banheira contendo uma solução de amitraz a 0,025%. Em vacas submetidas a tratamento idêntico, os resíduos no leite e na manteiga atingiram, respectivamente, um máximo de 0,01 e 0,17mg/kg seis horas após, declinando para zero e 0,01mg/kg dois dias após o tratamento. Entretanto, SOMERVILLE (1972, *cf.* FAO/WHO, 1980) havia encontrado níveis mais altos no leite colhido de uma vaca tratada dermicamente por duas vezes com um intervalo de sete dias entre as aplicações: um máximo de 0,09mg/l durante o tratamento e 0,03mg/l decorridos nove

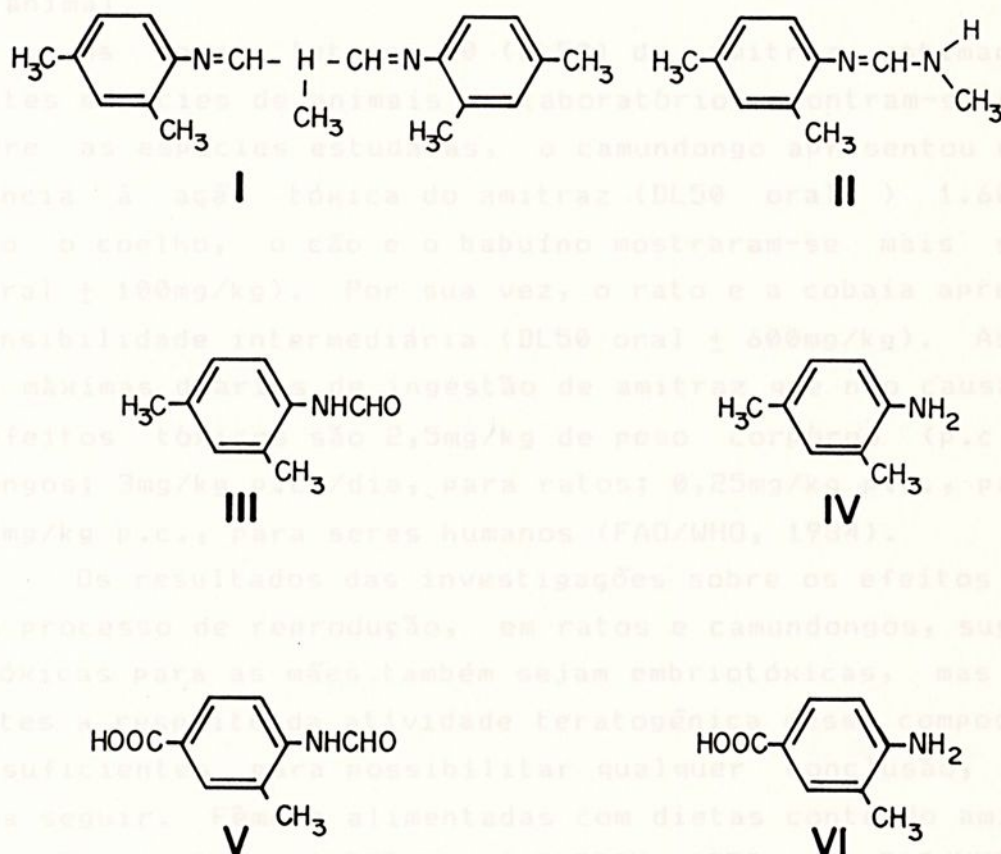


Figura 1. Fórmulas estruturais do amitraz (I) e de seus derivados II, III, IV, V e VI.

dias da segunda aplicação.

Os limites máximos de resíduos (LMR) de amitraz permitidos, segundo recomendação da Food and Agriculture Organization - FAO (FAO/WHO, 1980), são apresentados na Tabela 5. Os valores dos LMR variam amplamente (de 0,01 a 0,50mg/kg) de acordo com o produto. Em geral, os LMR dos produtos de origem vegetal são maiores que os de origem animal.

As doses letais 50 (DL50) de amitraz estimadas para diferentes espécies de animais de laboratório encontram-se na Tabela 6. Entre as espécies estudadas, o camundongo apresentou uma maior resistência à ação tóxica do amitraz (DL50 oral $\pm$ 1.600mg/kg), enquanto o coelho, o cão e o babuíno mostraram-se mais sensíveis (DL50 oral $\pm$ 100mg/kg). Por sua vez, o rato e a cobaia apresentaram uma sensibilidade intermediária (DL50 oral $\pm$ 600mg/kg). As concentrações máximas diárias de ingestão de amitraz que não causam quaisquer efeitos tóxicos são 2,5mg/kg de peso corpóreo (p.c.), para camundongos; 3mg/kg p.c./dia, para ratos; 0,25mg/kg p.c., para cães; e 0,003mg/kg p.c., para seres humanos (FAO/WHO, 1984).

Os resultados das investigações sobre os efeitos do amitraz no processo de reprodução, em ratos e camundongos, sugerem que doses tóxicas para as mães também sejam embriotóxicas, mas os dados existentes a respeito da atividade teratogênica desse composto ainda são insuficientes para possibilitar qualquer conclusão, como se resume a seguir. Fêmeas alimentadas com dietas contendo amitraz nas concentrações de 200mg (MERRYMAN & SUTTON, 1972, **cf.** FAO/WHO, 1980) e 400 mg/kg p.c. (BROWN **et alii**, 1978 e CHANNON & CRYER, 1978, **cf.** FAO/WHO, 1980; HOUNSELL & RUSH, 1984, **cf.** FAO/WHO, 1984) apresentaram uma duração média do estro mais prolongada. Nenhum efeito foi encontrado no nível de beta-estradiol no plasma, porém foram observados níveis sanguíneos mais baixos de progesterona e mais altos de sulfato de deidroepiandrosterona, nas fêmeas tratadas com doses de 100 e 400mg/kg p.c., embora o efeito se manifestasse em grau menor com a primeira dessas doses. Em ratas alimentadas com uma dieta contendo 12mg/kg p.c. de amitraz, do primeiro dia de prenhez até o desmame da prole aos 21 dias, houve uma redução do ganho de peso das mães e do número médio de filhotes sobreviventes até o quarto dia após o nascimento, o que não ocorreu quando as ratas eram tratadas com doses mais baixas (SUTTON, 1973, **cf.** FAO/WHO, 1980). Em animais



Tabela 5. Limites máximos de resíduos (LMR) de amitraz permitidos pela FAO (FAO/WHO, 1980).

=====	
Produto	LMR (mg/kg)
=====	
romã	0,50
pêssego	0,50
cereja	0,50
pepino	0,50
laranja	0,50
semente de algodão	0,50
óleo de sementes de algodão	0,05
óleo de oliva	0,05
carne bovina	0,05
carne suína	0,05
carne ovina	0,20
derivados de carne bovina	0,20
derivados de carne suína	0,20
derivados de carne ovina	0,20
leite	0,01
=====	

Tabela 6. Toxicidade aguda do amitraz. DL50: dose letal 50

Espécie	Via de absorção	DL50	Autores *
camundongo	oral	> 1.600mg/kg	PATTON & SUTTON, 1971
rato	oral	± 600mg/kg	PATTON & SUTTON, 1971; SHAW, 1973
	intraperitonal	± 800mg/kg	SHAW, 1971, 1973
	inalação	65mg/l	BERCZY <i>et alii</i> , 1972
	dérmica	> 1.600mg/kg	PATTON & SUTTON, 1971
cobaia	oral	400-800mg/ml	PATTON & SUTTON, 1971; SUTTON, 1970
coelho	oral	> 100mg/ml	PATTON & SUTTON, 1971
	dérmica	> 200mg/ml	SUTTON & WILLIAMS, 1972
cão	oral	± 100mg/ml	PATTON & SUTTON, 1971
babuíno	oral	100-250mg/ml	PATTON, 1973

* cf. FAO/WHO, 1980

tratados com 200mg de amitraz/kg p.c. foi observada uma queda no crescimento, no consumo de alimentos, na fertilidade e na viabilidade. Em três gerações sucessivas tratadas com 50mg de amitraz/kg p.c. houve uma diminuição no número de filhotes sobreviventes até 21 dias de idade (SUTTON, 1973 e LANCASTER & WILLIAMS, 1978, **cf.** FAO/WHO, 1980). Nenhum efeito teratogênico foi observado na descendência de fêmeas de ratos e coelhos submetidas a doses diárias de 1, 3, 5, 12 e 25mg de amitraz/kg p.c., e abortos só ocorreram nos tratamentos com a dose mais alta (SUTTON, 1973, **cf.** FAO/WHO, 1980).

Há poucos estudos sobre a atividade carcinogênica do amitraz. Uma alta incidência de tumores linforreticulares foi encontrada em fêmeas de camundongos alimentadas com dieta contendo 400mg de amitraz/kg por 80 semanas, o que não ocorreu em animais submetidos a doses mais baixas desse composto (BURNETT **et alii**, 1976 e KAKUK, 1979, **cf.** FAO/WHO, 1980). Além disso, em camundongos também tratados com 400ppm de amitraz, COLLEY **et alii** (1983, **cf.** FAO/WHO, 1984) encontraram um aumento do tamanho do fígado e de nódulos linfáticos, tanto em machos como em fêmeas, uma incidência maior de dilatação da glândula prepucial em machos e de tumores hepatocelulares em fêmeas. Em adição, houve um aumento dependente de dose na incidência de nódulos hiperplásticos e focos telangiectásicos e basofílicos, nas concentrações de 25, 100 e 400ppm, em machos e fêmeas. Nenhum efeito carcinogênico foi detectado em ratos tratados por dois anos com doses de 15, 50 e 200mg/kg (SUTTON & OFFER, 1973, **cf.** FAO/WHO, 1980), porém a idade dos animais no início dos experimentos foi considerada fora dos padrões exigidos pelos grupos de especialistas em resíduos de pesticidas da FAO e World Health Organization (WHO).

A atividade farmacológica do amitraz em animais inclui a inibição da oxidase de monoamina (BONSALL & TURNBULL, 1983), a ação sinérgica de alfa-2-adrenorreceptores (BONSALL & TURNBULL, 1983; HSU & KAKUK, 1984; ROBERTS & ARGENZIO, 1986; HSU **et alii**, 1987; CULLEN & REYNOLDS, 1988) e a inibição da síntese de prostaglandina (YIM **et alii**, 1978; BONSALL & TURNBULL, 1983). Inclui, também, uma ação anti-histamínica em cavalos (PASS & SEAWRIGHT, 1982), a inibição da liberação de insulina em cães (HSU & SCHAFFER, 1988) e um efeito octopaminérgico em *Drosophila*, por estimular a ciclase de adenilato (DUDAI **et alii**, 1987).

Os efeitos tóxicos do amitraz em mamíferos são sedação,



bradicardia, midríase, hipotensão, hipotermia, poliúria, vômito, hiperglicemia, depressão do sistema nervoso central e redução da atividade motora condicionada (DOBOZY, 1982, **cf.** HSU & KAKUK, 1984; BONSALL & TURNBULL, 1983). Em cães, o composto causa diminuição dos batimentos cardíacos, hipertensão, arritmia e hiperglicemia (HSU **et alii**, 1986; CULLEN & REYNOLDSON, 1988; HSU & SCHAFFER, 1988). Seu uso em gatos é inapropriado, devido a um efeito tóxico suave, caracterizado principalmente por anorexia transitória (GUNARATNAM **et alii**, 1983). Além disso, o amitraz não é recomendado como carrapaticida para equinos por causar, após 24 horas do tratamento, uma síndrome caracterizada por sonolência, depressão, redução ou cessação do peristaltismo intestinal normal, ausência de eliminação de fezes e progressiva compactação do intestino grosso, podendo levar os animais à morte (ROBERTS & SEAWRIGHT, 1979, 1983; DARVILL, 1985). Em função de seus efeitos no intestino de equinos, ROBERTS & ARGENZIO (1986) administraram o amitraz intravenosamente na dose de 1mg/kg p.c. a equinos diarreicos, para investigar seu potencial como composto terapêutico. Esses autores verificaram que o amitraz interrompia o peristaltismo intestinal, que retornava ao seu ritmo normal entre 8 e 22 horas, e a consistência do conteúdo fecal retornava também ao normal 24 horas após o tratamento, provavelmente devido à sua ação sinérgica de alfa-2-adrenorreceptores. Porém, a possibilidade da aplicação clínica de amitraz para combater diarreias em equinos ainda requer estudos adicionais, pelo fato de alguns animais terem apresentado dores abdominais e devido aos profundos efeitos sobre o sistema nervoso central. Vários dos efeitos tóxicos do amitraz, como os exercidos sobre a fisiologia intestinal de equinos e os cardiovasculares em cães, podem ser revertidos pela "yohimbine", uma antagonista de alfa-2-adrenorreceptores, o que a torna um antidoto em potencial (HSU & HOPPER, 1986; HSU **et alii**, 1986; ROBERTS & ARGENZIO, 1986).

Poucos casos de envenenamento humano por amitraz são conhecidos (BONSALL & TURNBULL, 1983), a despeito da produção de milhares de toneladas desse composto desde o início de sua comercialização em 1974. Isso torna difícil uma extrapolação segura ao homem dos sintomas de intoxicação observados em animais. No entanto, os sinais comuns de intoxicação em animais, como depressão do sistema nervoso central com episódios de hiperexcitabilidade, hipotensão,

bradicardia, hipotermia e hiperglicemia, devem ser considerados como possíveis critérios para diagnóstico de envenenamento no homem. Os animais que sobrevivem ao envenenamento por doses potencialmente letais de amitraz mostram uma completa recuperação dos sintomas farmacológicos e dos sinais de debilitação geral em cerca de sete a dez dias. Todavia, como nos concentrados emulsionáveis das formulações comerciais o amitraz encontra-se dissolvido em solventes aromáticos, em geral o xilol, os efeitos farmacológico e toxicológico dos solventes também devem ser considerados, nos casos de superexposição às formulações comerciais.

I.3. Avaliação da potencialidade mutagênica do amitraz.

Os métodos de avaliação da atividade mutagênica de compostos químicos encontram-se em franco desenvolvimento, tanto em quantidade como em qualidade, em função principalmente do grande número de compostos químicos disponíveis com o aumento da industrialização e do progresso tecnológico. De modo geral, os novos compostos que estão sendo introduzidos no ambiente de forma contínua alteram as relações de equilíbrio dinâmico resultantes do processo evolutivo coordenado ao longo de bilhões de anos. Por isso, podem acarretar prejuízos de natureza genética, não só os que dizem respeito à própria saúde humana, como os que redundam em consequências de ordem econômica.

Existe um grau elevado de redundância quanto aos tipos de bioensaios atualmente disponíveis para avaliar a atividade mutagênica de compostos químicos. BRUSICK (1987) reuniu esses bioensaios em quatro grupos, com base em sua especificidade à natureza das lesões causadas ao material genético: (a) bioensaios que avaliam a indução ou reversão de mutações gênicas ou de ponto, provocadas por inserção, deficiência ou substituição de bases nitrogenadas em um gene específico, em células de bactérias (*Salmonella typhimurium*), de leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*), de mamíferos (linfoma de camundongo, ovário de hamster chinês, linhagem V79 de hamster) e em mamíferos *in vivo*; (b) testes que detectam lesões primárias no DNA na forma de estímulo dos mecanismos de reparo do DNA (síntese de DNA não programada), de formação de aductos de DNA, de rupturas na estrutura do DNA e de trocas entre cromátides-irmãs (TCI); (c) bioensaios que identificam indiretamente



as alterações no DNA, como a ativação mutacional de oncogenes, por avaliar a capacidade de um agente para transformar células normais de mamíferos em células com propriedades neoplásicas; e (d) bioensaios que avaliam aberrações cromossômicas estruturais e numéricas por meio da análise de cromossomos metafásicos e do teste de micronúcleos em células animais e vegetais superiores, do teste do dominante letal em roedores, de deficiências cromossômicas e aneuploidias em microrganismos e de perdas de cromossomos sexuais e de translocações herdáveis em **Drosophila melanogaster** e em roedores.

Dos bioensaios acima citados, apenas a análise de cromossomos metafásicos, o teste de micronúcleos e a análise de TCI são parâmetros citogenéticos, e podem ser analisados em diferentes organismos, como mamíferos, **Drosophila**, **Allium cepa**, **Tradescantia paludosa** e **Vicia faba**. Em mamíferos, inúmeros tipos celulares podem ser utilizados, como linfócitos, células de medula óssea, fibroblastos, células de ovário, espermatogônias, espermátócitos e hepatócitos.

Na Tabela 7 encontram-se discriminados os estudos relatados na literatura visando a avaliação da potencialidade mutagênica do amitraz e, na Tabela 8, os estudos referentes aos seus derivados. Todos os bioensaios não-citogenéticos que avaliaram a atividade mutagênica do amitraz encontraram resultados negativos, com exceção do teste de dominante letal, para a concentração de 50mg/kg p.c. (PALMER & JAMES, 1977, cf. FAO/WHO, 1980). Todos os bioensaios não-citogenéticos que avaliaram a atividade mutagênica dos derivados do amitraz também encontraram resultados negativos, excetuando-se o teste de Ames para os derivados III e IV (ZIMMER et alii, 1977, cf. FAO/WHO, 1980), e o teste de mutação em linfoma de camundongo, com ativação metabólica, para as concentrações superiores a 1µg/ml do derivado IV (MCGREGOR & RIACH, 1983, cf. FAO/WHO, 1984).

Apenas um bioensaio de natureza citogenética foi realizado com o amitraz (CAMPELLO & RODRIGUES, 1986), tendo sido encontrada uma frequência significativamente elevada de aberrações cromossômicas nas células IB-RS-2 de procedência suína tratadas com 50µg/ml. Outro bioensaio citogenético, o teste de micronúcleos (HOUNSELL & WALKER, 1983, cf. FAO/WHO, 1984), foi empregado para o derivado IV, porém os resultados foram negativos. Todavia, não foram realizados estudos das frequências de TCI, nem tampouco estudos com quaisquer outros parâmetros citogenéticos, como as frequências de



Tabela 7. Avaliação da atividade mutagênica do amitraz em diversos sistemas.

Bioensaio	Autores	Organismos testados	Concentrações usadas	Resultados
Dano ao DNA	PETZOLD et alii, 1977 *	fibroblastos de pulmão de hamster chinês	várias	negativo
Síntese de DNA não programada (com e sem atividade metabólica)	MCGREGOR & RIACH, 1983 **	fibroblastos embrionários humanos	20, 60, 100, 140, 180, 220, 260, 300ug/ml	negativo
Teste de Ames (com e sem atividade metabólica)	EVEREST & WILCOX, 1976; TUPLIN & WILCOX, 1978 *	<i>Salmonella typhimurium</i> (linhagens TA1535, TA1437, TA1538) <i>Escherichia coli</i> (linhagens wp2, wp2 uvrA)		negativo
	MCGREGOR & PRENTICE, 1983 **	<i>S. typhimurium</i> (linhagens TA98, TA100, TA1535, TA1537, TA1538)	0, 33, 100, 333, 1.000, 3300, 10.000ug/placa	negativo
	MORIYA et alii, 1983	<i>S. typhimurium</i> (linhagens TA100, TA98, TA1535, TA1537, TA1538) <i>E. coli</i> (linhagem wp2 hcr)	5.000ug/placa	negativo
	TUDEK et alii, 1988	<i>S. typhimurium</i> (linhagens TA97, TA98, TA100, TA102) <i>E. coli</i> (linhagens K12, AB1157, AB1157 ada3)	5, 25, 50, 75, 100, 200ug/placa 50, 100, 250, 500ug/placa	negativo
Hospedeiro intermediário	WILCOX, 1976; EVEREST, 1976 **	camundongo/ <i>S. typhimurium</i> (linhagens G46, TA1532, TA1964)	> 400mg/kg p.c.	negativo
Teste de mutação em linfoma de camundongo (com e sem atividade metabólica)	MCGREGOR & RIACH, 1984 **	células L5178Y TK+/- de camundongo	com ativação: até 33ug/ml sem ativação: até 20ug/ml	negativo
Transformação celular	MCGREGOR & RIACH, 1983 **	clone C3H/10 T1/2 de fibroblastos de embrião de camundongo	com ativação: 12,5; 25; 37,5ug/ml sem ativação: 5; 10; 15ug/ml	negativo
Dominante letal	PALMER & JAMES, 1977 *	camundongo	12mg/kg p.c. 50mg/kg p.c.	negativo positivo***
Aberrações cromossômicas	CAMPELLO & RODRIGUES, 1986	células IB-RS-2	20ug/ml 30ug/ml 50ug/ml	negativo negativo positivo
		medula óssea de camundongos	42mg/kg p.c.	negativo

* cf. FAO/WHO, 1980; ** cf. FAO/WHO, 1984; *** fêmeas tratadas: discreto aumento na perda média pós-implantação e redução no tamanho médio de filhotes viáveis; machos tratados: taxa reduzida de implantação.

Tabela 8. Avaliação da atividade mutagênica de derivados do amitraz em diversos sistemas.

Bioensaio	Autores	Organismos testados	Concentrações	Derivados	Resultados
Dano ao DNA	PETZOLD et alii, 1977 *	fibroblastos de pulmão de hamster chinês	várias	II,III,IV,V	negativo
Teste de Ames (com e sem atividade metabólica)	EVEREST & WILCOX, 1976; TUPLIN & WILCOX, 1978 *	<i>Salmonella typhimurium</i> (linhagens TA1535,TA1437 TA1538) <i>Escherichia coli</i> (linhagens wp2,wp2 uvrA)		II,III,V	negativo
	ZIMMER et alii, 1977 *	<i>Salmonella typhimurium</i> linhagens TA100		III, IV	atividade mutagênica fraca, mas consistente
	RICHOLD et alii, 1983 **	<i>S. typhimurium</i> (linhagens TA98,TA100,TA1535,TA1537, TA1538)	até 5.000ug/placa	II,III	negativo
Teste de mutação em linfoma de camundongo (com e sem atividade metabólica)	MCGREGOR & RIACH, 1983 **	células L5178Y TK+/- de camundongo	1; 3,3; 10; 33,3; 100; 200; 300; 333,3; 400; 500; 600ug/ml	IV	com ativação:positivo para > 1ug/ml sem ativação:negativo até 300ug/ml
Transformação celular	MCGREGOR et alii, 1984 **	clone C3H/10 T1/2 de fibroblastos de embrião de camundongo	com ativação: 5, 10, 20ug/ml sem ativação: 100, 200, 400ug/ml	IV	negativo
Micronúcleos	HOUNSELL & WALKER, 1983 **	medula óssea de camundongo	56,3; 112,5; 225 mg/kg (2x em 24h)	IV	negativo

* cf. FAO/WHO, 1980

** cf. FAO/WHO, 1984

aberrações cromossômicas e o teste de micronúcleos, em células humanas cultivadas.

A utilização de parâmetros citogenéticos é importante porque parte dos compostos que dão resultados positivos quando avaliados por esses parâmetros apresentam resultados negativos em sistemas microbianos. Em uma extensa revisão da literatura, ISHIDATE **et alii** (1988) verificaram que apenas 59% (176/298) dos agentes químicos que induziram anomalias cromossômicas mostravam resultados positivos no teste de Ames, que avalia a indução de mutações gênicas em *Salmonella typhimurium*. Dessa forma, um grande número de agentes genotóxicos poderiam ser considerados não-genotóxicos se avaliados apenas pelo teste de Ames.

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, quanto por agentes físicos, como os raios X (FRANK **et alii**, 1978; HEDDLE **et alii**, 1978a; SALAMONE **et alii**, 1980; YAMAMOTO & KIKUCHI, 1981; DEGRASSI & RIZZONI, 1982). Constitui-se em uma técnica auxiliar, econômica e rápida para avaliação das aberrações cromossômicas no homem (COUNTRYMAN & HEDDLE, 1976; JENSEN & HÜTTEL, 1976; FRANK **et alii**, 1978; HEDDLE **et alii**, 1978a; 1978b; HÖGSTEDT & MITELMAN, 1981; DEGRASSI & RIZZONI, 1982; HEDDLE **et alii**, 1983; 1984) e, em alguns casos, mostrou-se até mais sensível que a análise dos cromossomos (JENSEN & HÜTTEL, 1976; JENSEN & NYFORS, 1979; DEGRASSI & RIZZONI, 1982). A rapidez, a economia e a sensibilidade deste teste também foram referidas em estudos desenvolvidos com outros mamíferos (FRANK **et alii**, 1978; YAMAMOTO & KIKUCHI, 1981; WATANABE **et alii**, 1982), com anfíbios (FERNANDEZ **et alii**, 1989; VAN HUMMELEN **et alii**, 1989) e com plantas (DEGRASSI & RIZZONI, 1982).

Os micronúcleos originam-se de fragmentos acêntricos, resultantes de deficiências cromossômicas, e de cromossomos dicêntricos ou em forma de anel (HEDDLE & CARRANO, 1977; HEDDLE **et alii**, 1978b) ou de cromossomos inteiros (VIAGGI **et alii**, 1987; FORD **et alii**, 1988), que não são capazes de participar normalmente do movimento anafásico da divisão celular. 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.

Os micronúcleos podem ser pesquisados tanto em preparações cromossômicas de culturas celulares destinadas à análise de cromossomos metafásicos (COUNTRYMAN & HEDDLE, 1976) como em preparações de culturas tratadas com citocalasina B, que bloqueia a citocinese, nas quais o citoplasma é preservado (FENECH & MORLEY, 1985a). O método de COUNTRYMAN & HEDDLE (1976) não permite a identificação dos núcleos que se dividiram apenas uma vez em cultura dos demais. Além disso, como nesse procedimento o citoplasma não é preservado, parte dos micronúcleos são perdidos, permitindo apenas uma subestimativa dos micronúcleos produzidos. Por outro lado, esse método apresenta a vantagem de possibilitar a análise de dois parâmetros (análise cromossômica e de micronúcleos) concomitantemente em lâminas de uma única cultura celular, o que representa uma economia de custo e de tempo.

Técnicas recentemente desenvolvidas permitem a separação dos micronúcleos que contêm cromossomos inteiros, originários de erros na disjunção cromossômica, daqueles micronúcleos portando aberrações cromossômicas estruturais instáveis. Essas técnicas baseam-se no tamanho e número de micronúcleos (SARTO *et alii*, 1987), na identificação de cinetócoros por imunofluorescência (DEGRASSI & TANZARELLA, 1988; HENNIG *et alii*, 1988), na identificação de centrômeros por bandamento C, na medida da área ou do conteúdo de DNA dos micronúcleos (VANDERKERKEN *et alii*, 1989).

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 *et alii*, 1978a). Contudo, esse teste não é útil na definição da natureza das anomalias estruturais produzidas, pois não se pode distinguir micronúcleos resultantes de aberrações cromossômicas estruturais diferentes. Por isso, apesar das vantagens que oferece, o teste de micronúcleos não deve substituir a análise cromossômica, porque a observação das mudanças dos tipos de aberrações estruturais que se manifestam sob diferentes condições pode permitir conclusões importantes (COUNTRYMAN & HEDDLE, 1976).

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 outros rearranjos detectáveis ao nível de resolução do microscópio de luz. A capacidade dos agentes químicos em induzir tais anomalias denomina-se clastogenicidade.

CARRANO & NATARAJAN (1988), em artigo que trata da utilidade das técnicas citogenéticas para a monitorização populacional, relataram alguns dados resumidos a seguir, que destacam a importância da análise de aberrações cromossômicas como um instrumento para avaliar os riscos da exposição ocupacional a agentes mutagênicos. A frequência de aberrações cromossômicas estruturais ou numéricas em recém-nascidos é da ordem de 6 por 1.000. Todavia, a análise de abortos humanos indica que cerca de 50% de todos os abortos espontâneos é cromossomicamente anômala. Outro dado importante é que populações expostas a radiação ionizante, como os sobreviventes da bomba atômica, ou a agentes genotóxicos, apresentam frequências aumentadas de aberrações cromossômicas em seus linfócitos. Além disso, muitos tipos de cânceres humanos estão associados com aberrações cromossômicas específicas ou não-específicas e inúmeras doenças hereditárias humanas, como a ataxia telangiectasia, a anemia de Fanconi e a síndrome de Bloom, estão associadas com frequências de aberrações cromossômicas e incidência de câncer elevadas.

A análise cromossômica permite também a identificação 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 no processamento do material para análise como, por exemplo, na hipotonização. Já as células hiperdiploides devem, muito provavelmente, originar-se em consequência de falha na disjunção dos cromossomos-filhos em uma divisão anterior, que podem ser provocadas por agentes que alteram as propriedades do fuso mitótico ou do centrômero.

