Paula Helena do Vale Bosso

Avaliação Citogenética do Efeito Sinergístico entre a Terapia de Reposição Hormonal e o Tabagismo em Mulheres Pós - Menopáusicas

unesp

PAULA HELENA DO VALE BOSSO

AVALIAÇÃO CITOGENÉTICA DO EFEITO SINERGÍSTICO ENTRE A TERAPIA DE REPOSIÇÃO HORMONAL E O TABAGISMO EM MULHERES PÓS-MENOPÁUSICAS

Inst. de Biociências, Letras e Ciências Exatas - UNESP
BIBLIOTECA
S. J. Rio Preto
899/00

Dissertação apresentada para obtenção do grau de Mestre em Genética, no curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Área de Concentração em Genética, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista - UNESP

já assinado

São José do Rio Preto
2000

Orientador : Profª. Drª. Nívea Dulce Tedeschi Conforti Froes

Dedico esta etapa da minha vida especialmente

Aos meus pais.
Eleny e Santo, aos quais
devo tudo que sou.

Agradecimentos Especiais

'A Deus pela vida, onde tento retribuir fazendo o melhor que posso a cada momento.

Aos meus pais, pelo amor e dedicação e por me ensinarem a ter caráter e responsabilidade.

'A Nívea pelos seus ensinamentos, compreensão e incentivo.

'A Rosa por tornar a distância de casa menos difícil.

'A grande amiga Ana Regina por todo auxílio prestado, tanto profissional quanto pessoal, durante esta etapa da minha vida.

Agradecimentos

À Profª Drª Nívea Dulce Tedeschi Conforti Froes pela orientação deste trabalho, sem a qual este não poderia ter sido realizado.

Ao Dr. Guaraci Silveira Garcia, médico ginecologista, que teve papel importante na realização deste trabalho promovendo o recrutamento das pacientes, e pela consideração a mim atribuída.

Às participantes do estudo, colaboradoras anônimas, mas imprescindíveis, que sempre se mostraram disponíveis a doarem o sangue nas várias etapas do trabalho.

Ao Prof. Dr. José Antônio Cordeiro e Profª Drª Adriana Barbosa que, apesar dos vários compromissos, me auxiliaram na realização da análise estatística.

Aos membros da banca examinadora deste trabalho, Profª Drª Ana Elizabete Silva, professora do curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Área de Concentração em Genética do IBILCE/UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto e Profª Drª Denise Crispim Tavares, professora do Departamento de Ciências Biológicas da Universidade de Franca, pelas valiosas sugestões na elaboração da forma definitiva.

À todos os professores do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Área de Concentração em Genética do IBILCE/UNESP e todos professores do Departamento de Biologia deste instituto, pela transmissão de seus conhecimentos e experiências.

Ao Josué Rodrigues dos Santos e Maria Helena Carabolante pelo auxílio técnico e todos os favores prestados.

À Kikue Kamoi de Oliveira e Maria Aparecida do Carmo Costa (Cidinha), funcionárias do ambulatório, que com muita paciência e dedicação me auxiliaram na obtenção das amostras de sangue.

Aos funcionários do Centro de Avaliação Materno Fetal (CAMF) de São José do Rio Preto que sempre me receberam e atenderem com muita presteza e simpatia.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação, Polo e Biblioteca, aqui em especial Elza Mitiko Sato e Maria do Carmo Junqueira, pela disponibilidade com que sempre me atenderam.

Aos funcionários dos Departamentos de Biologia e Botânica por todos os favores prestados.

'A Andréa Rossit, amiga e companheira de laboratório, pela colaboração no início do trabalho, além de todos os favores prestados.

Aos amigos da Pós-Graduação pela amizade e pelos bons momentos, que tornaram o curso mais agradável.

Ao amigo de Pós-Graduação Marcos Roberto Higino Estécio por sempre me auxiliar nos pequenos problemas existentes entre mim e o computador.

Ao Claudinei A. Nobile, pela colaboração e amizade.

'A Diretoria do Instituto de Biociência Letras e Ciências Exatas da UNESP de São José do Rio Preto, pelas condições materiais que possibilitaram a realização deste trabalho.

'A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pelo apoio financeiro.

'A Todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho,

Meus sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

I . INTRODUÇÃO 01

1 . Considerações gerais sobre o estrógeno 01

2 . Aspectos gerais do climatério 03

3 . A citogenética como parâmetro na predição de riscos adversos à saúde... 06

4 . Relação entre exposição a estrógenos e genotoxicidade 09

5 . O tabagismo como potenciador de riscos à saúde humana 13

II . OBJETIVOS 17

III . MATERIAL E MÉTODOS 18

1 . Caracterização da amostra 18

2 . Metodologia citogenética 20

3 . Análise citogenética 21

4 . Análise estatística 22

IV . RESULTADOS 23

V . DISCUSSÃO 40

1. Os estrógenos como fonte de risco para o homem 40

2. Aberrações cromossômicas como biomarcador na detecção de populações expostas 43

3. Cinética celular 53

VI . RESUMO 57

VII . ABSTRACT 59

VIII . REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 60

I – Introdução

1 - Considerações gerais sobre o estrógeno

O estrógeno é considerado o hormônio sexual feminino, uma vez que é responsável por muitas características típicas femininas, como por exemplo o crescimento e desenvolvimento da mama e da genitália feminina externa, além de estar envolvido no processo reprodutivo (Murad e Haynes, 1987).