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.

Uma das principais aplicações da análise de TCI tem sido a avaliação da atividade mutagênica. O primeiro trabalho em que os efeitos de um agente mutagênico foram relacionados com a frequência de TCI foi realizado por LATT (1974b), que detectou a capacidade da mitomicina C para aumentar a frequência de TCI em linfócitos humanos, mesmo em concentrações menores do que as necessárias para induzir quebras 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. Analisando os resultados de 216 artigos envolvendo 162 agentes químicos, LATT **et alii** (1981) os enquadraram em três classes, 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, a exposição ao composto com e sem ativação metabólica. Esses dados demonstraram o efeito dos agentes químicos sobre a frequência de TCI e confirmaram a utilidade da análise de TCI como um parâmetro para testar mutagenicidade de compostos químicos.

Outros autores (GEBHART, 1981; ABE & SASAKI, 1982; GULATI **et alii**, 1989) analisaram os efeitos de agentes químicos quanto à indução de TCI e de aberrações cromossômicas **in vitro** e encontraram um alto grau de concordância entre os resultados obtidos por esses dois parâmetros, reforçando a validade do uso do teste de TCI. 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%) mostravam 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 estabeleceram uma correlação positiva entre TCI



e carcinogenicidade, em 80% dos casos. Mais recentemente, GULATI **et alii** (1989) encontraram uma concordância entre os resultados obtidos por esses dois parâmetros em 21 agentes (78%) de um total de 27 testados. Desses 27 agentes, 17 eram carcinogênicos e apenas dois deles apresentaram resultados negativos para ambos os parâmetros citogenéticos.

Há um grau elevado de concordância entre as informações obtidas pela análise de TCI e de outros parâmetros utilizados na detecção de agentes mutagênicos. Esse fato, associado à verificação de que a combinação desse sistema com outros praticamente elimina os resultados falso-negativos e à constatação de 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, em função da discordância entre seus resultados e os de outros sistemas, em alguns casos, é recomendada sua utilização em conjunto com outros testes (GEBHART, 1981).

I.4. Objetivos.

A utilização de acaricidas é indispensável para o controle de ácaros em espécies animais e vegetais de interesse econômico. No entanto, a possível ação clastogênica ou citotóxica desses produtos coloca em risco o patrimônio genético de reprodutores obtidos por laborioso melhoramento genético. Tal risco estende-se à espécie humana, por via indireta, considerando que nem sempre são respeitados, pelos produtores, os prazos de carência para o abate de animais ou para a coleta de leite após o tratamento, bem como a época e a dose corretas de aplicação desses acaricidas nos cultivares.

Por isso, foi proposto neste estudo a investigação do potencial genotóxico do amitraz, o princípio ativo de carrapaticidas largamente usados no Brasil, em culturas de linfócitos humanos. Os objetivos visados e os parâmetros empregados na sua avaliação foram: (a) determinação da intensidade da resposta ao estímulo mitogênico da fito-hemaglutinina, por meio do índice mitótico; (b) identificação da potencialidade clastogênica, pelas frequências de núcleos associados a micronúcleos e de metáfases portadoras de aberrações cromossômicas estruturais e numéricas; (c) avaliação da indução de

II. MATERIAL E METODOS

II.1. Doadores.

Dezesseis indivíduos do sexo masculino aparentemente saudáveis, de uma faixa etária variável de 18 a 28 anos, foram selecionados para o estudo do efeito de várias concentrações de amitraz em linfócitos humanos cultivados. Em entrevista inicial, os doadores relataram não terem sido expostos a raios X, usado medicamentos ou manifestado doenças de natureza viral nos seis meses que antecederam a colheita do sangue. Nenhum deles era fumante ou consumidor de bebidas alcóolicas. Dois doadores desempenhavam atividades administrativas e os demais eram estudantes, não sujeitos à exposição rotineira a substâncias tóxicas.

II.2. Amitraz técnico e concentrações utilizadas.

O amitraz técnico (AMZ), N-metilbis (2,4-xililiminometil) amina(IUPAC), foi fornecido pela Coopers do Brasil S.A. (Cotia-SP), com grau de pureza superior a 95%. Anteriormente designado por triazida ou azaform, o amitraz é também conhecido pelas sinônimas N'-(2,4-dimetilfenil)-N-[(2,4-dimetilfenil)imino]metil]-N-metilmetaniminamida (CA 33089-61-1); NN-di-(2,4-xililiminometil) metil-amina; 2-metil-1,3-di-(2,4-xililimino)-2-azapropana; e 1,5-di-(2,4-dimetilfenil)-3-metil-1,3,5-triazapenta-1,4-dieno (Boots Company Limited, código BTS 27419). Sua fórmula molecular é $C_{19}H_{23}N_3$ (PM=293). As impurezas encontradas no amitraz técnico são N-2,4-dimetilfenil-N-metilformamidina (composto **II**); 2,4-dimetilformanilida (composto **III**); 2,4-dimetilanilina (composto **IV**); N,N'-bis-(2,4-dimetilfenil)formamidina; 1,3,5-tri-(2,4-dimetilfenil)-1,3,5-triazapenta-1,4-diena; N,N'-bis-2,4-dimetilfenil-N-metilformamidina; e etil-N-2,4-dimetilfenil formamidato. Alguns desses compostos (**II**, **III** e **IV**) também são produtos da degradação do AMZ *in vivo*.

Inicialmente foram investigados os efeitos de três concentrações de amitraz técnico por mililitro de meio de cultura, com base em informações obtidas na literatura: 0,02, 0,2 e 1µg. Em virtude dos resultados obtidos com essas concentrações, vários testes foram realizados com as concentrações de 10, 20, 25, 40, 50, 60, 80, 100 e 150µg de AMZ por ml objetivando-se escolher três concentrações para o estudo citogenético, em função da sua citotoxicidade.

Desse modo, foram escolhidas as concentrações de 25, 50 e 100 µg de AMZ por ml para estudo em culturas de dez indivíduos.

Cada uma das soluções testadas de AMZ foi preparada de forma a conter a dose referida de AMZ em determinado volume de acetona. Esse solvente foi escolhido por permitir uma dissolução melhor do composto e aumentar a sua solubilidade em meio de cultura, tendo sido empregado na concentração de 0,5 µl/ml de meio de cultura.

II.3. Ensaios.

Foram realizados dezesseis ensaios, cada um deles codificado por um algarismo romano correspondente ao do doador do material utilizado para a sua execução. Na Tabela 9 encontram-se as características de cada um dos dezesseis ensaios relativas aos grupos de tratamento dos quais foram constituídos, do número de frascos e dos parâmetros que foram analisados. No Ensaio **I** foram testados cinco grupos de tratamento: um controle (**Co**), um controle com 0,5 µl de acetona por mililitro de meio de cultura (**CoAc**) e as seguintes concentrações de AMZ por mililitro de meio de cultura: 1 µg (**A-1**), 0,2 µg (**A-0,2**) e 0,02 µg (**A-0,02**). O grupo **A-1** tem a concentração equivalente à solubilidade máxima do AMZ em solução aquosa (WORTHING, 1983) e o grupo **A-0,02** corresponde à concentração detectada em carne de bovinos tratados com AMZ (MCDOUGALL *et alii*, 1979). No Ensaio **II** foram montados os mesmos grupos de tratamento do Ensaio **I**, com exceção do grupo **A-0,2**, tendo sido também pesquisada a frequência de TCI.

Em face dos resultados obtidos nos Ensaios **I** e **II**, concentrações maiores foram testadas nos ensaios seguintes. Foram montados seis grupos de tratamento no Ensaio **III**: **Co**, **A-100** (100 µg/ml), **A-80** (80 µg/ml), **A-40** (40 µg/ml), **A-20** (20 µg/ml) e **A-10** (10 µg/ml); quatro grupos de tratamento no Ensaio **IV**: **Co**, **A-80**, **A-60** (60 µg/ml) e **A-40**; quatro grupos de tratamento no Ensaio **V**: **Co**, **CoAc**, **A-80** e **A-40**; seis grupos de tratamento no Ensaio **VI**: **Co**, **CoAc**, **A-150** (150 µg/ml), **A-100**, **A-50** (50 µg/ml) e **A-25** (25 µg/ml); e cinco grupos de tratamento nos Ensaios **VII** a **XVI**: **Controle**, **CoAc**, **A-100**, **A-50** e **A-25**. Concentrações de AMZ superiores a sua solubilidade máxima em água (1 µg/ml) puderam ser analisadas devido à dissolução prévia desse agente em acetona.

Tabela 9. Caracterização dos ensaios.

Ensaios	Grupos de tratamento	Número de frascos		Parâmetros analisados*
		Sem 5-BrdU	Com 5-BrdU	
I	Co; CoAc; A-1; A-0,2; A-0,02	2		IM, MN, AC
II	Co; CoAc; A-1; A-0,02	1	2	IM, MN, AC, TCI
III	Co; A-100; A-80; A-40; A-20; A-10	1		IM
IV	Co; A-80; A-60; A-40	1		IM
V	Co; CoAc; A-80; A-40		1	IM
VI	Co; CoAc; A-150; A-100; A-50; A-25		1	IM
VII a XVI	Co; CoAc; A-100; A-50; A-25	1	2	IM, MN, AC, TCI

* IM: índice mitótico; MN: teste de micronúcleos; AC: frequências de alterações cromossômicas estruturais e numéricas; TCI: frequências de trocas entre cromátides-irmãs.

II.4. Culturas de linfócitos e preparações cromossômicas.

Foram colhidos 10ml (Ensaio **I** a **VI**) ou 20ml (Ensaio **VII** a **XVI**) de sangue periférico de cada doador, com seringa descartável heparinizada. Os linfócitos foram cultivados segundo técnica modificada de MOORHEAD **et alii** (1960), em meio de cultura RPMI 1640 (Difco), enriquecido com 20% de soro humano AB filtrado. O volume final contido em cada frasco de cultura constituiu-se de 5 ml do meio completo, 0,2 ml de solução de fito-hemaglutinina (concentração final de 0,36 mg/ml de meio), fornecida pela Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - SP, e cerca de 6 gotas de plasma sanguíneo rico em linfócitos.

Nos frascos em que se pretendia a marcação diferencial das cromátides-irmãs, que permite a avaliação da frequência de trocas entre elas, adicionou-se solução de 5-bromodesoxiuridina (5-BrdU - Sigma), em concentração final de $3,25 \cdot 10^{-5}$ M. Esses frascos foram previamente envoltos com papel alumínio, para impedir a fotólise das cadeias de DNA que incorporam a 5-BrdU, o que eleva a frequência de trocas entre cromátides-irmãs (WOLFF & PERRY, 1974). As culturas foram incubadas em estufa a 37°C por 72 horas em todos os ensaios, com exceção das culturas não-tratadas com 5-BrdU dos Ensaios **VII** e **XVI**, que foram incubadas por 48 horas.

Aproximadamente 60 minutos antes da colheita adicionou-se, a cada frasco, 0,1 ml de solução de colquicina Houdé a $4 \cdot 10^{-5}$ M, para a interrupção da divisão celular. A seguir, processaram-se a hipotonização com KCl a 0,075 M, a fixação do material com metanol - acético 3:1 e a preparação das lâminas. Depois de secas à temperatura ambiente, tanto as lâminas das culturas tratadas com 5-BrdU como as lâminas das culturas não-tratadas foram aquecidas a 90-95°C por 20 minutos. As lâminas provenientes dos frascos não-tratados com a 5-BrdU foram hidrolisadas com HCl 1 N por 7 minutos, a 60°C, e coradas com solução tamponada de Giemsa (Merck) a 2%, pH 6,8, por 5 minutos.

A coloração diferencial das cromátides seguiu a técnica proposta por KORENBERG & FREEDLENDER (1974), com modificações. As lâminas provenientes dos frascos tratados com 5-BrdU foram cobertas com um filme de bisbenzimidaz (Hoechst 33258, Sigma) preparado em solução fisiológica de Hanks à concentração de $0,94 \cdot 10^{-7}$ M e submetidas à luz UV (Philips UV, 15 W) a uma distância de 12 cm, por 12

minutos. A seguir, essas lâminas foram aquecidas a temperaturas variáveis de 87° a 89° C, em solução de NaH_2PO_4 1 M (pH 8,1 a 8,3), por 10 segundos, lavadas rapidamente em água destilada e coradas em solução aquosa de Giemsa a 2%, por 5 minutos. Todas as lâminas foram codificadas para análise citogenética em teste cego, ou seja, para que o pesquisador responsável pela análise não identificasse a procedência das lâminas.

As diversas culturas celulares de cada doador 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 de que as alíquotas a serem tratadas fossem separadas. Após o tratamento das alíquotas com o AMZ na concentração desejada, os frascos das culturas foram separados e incubados em estufa a 37° C. O número de frascos por grupo de tratamento variou com o ensaio (Tabela 9): dois frascos no Ensaio **I**, três frascos nos Ensaio **II** e **VII** a **XVI**, sendo que dois deles foram tratados com 5-BrdU, e apenas um frasco nos Ensaio **III** a **VI**, sendo que nos Ensaio **V** e **VI** esse foi tratado com 5-BrdU.

Para a realização dos Ensaio **VII** a **XVI**, um único volume de meio de cultura completo (meio RPMI 1640, enriquecido com 20% de soro humano AB) foi preparado e posteriormente separado em dez alíquotas e congelado a -20° C. Assim como foi feito em relação ao meio de cultura, as demais substâncias utilizadas para o desenvolvimento e colheita das culturas celulares desses dez ensaios também eram provenientes do mesmo lote. Decorreram-se quatro meses entre a realização dos ensaios **VII** e **XVI**.

II.5. Análise citogenética.

O material foi analisado em relação à resposta ao índice mitótico em todos os ensaios, à indução de micronúcleos e alterações cromossômicas estruturais e numéricas nos Ensaio **I**, **II** e **VII** a **XVI**, e à frequência de TCI nos Ensaio **II** e **VII** a **XVI** (Tabela 9).

O índice mitótico foi considerado como a frequência de núcleos em divisão, ou seja, núcleos em prófase ou metáfase nos quais os cromossomos aparecem como filamentos identificáveis, em relação ao total de núcleos. O índice mitótico relativo foi tomado como a relação entre o índice mitótico do grupo tratado com AMZ e o de seu controle. Tanto para a estimativa do índice mitótico como

para o teste de micronúcleos foram analisados 2.000 núcleos por grupo de tratamento. Nos grupos **Co**, **A-100**, **A-40** e **A-10** do Ensaio **III** e nos grupos **Co** e **A-40** do Ensaio **IV** o número de núcleos utilizados para o cálculo do índice mitótico foi aumentado para 10.000, e nos grupos de tratamento do Ensaio **VI** para 4.000. Esse aumento na amostragem objetivou verificar se as amostras de 2.000 núcleos eram, de fato, representativas da população de núcleos. A introdução de 5-BrdU nos frascos dos Ensaios **V** e **VI** teve por objetivo investigar se a ação do AMZ, avaliada pelo índice mitótico, era alterada na presença da 5-BrdU.

O teste de micronúcleos foi desenvolvido segundo descrição de COUNTRYMAN & HEDDLE (1976) e HEDDLE *et alii* (1978b). Foram considerados apenas os micronúcleos: (a) com diâmetro inferior a um terço do núcleo principal, ou seja, do linfoblasto; (b) não refringentes, para excluir pequenas partículas coradas; (c) com coloração igual ou mais clara que a do linfoblasto, para excluir grandes partículas coradas; (d) em número menor ou igual a três ao redor de um mesmo núcleo; e (e) não ligados ao núcleo principal, porém estando a uma distância máxima equivalente a quatro vezes o diâmetro desse.

A ocorrência de aberrações cromossômicas foi pesquisada em 100 metáfases consideradas tecnicamente de boa qualidade para análise, por grupo de tratamento. As aberrações cromossômicas estruturais foram classificadas de acordo com o recomendado pelo International System for Human Cytogenetic Nomenclature (ISCN, 1978). As anomalias foram consideradas quebras quando um segmento cromossômico estava separado do restante por uma distância superior à largura da cromátide e deslocado em relação ao cromossomo, ou falhas quando a separação não ultrapassava a distância equivalente à largura da cromátide e o segmento apresentava-se em alinhamento com o material cromossômico. Além disso, os eventos foram considerados cromatídicos quando afetavam apenas uma das cromátides, e cromossômicos quando ambas as cromátides eram afetadas. Designaram-se cromossomos marcadores aqueles que não se enquadravam em um dos grupos cromossômicos normais e foram identificados como deficientes os cromossomos com braços menores que o esperado. Os segmentos cromossômicos com ausência de centrômero foram considerados fragmentos acêntricos. Denominaram-se de figuras quadrirradiais as figuras com

quatro braços cromossômicos em forma de cruz, resultantes de quebras cromatídicas e subsequente rearranjo do material. Entre as anomalias numéricas, foram consideradas apenas as hiperdiploidias, sendo identificados os grupos cromossômicos com elementos em excesso.

A capacidade de indução de trocas entre cromátides-irmãs pelo AMZ foi investigada em células de segunda geração cultivadas na presença de 5-BrdU, nas quais as cromátides-irmãs de cada cromossomo diferem entre si pela intensidade de coloração, de tal forma que as trocas ocorridas entre elas podiam ser visualizadas. De cada frasco foram analisadas 25 metáfases com 46 cromossomos, totalizando 50 metáfases por grupo de tratamento. As trocas ao nível do centrômero não foram consideradas, as trocas cromatídicas terminais foram computadas como uma TCI e as intersticiais como duas TCI.

Toda a análise citogenética foi feita em microscópio Carl Zeiss, modelo Jenamed 2. Para documentação de eventos anômalos encontrados ou para esclarecimento de dúvidas as células foram fotografadas em microscópio Carl Zeiss, modelo Standard WL, com equipamento fotográfico MC 36, usando-se filme Panatomic X 32 ASA ou Kodalith Orthofilm 6556 type 3 (Kodak). Os negativos foram revelados em solução Kodak D-72 por 2 minutos e meio, tratados com solução fixadora ácida (Kodak) por 10 minutos e copiados em papel fotográfico Kodabrome F2 ou F3.

II.6. Análise estatística.

O teste de igualdade de proporções foi utilizado para comparar as frequências de células em divisão, de núcleos com micronúcleos e de metáfases com anomalias cromossômicas entre os grupos de tratamento nos Ensaio I e II. Esse teste também foi aplicado para a comparação de frequências de células com diferentes tipos de eventos anômalos nos grupos de tratamento dos Ensaio VII a XVI. A análise de variância foi empregada para verificação da homogeneidade entre os diferentes grupos de tratamento, com relação às frequências de trocas entre cromátides-irmãs no Ensaio II, e com relação às frequências de células em divisão, de núcleos com micronúcleos, de metáfases com anomalias cromossômicas e de trocas entre cromátides-irmãs, nos Ensaio VII a XVI. Nas situações com valores de F significativos foram feitas comparações múltiplas de médias com a diferença honestamente significativa de Tukey.

Para a realização desses testes, as frequências de células em divisão, de núcleos com micronúcleos e de metáfases com anomalias cromossômicas foram submetidas à transformação arco seno da raiz quadrada e as frequências de trocas entre cromátides-irmãs sofreram transformação raiz quadrada, procedimento esse que melhora a aderência dos dados a uma distribuição normal.

O teste Z foi usado para comparação das frequências de quebras e falhas e de eventos cromossômicos e cromatídicos e o qui-quadrado para testar a casualidade da distribuição de quebras e falhas e de trocas entre cromátides-irmãs ao longo dos cromossomos, nos grupos Co, CoAc, A-100, A-50 e A-25 dos Ensaios VII a XVI. O coeficiente de correlação linear de Pearson foi usado para detectar possíveis associações entre os diferentes parâmetros citogenéticos utilizados para a análise dos grupos Co, CoAc, A-100, A-50 e A-25 dos Ensaios VII a XVI e o teste t de Student para determinar a significância de r.

Os testes estatísticos foram aplicados seguindo-se as recomendações de NETER & WASSERMAN (1979), FLEISS (1981) e PERES & SALDIVA (1982). O nível crítico de rejeição da hipótese de nulidade foi fixado em 5%.

Os testes estatísticos foram aplicados seguindo-se as recomendações de NETER & WASSERMAN (1979), FLEISS (1981) e PERES & SALDIVA (1982). O nível crítico de rejeição da hipótese de nulidade foi fixado em 5%.

Na Tabela 14 são apresentadas as frequências de ICI em 50 metáfases analisadas de cada grupo de tratamento do Estudo II e na Tabela 15 os resultados da análise de variância para comparação dessas frequências. As frequências de ICI dos diferentes grupos de tratamento não diferiram significativamente entre si, variando de $6,19 \pm 0,42$ em A-1 a $7,50 \pm 0,53$ em CoAc.

Em face dos resultados negativos obtidos com as concentrações testadas nos Ensaios I e II, decidiu-se investigar o poten-

III. RESULTADOS

III.1. Testes para escolha das concentrações de amitraz a terem seus efeitos analisados: Ensaios I a VI.

Na Tabela 10 encontram-se as frequências de células em divisão, o índice mitótico (IM), o índice mitótico relativo (IMR) e as frequências de núcleos com micronúcleos (MN) de cada grupo de tratamento dos Ensaios I e II. Com relação ao IM, os grupos tratados com AMZ (A-1, A-0,2 e A-0,02) apresentaram índices maiores que o Co no Ensaio I e menores no Ensaio II. As frequências de micronúcleos nos grupos de tratamento do Ensaio I foram semelhantes e, no Ensaio II, as frequências de micronúcleos nos grupos CoAc, A-1 e A-0,02 foram maiores que a do Co, porém não diferiram entre si. Todavia, essas diferenças não foram significativas, conforme se verifica dos resultados da análise estatística apresentados na Tabela 11.

As frequências de anomalias cromossômicas em 100 células de cada grupo de tratamento dos Ensaios I e II são mostradas na Tabela 12. Nos Ensaios I e II, a maioria das metáfases com anomalias apresentou um único evento por célula; com dois eventos havia três células no grupo Co, cinco em CoAc, dois em A-1, um em A-0,2 e um em A-0,02, com três anomalias havia uma metáfase em A-0,02 e com quatro anomalias havia uma metáfase em CoAc. Os tipos de eventos observados foram quebras, falhas, cromossomos com deficiência e fragmentos acêntricos. Quebras e falhas foram mais frequentes que os outros tipos de eventos anômalos. Os eventos cromatídicos foram mais frequentes que os cromossômicos. Não foram encontradas metáfases hiperdiplóides. Em ambos os ensaios, os grupos tratados com AMZ e controles não diferiram significativamente entre si em relação às frequências médias de metáfases com anomalias cromossômicas (Tabela 13).

Na Tabela 14 são apresentadas as frequências de TCI em 50 metáfases analisadas de cada grupo de tratamento do Ensaio II e na Tabela 15 os resultados da análise de variância para comparação dessas frequências. As frequências de TCI dos diferentes grupos de tratamento não diferiram significativamente entre si, variando de $6,10 \pm 0,42$ em A-1 a $7,58 \pm 0,53$ em CoAc.

Em face dos resultados negativos obtidos com as concentrações testadas nos Ensaios I e II, decidiu-se investigar o poten-



cial genotóxico do AMZ em outras concentrações: uma capaz de reduzir o IM em torno de 50% e duas mais baixas, com concentrações correspondentes a 50 e 25% da concentração mais alta. Para a escolha dessas concentrações, a ação citotóxica de várias concentrações de AMZ foi avaliada nos Ensaio **III** a **VI**.

Na Tabela 16 são mostrados o IM e o IMR de cada grupo de tratamento dos Ensaio **III** a **VI** e na Tabela 17 os resultados da análise estatística desses dados. Em todos esses ensaios, os grupos de tratamento diferiram significativamente entre si. De modo geral, nas culturas sem tratamento com 5-BrdU (Ensaio **III** e **IV**), os grupos **A-100**, **A-80** e **A-60** apresentaram um IM equivalente a 50% ao do **Co** e o IM dos grupos **A-40**, **A-20** e **A-10** foram semelhantes ao do **Co**. As culturas celulares dos Ensaio **V** e **VI** foi adicionada a 5-BrdU. Não se observou o efeito da 5-BrdU sobre o IM dos grupos **A-100**, **A-80** e **A-60**, porém houve uma redução do IM do grupo **A-40** no Ensaio **V** em relação aos anteriores (**III** e **IV**). Além disso, houve discordância entre os resultados de IM do grupo **CoAc** nos Ensaio **V** (IMR=61,9) e **VI** (IMR=133,3) e o IM do grupo **A-50** (IMR=116,7) foi superior ao IM dos grupos **A-40** (IMR=50,0) e **A-25** (IMR=50,0). O IM do grupo **A-150** foi o menor observado (IMR=33,3). Nesse grupo de tratamento ocorreu saturação do AMZ perceptível a olho nú. Como consequência, a concentração estimada de 150µg/ml de meio de cultura era, de fato, uma superestimativa da concentração real.

O número de núcleos considerado para o cálculo do IM foi aumentado de 2.000 para 10.000 nos grupos **Co**, **A-100**, **A-40** e **A-10** do Ensaio **III** e nos grupos **Co** e **A-40** do Ensaio **IV**, e para 4.000 núcleos em todos os grupos de tratamento do Ensaio **VI**, com o objetivo de avaliar se uma amostra de 2.000 núcleos era representativa da população celular. O aumento no tamanho da amostra não alterou de forma significativa o IMR dos diferentes grupos de tratamento nos Ensaio **III** (qui-quadrado=0,01; GL=3; $P>0,05$), **IV** (qui-quadrado=0,005; GL=1; $P>0,05$) e **VI** (qui-quadrado=0,05; GL=5; $P>0,05$). Em função dos resultados obtidos nos Ensaio **III** a **VI**, foram selecionadas as concentrações de 100, 50 e 25µg/ml para o desenvolvimento do estudo citogenético.

Tabela 10. Índice mitótico (IM), índice mitótico relativo (IMR) e frequências de núcleos com micronúcleos (MN) em 2.000 células analisadas por grupo de tratamento (GT) nos Ensaio I e II. FA: frequência absoluta.

Ensaio	GT	Células em divisão	IM (%)	IMR (%)	MN	
					FA	%
I	Co	41	20	100,0	7	0,35
	CoAc	53	26	130,0	8	0,40
	A-1	57	28	140,0	9	0,45
	A-0,2	65	32	160,0	12	0,60
	A-0,02	52	26	130,0	10	0,50
II	Co	74	37	100,0	2	0,10
	CoAc	51	26	70,3	10	0,50
	A-1	69	34	91,9	9	0,45
	A-0,02	55	28	75,7	10	0,50

Tabela 11. Valores do teste de igualdade de proporções para comparação de células em divisão e de núcleos com micronúcleos (MN) entre os grupos de tratamento dos Ensaio I (GL=4) e II (GL=3). NS: $P > 0,05$.

Ensaio	IM	MN
I	5,59 NS	1,62 NS
II	6,02 NS	8,50 NS

Tabela 12. Frequências de eventos anômalos e de metáfases com anomalias estruturais em 100 metáfases dos grupos de tratamento (GT) dos Ensaios I e II. Q: quebras; F: falhas; CS: cromossômicas; CT: cromatídicas; Ace: fragmentos acêntricos; Del: cromossomos com deficiência.

Ensaio	GT	Metáfases anômalas			Eventos anômalos						
		Q+F	Ace+Del	Total	Q		F		Ace	Del	Total
					CS	CT	CS	CT			
I	Controle	9	2	10	2	4	1	3	2		12
	CoAc	11	2	12	1	4	2	5	1	1	14
	A-1	8	1	9	1	3	2	2	1		9
	A-0,2	5	1	6	2	2	1	1		1	7
	A-0,02	5	3	8	1	1		3	2	1	8
II	Controle	12	1	13	5	2	1	5		1	14
	CoAc	13		13	5	6	1	8			20
	A-1	20	1	21	5	7		10		1	23
	A-0,02	11	1	11	3	5	1	4		1	14

Tabela 13. Valores do teste de igualdade de proporções para comparação das frequências médias de metáfases com quebras e falhas, com outros tipos de anomalias estruturais e de frequências totais de metáfases com anomalias entre os grupos de tratamento dos Ensaio I (GL=4) e II (GL=3). NS: $P > 0,05$.

Ensaio	Metáfases anômalas com		
	Q+F	Ace+Del	Total
I	3,87 NS	1,58 NS	2,44 NS
II	4,15 NS	1,01 NS	4,19 NS

Tabela 14. Frequência de TCI em 50 metáfases analisadas por grupo de tratamento no Ensaio II.