A esteroidogênese inicia-se por estímulos das gonadotrofinas, FSH (hormônio folículo-estimulante) e LH (hormônio luteinizante), ambos produzidos na pituitária. No ovário ocorre a conversão do acetato em colesterol e, subsequentemente, em outros esteróides (Figura 1). Os andrógenos constituem os precursores comuns dos estrógenos. A atividade da 17 β-hidroxidesidrogenase converte a androstenediona em testosterona, que não é um produto secretório importante do ovário normal. Ela é rapidamente desmetilada na porção C-19 e aromatizada a estradiol, o principal estrógeno secretado pelo ovário humano. O estradiol também se origina da androstenediona, via estrona, e a própria estrona é secretada em quantidades significantes, diariamente. O estriol é o metabólito periférico da estrona e estradiol e não um produto secretório do ovário (Speroff *et al.*, 1995).

A conversão dos esteróides nos tecidos periféricos nem sempre constitui uma forma de inativação. Os andrógenos livres são convertidos perifericamente em estrógenos livres, por exemplo, na pele e células adiposas. A localização das células adiposas influenciam a sua atividade, pois mulheres com obesidade central, ou seja localizada na área abdominal têm mais andrógenos. Os andrógenos circulantes podem derivar estrógeno suficiente para provocar sangramento em mulheres pós-menopáusicas. Na mulher, a glândula supra-renal é a principal fonte de andrógeno circulante, em particular a androstenediona (Speroff *et al.*, 1995).

Na mulher não-grávida normal, o estradiol é produzido em uma taxa de 100-300g/dia. A produção de androstenediona é cerca de 3 mg/dia e a conversão periférica (cerca de 1%) de androstenediona a estrona responsabiliza-se por cerca de



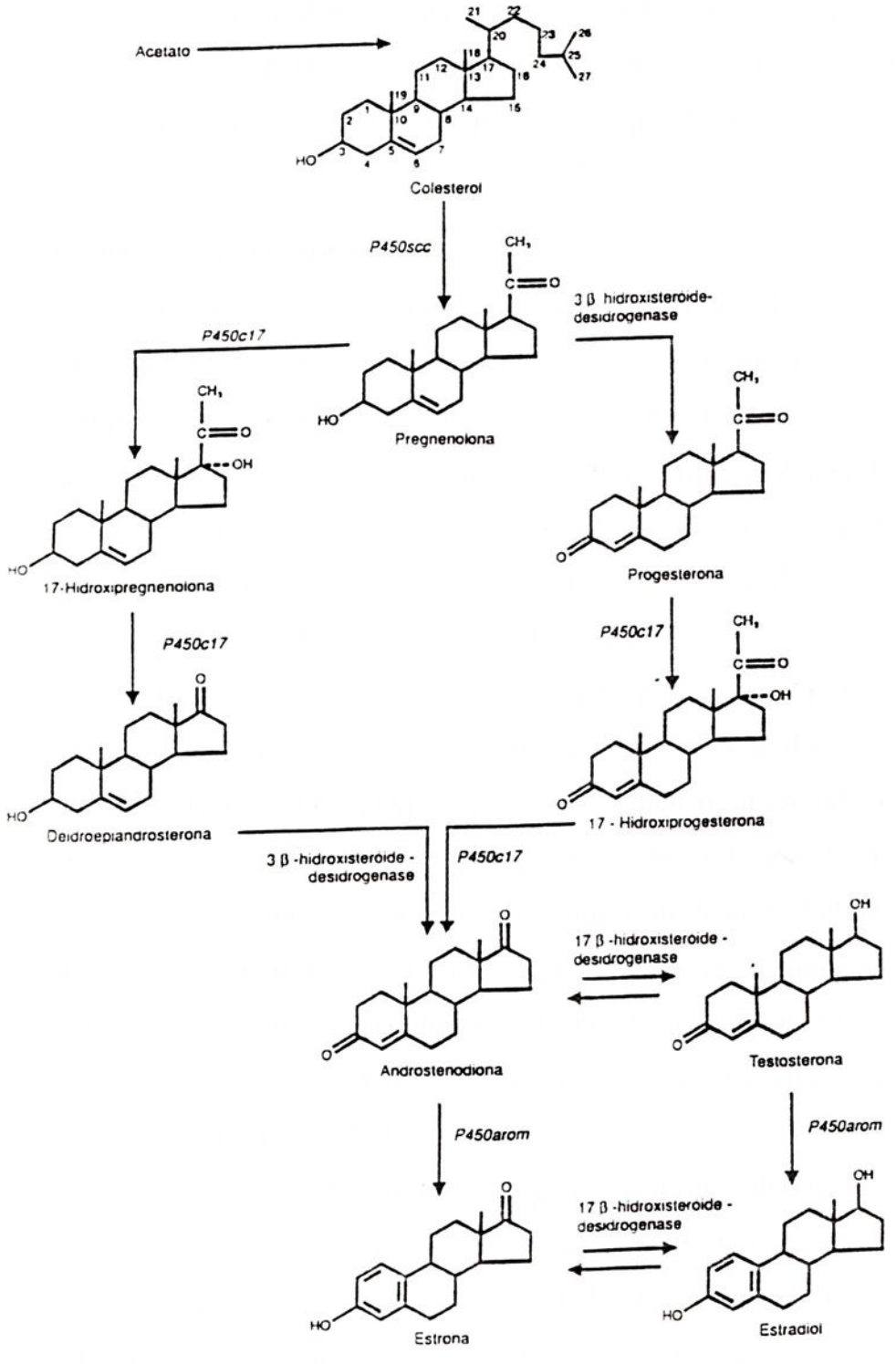


Figura 1 - Etapas da biossíntese dos estrogenos. (Adaptado de Speroff *et al.*, 1995)

20-30% da estrona produzida por dia. Uma vez que a androstenediona é secretada em quantidades de miligramas, mesmo uma pequena conversão percentual em estrógenos resulta em importante contribuição ao conteúdo estrogênico funcional, que existem e atua em quantidades de microgramas (Speroff *et al.*, 1995).

2 - Aspectos gerais do climatério

No decorrer da vida, a mulher passa por uma fase de transição entre o período reprodutor e o não reprodutor, fase essa denominada climatério. A menopausa representa evento marcante no período do climatério e constitui a última menstruação. O climatério seria então uma época, enquanto a menopausa uma data, quando ocorre a interrupção da função reprodutora iniciada na puberdade. Tal fenômeno fisiológico é decorrente do desaparecimento dos folículos ovarianos, que dificulta a produção de estrógeno pelo ovário (Halbe, 1987).

Na maioria das mulheres, a menopausa, ou seja, a ocorrência da última mestruação, se dá entre 50 e 55 anos, mas algumas mulheres atingem a menopausa na década dos 40, enquanto outras podem menstruar até 60 anos (Wren, 1992). A idade média da menopausa parece não estar relacionada à menarca, condições social ou econômica, raça, paridade, altura ou peso. Entretanto, a idade da menopausa pode ser afetada pelo fumo, pois mulheres fumantes atingem a menopausa mais cedo do que as não fumantes (Gant e Cunningham, 1993). Após ter passado um ano da última menstruação, considera-se que a mulher está na pós-menopausa (Wren, 1992; FEDERAÇÃO, 1995).

No início do climatério começam a surgir alterações no ciclo menstrual, ou seja, nessa fase as ovulações tornam-se menos frequentes. Ao aproximar-se a menopausa, os ovários vão reduzindo seus volumes, não respondem mais aos estímulos das gonadotrofinas - FSH e LH, hormônios responsáveis pelo crescimento e manutenção do folículo, ovulação, formação e manutenção do corpo lúteo - apresentam redução progressiva na síntese de estrógeno, progesterona e outros hormônios ovarianos. O resultado desses baixos níveis de homônios

ovarianos, muitas vezes se manifesta através de mudanças físicas, psicológicas e sexuais (FEDERAÇÃO, 1995).

Com a ausência da população folicular nos ovários de mulheres pós-menopáusicas, a produção hormonal ovariana é realizada principalmente pelo estroma, que produz essencialmente andrógeno em quantidades reduzidas. O estroma ovariano não possui a enzima necessária para aromatizar o anel A dos andrógenos e por isso, não pode convertê-los em estrógeno. Sendo assim, o que se observa é uma conversão periférica da androstenediona, andrógeno também sintetizado na glândula adrenal, em estrógeno, principalmente no tecido adiposo. Devido a essa conversão periférica pode-se explicar o motivo pelo qual muitas mulheres apresentam climatério assintomático (Halbe, 1987). Embora essa produção contínua de estrógeno na pós-menopausa seja benéfica, ela pode ser responsável pelo aumento da incidência de câncer de endométrio entre mulheres obesas (Wren, 1992).