Grupo de tratamento	TCI	TCI/célula			
		$\bar{X}$	$\pm$	S $\bar{X}$	Mínimo Máximo
Controle	370	7,40	0,55		2 25
CoAc	379	7,58	0,53		2 20
A-1	305	6,10	0,42		0 11
A-0,02	372	7,44	0,36		1 13

Tabela 15. Análise de variância para comparação das frequências transformadas de TCI entre os grupos de tratamento (GT) do Ensaio II. **NS: P > 0,05.**

FV	GL	SQ	QM	F
GT	3	2,99	1,00	2,47 NS
Resíduo	196	79,22	0,40	
Total	199	82,21		

*: culturas com 5-BrdU

Tabela 16. Índice mitótico (IM) e índice mitótico relativo (IMR) nos grupos de tratamento (GT) dos Ensaios **III** a **VI**.

Ensaio	GT	Número de células		IM (%)	IMR (%)
		Analizadas	Em divisão		
III	Co	2.000	83	42	100,0
		10.000	375	38	100,0
	A-100	2.000	46	23	54,8
		10.000	269	27	71,0
	A-80	2.000	39	20	47,6
	A-40	2.000	90	45	107,1
		10.000	467	47	123,7
	A-20	2.000	91	46	109,5
	A-10	2.000	100	50	119,0
		10.000	431	43	113,2
IV	Co	2.000	40	20	100,0
		10.000	216	22	100,0
	A-80	2.000	21	10	50,0
	A-60	2.000	22	11	55,0
	A-40	2.000	40	20	100,0
		10.000	166	17	77,3
V *	Co	2.000	85	42	100,0
	CoAc	2.000	53	26	61,9
	A-80	2.000	42	21	50,0
	A-40	2.000	37	18	42,9
VI *	Co	2.000	13	6	100,0
		4.000	25	6	100,0
	CoAc	2.000	15	8	133,3
		4.000	28	7	116,7
	A-150	2.000	3	2	33,3
		4.000	7	2	33,3
	A-100	2.000	8	4	66,7
		4.000	13	3	50,0
	A-50	2.000	14	7	116,7
		4.000	25	6	100,0
	A-25	2.000	6	3	50,0
		4.000	15	4	66,7

*: culturas com 5-BrdU

Tabela 17. Valores do teste de igualdade de proporções para comparação das frequências médias de células em divisão nos grupos de tratamento dos Ensaios **III** a **VI**. *: $P < 0,05$.

Ensaio	Número de células analisadas	GL	Estimativa
III	2.000	5	45,93 *
	10.000	5	60,35 *
IV	2.000	3	11,30 *
	10.000	3	5,73 *
V	2.000	3	26,45 *
VI	2.000	5	12,19 *
	4.000	5	18,60 *

III.2. Avaliação dos efeitos do amitraz pelo índice mitótico e pela frequência de micronúcleos nos Ensaios VII a XVI.

Na Tabela 18 encontram-se o IM, o IMR e as frequências de núcleos com micronúcleos (MN) dos Ensaios VII a XVI e na Tabela 19 as somas dos resultados desses dez ensaios. A cultura celular do grupo **A-100** do Ensaio **X** não cresceu. Foram encontradas diferenças significativas entre doadores e entre grupos de tratamento, com relação às frequências médias transformadas de células em divisão e com relação às frequências médias transformadas de MN (Tabelas 20, 21 e 22). Os seguintes grupos de doadores não diferiram entre si com relação ao IM: doadores **XI**, **IX** e **X**, doadores **IX**, **X**, **XIV** e **XV**, doadores **X**, **XIV**, **XV**, **XII** e **XVI**, doadores **XIV**, **XV**, **XII**, **XVI** e **XIII** e doadores **XII**, **XVI**, **XIII**, **VII** e **VIII**. Não diferiram entre si com relação às frequências de MN os doadores **XIV**, **XII**, **XI**, **IX** e **XV**, os doadores **XI**, **IX**, **XV** e **XVI** e os doadores **XVI**, **VII**, **XIII** e **VIII**. Os grupos **A-100** (IMR=50,0) e **A-50** (IMR=68,8) e os grupos **A-50**, **A-25** (IMR=81,2), **CoAc** (IMR=93,8) e **Co** (IMR=100,0) não diferiram entre si com relação ao IM e os grupos **Co** (0,98%), **CoAc** (1,02%), **A-25** (1,16%) e **A-100** (1,17%) e os grupos **A-25**, **A-100** e **A-50** (1,36%) não diferiram entre si com relação às frequências de MN. Portanto, diferiram de ambos os controles somente o grupo **A-100** para IM e o grupo **A-50** para micronúcleos.

Cada micronúcleo geralmente está associado a um núcleo principal, mas em raros casos havia dois micronúcleos associados a um único núcleo (Figura 2). Foram observadas também situações nas quais o micronúcleo estava ligado ao núcleo principal por uma ponte de cromatina (Figura 2d e 2e). Esses casos, de acordo com os critérios considerados para análise, como já referido, não foram computados para o cálculo das frequências de MN.

Tabela 18. Índice mitótico (IM), índice mitótico relativo (IMR) e frequências absolutas (FA) e percentuais de núcleos com micronúcleos (MN) em 2.000 células analisadas por grupo de tratamento nos Ensaios VII a XVI.

Ensaio	Grupo de tratamento	Número de células em divisão	IM (%)	IMR (%)	MN	
					FA	%
VII	Co	37	18	100,0	29	1,45
	CoAc	53	26	144,4	26	1,30
	A-100	29	14	77,8	31	1,55
	A-50	42	21	116,7	29	1,45
	A-25	49	24	133,3	28	1,40
VIII	Co	47	24	100,0	25	1,25
	CoAc	62	31	129,2	33	1,65
	A-100	37	18	75,0	29	1,45
	A-50	39	20	83,3	49	2,45
	A-25	44	22	91,7	35	1,75
IX	Co	14	7	100,0	13	0,65
	CoAc	3	2	28,6	19	0,95
	A-100	4	2	28,6	25	1,25
	A-50	7	4	57,1	18	0,90
	A-25	9	4	71,4	18	0,90
X	Co	20	10	100,0	19	0,95
	CoAc	36	18	180,0	16	0,80
	A-50	12	6	60,0	31	1,55
	A-25	17	8	90,0	25	1,25
XI	Co	15	8	100,0	14	0,70
	CoAc	8	4	50,0	16	0,80
	A-100	0	0	0,0	21	1,05
	A-50	1	1	12,5	21	1,05
	A-25	2	1	12,5	16	0,80
XII	Co	47	24	100,0	16	0,80
	CoAc	42	21	87,5	17	0,85
	A-100	16	8	33,3	15	0,75
	A-50	26	13	54,2	19	0,95
	A-25	14	7	29,2	12	0,60
XIII	Co	64	32	100,0	36	1,80
	CoAc	32	16	50,0	24	1,20
	A-100	26	13	40,6	25	1,25
	A-50	28	14	43,8	42	2,10
	A-25	32	16	50,0	37	1,85
XIV	Co	16	8	100,0	9	0,45
	CoAc	13	6	75,0	13	0,65
	A-100	9	4	50,0	15	0,75
	A-50	18	9	112,5	15	0,75
	A-25	31	16	200,0	11	0,55
XV	Co	23	12	100,0	16	0,80
	CoAc	18	9	75,0	14	0,70
	A-100	11	6	50,0	21	1,05
	A-50	18	9	75,0	23	1,15
	A-25	18	9	75,0	24	1,20
XVI	Co	31	16	100,0	20	1,00
	CoAc	24	12	75,0	27	1,35
	A-100	17	8	50,0	28	1,40
	A-50	33	16	100,0	25	1,25
	A-25	38	19	118,8	27	1,35

Tabela 20. Análise de variância para comparação das frequências médias transformadas de células em divisão entre quadros e entre grupos de tratamento (GT) nos Ensaio VII a XVI. * P < 0,05.

FV	GL	SS	QM	F
Quadros	7	0,0920778	0,00337044	12,94 *
GT	4	0,01312835	0,00328214	3,46 *
Resíduo	36	0,01030377	0,00028624	
Total	47	0,09550994		

Tabela 19. Índice mitótico (IM), índice mitótico relativo (IMR) e frequências de núcleos com micronúcleos (MN) em cada um dos grupos de tratamento (GT), somados os Ensaio VII a XVI.

GT	Células analisadas	Número de células em divisão	IM (%)	IMR (%)	MN	
					FA	%
Co	20.000	314	16	100,0	197	0,98
CoAc	20.000	291	15	93,8	205	1,02
A-100	18.000	149	8	50,0	210	1,17
A-50	20.000	224	11	68,8	272	1,36
A-25	20.000	254	13	81,2	233	1,16

XI IX X XIV XV XII XVI XIII VII VIII

GT A-100 A-50 A-25 CoAc Co

MN Quadros XIV XII XI IX XV XVI VII XIII VIII

GT Co CoAc A-25 A-100 A-50

Tabela 20. Análise de variância para comparação das frequências médias transformadas de células em divisão entre doadores e entre grupos de tratamento (GT) nos Ensaios VII a XVI. *: $P < 0,05$.

FV	GL	SQ	QM	F
Doadores	9	0,05920772	0,00657864	12,94 *
GT	4	0,01312855	0,00328214	6,46 *
Resíduo	36	0,01830257	0,00050840	
Total	49	0,09063884		

Tabela 21. Análise de variância para comparação das frequências médias transformadas de núcleos com micronúcleos entre doadores e entre grupos de tratamento (GT) nos Ensaios VII a XVI. *: $P < 0,05$.

FV	GL	SQ	QM	F
Doadores	9	0,01298792	0,00144310	16,36 *
GT	4	0,00183093	0,00045773	5,19 *
Resíduo	36	0,00317595	0,00008822	
Total	49	0,01799479		

Tabela 22. Comparações múltiplas de Tukey das frequências médias transformadas de células em divisão (IM) e de núcleos com micronúcleos (MN) entre doadores e entre grupos de tratamento (GT) nos Ensaios VII a XVI. Os doadores ou grupos de tratamento ligados por barra não diferiram entre si.

Parâmetro	Fonte de Variação	Comparações
IM	Doadores	XI IX X XIV XV XII XVI XIII VII VIII
	GT	A-100 A-50 A-25 CoAc Co
MN	Doadores	XIV XII XI IX XV XVI VII XIII VIII
	GT	Co CoAc A-25 A-100 A-50

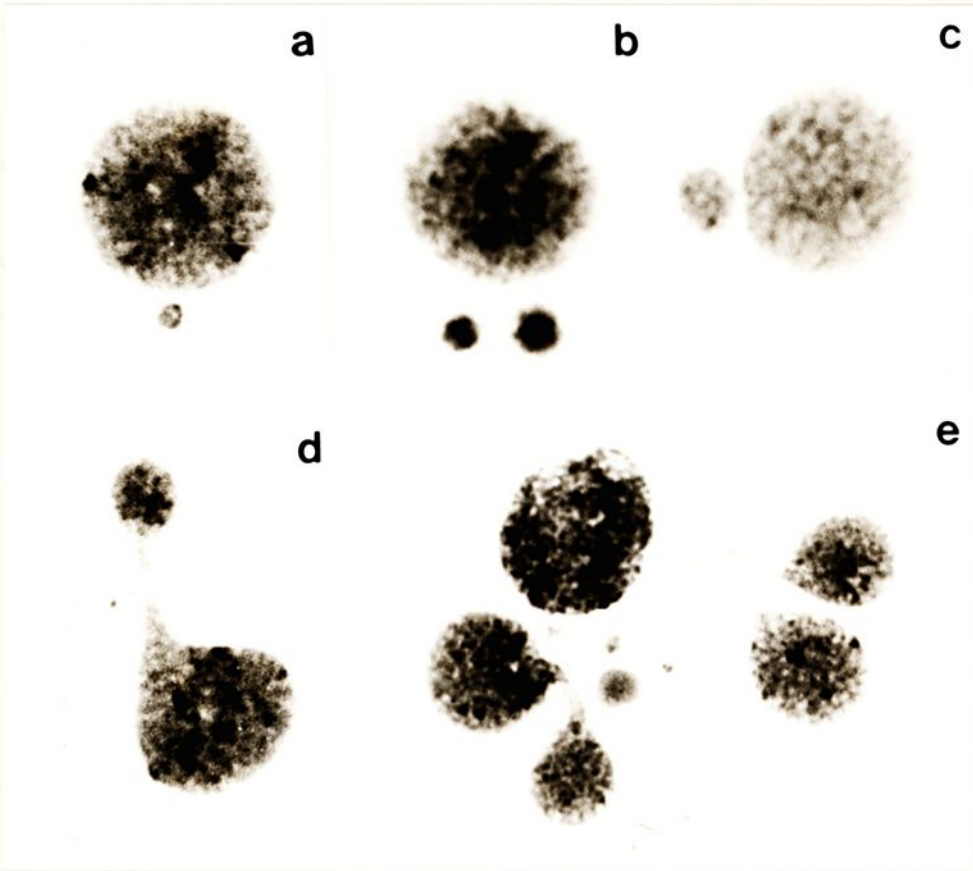


Figura 2. Núcleo principal com um ou dois micronúcleos (a-c); núcleos ligados a micronúcleos por pontes de cromatina (d e e).

III.3. Avaliação dos efeitos do amitraz pela frequência de anomalias cromossômicas nos Ensaios VII a XVI.

As frequências de metáfases com anomalias cromossômicas em cada grupo de tratamento dos Ensaios VII a XVI são mostradas na Tabela 23 e as somas dos resultados por grupo de tratamento desses dez ensaios na Tabela 24. A amostra foi de 100 metáfases por grupo de tratamento, com exceção dos grupos A-100 e A-50 do Ensaio XI, cujos baixos IM somente permitiram a análise de 30 e 29 metáfases, respectivamente. Além disso, a cultura celular no grupo A-100 no Ensaio X não cresceu, como já referido.

Na análise de metáfases aneuplóides somente foram consideradas as hiperdiplóides. As frequências de metáfases hipodiplóides são, de modo geral, uma superestimativa das frequências reais, em função da ocorrência de artefatos devidos à hipotonização celular realizada na colheita das culturas. Além disso, a ordem dessa superestimativa poderia variar com os ensaios, que foram realizados em momentos diferentes. Por esse motivo, as metáfases hipodiplóides não foram consideradas.

A ocorrência de metáfases com anomalias estruturais foi muito mais comum (94,6% a 100,0%) que as com anomalias numéricas (de 0% a 5,4%), em todos os grupos de tratamento. Entre as metáfases com anomalias estruturais, as que apresentavam quebras e falhas eram muito mais frequentes (de 83,6% a 92,0%) que as portadoras de outros tipos de anomalias (de 8,0% a 16,4%), em todos os grupos de tratamento. Os grupos tratados com AMZ apresentaram frequências de metáfases com quebras e falhas (de 5,2% a 6,3%) e com outras anomalias (de 0,8% a 1,0%) maiores que as observadas nos controles (4,6% e de 0,4% a 0,5%, respectivamente).

Na Tabela 25 apresenta-se o resultado da análise de variância para comparação das frequências médias de metáfases com anomalias entre doadores e entre grupos de tratamento, após transformação para arco seno da raiz quadrada da proporção, concluindo-se pela não rejeição da igualdade entre as médias. Todavia, quando os grupos Co dos ensaios foram reunidos em conjuntos de doadores, ou seja, doadores VII+VIII+IX+X, doadores XI+XII+XIII e doadores XIV+XV+XVI, com base no tempo de realização dos ensaios após o preparo do meio de cultura, detectaram-se frequências de metáfases

anômalas de 3,8%, 5,3% e 7,3%, respectivamente.

Comparando-se os grupos de tratamento em relação à incidência de metáfases com diferentes tipos de anomalias, verificaram-se os resultados apresentados na Tabela 26. Os grupos de tratamento não diferiram entre si quanto às frequências médias de metáfases com anomalias estruturais, às frequências médias de metáfases com quebras e falhas, às frequências médias de metáfases com outras anomalias estruturais e com relação às frequências médias de metáfases hiperdiplóides. Os grupos de tratamento também não diferiram entre si quanto às frequências de metáfases com outros tipos de anomalias estruturais relativas ao total de metáfases com anomalias, quando comparados pelo teste de igualdade de proporções (estimativa=0,86; GL=4; $P>0,05$).

As frequências de eventos anômalos nos grupos de tratamento dos Ensaio **VII** a **XIV** são mostradas na Tabela 27 e as somas dos resultados por grupo de tratamento desses dez ensaios na Tabela 28. Nos cinco grupos de tratamento, a maioria das metáfases com anomalias apresentou um único evento por célula: com dois eventos anômalos havia três metáfases no grupo **Co**, seis no grupo **CoAc**, duas no grupo **A-100**, cinco no grupo **A-50** e seis no grupo **A-25** e com três eventos havia apenas duas metáfases do grupo **A-50**. As frequências médias de quebras e falhas cromossômicas e cromatídicas, de outras anomalias estruturais e de alterações numéricas dos grupos **Co**, **CoAc**, **A-100**, **A-50** e **A-25** estão representadas graficamente na Figura 3. Em todos os grupos de tratamento os eventos mais comuns foram quebras e falhas, principalmente as quebras cromossômicas e as falhas cromatídicas. Cromossomos extranumerários ocorreram raramente, não tendo sido observados nos grupos **CoAc** e **A-100**. O grupo **A-100** destaca-se por ter apresentado frequência baixa de quebras cromatídicas e frequência alta de falhas cromatídicas em relação aos demais.

Na Tabela 29 são apresentadas as frequências absolutas e relativas de quebras e falhas nos grupos **Co**, **CoAc**, **A-100**, **A-50** e **A-25**. As comparações das distribuições dos diferentes tipos de eventos (quebras x falhas; cromossômicos x cromatídicos) em cada grupo de tratamento, pelo teste **Z** (Tabela 30), não detectaram diferenças significativas, exceto no grupo **A-100**, no qual a frequência de falhas é significativamente maior que a de quebras e a de eventos cromatídicos maior que a de cromossômicos.

Exemplos de quebras e falhas dos tipos cromossômico e cromatídico e de figuras quadrirradaiais encontram-se ilustradas na Figura 4. As raras quebras centroméricas, um exemplo das quais consta também da Figura 4, foram computadas como quebras cromossômicas.

Na Tabela 31 são mostradas as frequências absolutas e relativas de quebras e falhas distribuídas pelos cromossomos ou grupos cromossômicos, nos grupos **Co**, **CoAc**, **A-100**, **A-50** e **A-25**, distribuições essas que se encontram graficamente representadas na Figura 5. De modo geral, em todos os grupos de tratamento as quebras e falhas apresentaram-se com maior frequência nos cromossomos maiores (1, 2, B e C+X), e em menor frequência ou ausentes nos cromossomos menores (D, E, F e G+Y), quando comparadas à distribuição de frequências esperadas de acordo com o tamanho relativo do cromossomo ou grupo cromossômico calculado por LUBS *et alii* (ISCN, 1978). São exceções os cromossomos 2 no grupo **A-100** e o grupo cromossômico E no grupo **A-50**. As frequências encontradas nos cromossomos 3 foram semelhantes às esperadas em todos os grupos de tratamento, exceto no **Co**, no qual é menor. Em face do pequeno número de eventos, os cromossomos foram reunidos em quatro conjuntos (A, B, C+X e D+E+F+G+Y) para a realização da análise estatística. Os grupos de tratamento não diferiram entre si com relação à distribuição dos eventos nesses quatro conjuntos cromossômicos (qui-quadrado=12,98; GL=12; $P > 0,05$). Diferenças significativas entre as distribuições observadas e esperadas de eventos anômalos, com base no tamanho relativo dos cromossomos que compõem esses quatro conjuntos cromossômicos, foram encontradas nos grupos **CoAc** (qui-quadrado=11,52; GL=3; $P < 0,05$) e **A-25** (qui-quadrado=10,19; GL=3; $P < 0,05$), mas não em **Co** (qui-quadrado=3,72; GL=3; $P > 0,05$), **A-100** (qui-quadrado=4,20; GL=3; $P > 0,05$) e **A-50** (qui-quadrado=1,21; GL=3; $P > 0,05$).

As anomalias cromossômicas estruturais classificadas como "outras", assim como os cromossomos em excesso nos casos de hiperdiploidia estão discriminados na Tabela 32. No grupo **Co** foram identificadas duas metáfases com possíveis translocações recíprocas: uma $t(C;D)$ no Ensaio **XII** (Figura 6a) e uma $t(1;C)$ no Ensaio **XIII** (Figura 6b). No Ensaio **VIII** foi encontrada uma metáfase com ausência de um cromossomo C e um fragmento, provavelmente resultantes de quebra cromossômica em Cq proximal, com perda do cromossomo C deficiente.

Uma metáfase contendo um fragmento pequeno de origem não identificada ao nível de resolução da técnica utilizada foi observada no Ensaio **XV** e um cromossomo C extra foi identificado em uma metáfase no Ensaio **XVI**.

No grupo **CoAc** foram interpretados como translocações recíprocas os achados de três células: uma $t(3;B)$ no Ensaio **VIII**, uma $t(1;16)$ no Ensaio **XII** e uma $t(C;C)$ no Ensaio **XV**. Foram também identificados uma figura quadrirradial ($B;C$) no Ensaio **VIII** e um cromossomo D com deficiência do braço longo no Ensaio **XIV**. Nenhuma metáfase hiperdiploide foi encontrada nesse grupo de tratamento.

Das oito anomalias estruturais classificadas como "outras" no grupo **A-100**, três ocorreram no Ensaio **IX**: uma metáfase com provável $t(D;16)$, uma metáfase com um cromossomo B com braço curto deficiente e uma metáfase com um cromossomo G ausente e um cromossomo F extra. Possíveis translocações $t(1;1)$ e $t(1;3)$ foram observadas nos Ensaios **VII** (Figura 6c) e **VIII** (Figura 7a), respectivamente. No Ensaio **XII** foi encontrada uma metáfase com um cromossomo C ausente e um cromossomo 3 extra e nos Ensaios **XIII** e **XVI** foram observadas uma metáfase com um cromossomo marcador interpretado como um D com deficiência no braço longo e uma metáfase com um fragmento pequeno de origem não identificada, respectivamente. No grupo **A-100** também não foram encontradas metáfases hiperdiploides.

No grupo **A-50** foram encontradas nove metáfases com anomalias classificadas como "outras": uma metáfase com uma figura quadrirradial ($C;C$) no Ensaio **VII** (Figura 4f); uma metáfase cujos rearranjos não puderam ser interpretados, com falta de um cromossomo 1, dois cromossomos C, um cromossomo D e um cromossomo E, e presença de três cromossomos dicêntricos e dois fragmentos grandes, no Ensaio **VIII** (Figura 7b); uma metáfase com um cromossomo C ausente e um fragmento, eventos esses interpretados como uma quebra cromossômica em Cq proximal e perda do cromossomo C deficiente, no Ensaio **IX**; uma provável $t(C;D)$, no Ensaio **X**; uma metáfase com um cromossomo 3 e um cromossomo 16 parcialmente desespiralizados, no Ensaio **XII** (Figura 7c); uma metáfase com um cromossomo B ausente e um cromossomo 1 extra e uma metáfase com provável $t(C;D)$, no Ensaio **XIV**; uma metáfase com possíveis translocações $t(2;C)$ e $t(D;D)$ e um cromossomo D com braço longo deficiente, no Ensaio **XV** (Figura 8a); e uma provável $t(B;C)$, no Ensaio **XVI**. No grupo **A-50** foram identificadas três metá-

fases hiperdiplóides: com um cromossomo E (17 ou 18), um cromossomo 16 e um cromossomo C extras, nos Ensaios **VII**, **X** e **XV**, respectivamente.

Oito metáfases com anomalias classificadas como "outras" foram identificadas no grupo **A-25**: uma figura quadrirradial (F;F) no Ensaio **VIII** (Figura 4g); uma metáfase com um cromossomo B com braço longo aumentado (Bq+) no Ensaio **XI**; uma metáfase com um cromossomo C com braço longo deficiente (Cq-) no Ensaio **XII**; no Ensaio **XIII** havia duas metáfases com anomalias: uma com uma figura quadrirradial (C;C) (Figura 4h) e outra com um cromossomo C ausente e um cromossomo G extra, eventos esses interpretados como derivados de uma possível quebra cromossômica em Cq proximal, com perda do fragmento distal; no Ensaio **XVI** haviam três metáfases anômalas, sendo duas portadoras de prováveis translocações, uma t(C;D) e outra t(2;E), e uma metáfase com um cromossomo C ausente e um fragmento, eventos esses interpretados como uma possível quebra cromossômica em Cq proximal, com perda do cromossomo C deficiente. No grupo **A-25** ocorreram quatro metáfases hiperdiplóides: uma com um cromossomo G (Figura 8b) e outra com um cromossomo B e um G extras, no Ensaio **VII**, e duas metáfases com um cromossomo 3 extra, uma no Ensaio **X** e outra no Ensaio **XIII**.

Tabela 23. Frequências percentuais de metáfases com anomalias estruturais e numéricas nos grupos de tratamento dos Ensaios VII a XVI. Q: quebras; F: falhas.

Ensaio	Grupo de tratamento	Metáfases com anomalias estruturais			Metáfases hiperdiplóides
		Q+F	Outras	Total	
VII	Co	3		3	
	CoAc	4		4	
	A-100	7	1	8	
	A-50	5	1	5	1
	A-25	6		6	2
VIII	Co	5	1	6	
	CoAc	4	2	6	
	A-100	2	1	3	
	A-50	5	1	6	
	A-25	8	1	9	
IX	Co	3		3	
	CoAc	3		3	
	A-100	9	3	12	
	A-50	6	1	7	
	A-25	4		4	
X	Co	3		3	
	CoAc	8		8	
	A-50	6	1	7	1
	A-25	4		4	1
XI	Co	4		4	
	CoAc	5		5	
	A-100	17		17	
	A-50	7		7	
	A-25	7	1	8	
XII	Co	5	1	6	
	CoAc	8	1	9	
	A-100	5	1	6	
	A-50	2	1	3	
	A-25	5	1	5	
XIII	Co	3	1	4	
	CoAc	1		1	
	A-100	3	1	4	
	A-50	2		2	
	A-25	1	2	3	1
XIV	Co	7		7	
	CoAc	4	1	5	
	A-100	7		7	
	A-50	6	2	8	
	A-25	9		9	
XV	Co	5	1	6	
	CoAc	4	1	5	
	A-100	6		6	
	A-50	10	1	11	1
	A-25	5		5	
XVI	Co	8		8	1
	CoAc	5		5	
	A-100	7	1	8	
	A-50	4	1	4	
	A-25	14	3	17	

Tabela 24. Frequências de anomalias estruturais e numéricas encontradas nos Ensaios VII a XVI. Q: quebras; F: falhas; FA: frequência absoluta.

Grupo de tratamento	Metáfases analisadas	Metáfases com anomalias estruturais						Metáfases hiperdiplbides	
		Q+F		Outras		Total		FA	%
		FA	%	FA	%	FA	%		
Co	1.000	46	4,6	4	0,4	50	5,0	1	0,1
CoAc	1.000	46	4,6	5	0,5	51	5,1		
A-100	830	51	6,1	8	1,0	59	7,1		
A-50	929	48	5,2	9	1,0	55	5,9	3	0,3
A-25	1.000	63	6,3	8	0,8	70	7,0	4	0,4

Tabela 25. Análise de variância para comparação das frequências médias transformadas de metáfases com anomalias entre doadores e entre grupos de tratamento (GT) dos Ensaios VII a XVI. NS: $P > 0,05$.

FV	GL	SQ	QM	F
Doadores	9	0,04941595	0,00549066	1,65 NS
GT	4	0,02493207	0,00623302	1,88 NS
Resíduo	36	0,11949232	0,00331923	
Total	49	0,19384034		

Tabela 26. Valores do teste de igualdade de proporções para comparação das frequências médias de metáfases com quebras e falhas, de metáfases com outros tipos de anomalias estruturais, de metáfases com anomalias estruturais e de metáfases hiperdiplóides entre os grupos de tratamento dos Ensaios VII a XVI. GL=4; NS: $P > 0,05$.

Metáfases	Estimativa
Com quebras e falhas	4,71 NS
Com outras anomalias estruturais	3,71 NS
Com anomalias estruturais	6,81 NS
Hiperdiplóides	7,53 NS

Tabela 27. Frequências de eventos anômalos em 100 metáfases analisadas por grupo de tratamento, nos Ensaios VII a XVI. Q: quebras; F: falhas; CS: cromossômicas; CT: cromatídicas.