O estrógeno é um hormônio que possui receptores em vários tecidos, como vagina, útero, ovário, bexiga, pele, osso, coração, artéria, fígado, cérebro, músculo e outros. Assim sendo, quando seus níveis encontram-se baixos ou ausentes, as células desses tecidos tornam-se relativamente inativas. Em mulheres pós-menopáusicas que apresentam níveis de estrógeno muito baixos verifica-se com freqüência ondas de calor e sudorese, por vezes acompanhadas de palpitações, vertigens e formigações. As ondas de calor ocorrem em 85% das mulheres que se encontram no climatério e podem continuar por 10 anos ou mais em 57% das mulheres após a última menstruação. Em decorrência dos sintomas vasomotores são frequentes alterações no sono que podem indiretamente levar a sintomas não específicos, como agitação, nervosismo, mudança de humor, ansiedade, irritabilidade, perda de memória e de concentração, cansaço, perda da libido, depressão, dores de cabeça e sintomas musculares. Na tentativa de abrandar esses sintomas, as mulheres freqüentemente fazem uso de sedativos, hipnóticos ou drogas psicotrópicas (Kase, 1987; Witt e Lousberg, 1997).

A osteoporose é o problema mais grave enfrentado por mulheres pós-

menopáusicas e consiste na alteração da estrutura óssea, devido à perda de cálcio. Como conseqüência, aproximadamente 25 milhões de mulheres americanas são afetadas e 1,5 milhões de pessoas por ano apresentam fraturas decorrentes do problema. No início do climatério há uma perda óssea de aproximadamente 2% ao ano e após 5 anos de cessação da função ovariana esta taxa cai para 1%. A menopausa cirúrgica, ou seja, a retirada dos ovários, resulta em uma perda ainda maior. A ausência do estrógeno leva à uma maior reabsorção óssea pelos osteoclastos do que uma reposição pelos osteoblastos (Witt e Lousberg, 1997). Além da osteoporose, na ausência de estrógeno alterações atróficas ocorrem em todas as superfícies de mucosas, principalmente vagina e útero, conduzindo à ocorrência de vaginite, prurido, estenose, uretrite, disúria e micção noturna (Wren, 1992).

As doenças cardiovasculares são uma das principais causas de morte entre mulheres, e sua incidência aumenta drasticamente após a menopausa. Mulheres brancas com 50 anos têm aproximadamente 46% de probabilidade de desenvolver doenças do coração e 31% de morrer em decorrência delas (Witt e Lousberg, 1997).

A reposição apropriada de estrógeno resulta na manutenção do conteúdo mineral ósseo, prevenindo a osteoporose e o aparecimento das ondas de calor (FEDERAÇÃO, 1995). Além disso, parece reduzir o risco de Doença de Alzheimer (Tang *et al.*, 1996), reduz o risco de câncer de colo (Jacobs *et al.*,1994; Newcomb e Storer, 1995), atua na melhoria do tônus muscular, reduz o risco de morte por infarto do miocárdio e derrame, na ordem de 50 a 70% e permite um aumento na sensação de bem-estar. Evidências epidemiológicas sugerem também redução significativa na incidência do câncer não genital. Desse modo, mulheres que fazem uso de estrógeno a partir do início do climatério, vivem, em média, 4 anos mais do que aquelas que não fazem a reposição (Wren, 1992).

3 – A citogenética como parâmetro na predição de riscos adversos à saúde

O homem tem sido exposto a um grande número de agentes químicos, cuja exposição se intensificou com o início da revolução industrial. Esses agentes podem interagir com o DNA causando inúmeras lesões caracterizadas por perda e alterações químicas de bases, bem como a ocorrência de erros durante a duplicação do DNA (Defais, 1990), afetando, portanto, a integridade de sua codificação, o que pode levar à ocorrência de mutações, recombinações, rearranjos, aberrações cromossômicas e amplificações gênicas.

A partir dessas considerações, contínuos esforços têm sido empreendidos na tentativa de se estabelecer mecanismos confiáveis para a identificação e detecção da ação de agentes danosos, para que esses conhecimentos sejam empregados no acompanhamento de populações expostas. Com isso, a monitoração humana foi desenvolvida como um recurso confiável e preventivo para a saúde pública (Au, 1991), tendo em vista que a exposição do homem a agentes nocivos pode induzir alterações genéticas detectáveis antes mesmo do desenvolvimento da doença (Perera *et al.*, 1996).

Os biomarcadores ou marcadores biológicos são indicadores de eventos em sistemas biológicos e incluem enzimas alteradas, funções celulares anormais, presença de metabólitos ativos e demonstração de danos genéticos (Au, 1991). Estimar o risco do câncer com base na análise de biomarcadores é um recurso mais preciso do que aquele baseado na estimativa de risco (Albertini, 1994).

Os linfócitos do sangue periférico são as células mais indicadas para o estudo de monitoração genética; são facilmente obtidos de amostras de sangue, e por entrarem em contato com todos os tecidos do corpo podem ser considerados monitores não específicos de um órgão (Au, 1991). Embora a produção de milhões de novos linfócitos por dia, implique em um "tunover" celular, muitas células linfóides possuem vida longa e persistem como "células de memória" por muitos anos. Estudos de danos cromossômicos em linfócitos de pessoas expostas à radiação, indicam uma média de vida de 3,5 anos. Além disso, é evidente que uma proporção de células pode sobreviver muitas décadas em um estágio não

proliferativo (Bender *et al.*, 1988) e, portanto, acumular danos de repetidas exposições. Desse modo, tais células mostram-se ideais para detectar danos decorrentes da exposição crônica a baixas doses de agentes perigosos (Au, 1991; Legator e Au, 1994; Natarajan *et al.*, 1996).

Dentre os mais importantes biomarcadores, encontram-se as aberrrações cromossômicas, alterações detectáveis em forma de quebras e rearranjos nos cromossomos humanos, como conseqüência da exposição do homem a agentes mutagênicos e carcinogênicos (Preston, 1990). Assim, o teste de aberrações cromossômicas é freqüentemente utilizado para monitorar populações expostas e também como padrão de documentação dos efeitos biológicos (Au *et al.*, 1996).

As aberrações cromossômicas podem ser causadas pela ação de diferentes tipos de agentes. Elas podem ser do tipo cromatídica, quando a lesão afeta uma das cromátides e cromossômica, quando ambas as cromátides são afetadas. Outras alterações possíveis são deficiências e translocações. No primeiro caso, ocorre perda de material genético, sendo as conseqüências dependentes da quantidade de material perdido. No segundo caso, um pedaço de cromossomo é transferido para outro. Esses eventos podem induzir a justaposição dos genes, em decorrência dos rearranjos cromossômicos, o que pode levar à expressão anormal de genes translocados (Au, 1991). A radiação ionizante, por exemplo, ou químicos radiomiméticos como a bleomicina podem causar aberrações tanto cromossômicas quanto cromatídicas, dependendo da fase do ciclo celular em que a célula se encontra. Esses agentes produzem aberrações do tipo cromossômica em G1, cromatídica em G2 e ambos os tipos em S e são denominados agentes S-independentes. Por outro lado, a maioria dos compostos químicos induz aberrações do tipo cromatídica, independente da fase do ciclo celular em que a célula se encontra e são denominados agentes S-dependentes, pois dependem da fase S para serem visualizadas (Rabello-Gay, 1991a; Natarajan, 1993). Desse modo, o teste de aberração cromossômica pode ser usado como um marcador biológico geral.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

Existe uma correlação entre níveis aumentados de aberrações cromossômicas em linfócitos de sangue periférico e risco de câncer. Além disso, aberrações cromossômicas também são freqüentes em células cancerígenas, fetos abortados espontaneamente e malformações congênitas (Hagmar *et al.*, 1994; Legator e Au, 1994).

Em contraste com técnicas moleculares, como a detecção de mutações em ponto que refletem o efeito de um agente em um determinado gene, a aberração cromossômica é um biomarcador muito sensitivo capaz de detectar o efeito do agente sobre todo o genoma (Natarajan *et al.*, 1996).

Há outros testes capazes de determinar a genotoxicidade de um composto. Entre eles, os ensaios de curta duração em sistema bacteriano (teste de Ames), o teste de micronúcleos, determinação da formação de adutos no DNA e a estimativa da freqüência de trocas entre cromátides-irmãs (TCI).

O teste de Ames avalia a capacidade que certos compostos químicos apresentam de rerverter mutações no genoma de linhagens de *Salmonella typhimurium* dependentes de histidina (his). Esse teste verifica a ocorrência de colônias revertentes, pois apenas crescerão em meio sem histidina, as células nas quais o composto testado for capaz de reverter ou suprimir a mutação original (Sanchez, 1991).

Os micronúcleos são pequenos núcleos citoplasmáticos, portadores de cromossomos dicêntricos ou em anel, fragmentos acêntricos ou até mesmo cromossomos inteiros, que não participam do movimento anafásico normal da divisão celular e são avaliados pela sua freqüência em relação ao total de núcleos analisados (Rabello-Gay, 1991b).

Um outro método existente é o que detecta a presença de adutos no DNA, que estão presentes em grande quantidade em tecidos-alvo de indivíduos expostos a agentes genotóxicos. Contudo, deve-se levar em conta que um único composto químico pode formar uma variedade de adutos diferentes, mas nem todos serão mutagênicos (Legator e Au, 1994).

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

A troca entre cromátides irmãs é um evento em que ocorre quebras no mesmo loco das duas cromátides de um cromossomo, seguidas de intercâmbio e reparo. Os mecanismos moleculares envolvidos não estão ainda bem definidos, sendo também seu significado biológico ainda desconhecido. Assim, quando se seleciona apenas um procedimento para monitoramento genético, esse teste não deve ser utilizado (Legator e Au, 1994).