Ensaio	Grupo de tratamento	Eventos estruturais						Alterações numéricas	
		Quebras		Falhas		Q+F	Outros		Total
		CS	CT	CS	CT				
VII	Co	1		1		4		4	
	CoAc	2	1	1	1	4		4	
	A-100	2			5	7	1	8	
	A-50	3			2	5	1	6	1
	A-25	3	2		1	6		6	3
VIII	Co	1	2		3	6	1	7	
	CoAc			1	4	5	2	7	
	A-100				2	2	1	3	
	A-50	1		1	3	5	3	8	
	A-25	2	2		4	8	1	9	
IX	Co	1			2	3		3	
	CoAc		2	1		3		3	
	A-100		1		8	9	3	12	
	A-50		1		5	6	1	7	
	A-25	2			2	4		4	
X	Co	3				3		3	
	CoAc	5		2	3	10		10	
	A-50	3		2	2	7	1	8	1
	A-25			1	3	4		4	1
XI	Co	3			1	4		4	
	CoAc	3	1		1	5		5	
	A-100 *				5	5		5	
	A-50 **	2				2		2	
	A-25	2		3	4	9	1	10	
XII	Co	2	1		2	5	1	6	
	CoAc	1	3		5	9	1	10	
	A-100	2		1	2	5	1	6	
	A-50	1	1			2	2	4	
	A-25	2	1	1	1	5	1	6	
XIII	Co	1	1		1	3	1	4	
	CoAc				1	1		1	
	A-100	2			3	5	1	6	
	A-50	1	1			2		2	
	A-25				1	1	2	3	1
XIV	Co	3	1	4		8		8	
	CoAc	1	1	1	2	5	1	6	
	A-100	5		1	1	7		7	
	A-50	4	1		1	6	2	8	
	A-25	5		1	4	10		10	
XV	Co	1	1	1	2	5	1	6	
	CoAc			1	3	4	1	5	
	A-100	1		1	4	6		6	
	A-50	3		1	7	11	3	14	1
	A-25	2		1	2	5		5	
XVI	Co	3	1		4	8		8	1
	CoAc	2	1	1	2	6		6	
	A-100	2	1	1	3	7	1	8	
	A-50	2			2	4	1	5	
	A-25	5	4	1	5	15	3	18	

*: em 30 metáfases

**: em 29 metáfases

Tabela 28. Frequências totais de eventos anômalos nos Ensaios VII a XVI.
Q: quebras; F: falhas; CS: cromossômicas; CT: cromatídicas.

Grupo de tratamento	Metáfases analisadas	Eventos estruturais							Alterações numéricas
		Q		F		Q+F	Outros	Total	
		CS	CT	CS	CT				
Co	1.000	19	8	6	16	49	4	53	1
CoAc	1.000	14	8	8	22	52	5	57	
A-100	830	14	2	4	33	53	8	61	
A-50	929	20	4	4	22	50	14	64	3
A-25	1000	23	9	8	27	67	8	75	5

Figura 2. Frequências médias de anomalias cromossômicas (AC) nos grupos Co, CoAc, A-100, A-50 e A-25. QCS: quebra cromossômica; QCT: quebra cromatídica; FCS: falha cromossômica; FCT: falha cromatídica; OA: outras anomalias estruturais; AN: alterações numéricas.

Tabela 29. Frequências absolutas (FA) e relativas (FR) de quebras e falhas, cromatídicas e cromossômicas, nos grupos Co, CoAc, A-100, A-50 e A-25.

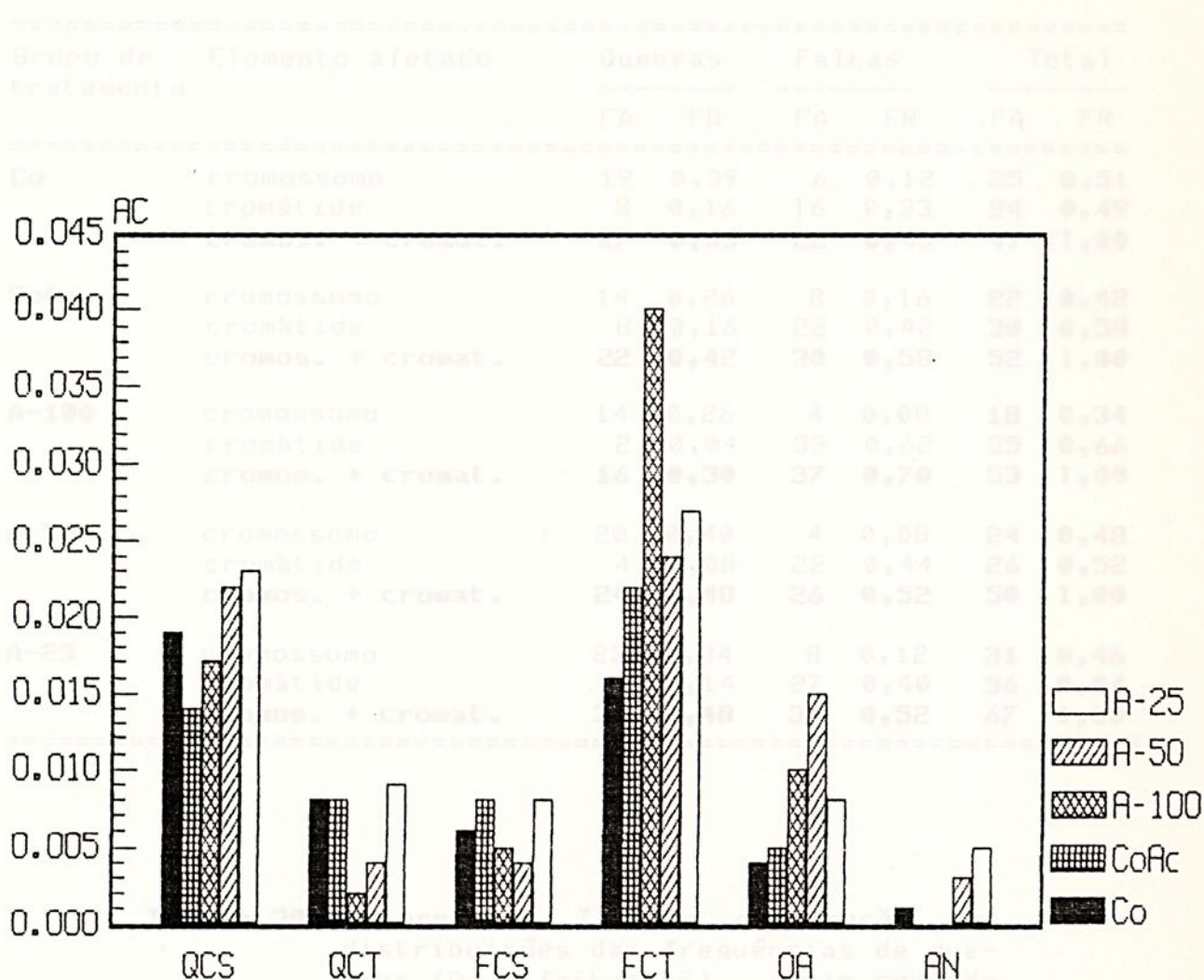


Figura 3. Frequências médias de anomalias cromossômicas (AC) nos grupos Co, CoAc, A-100, A-50 e A-25. QCS: quebra cromossômica; QCT: quebra cromatídica; FCS: falha cromossômica; FCT: falha cromatídica; OA: outras anomalias estruturais; AN: alterações numéricas.

CoAc 1,17 NS 1,17 NS
 A-100 3,18 * 2,46 *
 A-50 0,20 NS 0,20 NS
 A-25 0,33 NS 0,66 NS

Tabela 29. Frequências absolutas (FA) e relativas (FR) de quebras e falhas, cromatídicas e cromossômicas, nos grupos **Co**, **CoAc**, **A-100**, **A-50** e **A-25**.

Grupo de tratamento	Elemento afetado	Quebras		Falhas		Total	
		FA	FR	FA	FR	FA	FR
Co	cromossomo	19	0,39	6	0,12	25	0,51
	cromátide	8	0,16	16	0,33	24	0,49
	cromos. + cromat.	27	0,55	22	0,45	49	1,00
CoAc	cromossomo	14	0,26	8	0,16	22	0,42
	cromátide	8	0,16	22	0,42	30	0,58
	cromos. + cromat.	22	0,42	30	0,58	52	1,00
A-100	cromossomo	14	0,26	4	0,08	18	0,34
	cromátide	2	0,04	33	0,62	35	0,66
	cromos. + cromat.	16	0,30	37	0,70	53	1,00
A-50	cromossomo	20	0,40	4	0,08	24	0,48
	cromátide	4	0,08	22	0,44	26	0,52
	cromos. + cromat.	24	0,48	26	0,52	50	1,00
A-25	cromossomo	23	0,34	8	0,12	31	0,46
	cromátide	9	0,14	27	0,40	36	0,54
	cromos. + cromat.	32	0,48	35	0,52	67	1,00

Tabela 30. Valores de Z para comparação das distribuições das frequências de quebras (Q) e falhas (F), assim como de eventos cromossômicos (CS) e de eventos cromatídicos (CT), nos grupos de tratamento dos Ensaios **VII** a **XVI**. **NS:** **P** > 0,05.

Grupo de tratamento	Valores de Z			
	Q x F		CS x CT	
Co	0,70	NS	0,14	NS
CoAc	1,17	NS	1,17	NS
A-100	3,18	*	2,46	*
A-50	0,28	NS	0,28	NS
A-25	0,33	NS	0,66	NS



Figura 4. Metáfases parciais com (a) quebra cromossômica, (b) quebra cromatídica, (c) falha cromossômica, (d) falha cromatídica, (e) quebra centromérica, (f) figura quadrirradial (C;C), (g) figura quadrirradial (F;F) e (h) figura quadrirradial (C;C). Os cromossomos com anomalias são indicados pelas setas.

Tabela 31. Distribuição das frequências absolutas (FA) e relativas (FR) de quebras e falhas por cromossomo ou grupo cromossômico, nos grupos **Co**, **CoAc**, **A-100**, **A-50** e **A-25**.

Grupo de tratamento	Frequência	Cromossomo ou grupo cromossômico									Total
		1	2	3	B	C+X	D	E	F	G+Y	
Co	FA	4	7	1	9	19	2	2	3	2	49
	FR	0,08	0,14	0,02	0,18	0,40	0,04	0,04	0,06	0,04	1,00
CoAc	FA	6	6	3	8	25	0	2	1	1	52
	FR	0,12	0,12	0,06	0,15	0,47	0,0	0,04	0,02	0,02	1,00
A-100	FA	8	2	4	9	21	3	3	0	3	53
	FR	0,15	0,04	0,08	0,16	0,39	0,06	0,06	0,00	0,06	1,00
A-50	FA	4	4	3	4	21	3	9	1	1	50
	FR	0,08	0,08	0,06	0,08	0,42	0,06	0,18	0,02	0,02	1,00
A-25	FA	4	10	4	5	34	4	2	2	2	67
	FR	0,06	0,15	0,06	0,07	0,51	0,06	0,03	0,03	0,03	1,00
Tamanho relativo ao lote 2n*	FA	16,88	16,04	13,66	24,76	74,82	21,52	19,08	10,46	10,03	207,25
	FR	0,08	0,08	0,07	0,12	0,36	0,10	0,09	0,05	0,05	1,00

* Com base em LUBS *et alii* (ISCN, 1978)

Figura 3. Distribuição das frequências relativas de quebras e falhas por cromossomo ou grupo cromossômico observadas nos grupos **Co**, **CoAc**, **A-100**, **A-50** e **A-25** e as esperadas de acordo com o tamanho relativo dos cromossomos (E), segundo LUBS *et alii* (ISCN, 1978).

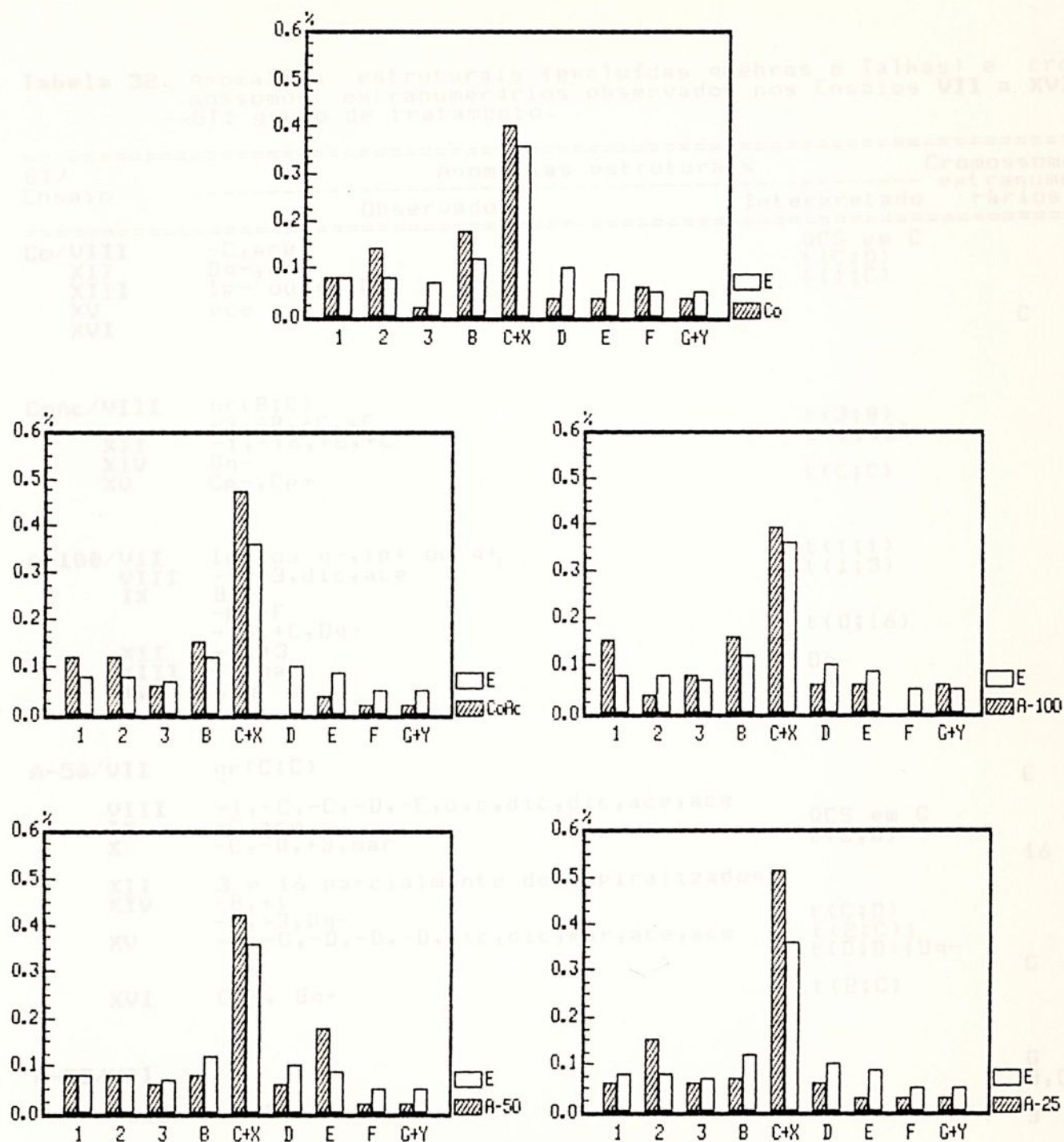
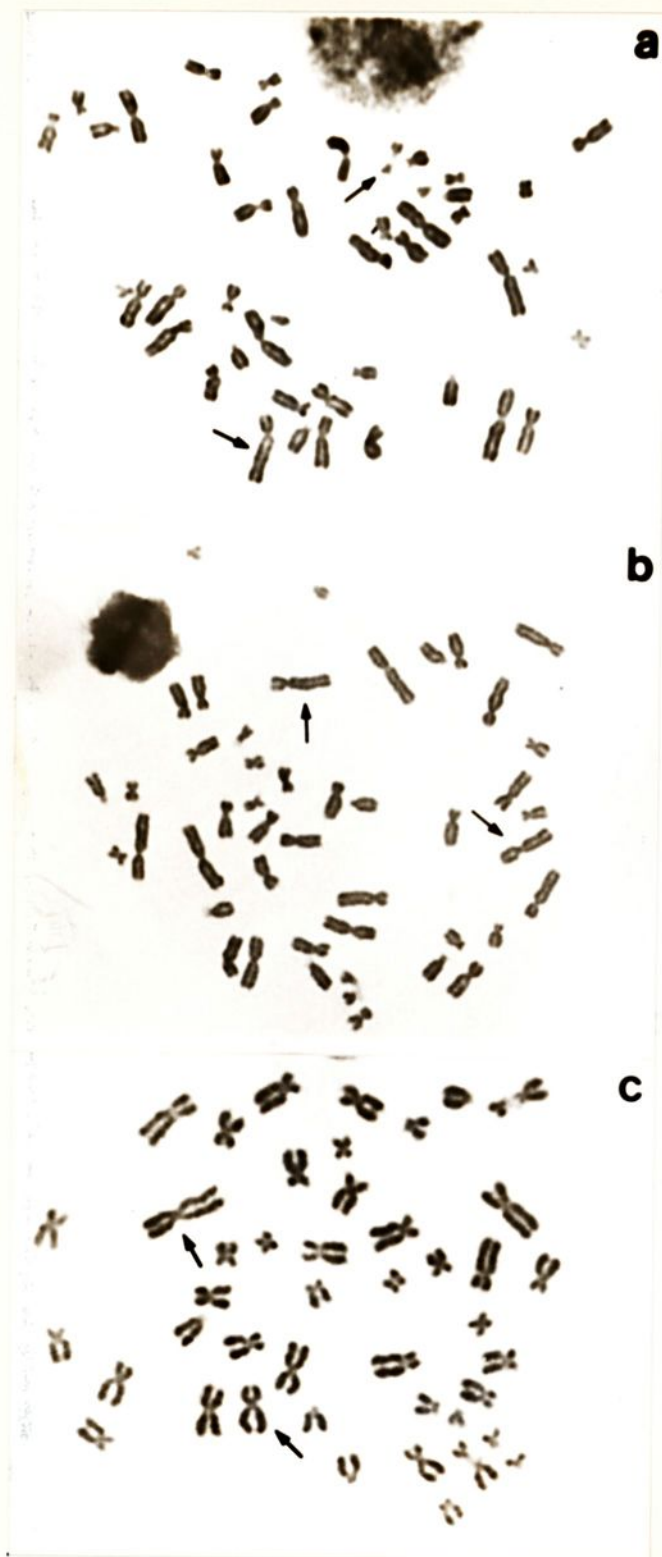


Figura 5. Distribuição das frequências relativas de quebras e falhas por cromossomo ou grupo cromossômico observadas nos grupos Co, CoAc, A-100, A-50 e A-25 e as esperadas de acordo com o tamanho relativo dos cromossomos (E), segundo LUBS *et alii* (ISCN, 1978).

Tabela 32. Anomalias estruturais (excluídas quebras e falhas) e cromossomos extranumerários observados nos Ensaio VII a XVI. GT: grupo de tratamento.

GT/ Ensaio	Anomalias estruturais		Cromossomos extranume- rários
	Observado	Interpretado	
Co/VIII	-C, ace	QCS em C	
XII	Dq-, Cq+	t(C;D)	
XIII	1p- ou q-, Cq+	t(1;C)	
XV	ace		
XVI			C
CoAc/VIII	qr(B;C)		
XII	-3, -B, +C, +E	t(3;B)	
XIV	-1, -16, +B, +C	t(1;16)	
XV	Dq- Cp-, Cp+	t(C;C)	
A-100/VII	1p- ou q-, 1p+ ou q+	t(1;1)	
VIII	-1, -3, dic, ace	t(1;3)	
IX	Bp- -G, +F -16, +C, Dq- -C, +3 -D, mar ace	t(D;16) Dq-	
XII			
XIII			
XVI			
A-50/VII	qr(C;C)		
VIII	-1, -C, -C, -D, -E, dic, dic, dic, ace, ace		E
IX	-C, ace	QCS em C	
X	-C, -D, +3, mar	t(C;D)	
XII	3 e 16 parcialmente desespiralizados		16
XIV	-B, +1 -C, +3, Dq-	t(C;D)	
XV	-2, -C, -D, -D, -D, dic, dic, mar, ace, ace	t(2;C); t(D;D); Dq-	
XVI	Cq-, Bq+	t(B;C)	C
A-25/VII			
VIII	qr(F;F)		G
X			B, G
XI	Bq+		3
XII	Cq-		
XIII	qr(C;C) -C, +6	Cq-	
XVI	-D, +E, Cq+ -C, ace -2, -E, +3, mar	t(C;D) QCS em C t(2;E)	3



46,XY,Dq-,Cq+

ou t(C;D)

Co/XII

46,XY,1p- ou q-,Cq+

ou t(1;C)

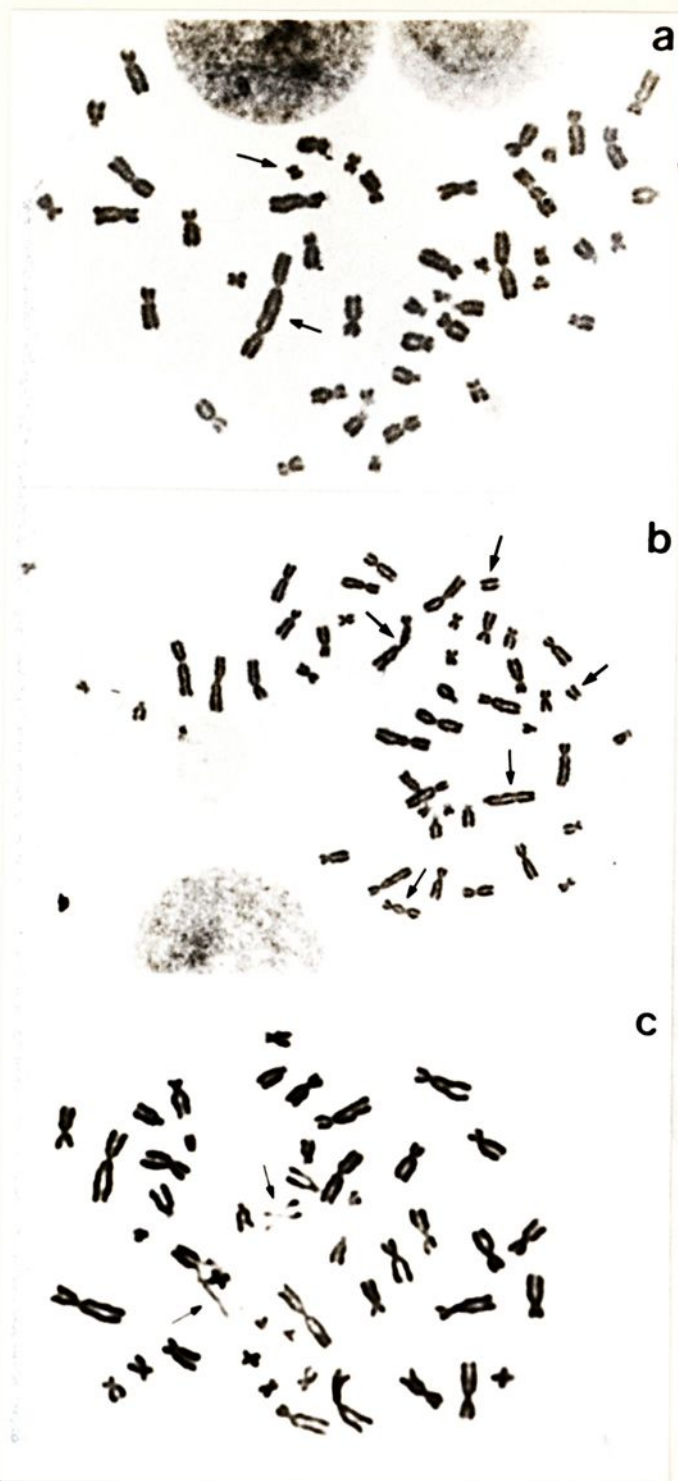
Co/XIII

46,XY,1p- ou q-,1p+ ou q+

ou t(1;1)

A-100/VII

Figura 6. Metáfases com rearranjos interpretados como prováveis translocações. Os cromossomos envolvidos estão indicados por setas.



45,XY,-1,-3,+dic,ace

ou t(1;3)

A-100/VIII

44,-1,-C,-C,-D,-E,+dic,

+dic,+dic,ace,ace

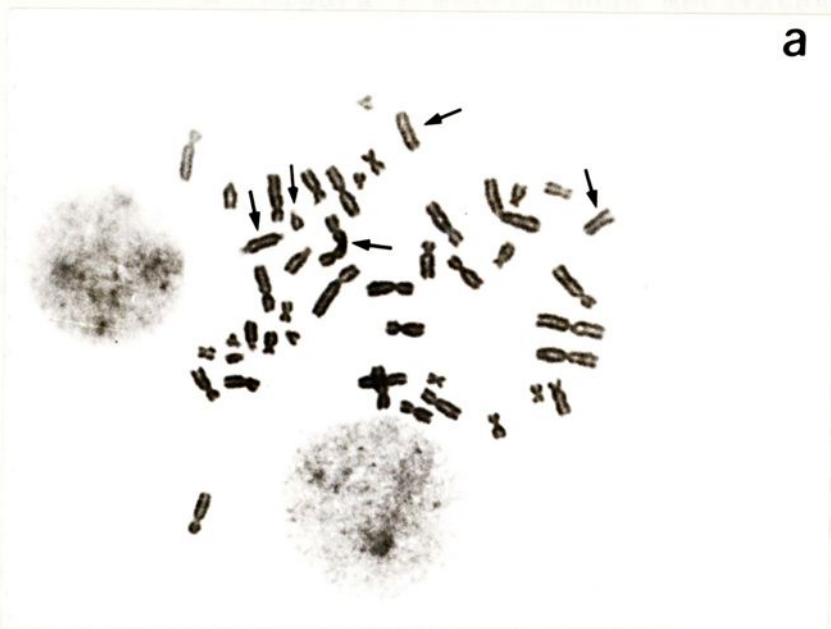
A-50/VIII

46,XY

A-50/XII

Figura 7. Metáfases com (a) uma provável t(1;3); (b) rearranjos não identificados; e (c) um cromossomo 3 e um cromossomo 16 parcialmente desespiralizados. Os cromossomos envolvidos estão indicados por setas.

a



44,XY,-2,-C,-D,-D,-D,
+dic,+dic,+mar,ace,ace
ou t(2;C), t(D;D),+Dq-

A-50/XV

b



47,XY,+G

A-25/VII

Figura 8. Metáfases (a) com prováveis t(2;C), t(D;D) e Dq-; e (b) com um cromossomo G extra. Os cromossomos envolvidos estão indicados por setas.

III.4. Avaliação dos efeitos do amitraz pela frequência de trocas entre cromátides-irmãs nos Ensaios VII a XVI.

A Figura 9 mostra duas metáfases com coloração diferencial entre as cromátides, uma delas com baixa frequência de TCI (2) e a outra com alta frequência de TCI (35).

Na Tabela 33 são apresentados os números totais de trocas entre cromátides-irmãs (TCI) e as médias, os erros padrões e as frequências mínima e máxima de TCI por célula, em 50 metáfases analisadas por grupo nos Ensaios VII a XVI.

No grupo **Co** o número médio de TCI variou de 7,84 a 17,80, com frequência média de 12,50, o número mínimo de TCI por célula foi de 1 e o máximo de 35. Em **CoAc** o número médio de TCI variou de 7,66 a 19,26, com frequência média de 12,85, o número mínimo de TCI por célula foi de 1 e o máximo de 30. Em **A-100** o número médio de TCI variou de 8,74 a 23,48, com frequência média de 14,63, o número mínimo de TCI por célula foi de 1 e o máximo de 36. Em **A-50** o número médio de TCI variou de 9,66 a 20,00, com frequência média de 14,87, o número mínimo de TCI por célula foi de 1 e o máximo de 37. Em **A-25** o número médio de TCI variou de 8,52 a 17,36, com frequência média de 13,57, o número mínimo de TCI por célula foi de 2 e o máximo de 30. A análise de variância detectou uma variabilidade intercelular significativa entre doadores para cada um dos grupos (Tabela 34). Uma variabilidade intercelular significativa entre grupos de tratamento foi também detectada para cada um dos doadores, com exceção dos doadores **VIII** e **XVI**.