4 - Relação entre exposição a estrógenos e genotoxicidade

Nos últimos trinta anos, um grande número de estudos epidemiológicos, citogenéticos e experimentais tem confirmado a hipótese de que os tumores são causados por danos ao material genético. Os avanços recentes da biologia molecular têm provado essa teoria e já não há discordância sobre o fato de que o dano ao DNA é a lesão básica que conduz à maioria das malignidades (Weinberg, 1992; 1996).

Os agentes genotóxicos são componentes físicos, químicos e biológicos, eficazes na indução de alterações cromossômicas e/ou gênicas nas células ou organismos a eles expostos. Essas modificações são usualmente observadas em neoplasias benignas ou não, estabelecendo a causalidade entre o agente e a doença (Natarajan *et al.*, 1996).

O desenvolvimento do câncer envolve muitas etapas, cada uma delas direcionada por vários fatores sendo alguns dependentes da constituição genética individual, outros do ambiente e estilo de vida, outros ainda, da interação de ambos. Pela modificação do ambiente ou dos hábitos, em princípio, é possível reduzir drasticamente a chance do desenvovimento de neoplasias (Willett *et al.*, 1996).

A Terapia de Reposição Hormonal (TRH) consiste na administração exógena de determinada dose de hormônio suficiente para se obter resultados positivos quanto a problemas decorrentes do climatério. Há benefícios substanciais obtidos a partir da TRH, todavia estudos mostram um aumento na incidência de cânceres hormônio-dependentes em mulheres submetidas a tal procedimento (Steinberg *et al.*, 1994; Risch e Howe, 1994; Colditz *et al.*, 1995; Garg *et al.*, 1998).

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

Desde 1932, quando Lacassagne levantou a hipótese da carcinogenicidade dos estrógenos, vários trabalhos foram realizados e relataram múltiplos tumores malignos e benignos em animais de laboratório expostos a esse hormônio (Lupulescu, 1995).

A carcinogênese é um processo com múltiplos estágios incluindo iniciação, promoção e progressão. A iniciação envolve a ligação covalente de um carcinógeno químico ao DNA (aduto), que acredita-se ser o primeiro passo para o processo carcinogênico (Diplle, 1995).

Segundo Yager e Liehr (1996) os metabólitos dos estrógenos têm a capacidade de interagir com o DNA e proteínas, produzindo danos ao material genético (Figura 2). O 16 α-hidroxiestradiol, um metabólito altamente estrogênico, tem a capacidade de se ligar a receptores de estrógenos, proteínas e DNA. Outros metabólitos do estradiol como o 2-hidroxiestradiol e 4-hidroxiestradiol podem se transformar em metabólitos inativos, como o 2/4-metoxiestradiol, ou produzir metabólitos como a semiquinona ou quinona que geram radicais livres com capacidade de interagir com o material genético, promovendo danos oxidativos, ou ainda possuem a capacidade de ligação com o DNA e proteínas.

Estudos *in vitro* relataram que após a ativação da estrona e do 17α-estradiol pelo dimetildioxirane (DMDO), um oxidante amplamente utilizado na ativação de uma variedade de carcinógenos químicos, os epóxidos resultantes foram capazes de se ligar covalentemente ao DNA. A aflatoxina B1, o mais potente carcinógeno conhecido, é ativado *in vitro* pelo DMDO da mesma forma que é *in vivo* pelas enzimas do citocromo P450 (Yu *et al.*, 1998).

O dietilbestrol (DES), um estrógeno sintético, foi amplamente usado na década de 40 para a prevenção de abortos, mas em 1971 resgistrou-se o primeiro caso de carcinogênese transplacental em humano, quando se observou que filhas de mulheres tratadas com o hormônio desenvolviam carcinomas cervical e vaginal (Hartley-Asp *et al.*, 1985). O aumento no risco de câncer mamário em mulheres que usaram o DES durante a gravidez também foi observado (Greenberg *et al.*, 1984). O DES é capaz de se ligar covalentemente ao DNA e mostrou-se responsável por