As somas dos resultados de TCI por grupo nos Ensaios VII a XVI são mostradas na Tabela 35. A análise de variância para comparação de frequências transformadas de TCI (Tabela 36) detectou diferenças significativas entre doadores e entre grupos de tratamento. As comparações múltiplas de Tukey entre as frequências médias transformadas de TCI (Tabela 37) não detectaram diferenças entre os doadores **VIII**, **XII**, **VII** e **XIII**, os doadores **VII**, **XIII** e **XVI**, os doadores **XIV**, **X**, **IX** e **XV** e os doadores **IX**, **XV** e **XI**. Não foram detectadas diferenças também entre os grupos **Co**, **CoAc** e **A-25** e os grupos **A-25**, **A-100** e **A-50**. Portanto, os grupos **A-100** e **A-50** diferiram significativamente de ambos os controles.

As distribuições de frequências de TCI por cromossomos ou

grupo cromossômico nos grupos **Co**, **CoAc**, **A-100**, **A-50** e **A-25**, e os valores de qui-quadrado para as comparações dessas distribuições com as esperadas de acordo com o tamanho relativo dos cromossomos, calculadas segundo LUBS *et alii* (ISCN, 1978), constam da Tabela 38. De modo geral, em todos os grupos de tratamento as frequências observadas foram maiores nos cromossomos grandes (1, 2, 3, B e C+X) e menores nos cromossomos pequenos (D, E, F e G+Y), em relação às frequências esperadas. Os grupos de tratamento não diferiram entre si com relação à distribuição das frequências de TCI por cromossomo ou grupo cromossômico (qui-quadrado=43,45; GL=36; $P>0,05$). Essas distribuições encontram-se representadas na Figura 10.

A Tabela 39 mostra a análise de correlação entre os diferentes parâmetros citogenéticos empregados nos grupos **Co**, **CoAc**, **A-100**, **A-50** e **A-25** dos Ensaios VII a XVI. O teste *t* para significância das correlações detectou correlações negativas significativas entre IM e TCI, em todos os grupos de tratamento exceto em **A-25**, e entre IM e AC em **A-100**, assim como correlações positivas significativas entre IM e micronúcleos no grupo **Co** e entre metáfases com anomalias cromossômicas e TCI nos grupos **A-100** e **A-50**.

Figura 9. Metáfases de células de TCI e TCI com 33 TCI.

Tabela 29. Frequências de TCI em 50 metáfases analisadas
por grupo de tratamento, nos Linhas VII a XVI.

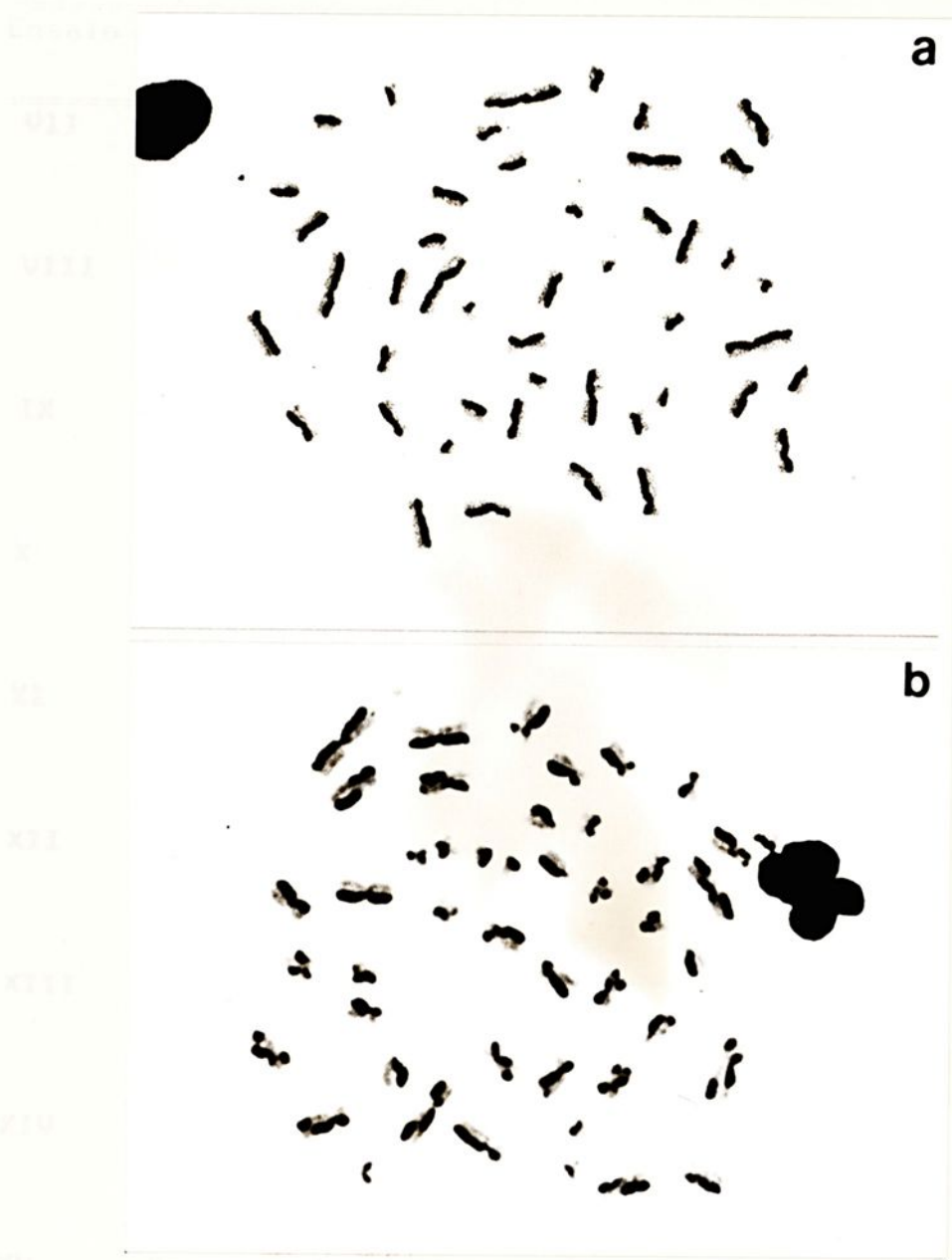


Figura 9. Metáfases (a) com 2 TCI e (b) com 35 TCI.

Tabela 33. Frequências de TCI em 50 metáfases analisadas por grupo de tratamento, nos Ensaios VII a XVI.

Ensaio	Grupo de tratamento	TCI	TCI/célula			
			$\bar{X}$	$\pm$	$S\bar{X}$	Mínimo Máximo
VII	Co	430	8,60	0,55		2 23
	CoAc	425	8,50	0,44		3 17
	A-100	500	10,00	0,52		3 21
	A-50	615	12,30	0,67		6 29
	A-25	600	12,00	0,51		6 27
VIII	Co	392	7,84	0,48		1 16
	CoAc	396	7,92	0,54		1 18
	A-100	437	8,74	0,53		4 20
	A-50	483	9,66	0,54		1 21
	A-25	426	8,52	0,44		3 16
IX	Co	743	14,86	0,63		7 28
	CoAc	912	18,24	0,73		8 28
	A-100	843	16,86	0,71		7 27
	A-50	895	17,90	0,64		8 29
	A-25	803	16,06	0,52		10 25
X	Co	701	14,02	0,65		6 32
	CoAc	725	14,50	0,52		5 21
	A-100	961	19,22	0,69		9 30
	A-50	895	17,90	0,73		8 30
	A-25	798	15,96	0,52		9 23
XI	Co	890	17,80	0,78		7 35
	CoAc	963	19,26	0,82		9 30
	A-100	1.174	23,48	0,83		11 36
	A-50	1.000	20,00	0,80		7 33
	A-25	835	16,70	0,61		8 25
XII	Co	487	9,74	0,53		2 17
	CoAc	383	7,66	0,49		2 16
	A-100	518	10,36	0,74		1 22
	A-50	502	10,04	0,58		1 19
	A-25	443	8,86	0,50		2 18
XIII	Co	519	10,38	0,47		4 21
	CoAc	433	8,66	0,52		3 19
	A-100	560	11,20	0,54		4 22
	A-50	580	11,60	0,49		5 21
	A-25	528	10,56	0,56		3 20
XIV	Co	692	13,84	0,54		7 22
	CoAc	751	15,02	0,65		5 25
	A-100	804	16,08	0,59		9 31
	A-50	983	19,66	0,74		10 37
	A-25	847	16,94	0,52		9 25
XV	Co	778	15,56	0,57		7 24
	CoAc	840	16,80	0,63		10 28
	A-100	930	18,60	0,61		10 31
	A-50	900	18,00	0,60		8 27
	A-25	868	17,36	0,72		8 30
XVI	Co	618	12,36	0,49		7 21
	CoAc	599	11,98	0,50		5 20
	A-100	587	11,74	0,48		6 19
	A-50	583	11,66	0,59		5 22
	A-25	638	12,76	0,59		3 22

Tabela 34. Análise de variância e comparações múltiplas de Tukey das frequências de TCI entre doadores para cada grupo de tratamento (GT) e entre grupos de tratamento para cada doador, nos Ensaios VII a XVI. Doadores: GL=9 (resíduo: GL=490); GT: GL=4 (resíduo: GL=245); NS: $P > 0,05$; *: $P < 0,05$. Os doadores ou grupos de tratamento ligados por barra não diferiram entre si.

Fonte de variação	Doador/ GT	F	Comparações de Tukey									
Doadores	Co	32,92*	VIII	VII	XII	XIII	XIV	XVI	X	IX	XV	XI
	CoAc	58,72*	XII	VIII	VII	XIII	XVI	X	XIV	XV	IX	XI
	A-100	58,49*	VIII	XII	VII	XIII	XVI	XIV	IX	XV	X	XI
	A-50	42,42*	VIII	XII	XVI	XIII	VII	X	IX	XV	XIV	IX
	A-25	40,59*	VIII	XII	XIII	VII	XVI	X	IX	XI	XIV	XV
GT	VII	12,21*	Co	CoAc	A-100	A-25	A-50					
	VIII	2,21NS										
	IX	4,48*	Co	A-25	A-100	A-50	CoAc					
	X	12,12*	Co	CoAc	A-25	A-50	A-100					
	XI	10,73*	A-25	Co	CoAc	A-50	A-100					
	XII	3,10*	CoAc	A-25	Co	A-50	A-100					
	XIII	5,43*	CoAc	Co	A-25	A-100	A-50					
	XIV	12,64*	Co	CoAc	A-100	A-25	A-50					
	XV	3,56*	Co	CoAc	A-25	A-50	A-100					
	XVI	0,68NS										

Tabela 35. Análise de variância para comparação das frequências transformadas de TCI, obtidas por grupo de tratamento, entre os ensaios VII a XVI, a: 0,05.

Tabela 35. Frequências totais de TCI em 500 metáfases analisadas por grupo de tratamento, obtidas pela soma dos resultados dos Ensaios VII a XVI.

Grupo de tratamento	TCI	TCI/célula			
		$\bar{X}$	$\pm$	S $\bar{X}$	Mínimo Máximo
Co	6.250	12,50	1,03	1	35
CoAc	6.427	12,85	1,42	1	30
A-100	7.314	14,63	1,55	1	36
A-50	7.436	14,87	1,32	1	37
A-25	6.786	13,57	1,09	2	30

Tabela 36. Análise de variância para comparação das frequências transformadas de TCI, entre doadores e entre grupos de tratamento (GT) dos Ensaio **VII** a **XVI**. *: $P < 0,05$.

FV	GL	SQ	QM	F
Doadores	9	14,58	1,62	53,99 *
GT	4	0,84	0,21	7,12 *
Resíduo	36	1,08	0,03	
Total	49	16,50		

Tabela 37. Comparações múltiplas de Tukey das frequências médias transformadas de TCI entre doadores e entre grupos de tratamento dos Ensaio **VII** a **XVI**. Os doadores ou grupos de tratamento ligados por barra não diferiram entre si.

Comparações										
Fonte de variação	VIII	XII	VII	XIII	XVI	XIV	X	IX	XV	XI
Doadores										

Tabela 38. Distribuição das frequências de TCI por cromossomo ou grupo cromossômico nos grupos **Co**, **CoAc**, **A-100**, **A-50** e **A-25** e valores de qui-quadrado da comparação com as frequências casualmente esperadas com base no tamanho relativo dos cromossomos. GT: grupo de tratamento; O: observada; E: esperada, calculada de acordo com LUBS *et alii* (ISCN, 1978); GL=9; *: $P<0,05$.

GT	Distribuição	Cromossomo ou grupo cromossômico											Valores de qui-quadrado
		1	2	3	B	C+X	D	16	17+18	F	G+Y	Total	
Co	O	557	557	484	920	2.315	660	165	302	165	125	6.250	265,7*
	E	509	484	412	747	2.256	649	203	373	315	302	6.250	
CoAc	O	525	572	461	990	2.434	627	154	300	199	165	6.427	234,7*
	E	523	497	424	769	2.321	667	208	383	324	311	6.427	
A-100	O	629	645	552	1.113	2.738	726	180	350	217	164	7.314	288,6*
	E	596	566	482	874	2.641	759	237	436	369	354	7.314	
A-50	O	668	663	508	1.078	2.815	757	187	378	193	189	7.436	258,6*
	E	606	576	490	888	2.685	772	241	443	375	360	7.436	
A-25	O	643	671	501	1.024	2.499	629	174	318	170	157	6.786	330,8*
	E	553	525	447	811	2.450	705	220	405	342	328	6.786	

Figura 38. Distribuição das frequências de TCI por cromossomo ou grupo cromossômico encontradas nos grupos **Co**, **CoAc**, **A-100**, **A-50** e **A-25** e esperadas de acordo com o tamanho relativo dos cromossomos (E), segundo LUBS *et alii* (ISCN, 1978).

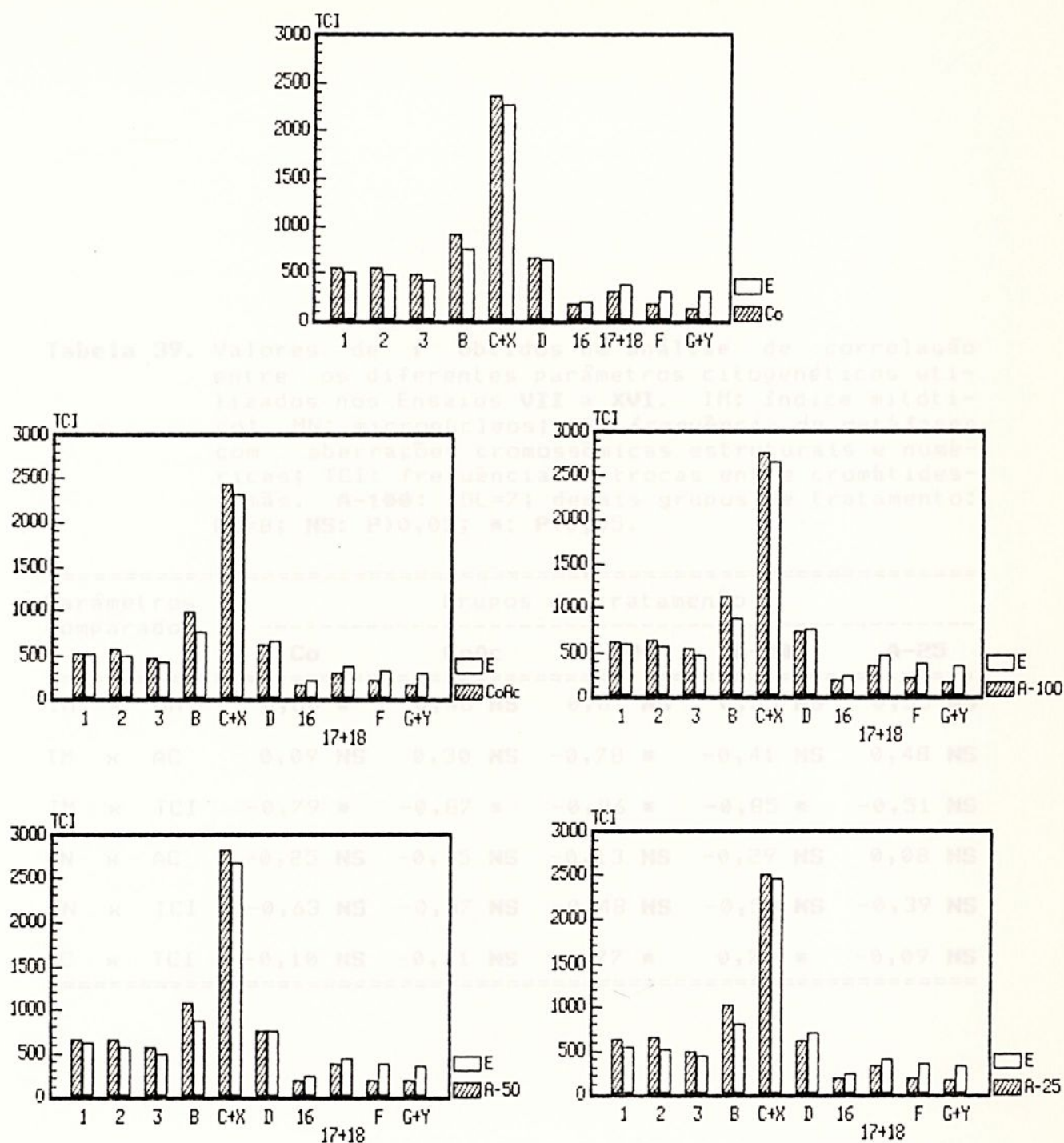


Figura 10. Distribuição das frequências de TCI por cromossomo ou grupo cromossômico encontradas nos grupos **Co**, **CoAc**, **A-100**, **A-50** e **A-25** e esperadas de acordo com o tamanho relativo dos cromossomos (E), segundo LUBS *et alii* (ISCN, 1978).

Tabela 39. Valores de r obtidos da análise de correlação entre os diferentes parâmetros citogenéticos utilizados nos Ensaio **VII** a **XVI**. IM: índice mitótico; MN: micronúcleos; AC: frequência de metáfases com aberrações cromossômicas estruturais e numéricas; TCI: frequência de trocas entre cromátides-irmãs. **A-100:** GL=7; demais grupos de tratamento: GL=8; **NS:** $P > 0,05$; *****: $P < 0,05$.

Parâmetros comparados			Grupos de tratamento				
			Co	CoAc	A-100	A-50	A-25
IM	x	MN	0,80 *	0,48 NS	0,61 NS	0,55 NS	0,55 NS
IM	x	AC	0,09 NS	0,30 NS	-0,78 *	-0,41 NS	0,48 NS
IM	x	TCI	-0,79 *	-0,87 *	-0,86 *	-0,85 *	-0,51 NS
MN	x	AC	-0,25 NS	-0,15 NS	-0,13 NS	-0,29 NS	0,08 NS
MN	x	TCI	-0,63 NS	-0,37 NS	-0,48 NS	-0,58 NS	-0,39 NS
AC	x	TCI	-0,10 NS	-0,11 NS	0,77 *	0,71 *	-0,09 NS

IV. DISCUSSÃO

Neste projeto foram investigados os efeitos de várias concentrações de AMZ em linfócitos humanos cultivados, sem o emprego de ativação metabólica. O procedimento de ativação é necessário, em determinadas situações, porque alguns xenobióticos não são genotóxicos por si, mas podem exercer tal atividade através dos produtos de sua biotransformação no organismo. Nesses casos, somente o emprego de sistemas de ativação metabólica permite a reprodução **in vitro** das condições existentes **in vivo**.

Em mamíferos, a mistura designada por S9, que inclui a fração microssômica S9, o NADP e o ácido isocítrico, é comumente utilizada como sistema de ativação metabólica (MADLE & OBE, 1980). A fração microssômica S9 é o sobrenadante obtido por centrifugação, a 9.000G, de homogeneizados de fígado de ratos previamente estimulados com indutores enzimáticos, como por exemplo o Aroclor 1254. Essa fração contém oxidases de função mista, que são enzimas que transformam os xenobióticos ou seus derivados pró-carcinógenos, formados via metabolismo oxidativo, em carcinógenos ou mutágenos finais. O NADP e o ácido isocítrico utilizados na mistura S9 fornecem energia ao sistema.

Contudo, a clivagem do AMZ que dá origem a seus derivados **II** e **III in vivo** parece não ser enzimática (SCHUNTNER & THOMPSON, 1978b) e, embora esse composto não seja higroscópico, sofre hidrólise em contato com a água, num processo que é mais rápido em pH ácido (HARRISON *et alii*, 1972b). Como as culturas celulares são soluções aquosas e o pH tende a acidificar-se durante seu desenvolvimento, tornou-se dispensável o uso de sistemas de ativação metabólica para testar os efeitos produzidos **in vitro** pelo AMZ ou seus derivados. Todavia, não é possível definir se os efeitos citotóxicos e clastogênicos encontrados nesta investigação são devidos ao AMZ, aos seus derivados produzidos por hidrólise no meio de cultura ou a ambos.

Um aspecto importante a ser considerado é que a ação carrapaticida do AMZ se dá justamente pela inibição das oxidases de função mista (SCHUNTNER & THOMPSON, 1976), que são os componentes da mistura S9 responsáveis pela ativação metabólica de xenobióticos. Dessa forma, os indivíduos expostos ao amitraz poderiam apresentar uma resistência aumentada a xenobióticos dependentes de ativação metabólica, apesar do comprometimento das funções normais dos siste-



mas enzimáticos afetados e da ação genotóxica do próprio amitraz.

Todos os ensaios foram realizados usando sangue periférico de doadores do sexo masculino aparentemente saudáveis, de uma faixa etária variável de 18 a 28 anos e que não eram fumantes ou consumidores de bebidas alcoólicas e nem tinham sido expostos a raios X, usado medicamentos ou apresentado doenças virais nos seis meses que antecederam a colheita do sangue. A padronização das características da amostra deveu-se ao fato de que fatores como o sexo, a idade, o uso de fumo, álcool e outros agentes químicos, a exposição a radiação e o estado de saúde serem fontes de variabilidade das frequências de eventos anômalos espontâneos em indivíduos normais avaliados por diferentes parâmetros citogenéticos, conforme exemplificado a seguir.

Linfócitos de doadores idosos têm uma capacidade proliferativa diminuída, que resulta de uma proporção menor de linfócitos T que respondem ao estímulo de mitógenos (WEKSLER & HUTTEROTH, 1974) e de uma falha na repetição das divisões dos linfócitos estimulados em culturas (INKELES *et alii*, 1977). FENECH & MORLEY (1985b) encontraram uma correlação positiva entre frequência de micronúcleos e idade e relataram um aumento de quatro vezes na frequência de micronúcleos de culturas de indivíduos de 80 anos em relação à de doadores recém-nascidos. Estudos realizados em roedores (GOLLAPUDI *et alii*, 1986; SUTOU *et alii*, 1986) mostraram que o sexo e a privação de alimentos devem contribuir para a variabilidade interindividual em relação à frequência de micronúcleos. Uma produção elevada de micronúcleos foi observada por COUNTRYMAN & HEDDLE (1976) em culturas irradiadas de linfócitos humanos.

A taxa de anomalias cromossômicas encontradas em células cultivadas aumenta com a idade (HEDNER *et alii*, 1982; NORMAN *et alii*, 1984; MARLHENS *et alii*, 1986), a exposição a raios X (NORMAN *et alii*, 1984) e o hábito de fumar (NAGAYA & TORIUMI, 1985), e é maior em mulheres do que em homens (HEDNER *et alii*, 1982).

Não há concordância na literatura com relação à associação entre TCI, idade e sexo. GALLOWAY & EVANS (1975), MORGAN & CROSSEN (1977a) e CROSSEN (1982a) não encontraram influência da idade e do sexo na determinação da frequência de TCI, porém DE ARCE (1981) observou que, na faixa de 30 a 40 anos, tanto homens como mulheres apresentavam um número mais elevado de TCI por célula, e HEDNER *et alii* (1982) referiram uma frequência maior de TCI no sexo

feminino em relação ao masculino, independente da idade. A diferença entre os sexos com relação à frequência de TCI foi confirmada por ROSA (1984) que, no entanto, também encontrou diferenças significativas entre homens normais de faixas etárias diversas e um pequeno aumento de TCI com o aumento da idade das mulheres. MORGOLIN & SHELBY (1985), revisando 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. Alguns outros fatores que podem atuar como indutores de TCI são o hábito de fumar (OBE *et alii*, 1982), a ingestão de bebidas alcólicas (BUTLER *et alii*, 1981; SESHADRI *et alii*, 1982) e o uso de medicamentos, como anticoncepcionais (KRISHNA-MURTHY & PREMA, 1979), antirreumáticos (MELARAGNO, 1982) ou antineoplásicos (BANERJEE & BENEDICT, 1979).

O AMZ, nas concentrações de 1, 0,2 e 0,02µg/ml, não reduziu o índice mitótico (IM) nem induziu o aparecimento de micronúcleos, anomalias cromossômicas estruturais e numéricas ou trocas entre cromátides-irmãs. Conforme referido em Material e Métodos, a concentração de 1µg/ml equivale à solubilidade máxima do AMZ em água (WORTHING, 1983) e a de 0,02µg/ml corresponde à concentração encontrada em tecidos de novilhos (MCDOUGALL *et alii*, 1979). Como todos os limites máximos de resíduos do AMZ recomendados pela FAO para produtos de origem animal e vegetal são inferiores à concentração de 1µg/ml (Tabela 5), esses resultados reforçam a conclusão de que os alimentos produzidos com o uso agropecuário apropriado do AMZ provavelmente não expõem a população a uma ação genotóxica desse princípio ativo.

Não foram encontrados estudos que avaliassem a mutagenicidade de tais concentrações de AMZ na literatura, com exceção de um que analisou a frequência de mutações de ponto em linfoma de camundongo após tratamento com 1µg/ml do derivado **IV** do AMZ, em sistema com ativação metabólica, cujos resultados também foram negativos (MC GREGOR & RIACH, 1984, *cf.* FAO/WHO, 1984).

Os efeitos de concentrações mais elevadas de AMZ sobre o IM foram, então, testados em diversos ensaios. Em culturas tratadas com 100, 80 e 60µg de AMZ por ml foi detectada uma inibição mitótica de 50%, não observada em concentrações inferiores. Porém, como se pretendia avaliar o potencial genotóxico do AMZ também pela frequên-

cia de TCI, o efeito do AMZ sobre o IM foi testado em culturas tratadas com a 5-BrdU. Esse procedimento foi necessário pois CROSSEN & MORGAN (1977), analisando culturas de linfócitos com 48, 72 e 96 horas de duração, estimuladas por fito-hemaglutinina e tratadas com 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 uma ação tóxica. Nessa condição, os resultados do IM das culturas tratadas com as concentrações de 100, 80 e 60µg/ml não se alteraram significativamente, mas as culturas tratadas com 25 e 40µg de AMZ por ml tiveram redução de 50% no índice mitótico.

Os protocolos para a avaliação de genotoxicidade de agentes químicos por parâmetros citogenéticos recomendam que sejam pesquisados os efeitos de uma concentração capaz de reduzir o índice mitótico em torno de 50% e de duas outras concentrações mais baixas, para investigar uma possível relação dose-efeito (BRUSICK, 1984; PERRY *et alii*, 1984; PRESTON *et alii*, 1987; ISHIDATE, 1988). Por isso, foram escolhidas para o desenvolvimento do estudo citogenético as concentrações de 100 (A-100), 50 (A-50) e 25µg/ml (A-25). Esses protocolos recomendam também que a concentração máxima de acetona ou outros solventes orgânicos usados no preparo das soluções-teste não exceda uma concentração final de 8µl/ml. Neste estudo, a concentração final estimada da acetona foi de 0,5µl/ml, tanto nos grupos tratados com o AMZ como no controle tratado com o veículo (CoAc).

Os efeitos das três concentrações escolhidas de AMZ foram investigados em dez indivíduos, devido à possibilidade de uma variação interindividual em resposta à ação de agentes químicos sobre os linfócitos humanos. Foi preparado um volume de meio de cultura enriquecido com soro humano AB suficiente para a realização dos dez ensaios. Do mesmo modo, todo o material restante utilizado, como a fito-hemaglutinina e as soluções de colquicina e de 5-BrdU, provinha do mesmo lote. O procedimento laboratorial foi idêntico para a execução dos dez ensaios e toda a análise citogenética foi feita por um único pesquisador.

Esses cuidados são necessários dado que inúmeros fatores contribuem para a variação interindividual detectada pelos diferentes parâmetros citogenéticos, como a concentração de 5-BrdU (MAZRIMAS & STETKA, 1978), as diferenças na resolução apresentadas pelas várias técnicas de coloração diferencial de cromátides-irmãs e



o tipo de meio de cultura utilizado (CROSSEN, 1982b), os critérios de análise empregados (ZAVALA *et alii*, 1979), 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), o tipo de soro adicionado ao meio de cultura (GOSH & NAND, 1979), a natureza *in vivo* ou *in vitro* do experimento (KRAM *et alii*, 1979) e o tipo de agente mitogênico utilizado (DEKNUDT & KAMRA, 1983).

Os resultados do índice mitótico confirmaram a ação citotóxica do AMZ sobre os linfócitos humanos (Tabela 19), que havia sido detectada nos testes preliminares. Esses resultados concordam com os encontrados por CAMPELLO & RODRIGUES (1986), que verificaram uma redução significativa do IM em culturas de células IB-RS-2 de suínos tratadas com 50µg de AMZ por ml, mas não nas tratadas com 20 e 30µg/ml.

Não é possível esclarecer o modo de ação do AMZ no processo de divisão celular, pois os eventos bioquímicos que conduzem o processo mitogênico são múltiplos. A redução do IM pode representar o bloqueio completo da divisão de um certa fração 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.

Os grupos tratados com o AMZ mostraram frequências de micronúcleos maiores que os controles (Tabela 19). Os micronúcleos originam-se de anomalias cromossômicas instáveis (HEDDLE & CARRANO, 1977) ou de cromossomos inteiros perdidos durante a anáfase (VIAGGI *et alii*, 1987; FORD *et alii*, 1988). Entretanto, como na análise de anomalias cromossômicas numéricas foram consideradas apenas as hi-perdiploidias, não é possível inferir qual desses processos contribuiu preferencialmente na formação dos micronúcleos observados. Anteriormente, apenas o derivado **IV** do AMZ havia sido submetido ao teste de micronúcleos. HOUNSELL & WALKER (1983, *cf.* FAO/WHO, 1984) não detectaram indução de micronúcleos em medula óssea de camundongos pelas concentrações de 56,3, 112,5 e 225mg desse composto por kg de peso corpóreo.

A frequência de micronúcleos foi maior nos grupos **Co** dos Ensaio **VII** a **XVI** do que nos **Co** dos Ensaio **I** e **II**. Todavia, esperar-se-ia encontrar o inverso, pois a frequência de micronúcleos deve crescer com o aumento do número de divisões celulares ocorridas e, portanto, com o aumento da duração da cultura. Uma explicação possível é que o meio de cultura e o soro humano AB usados nos dois conjuntos de Ensaio (**I** e **II** e **VII** a **XVI**), que eram provenientes de lotes diferentes, tenham contribuído para o estabelecimento da diferença entre os resultados encontrados.

Os grupos tratados com AMZ apresentaram frequências de aberrações cromossômicas maiores que as dos controles (Tabela 24), porém tais diferenças não foram significativas. Esses resultados discordam dos encontrados por CAMPELLO & RODRIGUES (1986), que verificaram uma ação clastogênica do AMZ em culturas de células IB-RS-2 de suínos, expostas por 48 horas a uma concentração de 50µg/ml. As causas dessa discordância são desconhecidas, porém é possível que a linhagem celular de suínos analisada seja mais sensível à ação do AMZ do que os linfócitos humanos. Outra hipótese que poderia justificar o achado seria que a acetona, usada como veículo na dissolução prévia do AMZ, tenha contribuído na expressão das anomalias cromossômicas detectadas, considerando que esses autores não relataram qual foi a concentração final estimada desse solvente nas diferentes culturas tratadas com o AMZ e nem referiram a existência de culturas-controle tratadas apenas com o solvente.

Apesar dos grupos tratados com o AMZ não terem diferido dos controles com relação à frequência de metáfases com anomalias, é interessante destacar a maior frequência de eventos anômalos raros nos grupos tratados com AMZ. Enquanto no grupo **Co** havia apenas translocações e fragmentos e no grupo **CoAc** havia apenas uma figura quadrirradial (**qr**), foram encontrados um cromossomo dicêntrico (**dic**) em **A-100**, cinco **dic** e uma **qr** em **A-50** e duas **qr** em **A-25**, além dos outros rearranjos. Investigando a ocorrência de anomalias cromossômicas em cerca de 30.000 linfócitos normais de homens e mulheres, RICHARDSON *et alii* (1984) não encontraram figuras quadrirradais em 21.570 células e a incidência de dicêntricos era menor do que 1:10.000 células. Esses autores concluíram que, em estudos de avaliação de genotoxicidade, as aberrações do tipo **qr** e **dic** devem ser consideradas mais importantes que os demais tipos de eventos, devido à sua ocorrência rara em culturas controles. Sob esse prisma, os

resultados observados neste estudo concordam com os de CAMPELLO & RODRIGUES (1986), que encontraram uma frequência muito maior de rearranjos, incluindo nessa categoria dicêntricos, quadrirradiais e translocações cromossômicas, inclusive nos grupos tratados com AMZ com concentrações de 20 e 30 µg/ml, que foram referidas como não genotóxicas.

A importância da consideração do aspecto qualitativo das aberrações detectadas em estudos para a avaliação de mutagenicidade pôde ser comprovada, também, por HASHIMOTO (1990), que não encontrou diferenças entre controles e aplicadores de inseticidas com relação às frequências de metáfases com todos os tipos de eventos agrupados, porém detectou uma frequência maior de anomalias cromossômicas complexas na amostra de aplicadores de inseticidas em relação à amostra controle.

Outro aspecto a ser considerado nesta discussão é que as aberrações cromossômicas complexas, como dicêntricos, figuras quadrirradiais e translocações, foram observadas nas culturas de 48 horas, mas não nas culturas de 72 horas. Essa diferença é perfeitamente justificável para os grupos tratados com AMZ, visto que as concentrações de AMZ usadas nas culturas de 48 horas foram muito maiores. Neste estudo, a frequência de células com aberrações cromossômicas complexas foi de 0,2% no grupo **Co** e 0,4% no grupo **CoAc**, em culturas de 48 horas. Outros autores (NIKULA *et alii*, 1984; SINHA *et alii*, 1984; POHLOVA *et alii*, 1986; STUCKER *et alii*, 1986; BENHAMOU *et alii*, 1988) também observaram células com aberrações cromossômicas complexas, em 0,15% a 0,29% dos linfócitos cultivados por 48 horas de indivíduos utilizados como controles em estudos de monitorização populacional. Por isso, a ocorrência dos tipos complexos de aberrações nas células controles cultivadas por 48 horas e a sua ausência nas cultivadas por 72 horas sugerem que as culturas de 48 horas são mais apropriadas para a detecção de efeitos clastogênicos. Todavia, há uma controvérsia a esse respeito na literatura. BUCKTON & PIKE (1964) relataram uma redução significativa na frequência de aberrações complexas em indivíduos expostos à radiação, com o aumento da duração das culturas. Do mesmo modo, MUTCHINICK *et alii* (1981) verificaram uma frequência de anomalias complexas significativamente maior em metáfases que haviam se dividido apenas uma vez em cultura do que em metáfases que haviam se dividido duas

vezes, na presença de 5-BrdU. Esses autores também encontraram uma relação semelhante para as anomalias mais simples, como quebras, falhas e fragmentos. Contudo, outros autores não encontraram diferenças entre metáfases de 48 e 72 horas com relação às frequências dos diferentes tipos de anomalias cromossômicas espontâneas ou observadas em culturas de indivíduos ocupacionalmente expostos (FUNES-CRAVIOTO *et alii*, 1975; PURCHASE *et alii*, 1978; SINHA *et alii*, 1984) ou até encontraram frequências maiores de todos os tipos em culturas de 72 horas (FORNI *et alii*, 1980).

Observou-se uma extensa região cromossômica desespiralizada em um cromossomo 3 e um cromossomo 16, em uma célula do grupo **A-50**. Esse achado assemelha-se ao encontrado em células tratadas com outros agentes químicos, como por exemplo a distamicina A, um antibiótico oligopeptídico, que promove a desespiralização da região centromérica dos cromossomos 1, 3, 9 e 16 e da porção distal do braço longo do cromossomo Y (PRANTERA *et alii*, 1979; SCHMID *et alii*, 1984). Apesar do fenômeno de desespiralização cromossômica ser raro, sua ocorrência em uma única célula deste estudo não permite a conclusão de que o AMZ exerça uma ação desespiralizante, nem que essa ação seja específica para os cromossomos 3 e 16.

As frequências de metáfases com anomalias cromossômicas foram altas nos controles de alguns ensaios (**I, II, VIII, XII, XIV, XV e XVI**). As frequências de células anômalas em culturas de linfócitos de indivíduos normais variam de 0,36% a 5% (ZAVALA *et alii*, 1979; PATHAK *et alii*, 1982; GUNDY & VARGA, 1983; RICHARDSON *et alii*, 1984). Em estudos de monitorização populacional de indivíduos ocupacionalmente expostos a agentes químicos, conduzidos na mesma época e no mesmo laboratório que o presente trabalho, foram encontradas frequências de 2,3% (BERTOLLO, 1990) e de 2,7% (HASHIMOTO, 1990) de metáfases anômalas nos indivíduos das amostras controle. Uma hipótese para explicar as altas frequências encontradas nos Ensaios **VIII, XII, XIV, XV e XVI** é que tenham ocorrido mudanças químicas ao longo do tempo nos componentes do meio de cultura, cujo estoque foi preparado e congelado a -20°C , e que tais mudanças tenham inativado certos compostos essenciais ou produzido toxinas que elevem a frequência de anomalias cromossômicas.

O tempo decorrido entre a realização dos Ensaios **VII a XVI** foi de quatro meses e eles foram enumerados em ordem crescente, de acordo com a sequência em que foram realizados. Quando esses



ensaios foram reunidos nos conjuntos **VII+VIII+IX+X**, **XI+XII+XIII** e **XIV+XV+XVI**, observou-se uma elevação nas frequências de metáfases anômalas nos controles, concordante com o aumento do tempo decorrido (3,8%, 5,3% e 7,3%, respectivamente), o que reforça a hipótese acima formulada. Pelo fato de não terem sido padronizados os lotes das substâncias usadas na realização das culturas celulares dos testes preliminares, como o meio de cultura e o soro suplementar, torna-se difícil interpretar a causa das frequências elevadas de células com anomalias cromossômicas nos controles dos Ensaios **I** e **II**.

A proporção de falhas e quebras espontâneas referidas em estudos publicados é variável, ora as quebras sendo mais frequentes, ora ocorrendo a situação inversa. Os próprios critérios de classificação dessas anomalias cromossômicas pelos diferentes pesquisadores 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 de natureza distinta, como a extração das proteínas, que se associam ao DNA sem que essa molécula seja afetada, ou quebras verdadeiras, que incluem rupturas da molécula de DNA. SATYA-PRAKASH *et alii* (1981) verificaram que a grande maioria das falhas, analisadas com a técnica de coloração pela prata, compreende uma descontinuidade da estrutura central da cromátide e, portanto, as falhas constituem-se em rupturas na estrutura da molécula e devem ser computadas na avaliação de clastogenicidade.

Na realidade, a variação na proporção de quebras e falhas descrita na literatura deve tanto expressar fenômenos reais como ser devida a diferenças nos critérios de análise. Neste estudo, a frequência de falhas foi maior que a de quebras no grupo **A-100**, mas as frequências desses dois fenômenos não diferiram entre si nos controles e nos demais grupos tratados com AMZ. Como a análise citogenética foi conduzida por um único pesquisador e em teste cego, pode-se concluir que não foram variações nos critérios de análise os responsáveis por essa diferença. Variação similar foi relatada por RICHARDSON *et alii* (1984), que observaram mais falhas que quebras em culturas tratadas com algumas substâncias químicas (solução salina e dimetilsulfóxido - DMSO, com e sem ativação metabólica, e etanol, com ativação metabólica), o que também ocorria no controle; porém, outras substâncias (ciclofosfamida ativada, etanol e mitomicina) induziam mais quebras que falhas.

Em outros estudos para avaliação do efeito clastogênico de agentes químicos *in vitro*, ou de monitorização populacional em profissionais expostos a esses agentes, foram encontradas nos controles frequências maiores (REIDY *et alii*, 1983; FROES, 1985; BERTOLLO, 1990), iguais (VICENTINI, 1984; HASHIMOTO, 1990) ou menores (YODER *et alii*, 1973; SINHA *et alii*, 1984) de quebras e falhas. Em relação aos eventos induzidos, as frequências proporcionais de quebras e falhas também variaram. As quebras foram referidas como mais frequentes por FROES (1985), em células tratadas com frações do extrato de avelãs (*Euphorbia tirucalli*) e por VIEIRA (1986), em células tratadas com a tintura de *Thuya occidentalis*. No entanto, RICHARDSON *et alii* (1984) encontraram mais falhas do que quebras em culturas tratadas com substâncias químicas (DMSO, etanol).

Pode-se supor, com base nessas informações, que independente da proporção de quebras e falhas que ocorrem espontaneamente em certo tipo celular, a situação pode ser modificada quando um agente químico adicionado à cultura induz preferencialmente um desses tipos de aberrações.

Quebras e falhas foram mais frequentes que os outros tipos de anomalias, independente da duração da cultura e do tratamento. Cada quebra ou falha representa um evento único nas células e envolve um só cromossomo, enquanto outras anomalias, como cromossomos dicêntricos, figuras quadrirradiais e translocações envolvem no mínimo três eventos subsequentes, ou seja, uma ruptura em pelo menos dois cromossomos e a fusão dos segmentos. Portanto, o achado de que quebras e falhas são mais frequentes que outros tipos de eventos anômalos deve refletir a probabilidade muito menor da ocorrência de eventos múltiplos e interdependentes dentro de uma única célula do que da ocorrência de um evento isolado.

Os eventos cromatídicos foram mais frequentes que os cromossômicos no grupo **A-100**, mas não diferiram entre si nos controles e nos demais grupos tratados com AMZ. Todavia, quando se considerou separadamente as quebras e as falhas, observou-se que as quebras são predominantemente do tipo cromossômico e as falhas preferencialmente do tipo cromatídico, em todos os grupos de tratamento. 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 (SAVAGE, 1980). Eventualmente, uma alteração no sistema de reparo pós-duplicação também pode servir de base para o aparecimento da quebra cromatídica. As aberrações cromossômicas, isto é, que afetam concomitantemente as duas cromátides, são mais provavelmente produzidas por alterações pré-duplicacionais não reparadas (SAVAGE, 1980), embora não se possa excluir a possibilidade de um agente afetar locos específicos, atingindo igualmente ambas as cromátides-irmãs após a duplicação (NATARAJAN, 1985).

Das anomalias cromossômicas espontâneas observadas em estudos populacionais ou em controles de experimentos para avaliação de atividade mutagênica, os eventos do tipo cromatídico são mais frequentes (PILINSKAYA, 1971; YODER *et alii*, 1973; BIANCHI *et alii*, 1974; VAN BAO *et alii*, 1974; KECK & EMERIT, 1979; MATTEI *et alii*, 1979; MEYNE *et alii*, 1979; BOHLKE *et alii*, 1983; SINHA *et alii*, 1984), o mesmo acontecendo em relação aos eventos induzidos por substâncias químicas (PILINSKAYA, 1971; YODER *et alii*, 1973; GEBHART, 1974; VAN BAO *et alii*, 1974; TAMURA *et alii*, 1974; RABELLO *et alii*, 1975; JAMEELA *et alii*, 1979; MEYNE *et alii*, 1979; BOHLKE *et alii*, 1983).

A natureza da anomalia induzida, cromossômica ou cromatídica, depende do tipo de agente mutagênico empregado (NATARAJAN, 1985; NATARAJAN & OBE, 1986). Agentes como os raios X, a bleomicina e a estreptonigrina, que induzem quebras no filamento do DNA, produzem aberrações cromossômicas em G1, cromatídicas em G2 e uma mistura de ambas na fase S do ciclo celular e, portanto, são denominados de agentes S-independentes. Por outro lado, os agentes S-dependentes induzem apenas eventos cromatídicos independente da fase do ciclo celular em que se faz o tratamento e as anomalias são visualizadas somente após a passagem das células por um período S. Nessa categoria são incluídos a luz ultravioleta e a maioria dos agentes químicos, por exemplo os agentes alquilantes, os hidrocarbonetos policíclicos e as aminas aromáticas. Com base nos resultados obtidos neste estudo, é provável que o AMZ constitua-se em um agente S-independente.

De modo geral, as frequências de quebras e falhas foram mais elevadas nos três conjuntos de cromossomos maiores (A, B e C+X)

e mais baixas no conjunto de cromossomos menores (D+E+F+G+Y) que o esperado com base no tamanho relativo dos cromossomos (LUBS *et alii*, *cf.* ISCN, 1978), em todos os grupos de tratamento. Essas diferenças foram significativas em **CoAc** e **A-25**. Todavia, os grupos de tratamento não diferiram entre si com relação à distribuição de quebras e falhas nesses quatro conjuntos cromossômicos.

A casualidade na distribuição das aberrações cromossômicas ao longo do cariótipo foi referida em indivíduos normais por alguns autores (FUNES-CRAVIOTO *et alii*, 1974, entre outros), mas regiões preferenciais de anomalias foram encontradas em indivíduos normais (AYME *et alii*, 1976; BARNABEI *et alii*, 1982), e em portadores de síndromes de instabilidade cromossômica, incluindo anemia de Fanconi (KOSKULL & AULA, 1973; DUTRILLAUX *et alii*, 1977), síndrome de Bloom (SCHROEDER & GERMAN, 1974) e ataxia telangiectasia (COHEN *et alii*, 1975; AL SAADI *et alii*, 1980). A incidência de anomalias em regiões cromossômicas preferenciais pode ser atribuída à presença de sítios frágeis em células de indivíduos normais ou portadores de síndromes de instabilidade cromossômica (SUTHERLAND, 1977; KAHKONEN, 1988). Além disso, distribuições intercromossômicas não-casuais de anomalias induzidas pela exposição a agentes químicos e físicos também foram relatadas (SEABRIGHT, 1973; AYRAUD *et alii*, 1976).

A análise das frequências de trocas entre cromátides-irmãs detectou uma ação genotóxica do AMZ sobre os linfócitos humanos. Não foram encontrados na literatura relatos sobre a investigação da atividade genotóxica do AMZ por esse parâmetro citogenético. Como as TCI são quebras que ocorrem no mesmo loco das duas cromátides de um cromossomo, seguidas de intercâmbio e reparo, sua indução deve refletir uma indução de danos à estrutura das cromátides pelo AMZ.

Uma incidência de TCI aumentada nos cromossomos grandes (1, 2, 3, B e C+X) e reduzida nos cromossomos pequenos (D, E, F e G+Y) foi detectada tanto nos controles como nos grupos tratados com AMZ. 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 *et alii*, 1974; IKUSHIMA & WOLFF, 1974; SMYTH & EVANS, 1976; HOD & 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+Y (LATT, 1974a; MORGAN & CROSSEN, 1977b; MUTCHINICK *et alii*, 1979; GRANATA *et alii*, 1981; NEWMAN *et alii*, 1982; MCNALLY & RAY, 1983). Não há concordância também em relação à distribuição das TCI induzidas, que ora são casuais (LATT, 1974b; LAMBERT *et alii*, 1976), ora não casuais (IKUSHIMA & WOLFF, 1974; NEWMAN *et alii*, 1982; MCNALLY & RAY, 1983; FROES, 1985; VIEIRA, 1986; ZHANG *et alii*, 1988). O número elevado de TCI em cromossomos do grupo B tem sido relacionado a uma susceptibilidade preferencial à ação da 5-BrdU (MORGAN & CROSSEN, 1977b) e a escassez de TCI em cromossomos pequenos tem sido atribuída à ocorrência relativamente rara de TCI na região pericentromérica, que constitui uma grande parte desses cromossomos (LATT, 1974a).

Os resultados do IM mostraram que a ação do AMZ sobre o processo de divisão celular obedeceu uma relação dose-efeito (Tabela 19). Todavia, não se observou uma relação dose-efeito quanto à ação genotóxica do AMZ detectada pelos parâmetros micronúcleos e TCI (Tabelas 19 e 34), em relação aos quais o grupo **A-50** apresentou frequências maiores que o grupo **A-100**. Essa ausência de relação dose-resposta deveu-se, provavelmente, a uma eliminação seletiva de células severamente afetadas no grupo **A-100**, hipótese essa reforçada pelo baixo índice mitótico observado nesse grupo de tratamento. Do mesmo modo, essa pode ser também uma hipótese para justificar o achado de frequência de metáfases anômalas superior no grupo **A-25**, que nos **A-50** e **A-100** (Tabela 24).

Uma extensa variabilidade interindividual foi detectada para todos os parâmetros. As variações relativas ao índice mitótico observadas entre os doadores 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.

Vários fatores podem ter contribuído para as diferenças entre doadores avaliadas pelo teste de micronúcleos nos Ensaio **VII**



a **XVI**. Segundo HEDDLE **et alii** (1984), a frequência de micronúcleos em uma população de células, em determinado momento após o tratamento com um agente clastogênico, depende da taxa de divisão celular, da variação na frequência de fragmentos acêntricos ao longo do tempo, da fração desses fragmentos que originam micronúcleos e da pressão de seleção contra células com micronúcleos. Sendo os micronúcleos mantidos nas gerações celulares, as células de segunda geração ou de gerações posteriores devem apresentar mais micronúcleos acumulados no transcorrer das divisões celulares que as células de primeira geração. De fato, LASNE **et alii** (1984) encontraram uma incidência muito maior de micronúcleos em células que haviam se dividido duas ou mais vezes, em relação às que se dividiram apenas uma vez, em culturas celulares com incorporação de 5-BrdU e exposição a agentes mutagênicos. A correlação positiva significativa entre índice mitótico e micronúcleos no grupo **Co** (Tabela 39) está de acordo com os resultados obtidos por esses autores.

Uma possível causa da variabilidade interindividual com relação à frequência de metáfases com anomalias seria o tempo decorrido até a realização dos ensaios após o preparo do meio de cultura, conforme referido anteriormente. No entanto, a possibilidade de polimorfismos genéticos terem contribuído para essa variabilidade não deve ser descartada.

As frequências médias de TCI por célula variam amplamente entre os indivíduos analisados em diferentes investigações. Os valores médios extremos destacados por MORGAN & CROSSEN (1977a) em extensa revisão do assunto 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 (200ug/ml).

Além dos fatores interferentes na frequência de TCI já referidos anteriormente, as variações nas frequências de TCI, tanto as inter quanto as intraindividuais, podem ser devidas a diferenças individuais em relação à linha basal de TCI, em resposta à 5-BrdU (EVANS, 1977; MAZRIMAS & STETKA, 1978; LAMBERTI **et alii**, 1983), em resposta aos agentes que lesam o DNA ou à sua associação com a 5-BrdU (CROSSEN, 1982a). Além disso, os linfócitos T e B, cuja proporção não foi determinada neste estudo, diferem entre si quanto à frequência de TCI (BECHER **et alii**, 1979; LINDBLAD & LAMBERT, 1981; MILLER, 1986; SANTESSON, 1986; MILLER, 1988). Em adição, outras variáveis ainda desconhecidas podem ter contribuído para a variabi-

lidade observada.

A análise de correlação entre os resultados obtidos pelos diferentes parâmetros permite interessantes observações. Correlações positivas ocorreram entre o IM e as frequências de micronúcleos, no grupo **Co**, e entre as frequências de células com anomalias cromossômicas e de TCI/célula, nos grupos **A-100** e **A-50**. Correlações negativas entre o IM e a frequência de TCI/célula foram detectadas em todos os grupos de tratamento, com exceção do **A-25**, e entre IM e frequências de células com anomalias cromossômicas em **A-100**.

A frequência de micronúcleos é dependente do número de divisões que as células sofrem em cultura, conforme já referido. Portanto, se há um acúmulo de micronúcleos no transcorrer das divisões celulares, as células que se dividem várias vezes devem apresentar um número maior de micronúcleos do que as células que pouco ou nunca se dividem.

São escassos e contraditórios os estudos que investigaram uma possível relação entre TCI e IM. Além disso, a frequência de TCI tem sido comparada também com o índice de proliferação celular (IPC), calculado a partir das frequências de células de primeira, de segunda e de terceira gerações cultivadas na presença de 5-BrdU. Alguns autores (BEEK & OBE, 1979; GIULOTTO *et alii*, 1980; PARKES *et alii*, 1985) não detectaram correlação entre frequências de TCI espontâneas e IM ou IPC, sendo que BEEK & OBE (1979) encontraram resultados semelhantes em relação às frequências de TCI induzidas pelo agente alquilante trenimon. Entretanto, outros autores detectaram uma correlação negativa entre TCI e IM ou IPC, tanto para frequências espontâneas (LAMBERTI *et alii*, 1983) como para frequências induzidas por derivados de 9-aminoacridina (GIBAS & LIMON, 1979), acetaldeído (BOHLKE *et alii*, 1983), ciclofosfamida e mitomicina C (DEKNUDT & KAMRA, 1983), anticoagulantes (TUCKER & CHRISTENSEN, 1987) e tabaco e pesticidas (RUPA *et alii*, 1989). Esses resultados concordam com a correlação negativa entre IM e TCI detectada neste estudo. Todavia, quando são empregadas concentrações muito altas e tóxicas do agente, que reduzem drasticamente o IM, as frequências observadas de TCI podem ser menores que as esperadas (MORIMOTO *et alii*, 1985), provavelmente em função da seleção negativa de células severamente afetadas.

Não houve correlação entre o IM e a frequência de metáfa-



ses com anomalias cromossômicas, mas no grupo **A-100** detectou-se uma correlação negativa devida a baixos índices mitóticos e altas frequências de metáfases anômalas, tendência que praticamente começa a se manifestar no grupo **A-50**. Esses resultados reforçam a hipótese formulada anteriormente de que um excesso de aberrações cromossômicas induzidas poderia estar provocando a morte celular que, por sua vez, estaria reduzindo o IM.

Correlações positivas entre aberrações cromossômicas e TCI foram detectadas em 68% de 215 substâncias consideradas por GEBHART (1981), em 80% de 69 agentes químicos revistos por ABE & SASAKI (1982) e em 78% de 27 compostos testados por GULATI *et alii* (1989), conforme relatado na Introdução. Desse modo, a correlação positiva detectada entre esses dois parâmetros nos grupos **A-100** e **A-50**, sugerem que uma parcela dos danos causados pelo AMZ ao DNA não tenha sido reparada e se expresse na forma de anomalias cromossômicas, enquanto os danos restantes tenham sido reparados, alguns deles manifestando-se como TCI.

A ausência de correlação entre os resultados de alguns dos parâmetros citogenéticos analisados indica a necessidade do emprego concomitante de vários deles para a avaliação de genotoxicidade de compostos químicos, evitando-se assim uma interpretação errônea dos resultados (falso-negativos ou falso-positivos).



V. RESUMO E CONCLUSÕES

O amitraz (AMZ) é o princípio ativo de carrapaticidas amplamente utilizados no Brasil, principalmente para o controle de **Boophilus microplus** em bovinos. Além disso, em outros países esse composto é usado no combate a uma variedade de ácaros e insetos zoo ou fitoparasitas de interesse econômico. No entanto, os resultados da investigação do potencial genotóxico do AMZ relatados na literatura são ainda escassos e contraditórios, nenhum deles tendo sido realizado em células humanas. Por esse motivo, foi proposto o presente estudo, que visou investigar o potencial genotóxico do AMZ em culturas de linfócitos humanos.

As culturas foram desenvolvidas com linfócitos do sangue periférico de dezesseis doadores do sexo masculino, de uma faixa etária variável de 18 a 28 anos. Nenhum deles era fumante, todos eram saudáveis, com dieta alimentar usual, não consumiam bebida alcoólica e não tinham recebido radiação, feito uso de medicamentos ou contraído doença viral em período próximo da colheita de sangue para a análise pretendida.