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

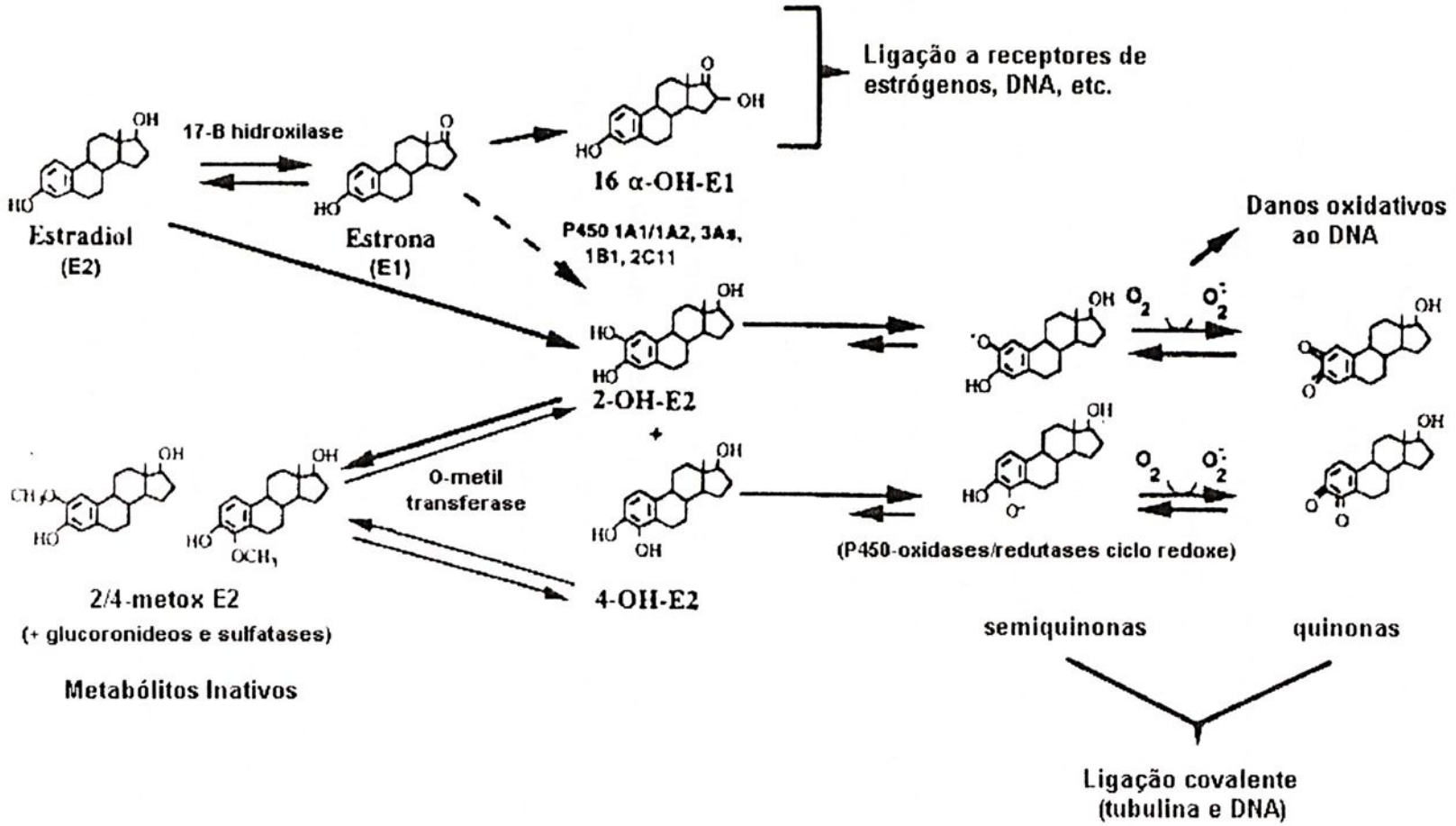


Figura 2 - Caminhos do metabolismo oxidativo, ciclo redox e inativação do estradiol. (Adaptado de Yager e Liehr, 1996)

aberrações cromossômicas estruturais em células de camundongo, de hamster Chinês e de humanos (Banduhn e Obe, 1985).

Hormônios como o 17 β-estradiol, o DES e outros estrógenos induzem transformações neoplásicas e morfológicas em células embrionárias de hamster Sírio. Além disso, McLachlan *et al.* (1982) observaram que as transformações induzidas por esses estrógenos eram indistinguíveis daquelas induzidas por carcinógenos químicos como o benzo(a)pireno.

Os estrógenos como etinilestradiol, hidrocortisona, dexametasona e mestranol têm sido referidos como portadores de ação genotóxica (Wheeler *et al.*, 1986; Singh *et al.*, 1994; Dhillon *et al.*, 1995). Telang *et al.* (1992) observaram que a 16 α-hidroxiestrona, pode agir como iniciadora da transformação pré-neoplásica em células mamárias de camundongo. Do mesmo modo, o dietilestradiol, um estrógeno sintético, induz danos ao DNA evidenciados pela presença de anomalias cromossômicas estruturais e numéricas, além de promover a expressão aberrante de certos genes (Cohen e Ellwein, 1991). Adicionalmente, Nutter *et al.* (1994) demonstraram a elevação de radicais livres na presença de hormônios esteróides durante sua metabolização.

Os hormônios estrogênicos são também referidos como agentes mitogênicos, uma vez que ativam o processo de divisão celular. Esse passo é essencial para a ocorrência da carcinogênese, pois aumenta o risco de erros no material genético, podendo levar à ativação de oncogenes por mutação, translocação ou amplificação (Preston *et al.*, 1990).