Os linfócitos foram cultivados em meio RPMI 1640 (Difco) enriquecido com 20% de soro humano AB e estimulados por fito-hemaglutinina. A colquicina foi adicionada uma hora antes da hipotonização e fixação com metanol:ácido acético. Para a coloração diferencial das cromátides-irmãs, que permite a análise de trocas entre cromátides-irmãs (TCI), foi adicionada 5-BrdU ($3,25 \cdot 10^{-5}$ M) no início das culturas e as lâminas foram cobertas com Hoechst 33258 ($0,94 \cdot 10^{-7}$ M), incubadas em NaH_2PO_4 (1M; pH 8,1-8,3; 87-89° C) e coradas em solução de Giemsa a 2%. Para o estudo dos demais parâmetros citogenéticos (índice mitótico - IM; frequências de núcleos associados a micronúcleos - MN; e frequências de metáfases com anormalias cromossômicas - AC), as lâminas foram apenas coradas com solução de Giemsa a 2%. A análise citogenética foi realizada em teste cego, isto é, as lâminas foram codificadas para que o pesquisador não identificasse sua procedência.

Foram desenvolvidos dezesseis ensaios, cada um com células de um único doador, nos quais foram testadas diferentes concentrações de AMZ, dissolvido em acetona. O composto foi testado inicialmente nas concentrações de 0,02, 0,2 e 1 µg/ml, em culturas de 72 horas, nos Ensaios I e II. Nenhuma delas apresentou efeitos cicloa-

tivos ou genotóxicos avaliados pelos parâmetros acima mencionados. As anomalias cromossômicas estruturais foram quebras, falhas, cromossomos com deficiências e fragmentos, sendo que quebras e falhas foram mais frequentes (62% a 100%) para todas as concentrações. Não foram encontradas células hiperdiploides.

Para a seleção das demais concentrações a serem estudadas, foi analisado o IM em culturas de 72 horas tratadas com amitraz nas concentrações de 10, 20, 25, 40, 50, 60, 80, 100 e 150 µg/ml, nos Ensaio **III** a **VI**. Houve redução em torno de 50% do IM nas culturas tratadas com concentrações entre 60 e 100 µg/ml e de 77% com a de 150 µg/ml, em relação ao controle. Na presença de 5-BrdU, as concentrações de 25 e 40 µg/ml também reduziram o IM ao redor de 50%. A utilização de amostras de 4.000 e 10.000 núcleos para o cálculo do IM confirmaram os resultados observados em amostras de 2.000 núcleos que, portanto, foram consideradas representativas da população celular. Com base nesses resultados foram selecionadas para estudo citogenético as concentrações de 25 (**A-25**), 50 (**A-50**) e 100 µg (**A-100**) de AMZ por ml.

O estudo dos efeitos dessas concentrações em dez doadores (Ensaio **VII** a **XVI**) compreendeu a avaliação de todos os parâmetros. Os valores do índice mitótico relativo (100% para o grupo controle - **Co**) foram 94% no controle com acetona (**CoAc**), 50% em **A-100**, 69% em **A-50** e 81% em **A-25**. As frequências percentuais de núcleos com micronúcleos associados foram 0,98 em **Co**, 1,02 em **CoAc**, 1,17 em **A-100**, 1,36 em **A-50** e 1,16 em **A-25**. As frequências percentuais de metáfases com anomalias cromossômicas foram 5,1 em **Co**, 5,1 em **CoAc**, 7,1 em **A-100**, 6,2 em **A-50** e 7,4 em **A-25**. As frequências médias de TCI por célula foram $12,50 \pm 1,03$ em **Co**, $12,85 \pm 1,42$ em **CoAc**, $14,63 \pm 1,55$ em **A-100**, $14,87 \pm 1,32$ em **A-50** e $13,57 \pm 1,09$ em **A-25**. Os três primeiros parâmetros foram avaliados em culturas de 48 horas e as frequências de TCI em culturas de 72 horas. Os índices mitóticos relativos foram menores e as frequências de núcleos com micronúcleos, de metáfases com aberrações cromossômicas e de TCI por célula foram maiores em todos os grupos tratados com AMZ, em relação aos controles. Foram detectadas diferenças estatisticamente significativas entre doadores e entre grupos de tratamento quanto aos parâmetros IM, MN e TCI. Diferem dos controles os grupos **A-100** para IM, **A-50** para MN e ambos para TCI. Porém, alguns doadores mostraram-se

particularmente sensíveis à concentração de 25µg/ml, em pelo menos um desses parâmetros citogenéticos (IM: doadores **XI**, **XII** e **XIII**; MN: doadores **VIII**, **IX**, **XV** e **XVI**; TCI: doadores **VII**, **X**, **XIV** e **XV**). A distribuição de TCI por cromossomo ou grupo cromossômico não foi casual para nenhum dos cinco grupos de tratamento, ocorrendo frequências maiores nos cromossomos 1, 2, B e C+X e menores em D, E, F e G+Y, em relação às frequências esperadas com base no tamanho relativo dos cromossomos.

Em discordância aos demais parâmetros, não foram detectadas diferenças significativas entre doadores e entre grupos de tratamento com relação às frequências de metáfases com anomalias cromossômicas. Todavia, alguns doadores (**VII**, **IX**, **XI**, **XV** e **XVI**) mostraram-se sensíveis a pelo menos uma das concentrações testadas por esse parâmetro. As anomalias cromossômicas estruturais encontradas foram quebras, falhas, fragmentos, translocações, figuras quadrirradiais e cromossomos com deficiência, dicêntricos ou marcadores, sendo que os eventos raros foram mais frequentes nos grupos tratados com AMZ. Foram também observados rearranjos não identificados e cromossomos parcialmente desespiralizados. As metáfases com quebras e falhas foram mais frequentes (de 86% a 92%) que as portadoras de outros tipos de anomalias estruturais (de 8% a 14%). As metáfases com alterações numéricas do tipo hiperdiploidia foram raras em todos os grupos de tratamento (de 0% a 6%).

Quando os resultados dos diferentes parâmetros foram comparados entre si, detectaram-se correlações negativas significativas entre IM e TCI, em todos os grupos de tratamento exceto em **A-25**, e entre IM e AC em **A-100**, assim como correlações positivas significativas entre IM e MN no grupo **Co** e entre AC e TCI nos grupos **A-100** e **A-50**.

Considerados os limites das técnicas utilizadas, o presente estudo mostrou que: (1) concentrações baixas de AMZ (1µg/ml e inferiores), às quais os indivíduos se expõem pela ingestão de alimentos produzidos com o uso agropecuário apropriado do AMZ, provavelmente não exercem efeitos cicloativos e clastogênicos; (2) apesar da ampla variabilidade interindividual em resposta à ação do amitraz, a exposição acidental, intencional ou ocupacional a concentrações elevadas do AMZ (25µg/ml e superiores) devem constituir uma fonte de risco, devido aos efeitos genotóxicos observados em pelo menos uma parcela da amostra de doadores; (3) a ação do AMZ

sobre linfócitos humanos avaliada pelo índice mitótico obedece uma relação dose-efeito, mas não quando ela é avaliada pelas frequências de micronúcleos, de metáfases com anomalias cromossômicas e de TCI; (4) a existência de correlação apenas entre alguns parâmetros citogenéticos indica a necessidade do emprego concomitante de vários deles para a avaliação de genotoxicidade de compostos químicos, para se evitar uma interpretação errônea dos resultados (falso-negativos ou falso-positivos); (5) a ocorrência de rearranjos cromossômicos complexos em culturas de 48 horas, mas não em culturas de 72 horas dos controles, pode ser devida a uma eliminação seletiva de células portadoras desses rearranjos durante o desenvolvimento das culturas e, portanto, culturas de 48 horas devem ser mais sensíveis para detectar a ação genotóxica de xenobióticos.

Considerando que o AMZ sofre hidrólise em solução aquosa, como o meio de cultura, produzindo derivados idênticos aos resultantes da sua biotransformação, não é possível definir se os efeitos genotóxicos encontrados neste estudo são devidos ao AMZ, aos seus derivados ou à interação entre ambos.

VI. SUMMARY

Amitraz (AMZ) is a formamidine pesticide used worldwide for the control of plant and animal pests. In Brazil this compound is mainly used for the control of ectoparasitic infestations of **Boophilus microplus** on livestock specially on cattle. Very little information is available on the genotoxic effects of this newly developed compound and its degradation products in mammals. The study reported here was undertaken to detect genotoxic effects of AMZ in human short-term cultured lymphocytes.

Peripheral lymphocytes were drawn from sixteen healthy males aged from 18 to 28 years without exposure to known mutagens. PHA stimulated lymphocyte cultures were grown in RPMI 1640 (Difco) with 20% AB human serum and antibiotics. Harvest was performed by standard procedures. The frequency of sister-chromatid exchanges (SCE) was analysed by adding 5-bromodeoxyuridine (3.25×10^{-5} M) at the time of setting up the cultures. The slides were covered with 0.94×10^{-7} M Hoechst 33258 and exposed to UV light for 12 minutes. They were then incubated in 1M NaH_2PO_4 at 87-89°C and stained in 2% Giemsa. For the analysis of mitotic index (MI), frequency of micronuclei (MN) and of cells with chromosomal aberrations (CA) only standard staining procedure with 2% Giemsa was performed. Cytogenetic analysis were made through a "blind test".

Several dosages of AMZ dissolved in acetone were added to cultures in 16 assays, each with cells from one donor. Initially 0.02, 0.2, and 1µg/ml of the compound were added to 72h cultures (assays #I and II) and cycloactive or genotoxic effects were not detected. The structural aberrations observed were gaps, breaks, deletions and acentric fragments. Gaps and breaks were more frequent (62% to 100%) in all samples. Hyperdiploid cells were not found.

MI were estimated in assays #III to VI in order to select the other dosages of AMZ (ranging from 10 to 150µg/ml) to be used for the cytogenetic study. MI was 50% reduced in cultures treated with 60, 80, and 100µg/ml and 77% reduced in cultures treated with 150µg/ml. Significant reduction of MI were also observed at dosages of 25 and 40µg/ml in the presence of 5-BrdU. Dosages of 25, 50, and 100µg/ml were then chosen for the analysis of MI, MN and CA in 48 h cultures and SCE in 72 h cultures (assays #VII to XVI).

Significantly reduced MI and increased MN and SCE rates

were found at 50 and 100 µg/ml doses. Structural chromosome aberrations such as gaps, breaks, acentric fragments, reciprocal translocations, deletions, quadriradials, dicentrics, markers, and non-identified rearrangements were found in negative control, acetone- and AMZ-treated samples, but were more frequent in last ones. Hyperdiploidy was usually rare.

Despite the limitations of the techniques used, some conclusions can be drawn: (1) subjects exposed to concentrations of AMZ ($\leq 1 \mu\text{g/ml}$), as recommended for agricultural and veterinary use, probably are not at risk for genotoxic effects; (2) accidental or occupational exposure to high concentrations of AMZ ($> 25 \mu\text{g/ml}$) may constitute a general hazard, despite the interindividual variability among the assayed subjects; (3) the action of AMZ on human lymphocytes evaluated by MI follows a dose-effect relation, but the same was not found for MN, CA, and SCE; (4) the discrepancy between the results from different parameters points to the need for the use of several parameters to evaluate the genotoxicity of chemical compounds to avoid erroneous conclusions; (5) the occurrence of complex chromosomal rearrangements in 48h control cultures but not in 72h ones points to a possible negative selection of cells carrying these rearrangements during culture development. Thus, the 48h cultures may be more sensible to detect genotoxic action of xenobiotic compounds.

Both hydrolysis and enzymatic biotransformation of AMZ produce the same derivatives, thus the genotoxic effects detected in this study could be due to this compound and/or to its derivatives.

BAKER, J.E. & BENEDICT, W.F. Production of sister chromatid exchanges by various cancer chemotherapeutic agents. *Cancer Res.*, 39: 797-799, 1979.

BARNARD, M.R.; SAKAMOTO, K.; DELEY, J.R. & PURTILL, D.F. 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.; SCHMIST, C.G.; THEIS, B. & HOSSFELD, D.K. The rate of sister chromatid exchange in normal human bone marrow cells. *Hum. Genet.*, 50: 213-216, 1979.

BECK, D. & OBE, G. Sister chromatid exchanges in human leukocyte

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 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.
- AGBEDE, R.I.S. & KEMP, D.H. Immunization of cattle against **Boophilus microplus** using extracts derived from adult female ticks: histopathology of ticks feeding on vaccinated cattle. **Internat. J. Parasitol.**, **16**: 35-41, 1986.
- AHRENS, E.H.; DAVEY, R.B.; GEORGE, J.E. & COOKSEY, L.M. Efficacy and stability of wettable powder amitraz in field and laboratory studies against **Boophilus annulatus** (Acari: Ixodidae) in South Texas. **J. Econ. Entomol.**, **82**: 850-853, 1989.
- ALLCOCK, E.R.; WOODS, D.R. & RIVETT, D.E.A. Bacterial degradation products of the ixodicide amitraz. **J. Appl. Bacteriol.**, **44**: 383-386, 1978.
- AL SAADI, A.; PALUTKE, M. & KUMAR, G.K. Evolution of chromosomal abnormalities in sequential cytogenetic studies of ataxia telangiectasia. **Human Genet.**, **55**: 23-29, 1980.
- ARAGÃO, H.B. Ixodidas brasileiros e de alguns países limítrofes. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **31**: 759-843, 1936.
- AYME, S.; MATTEI, J.F.; MATTEI, H.G.; AURRAN, Y. & GIRAUD, F. Nonrandom distribution of chromosome breaks in cultured lymphocytes of normal subjects. **Human Genet.**, **31**: 161-175, 1976.
- 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.
- BANERJEE, A. & BENEDICT, W.F. Production of sister chromatid exchanges by various cancer chemotherapeutic agents. **Cancer Res.**, **39**: 797-799, 1979.
- 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.
- BEEK, B. & OBE, G. Sister chromatid exchanges in human leukocyte



- chromosomes: spontaneous and induced frequencies in early- and late-proliferating cells *in vitro*. **Hum. Genet.**, **49**: 51-61, 1979.
- BENHAMOU, S.; POT-DEPRUN, J.; SANCHO-GARNIER, H. & CHOUROULINKOV, I. Sister chromatid exchanges and chromosomal aberrations in lymphocytes of nurses handling cytostatic agents. **Int. J. Cancer.**, **41**: 350-353, 1988.
- BERTOLLO, E.M.G. **Estudo citogenético em profissionais expostos a agentes antineoplásicos**. Dissertação de Mestrado. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", 1990.
- BIANCHI, D.W.; DONALDSON, C.H. & MOORHEAD, P.S. Absence of damage to human chromosomes by spray adhesives. **Mutat. Res.**, **26**: 545-551, 1974.
- BOHLKE, J.U.; SINGH, S. & GOEDDE, 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.
- BONSALL, J.L. & TURNBULL, G.J. Extrapolation from safety data to management of poisoning with reference to amitraz (a formamidine pesticide) and xylene. **Human Toxicol.**, **2**: 587-592, 1983.
- BRASIL EM DADOS. **Produção e Comércio**. Vol. II, tom. II: 1-150, 1990.
- BROWN, A.S.; SEAWRIGHT, A.A. & WILKINSON, G.T. The use of amitraz in the control of an outbreak of sarcoptic mange in a colony of koalas. **Aust. Vet. J.**, **58**: 8-10, 1982.
- BRUSICK, D.J. Cytogenetic assays - aberrations and SCE techniques. **In: DOUGLAS, J.F. (ed.). Carcinogenesis and Mutagenesis Testing**. The Humana Press, p. 265-276, 1984.
- BRUSICK, D. **Principles of Genetic Toxicology**. New York, Plenum Press, 284p., 1987.
- BUCKTON, K.E. & PIKE, M.C. Time in culture. An important variable in studying in-vivo radiation-induced chromosome damage in man. **Int. J. Radiat. Biol.**, **8**: 439-452, 1964.
- BUTLER, M.G.; SANGER, W.G. & VEOMETT, G.E. Increased frequency of SCE in alcoholics. **Mutat. Res.**, **85**: 71-76, 1981.
- CAMPELLO, M.D. & RODRIGUES, M.A.R. Ação clastogênica do amitraz em células de mamíferos. **Arq. Inst. Biol.**, **53**: 41-45, 1986.
- CANNON, R.W. Amitraz in treatment of canine demodicosis. **Mod. Vet. Pract.**, **64**: 899-900, 1983.
- CARRANO, A.V. & NATARAJAN, A.T. Considerations for population



- monitoring using cytogenetic techniques. **Mutat. Res.**, **204**: 379-406, 1988.
- COELHO, W.P. & SA, J.P.M. **Manual Veterinário Pfizer**. Guarulhos-SP, 4 ed., 260 p., 1979.
- COHEN, M.M.; SHAHAM, M.; DAGAN, J.; SHMUELI, E. & SOHN, G. Cytogenetic investigations in families with ataxia-telangiectasia. **Cytogenet. Cell Genet.**, **15**: 338-356, 1975.
- COLLISON, C.H.; DANKA, R.G. & KENNEL, D.R. An evaluation of permethrin, carbaryl, and amitraz for the control of northern fowl mites on caged chickens. **Poult. Sci.**, **60**: 1812-1817, 1981.
- COMPENDIO VETERINARIO. Indicador Terapêutico dos Produtos para Medicina Veterinária. São Paulo, Organização Andrei Editora, 23a. ed., 646 p., 1989.
- COUNTRYMAN, P.I. & HEDDLE, J.A. The production of micronuclei from chromosome aberrations in irradiated cultures of human lymphocytes. **Mutat. Res.**, **41**: 321-332, 1976.
- COWAN, L.A. & CAMPBELL, K. Generalized demodecosis in a cat responsive to amitraz. **J. Am. Vet. Med. Association**, **192**: 1442-1444, 1988.
- 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.
- CULLEN, L.K. & REYNOLDS, J.A. Cardiovascular responses to amitraz in the presence of autonomic antagonists and agonists. **Arch. Int. Pharmacodyn.**, **296**: 45-56, 1988.
- CURTIS, R.J. Amitraz in the control of non-ixodide ectoparasites of livestock. **Vet. Parasitol.**, **18**: 251-264, 1985.
- DARVILL, F.M. Illness of horses following spraying with amitraz. **Aust. Vet. J.**, **62**: 176, 1985.

- DAVIS, D.A. The treatment of canine demodecosis with amitraz. **J. S. Afr. Vet. Ass.**, **56**: 43-46, 1985.
- 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.
- 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.
- DEGRASSI, F. & TANZARELLA, C. Immunofluorescent staining of kinetochores in micronuclei: a new assay for the detection of aneuploidy. **Mutat. Res.**, **203**: 339-345, 1988.
- DE JERSEY, J.; NOLAN, J.; DAVEY, P.A. & RIDDLES, P.W. Separation and characterization of the pyrethroid-hydrolyzing esterases of the cattle tick, **Boophilus microplus**. **Pestic. Biochem. Physiol.**, **23**: 349-357, 1985.
- DEKNUDT, G. & KAMRA, D. Influence of various mitogens on the yield of sister-chromatid exchanges, induced by chemicals, in human lymphocytes. **Mutat. Res.**, **111**: 161-170, 1983.
- DELAHITTE, J.D. & HAVRILECK, B. The treatment of varroasis by amitraz used cold - mode of action and reliability. **Revue Méd. Vet.**, **138**: 585-587, 1987.
- DUDAI, Y.; BUXBAUM, J.; CORFAS, G. & OFARIM, M. Formamidines interact with **Drosophila** octopamine receptors alter the flies' behavior and reduce their learning ability. **J. Comp. Physiol. A**, **161**: 739-746, 1987.
- DUTRILLAUX, B.; COUTURIER, J.; VIEGAS-PEQUIGNOT, E. & SCHAISON, G. Localization of chromatid breaks in Fanconi's anemia, using three consecutive strains. **Human Genet.**, **37**: 65-71, 1977.
- DUTRILLAUX, B.; FOSSE, A.M.; PRIEUR, M. & LEJEUNE, J. Analyse des échanges de chromatides dans les cellules somatiques humaines. **Chromosoma**, **48**: 327-340, 1974.
- EISCHEN, F.A.; PETTIS, J.S. & DIETZ, A. Prevention of **Acarapsis woodi** infestation in queen honey bees with amitraz. **Am. Bee J.**, **126**: 498-500, 1986.
- EVANS, H.J. What are sister chromatid exchanges? In: DE LA CHAPELLE, A. & SORSA, M. (eds.). **Chromosome Today**. Amsterdam, Elsevier/North-Holland Biomedical Press, 1977.
- FAO/WHO (1980). **Pesticide Residues in Food**. Food and Agriculture Organization/World Health Organization (FAO-WHO). Rome, Italy,

pp. 1-59, 1980.

FAO/WHO (1984). **Pesticide Residues in Food.** Food and Agriculture Organization/World Health Organization (FAO-WHO). Rome, Italy, pp. 537-543, 1984.

FARMER, H. & SEAWRIGHT, A.A. The use of amitraz (N'-(2,4-dimethylphenyl) - N - [[(2,4-dimethylphenyl) imino] -methyl] -N-methylmethaniminamide) in demodecosis in dogs. **Aust. Vet. J.**, **56**: 537-541, 1980.

FAUCON, J.P. & FLECHE, C. The amitraz for the treatment of bee varroatosis. **Revue Méd. Vét.**, **139**: 389-406, 1988.

FENECH, M. & MORLEY, A.A. Measurement of micronuclei in lymphocytes. **Mutat. Res.**, **147**: 29-36, 1985a.

FENECH, M. & MORLEY, A.A. The effect of donor age on spontaneous and induced micronucleus. **Mutat. Res.**, **148**: 99-105, 1985b.

FERNANDEZ, M.; GAUTHIER, L. & JAYLET, A. Use of newt larvae for **in vivo** genotoxicity testing of water: results on 19 compounds evaluated by the micronucleus test. **Mutagenesis**, **4**: 17-26, 1989.

FLECHTMANN, C.H.W. **Acaros de Importância Médico-Veterinária.** São Paulo, Livraria Nobel S.A., 3a. ed., 192 p., 1985.

FLEISS, J.L. **In: Statistical Methods for Rates and Proportions.** John Willey & Sons, p. 138-158, 1981.

FOLZ, S.D.; ASH, K.A.; CONDER, G.A. & RECTOR, D.L. Amitraz: a tick and flea repellent and tick detachment drug. **J. Vet. Pharmacol. Therap.**, **9**: 150-156, 1986.

FOLZ, S.D.; KAKUK, T.J.; HENKE, C.L.; RECTOR, D.L. & TESAR, F.B. Clinical evaluation of amitraz as a treatment for canine demodecosis. **Vet. Parasitol.**, **16**: 335-341, 1984a.

FOLZ, S.D.; KAKUK, T.J.; HENKE, C.L.; RECTOR, D.L. & TESAR, F.B. Clinical evaluation of amitraz for treatment of canine scabies. **Mod. Vet. Pract.**, **65**: 597-600, 1984b.

FORD, J.H.; SCHULTZ, C.J. & CORREL, A.T. Chromosome elimination in micronuclei: a common cause of hypoploidy. **Am. J. Hum. Genet.**, **43**: 733-740, 1988.

FORNI, A.; SCIAME, A.; BERTAZZI, P.A. & ALESSIO, L. Chromosome and biochemical studies in women occupationally exposed to lead. **Arch. Environ. Health**, **35**: 139-146, 1980.

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.; YAKOVLENKO, K.N.; KULESHOV, N.P. & ZHURKOV, V.S. Localization of chemically induced breaks in chromosomes of human leucocytes. **Mutat. Res.**, **23**: 87-105, 1974.
- FUNES-CRAVIOTO, F.; LAMBERT, B.; LIDSTEIN, J.; EHRENBERG, L.; NATARAJAN, A.T. & OSTERMANGOLKAR, S. Chromosome aberrations in workers exposed to vinyl chloride. **Lancet**, **i**: 459, 1975.
- 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.
- GIBAS, Z. & LIMON, J. The induction of sister-chromatid exchanges by 9-aminoacridine derivatives. I. The relation between the yield of SCE induction and cell kinetics in cultured human lymphocytes. **Mutat. Res.**, **67**: 93-96, 1979.
- GILIOME, J.H. & PRINGLE, K.L. The sensitivity of six colonies of the red spider mite, **Tetranychus cinnabarinus** (Boisd.), to amitraz. **J. Ent. Soc. Sth. Afr.**, **48**: 325-330, 1985.
- 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.
- GOLLAPUDI, B.B.; BRUCE, R.J.; LINScombe, V.A.; WATANABE, P.G. & SINHA, A.K. Effect of food and water deprivation on the parameters of the mouse bone marrow micronucleus test. **Mutat. Res.**, **173**: 121-125, 1986.
- GONZALES, J.C. **O Controle do Carrapato dos Bovinos.** Porto Alegre, Sulina, 103 p., 1975.
- GOSH, P.K. & NAND, R. Reduced frequency of sister chromatid exchanges in human lymphocytes cultured with autologous serum. **Hum. Genet.**, **51**: 167-170, 1979.



- HEDDLE, J.A.; STUART, S. & SALANONE, H.F. The bone marrow
- 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.
- GULATI, D.K.; WITT, K.; ANDERSON, B.; ZEIGER, E. & SHELBY, M.D. Chromosome aberration and sister chromatid exchange tests in chinese hamster ovary cells *in vitro*. III. Results with 27 chemicals. **Environ. Mol. Mutagen.**, **13**: 133-193, 1989.
- GUNARATNAM, P.; WILKINSON, G.T. & SEAWRIGHT, A.A. A study of amitraz toxicity in cats. **Aust. Vet. J.**, **60**: 278-279, 1983.
- GUNDY, S. & VARGA, L.P. Chromosomal aberrations in healthy persons. **Mutat. Res.**, **120**: 187-191, 1983.
- GUPTA, S.K.; CHHABRA, M.B. & RUPRAH, N.S. Experimental acaricidal efficacy of some acaricides against common bovine ticks. **Indian Vet. J.**, **65**: 482-484, 1988.
- HARRISON, I.R.; PALMER, B.H. & WILMSHURST, E.C. Chemical control of cattle ticks: resistance problems. **Pestic. Sci.**, **4**: 531-542, 1973.
- HARRISON, I.R.; KOZLIK, A.; MCCARTHY, J.F.; PALMER, B.H.; WAKERLEY, S.B.; WATKINS, T.I. & WEIGHTON, D.M. 1,5-di-(2,4-dimethylphenyl)-3-methyl-1,3,5-triazapenta-1,4-diene, a new acaricide active against strains of mites resistant to organophosphorus and bridged diphenyl compounds. **Pestic. Sci.**, **3**: 679-680, 1972a.
- HARRISON, I.R.; KOZLIK, A.; MCCARTHY, J.F.; PALMER, B.H. & WEIGHTON, D.M. Properties of some triazapentadienes - a new group of biologically active compounds. **Meded. Fac. Landbouwet. Ryksunio**, **37**: 765-775, 1972b.
- HASHIMOTO, E.M. Estudo cromossômico em linfócitos de aplicadores de inseticidas. Dissertação de Mestrado. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", 1990.
- HEDDLE, J.A. & CARRANO, A.V. The DNA content of micronuclei induced in mouse bone marrow by gamma-irradiation: evidence that micronuclei arise from acentric chromosomal fragments. **Mutat. Res.**, **44**: 63-69, 1977.
- 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, 1978b.

- 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. I., 2a. 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, 1978a.
- HEDDLE, K.; 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.; HOGSTEDT, B.; KOLNIG, A.-M.; MARK-VENDEL, E.; STROBECK, B. & MITELMAN, F. Sister chromatid exchanges and structural chromosome aberrations in relation to age and sex. **Hum. Genet.**, **62**: 305-309, 1982.
- HENNIG, U.G.G.; RUDD, N.L. & HOAR, D.I. Kinetochore immunofluorescence in micronuclei: a rapid method for the *in situ* detection of aneuploidy and chromosome breakage in human fibroblasts. **Mutat. Res.**, **203**: 405-414, 1988.
- HERBERT Jr., E.W.; WITHERELL, P.C. & SHIMANUKI, H. Control of *Varroa jacobsoni* on honey bees in queen cages and small laboratory cages using amitraz, fluvalinate and apitol. **Am. Bee J.**, **128**: 289-292, 1988.
- HERBERT Jr., E.W.; WITHERELL, P.C.; BRUCE, W.A. & SHIMANUKI, H. Evaluation of six methods of detecting *Varroa* mites in beehives, including the experimental use of acaricidal smokes containing fluvalinate or amitraz. **Am. Bee J.**, **129**: 605-608, 1989.
- HOGSTEDT, 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.E. Relation between the SCE points and the DNA replication bands. **Chromosoma**, **73**: 67-74, 1979.
- HSU, W.H. & HOPPER, D.L. Effect of yohimbine on amitraz-induced CNS depression and bradycardia in dogs. **J. Toxicol. Environ. Health**, **18**: 423-429, 1986.
- HSU, W.H. & KAKUK, T.J. Effect of amitraz and chlordimerform on heart rate and pupil diameter in rats: mediated by alfa 2-

- adrenoreceptors. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, **73**: 411-415, 1984.
- HSU, W.H. & SCHAFFER, D.D. Effects of topical application of amitraz on plasma glucose and insulin concentrations in dogs. **Am. J. Vet. Res.**, **49**: 130-131, 1988.
- HSU, W.H.; LU, Z.-X. & HEMBROUGH, F.B. Effect of amitraz on heart rate and aortic blood pressure in conscious dogs: influence of atropine, prazosin, tolazoline, and yohimbine. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, **84**: 418-422, 1986.
- HSU, W.H.; SHAW, R.W.; SCHAFFER, D.D.; CRUMP, M.H. & GREER, M.H. Further evidence to support the alfa-2-adrenergic nature of amitraz-induced decrease in intestinal motility. **Arch. Int. Pharmacodyn. Therap.**, **286**: 145-151, 1987.
- 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.
- INKELES, R.; INNES, J.B.; KUNTZ, M.M.; KADISH, A.S. & WECHSLER, M.E. Immunological studies of aging. III. Cytokinetic basis for the impaired response of lymphocytes from aged humans to plant lectins. **J. Exp. Med.**, **145**: 1176, 1977.
- ISCN (1978): An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. **Cytogenet. Cell Genet.**, **21**: 309-404, 1978.
- ISHIDATE, Jr., M. A proposed battery of tests for the initial evaluation of the mutagenic potential of medicinal and industrial chemicals. **Mutat. Res.**, **205**: 397-407, 1988.
- ISHIDATE, Jr., M.; HARNOIS, M.C. & SOFUNI, T. A comparative analysis of data on the clastogenicity of 951 chemical substances tested in mammalian cell cultures. **Mutat. Res.**, **195**: 151-213, 1988.
- 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.

- JOHNSTON, L.A.Y.; KEMP, D.H. & PEARSON, R.D. Immunization of cattle against *Boophilus microplus* using extracts derived from adult female ticks: effects of induced immunity on tick populations. **Internat. J. Parasitol.**, **16**: 27-34, 1986.
- KAHKONEN, M. Population cytogenetics of folate-sensitive fragile sites. **Hum. Genet.**, **80**: 344-348, 1988.
- KECK, M. & EMERIT, I. The influence of culture medium composition on the incidence of chromosomal breakage. **Hum. Genet.**, **50**: 277-283, 1979.
- KNOWLES, C.O. & BENEZET, H.J. Excretion balance, metabolic fate and tissue residues following treatment of rats with amitraz and N'-(2,4-dimethylphenyl)-N-methylformamidine. **J. Environ. Sci. Health (B)**, **16**: 547-555, 1981.
- KNOWLES, C.O. & HAMED, M.S. Comparative of amitraz and N'-(2,4-dimethylphenyl)-N-methylformamidine (BTS-27271) in bollworm and tobacco budworm larvae (Lepidoptera: Noctuidae). **J. Econ. Entomol.**, **82**: 1328-1334, 1989.
- KORENBERG, J. & FREEDLENDER, E. Giemsa technique of the detection of sister chromatid exchanges. **Chromosoma**, **48**: 355-360, 1974.
- KOSKUL, A. & AULA, P. Nonrandom distribution of chromosome breaks in Fanconi's anemia. **Cytogenet. Cell Genet.**, **12**: 423-434, 1973.
- 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.
- KRISHNA-MURTHY, P.B. & PREMA, K. Sister chromatid exchanges in oral contraceptive users. **Mutat. Res.**, **68**: 149-152, 1979.
- 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.
- LASNE, C.; GU, Z.W.; VENEGAS, W. & CHOULOULINKOV, 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. 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.
- LETCHER, J.D. Amitraz as a treatment for acariasis in african hedgehogs (*Atelerix albiventris*). **J. Zoo. Anim. Med.**, **19**: 24-29, 1988.
- LINDBLAD, A. & LAMBERT, B. Relation between sister chromatid exchange, cell proliferation and proportion of B and T cells in human lymphocyte cultures. **Hum. Genet.**, **57**: 31-34, 1981.
- MADLE, S. & OBE, G. Methods for analysis of the mutagenicity of indirect mutagens/carcinogens in eukaryotic cells. **Human Genet.**, **56**: 7-20, 1980.
- MARLHENS, F.; AL ACHKAR, W.; AURIAS, A.; COUTURIER, J.; DUTRILLAUX, A.M.; GERBAULT-SEREAU, M.; HOFFSCHIR, F.; LAMOLIATTE, E. LEFRONÇOIS, D.; LOMBARD, M.; MULLERIS, M.; PRIEUR, M.; PROD'HOMME, M.; SABATIER, L. VIEGAS-PEQUIGNOT, E. VOLOBOUEV, V. & DUTRILLAUX, B. The rate of chromosome breakage is age dependent in lymphocytes of adult controls. **Hum. Genet.**, **73**: 290-297, 1986.
- MATTEI, M.G.; AYME, S.; MATTEI, J.F.; AURRAN, Y. & GIRAUD, F. Distribution of spontaneous chromosomes breaks in man. **Cytogenet. 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.
- MCDUGALL, K.W.; HEATH, A.B. & BLACK, R.R. Residues of amitraz in the tissues, milk and butter of cattle dipped in Taktic. **Aust. J. Exp. Agric. Anim. Husb.**, **19**: 663-665, 1979.
- MCNALLY, A. & RAY, M. Sister chromatid exchange distribution in various human tissues exposed to MMC and BrdU. **Ann. Génét.**, **26**: 225-228, 1983.
- MELARAGNO, M.I.S.A. Trocas entre cromátides-irmãs induzidas e não induzidas pelo EMD 26644 (ácido mercapto oxazolil carboxílico). Dissertação de Mestrado. Instituto de Biociências - USP, 1982.
- MEYNE, J.; LOCKHART, L.H. & ARRIGHI, F.E. Nonrandom distribution of chromosomal aberrations induced by three chemicals. **Mutat. Res.**, **133-136**, 1985.



63: 201-209, 1979.

- MILLER, K. Sister chromatid exchange in highly purified human B and T lymphocytes. **Human Genet.**, **72**: 160-163, 1986.
- MILLER, K. Spontaneous sister-chromatid exchange frequencies in human B and T lymphocytes at BrdU borderline concentrations for sister-chromatid differentiation. **Mutat. Res.**, **202**: 97-101, 1988.
- MOORHEAD, P.S.; NOWELL, P.C.; MELLMAN, W.J.; BATIPS, D.M. & HUNGERFORD, D.A. Chromosome preparation of leukocytes cultured from human peripheral blood. **Exp. Cell Res.**, **20**: 613-616, 1960.
- MORGAN, W.F. & CROSSEN, P.E. The incidence of sister chromatid exchanges in cultured human lymphocytes. **Mutat. Res.**, **42**: 305-312, 1977a.
- MORGAN, W.F. & CROSSEN, P.E. The frequency and distribution of sister chromatid exchanges in human chromosomes. **Hum. Genet.**, **38**: 371-378, 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.
- MORIMOTO, K.; SATO-MIZUNO, M. & KOIZUMI, A. Sister-chromatid exchanges and cell-cycle kinetics in human lymphocyte cultures exposed to alkylating mutagens: apparent deformity in dose-response relationships. **Mutat. Res.**, **152**: 187-196, 1985.
- MORIYA, M.; OHTA, T.; WATANABE, K.; MIYAZAWA, T.; KATO, K. & SHIRASU, Y. Further mutagenicity studies on pesticides in bacterial reversion assay systems. **Mutat. Res.**, **116**: 185-216, 1983.
- MUTCHINICK, O.; LISKER, 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.; MAULEON, P.; LISKER, R. & GARCIA, G. Frequency and types of induced and spontaneous chromosome aberrations in relation to cell kinetics. **Hum. Genet.**, **59**: 137-140, 1981.
- NAGAYA, T. & TORIUMI, H. Effects of smoking on spontaneous and induced sister chromatid exchanges in lymphocytes. **Toxicol. Letters**, **25**: 293-296, 1985.
- NATARAJAN, A.T. Cytogenetics as an aid to mutagenicity testing. In: CLOPRA, V.L. (ed.). **Genetic Engineering in Agriculture**. New Dehli, Oxford University Press, pp. 303-318, 1985.

- NATARAJAN, A.T. & OBE, G. How do *in vivo* mammalian assays compare to *in vitro* assays in their ability to detect mutagens? **Mutat. Res.**, **167**: 189-201, 1986.
- NETER, J. & WASSERMAN, W. **Applied Linear Statistical Models**. Homewood, Richard D. Irwin, 842 p., 1979.
- NEWMAN, S.M.; SUMMITT, R.L. & NUNEZ, L.H. Incidence of nickel-induced sister-chromatid exchange. **Mutat. Res.**, **101**: 67-75, 1982.
- NIKULA, E.; KIVINIITTY, K.; LEISTI, J. & TASKINEN, P.J. Chromosome aberrations in lymphocytes of nurses handling cytostatic agents. **Scand. J. Work Environ. Health**, **10**: 71-74, 1984.
- NOLAN, J.; ROULSTON, W.J & SCHNITZERLING, H.J. The potential of some synthetic pyrethroids for control of the cattle tick (*Boophilus microplus*). **Aust. Vet. J.**, **55**: 463-466, 1979.
- NORMAN, A.; COCHRAN, S.; BASS, D. & ROE, D. Effects of age, sex and diagnostic X-rays on chromosome damage. **Int. J. Radiat. Biol.**, **46**: 317-321, 1984.
- OBE, G.; VOGT, H.J.; MADLE, S.; FAHNING, A. & HELLER, W.D. Double blind study on the effect of cigarette smoking on the chromosomes human peripheral blood lymphocytes *in vivo*. **Mutat. Res.**, **92**: 309-319, 1982.
- OPDEBEECK, J.P.; WONG, J.Y.M.; JACKSON, L.A. & DOBSON, C. Vaccines to protect Hereford cattle against the cattle tick, *Boophilus microplus*. **Immunology**, **63**: 363-367, 1988a.
- OPDEBEECK, J.P.; WONG, J.Y.M.; JACKSON, L.A. & DOBSON, C. Hereford cattle immunized and protected against *Boophilus microplus* with soluble and membrane-associated from the midgut of ticks. **Parasite Immunology**, **10**: 405-410, 1988b.
- 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.
- PALMER, B.H.; MCCARTHY, J.F.; KOSLIK, A. & HARRISON, I.R. A new chemical group of cattle acaricides. **Proceedings of the 3rd International Congress in Acaralogy**, pp. 687-691, 1971.
- PANDITA, T.K. Effect of temperature variation on sister chromatid exchange frequency in cultured human lymphocytes. **Hum. Genet.**, **63**: 189-190, 1983.
- PARKES, D.J.G.; SCOTT, D. & STEWART, A. Changes in spontaneous SCE frequencies as a function of sampling time in lymphocytes from



- normal donors and cancer patients. **Mutat. Res.**, **147**: 113-122, 1985.
- PASS, M.A. & SEAWRIGHT, A.A. Effect of amitraz on contractions of the guinea-pig ileum *in vitro*. **Comp. Biochem. Physiol.**, **73c**: 419-422, 1982.
- PATHAK, S.; HSU, T.C.; SAMAN, N.; HICKEY, R.C. & GIESLER, C.F. Chromosome instability in humans: a heritable trait? **Rev. Brasil. Genet.**, **5**: 577-586, 1982.
- PEREGRINE, D.J. & LEMON, R.W. The value of amitraz for control of *Bemisia tabaci* on cotton. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, **17**: 129-135, 1986.
- PERES, C.A. & SALDIVA, C.D. **Planejamento de Experimentos**. 5a. Sinape, Rio de Janeiro, 98 p., 1982.
- 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.E.; HENDERSON, L. & KIRKLAND, D. Sister chromatid exchange in cultured cells. In: UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Part II. Supplementary Procedures. Swansea, The United Kingdom Environmental Mutagen Society, 1984.
- PILINSKAYA, M.A. Cytogenetic action of the fungicide ziram in a culture of human lymphocytes *in vitro*. **Genetika**, **7**: 138-143, 1971.
- POHLOVA, H.; CERNA, M. & RÖSSNER, P. Chromosomal aberrations, SCE and urine mutagenicity in workers occupationally exposed to cytostatic drugs. **Mutat. Res.**, **174**: 213-217, 1986.
- PRANTERA, G.; PIMPINELLI, S. & ROCHI, A. Effects of distamycin A on human leukocytes *in vitro*. **Cytogenet. Cell Genet.**, **23**: 103-107, 1979.
- PRESTON, R.J.; SAN SEBASTIAN, J.R. & MCFEE, A.F. The *in vitro* human lymphocyte assay for assessing the clastogenicity of chemical agents. **Mutat. Res.**, **189**: 175-183, 1987.
- PURCHASE, I.H.F.; RICHARDSON, C.F.; ANDERSON, D.; PADDLE, G.M. & ADAMS, W.G.F. Chromosomal analyses in vinyl-chloride exposed workers. **Mutat. Res.**, **57**: 325-334, 1978.
- RABELLO, M.N.; BEÇAK, W.; ALMEIDA, W.F.; PIGATI, P.; UNGARO, M.; MURATA, T. & PEREIRA, C.A.B. Cytogenetic study on individual occupationally exposed to DDT. **Mutat. Res.**, **28**: 449-454, 1975.

- REIDY, J.A.; ZHOU, X. & CHEN, A.T.L. Folic acid and chromosome breakage. I. Implication for genotoxicity studies. **Mutat. Res.**, **122**: 217-221, 1983.
- 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 ≈ 30.000 cells. **Mutat. Res.**, **141**: 59-64, 1984.
- ROBERTS, M.C. & ARGENZIO, A. Effects of amitraz, several opiate derivatives and anticholinergic agents on intestinal transit in ponies. **Equine Vet. J.**, **18**: 256-260, 1986.
- ROBERTS, M.C. & SEAWRIGHT, A.A. Amitraz induced large impaction in the horse. **Aust. Vet. J.**, **55**: 553-554, 1979.
- ROBERTS, M.C. & SEAWRIGHT, A.A. Experimental studies of drug-induced impaction colic in the horse. **Equine Vet. J.**, **15**: 222-228, 1983.
- 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.
- RUPA, D.S.; REDDY, P.P. & REDDI, O.S. Analysis of sister-chromatid exchanges, cell kinetics and mitotic index in lymphocytes of smoking pesticide sprayers. **Mutat. Res.**, **223**: 253-258, 1989.
- SALAMONE, M.; HEDDLE, J.; STUART, E. & KATZ, M. Towards an improved micronucleus test. Studies on 3 model agents, mitomycin C, cyclophosphamide and dimethylbenzanthracene. **Mutat. Res.**, **74**: 347-356, 1980.
- SANTESSON, B. Different baseline sister chromatid exchange levels in density fractionated human lymphocytes. **Human Genet.**, **73**: 114-118, 1986.
- SARTO, F.; FINOTTO, S.; GIACOMELLI, L.; MAZZOTI, D.; TOMANIN, R. & LEVIS, A.G. The micronucleus assay in exfoliated cells of the human bucal mucosa. **Mutagenesis**, **2**: 11-17, 1987.
- SATYA-PRAKASH, K.L.; HSU, .C. & PATHAK, S. Chromatid lesions and chromatid core morphology. **Cytogenet. Cell Genet.**, **30**: 248-252, 1981.
- SAVAGE, J.R.K. Chromosomal aberrations as indicators of mutagenicity. **Clin. Exp. Dermatol.**, **5**: 139-145, 1980.
- SCHMID, W. The micronucleus test. **Mutat. Res.**, **31**: 9-15, 1975.
- SCHMID, M.; HUNGERFORD, D.A.; POPPEN, A. & ENGEL, W. The use of



- distamycin A in human lymphocyte cultures. **Hum. Genet.**, **65**: 377-384, 1984.
- SCHROEDER, T.M. & GERMAN, J. Bloom's syndrome and Fanconi's anemia: demonstration of two distinctive pattern of chromosome disruption and rearrangement. **Humangenetik**, **25**: 299-306, 1974.
- SCHUNTNER, C.A. & THOMPSON, P.C. Inhibition of a carbaryl oxidising enzyme as primary lesion in the lethal action of formamidines in **Boophilus microplus**. **J. Aust. Entomol. Soc.**, **15**: 388, 1976.
- SCHUNTNER, C.A. & THOMPSON, P.C. Mechanisms of resistance to bromophos-ethyl in two strains of the cattle tick **Boophilus microplus**. **Aust. J. Biol. Sci.**, **31**: 317-325, 1978a.
- SCHUNTNER, C.A. & THOMPSON, P.C. Metabolism of (14C) amitraz in larvae of **Boophilus microplus**. **Aust. J. Biol. Sci.**, **31**: 141-148, 1978b.
- SEABRIGHT, M. High resolution studies on the pattern of induced exchanges in the human karyotype. **Chromosoma**, **40**: 333-346, 1973.
- SESHADRI, R.; BAKER, E. & SUTHERLAND, G.R. Sister chromatid exchanges (SCE) analysis in mothers exposed to DNA damaging agents and their newborn infants. **Mutat. Res.**, **97**: 139-146, 1982.
- SILVA, N.R.S. Custo de carrapaticidas relacionado com o benefício. In: BECK, A.A.H.; MELO, H.J.H.; BIANCHIN, I. & SOARES, M.R.J. (Eds.). **Anais do I Seminário Nacional sobre Parasitoses dos Bovinos**. Campo Grande-MS, pp. 251-265, 1979.
- SINHA, A.K.; LINScombe, V.A.; GOLLAPUDI, B.B.; MCCLINTOCK, M.L.; FLAKE, R.E. & BONDER, K.M. The incidence of spontaneous cytogenetic aberrations in lymphocytes cultured from normal human for 48 and 72h. **Can. J. Genet. Cytol.**, **26**: 528-531, 1984.
- 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.
- STETKA, Jr., D.G. Operative and non-operative mechanisms of sister chromatid exchange. In: SANDBERG, A.A. (Ed.). **Sister Chromatid Exchange**. New York, Alan R. Liss, Inc., 1982.
- STONE, B.F. The genetics of resistance by ticks to acaricides. **Aust. Vet. J.**, **48**: 345-350, 1972.
- STONE, B.F. & YOULTON, N.J. Inheritance of resistance to chlopyrifos in the MT Alford strain and to diazinon in the Gracemere strain of the cattle tick (**Boophilus microplus**). **Aust. J. Biol. Sci.**, **35**: 427-440, 1982.

- STUCKER, I.; HIRSCH, A.; DOLOY, R.; BASTIE-SIGEAC, I. & HEMON, D. Urine mutagenicity, chromosomal abnormalities and sister chromatid exchanges in lymphocytes of nurses handling cytostatic drugs. **Int. Arch. Occup. Environ. Health**, **57**: 195-205, 1986.
- SUTHERLAND, G.R. Fragile sites on human chromosomes: demonstration of their dependence on the type of tissue-culture medium. **Science**, **197**: 265-266, 1977.
- SUTOU, S.; HAYASHI, M.; NISHI, Y.; SHIBUYA, T. & SHIMADA, H. Sex difference in the micronucleus test. The collaborative study group for the micronucleus test. **Mutat. Res.**, **172**: 151-163, 1986.
- TAMURA, H.; SUGIYAMA, Y. & SUGAHARA, R. Effect of bleomycin on the chromosomes of human lymphocytes at various cell phases. **Gann.**, **65**: 103-107, 1974.
- TUCKER, J.D. & CHRISTENSEN, M.L. Effects of anticoagulants upon sister-chromatid exchanges, cell-cycle kinetics, and mitotic index in human peripheral lymphocytes. **Mutat. Res.**, **190**: 225-228, 1987.
- TUDEK, B.; GAJEWSKA, J.; SZCZYPKA, M.; RAHDENSTARON, I. & SZYMCHYK, T. Screening for genotoxic activity of amitraz with short-term bacterial assays. **Mutat. Res.**, **204**: 585-591, 1988.
- VAN BAO, T.; SZABO, I.; RUZICKA, P. & CZEIZEL, A. Chromosome aberrations in patients suffering acute organic phosphate insecticide intoxication. **Humangenetik**, **24**: 33-57, 1974.
- VANDERKERKEN, K.; VANPARYS, Ph.; VERSCHAEVE, L. & KIRSCH-VOLDERS, M. The mouse bone marrow micronucleus assay can be used to distinguish aneugens from clastogens. **Mutagenesis**, **4**: 6-11, 1989.
- VAN HUMMELEN, P.; ZOLL, C.; PAULUSSEN, J.; KIRSCH-VOLDERS, M. & JAYLET, A. The micronucleus test in *Xenopus*: a new and simple *in vivo* technique for detection of mutagens in fresh water. **Mutagenesis**, **4**: 12-16, 1989.
- VIAGGI, S.; BONATTI, S. & ABBONDANDOLO, A. New evidence for the presence of chromosomes in micronuclei of human and chinese hamster cells. **Mutagenesis**, **2**: 367-370, 1987.
- VICENTINI, V.E.P. Ação do Extrato de Sementes de *strychnodendron obovatum* Benth sobre Raiz de Cebola, Medula Ossea de Rato e Linfócito Humano (TCIs). Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, 1984.
- VIEIRA, E.G. Efeitos Citogenéticos da Tintura de *Ibuja occidentalis*



- em Culturas de Linfócitos Humanos. Dissertação de Mestrado. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", 1986.
- 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.
- WEKSLER, M.E. & HUTTEROTH, T.H. Impaired lymphocyte functions in aged humans. **J. Clin. Invest.**, **53**: 99-104, 1974.
- WIKERHAUSER, T.; DAZAKULA, N.; KUTICIC, V.; RAPIC, D. & RAJKOVIC-JANJE, R. Effect of some new antiparasitic agents on common mite, helminthes, and intestinal flagellates in laboratory mice. **Acta Parasitologica Iugoslavica**, **9**: 37-42, 1978.
- WILLADSEN, P.; MCKENNA, R.V. & RIDING, G.A. Isolation from the cattle tick, **Boophilus microplus**, of antigenic material capable of eliciting a protective immunological response in the bovine host. **Internat. J. Parasitol.**, **18**: 183-189, 1988.
- WOLFF, S. & PERRY, P. Differential staining of sister chromatid exchange without autoradiography. **Chromosoma**, **48**: 341-353, 1974.
- WORTHING, C.R. **The Pesticide Manual. A World Compendium**. Levenham, Suffolk - Great Britain, The British Crop Protection Council, 7 ed., 1983.
- WRIGHT, F.C.; GUILLOT, F.S. & GEORGE, J.E. Efficacy of acaricides against chorioptic mange of goats. **Am. J. Vet. Res.**, **29**: 903-904, 1988.
- 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.
- YIM, G.K.W.; HOLSAPPLE, M.P.; PFISTER, W.R. & HOLLINGWORTH, R.M. Prostaglandin synthesis inhibited by formamide pesticides. **Life Sci.**, **23**: 2509-2515, 1978.
- 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.
- ZAVALA, C.; ARROYO, P.; LISKER, R.; ARNEVALE, A.; SALAMANCA, F.; NAVARRETE, J.I.; JIMENEZ, F.M.; BLANCO, B.; VASQUEZ, V.; SANCHEZ, J. & CANUN, S. Variability between and within laboratories in the analysis of structural chromosomal abnormalities. **Clin. Genet.**, **15**: 377-381, 1979.

ZHANG, S.; HUANG, J.; CHEN, P. & LI, C. Sister chromatid exchange and cell cycle patterns of normal human bone marrow cells after **in vitro** exposure to cytostatic drugs. **Cancer Genet. Cytogenet.**, **31**: 157-163, 1988.

Aos meus pais, José e Grácia, aos meus sogros, Joaquim e Teresinha, e aos meus familiares, pelo amor, interesse e incentivo. Ao Prof. Dr. Aluísio José Gallo, pela orientação durante parte do programa de Doutorado.

Aos professores Dra. Maria Conceição Zetzel, Sene (UNESP/Filia Solteira), Dr. Uziel Franco da Rocha (Fazenda Experimental Getúlio Vargas/Uberaba-MG), Dra. Maria Madalena Rebelo Gay (I. Butantan/SP), Dra. Maria Amélia Le Regina Rodrigues (I. Biológico/LP/SP), Pesquisadora Magali D'Ángelo Castello (I. Biológico/SP) e Dra. Elioza Helena Tajara da Silva (UNESP/São José do Rio Preto-SP), pelas importantes sugestões no planejamento do projeto de pesquisa.

Aos professores Dra. Nivea Dulce L. E. Fróis e Reinaldo José Tasso Feres, pelas valiosas discussões durante a redação da tese.

Ao Prof. Antônio José Manzato, pela preciosa colaboração na análise estatística dos dados.

A Consuelo Melcher, pela gentil cessão do material técnico utilizado na pesquisa.

A Unidade de Processamento de Dados do Campus de São José do Rio Preto/UNESP, que gentilmente disponibilizou para esta pesquisa o uso do equipamento de informática.

Ao Prof. Dr. James Robert Coleman, pela revisão do SUMMARY.

Aos docentes do curso, colaboradores, mas principalmente,

aos professores do Curso de Pós-Graduação, pela transmissão de seus conhecimentos e experiências.

Ao pós-graduando Marcos Lourenço, pela ajuda na digitação e impressão da tese e pelo apoio e incentivo constantes.

A pós-graduanda Sheila Maria Vaz, pela ajuda durante a confecção da tese.

VIII. AGRADECIMENTOS

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

Aos meus pais, José e Ofélia, aos meus sogros, Joaquim e Terezinha, e aos meus familiares, pelo amor, interesse e incentivo.

Ao Prof. Dr. Aluisio José Gallo, pela orientação durante parte do programa de Doutorado.

Aos professores Dra. Maria Conceição Zocoller Seno (UNESP/Ilha Solteira), Dr. Uriel Franco da Rocha (Fazenda Experimental Getúlio Vargas/Uberaba-MG), Dra. Maria Nazareth Rabello Gay (I. Butantan/SP), Dra. Maria Amélia La Regina Rodrigues (I. Biológico/SP), Pesquisadora Magali D'Angelo Campello (I. Biológico/SP) e Dra. Eloiza Helena Tajara da Silva (UNESP/São José do Rio Preto-SP), pelas importantes sugestões no planejamento do projeto de pesquisa.

Aos professores Dra. Nívea Dulce T. C. Fróes e Reinaldo José Fazzio Feres, pelas valiosas discussões durante a redação da tese.

Ao Prof. Antonio José Manzato, pela preciosa colaboração na análise estatística dos dados.

A Cooper-Wellcome, pela gentil cessão do amitraz técnico utilizado na pesquisa.

A Unidade de Processamento de Dados do Campus de São José do Rio Preto/UNESP, que solicitamente desenvolveu um programa para arquivo de dados de pesquisa.

Ao Prof. Dr. James Robert Coleman, pela revisão do SUMMARY.

Aos doadores de sangue, colaboradores anônimos, mas imprescindíveis.

Aos professores do Curso de Pós-Graduação, pela transmissão de seus conhecimentos e experiências.

Ao pós-graduando Marcelo Ferreira Lourenço, pela cuidadosa digitação e impressão da tese e pelo apoio e incentivo constantes.

A pós-graduanda Sheila Adami Vayego, pelo auxílio durante a confecção da tese.

Ao funcionário Josué Rodrigues dos Santos, pela preciosa colaboração durante a realização dos ensaios da pesquisa e nos serviços fotográficos.

A funcionária Rosana Silistino de Souza, pelo zelo nos serviços técnico-laboratoriais.

Aos colegas do Laboratório de Citogenética Humana, Ana Elisabete, Eliana, Elza, Eny, Nilce e Rosa, aos companheiros do Curso de Pós-Graduação e aos funcionários do Departamento de Biologia, pelo agradável ambiente de trabalho.

Aos funcionários Sidnei Olivio e Luiza Rosa Cirelli, responsáveis pelo bom andamento dos trabalhos no Centro de Microscopia, pela dedicação e incentivo.

Aos colegas do Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária, da Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira, UNESP, pelo estímulo e interesse.

A Professora Kuniko Iwamoto Haga, por assumir minhas atividades de docência durante o período de afastamento para cumprir o programa de Doutorado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação para o Desenvolvimento da UNESP (FUNDUNESP), pelo apoio financeiro.

A Reitoria da UNESP, pela concessão da Bolsa de Auxílio Viagem, durante a fase final do Curso de Pós-Graduação.

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

A Direção da Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira, UNESP, pela concessão de afastamento integral.