Os hormônios estrogênicos podem ainda ativar seus próprios receptores, bem como os receptores para fatores de crescimentos (EGF-R), além de oncogenes como o *MYC*, a superfamília *RAS* e o *FOS* (Miller *et al.*, 1993; Shiu *et al.*, 1993). Uma outra conseqüência do estrógeno foi constatada por Brunelli *et al.* (1996), que detectaram alterações nas células do sistema imune, como o aumento de células "killer" em pacientes sujeitas à TRH. Já a presença de citotoxicidade foi referida por Reimann *et al.* (1996) em linfócitos cultivados *in vitro* e células de

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

medula óssea de camundongos tratados por esteróides naturais, como o etinilestradiol.

Por outro lado, apesar das evidências de que os estrógenos administrados exogenamente estejam envolvidos na indução de neoplasmas, tanto benignos como malignos em ratos, camundongos e hamsters, histologicamente semelhantes aos encontrados no homem, não há embasamento preciso de que os estrógenos sejam, sozinhos, os únicos fatores responsáveis pela etiopatologia dos cânceres humanos (Davis *et al.*, 1993). Aliados a esses, a mulher pode ter sua taxa estrogênica aumentada por meio da presença de substâncias encontradas na natureza conhecidas como xenoestrógenos. Entre eles estão os compostos hidrocarbonetos aromáticos e policíclicos (HAPs), pesticidas, drogas, e material plástico (Davis e Bradlow, 1995).

Desse modo, uma outra explicação para a origem dos cânceres relacionados com a TRH parece residir nas interações entre fatores genéticos e ambientais. Davis e Bradlow (1995) propõem que substâncias conhecidas como xenoestrógenos sejam responsáveis por uma fração importante do processo maligno, em decorrência desses compostos afetarem a produção e o metabolismo dos estrógenos, uma vez que mimetizam a ação daqueles sintetizados endogenamente. Alguns xenoestrógenos, como os derivados da soja, brócolis e couve-flor, denominados fitoestrógenos, podem reduzir os efeitos dos estrógenos, enquanto outros como pesticidas, drogas e HAPs amplificam seus efeitos.

5 - O tabagismo como potenciador de riscos à saúde humana

Atualmente, 90% dos cânceres de pulmão originam-se como conseqüência do hábito de fumar, sendo esse também responsável por outros tipos de cânceres como cabeça e pescoço, esôfago, rim, pâncreas, bexiga e mama (Hoffmann *et al.*, 1986; Davidson *et al.*, 1993; Ames *et al.*, 1995; Phillips, 1996).

O condensado do cigarro contém mais de 4000 compostos químicos, dos quais inúmeros são nocivos à saúde, sendo que até o momento, 43 deles têm reconhecida ação carcinogênica (Solberg *et al.*, 1998). Dentre eles, os HAPs, as

nitrosaminas, as aminas aromáticas e heterocíclicas, os aldeídos, os compostos inorgânicos e uma miscelânea de químicos orgânicos. Alguns desses compostos, como os HAPs e as nitrosaminas, quando em contato com o organismo, tornam-se tóxicos somente após sofrerem transformações metabólicas, mediadas por enzimas pertencentes à família do citocromo P450, localizadas principalmente na fração microssomal do fígado (Heflich, 1991).

Os carcinógenos ativados do cigarro ligam-se covalentemente ao DNA, formando adutos que podem interferir na transcrição, resultando em mutações (Doerjer *et al.*, 1984). Van-Schooten *et al.* (1998) demostraram que as coronárias de fumantes contêm uma grande variedade de adutos de DNA aromático em níveis significantemente mais elevados do que os de não fumantes. Do mesmo modo, Foiles *et al.* (1991), Alexandrov *et al.* (1992) e Foiles *et al.* (1992) encontraram adutos provenientes do cigarro na urina, pulmão e sangue, respectivamente, de indivíduos tabagistas.

O aumento na freqüência de aberrações cromossômicas em células de indivíduos fumantes foi confirmado por alguns pesquisadores (Vijayalaxmi e Evans, 1982; Nakayama *et al.*, 1985; Kao-Shan *et al.*, 1987; Sinues *et al.*, 1990), assim como um aumento na freqüência de trocas entre cromátides-irmãs (Vijayalaxmi e Evans, 1982; Nahayama *et al.*, 1985). Além disso, Van-Diemen *et al.* (1995) mostraram um aumento significante na freqüência de hiperploidia em células de fumantes.

Estudos indicam uma maior freqüência de quebras nos cromossomos 1, 3, 7 e 11 de indivíduos expostos ao tabaco. Esses dados nos levam a crer que alguns locos dos referidos cromossomos possuem genes mais suscetíveis às mutações causadas pelos carcinógenos do cigarro. Amplificações gênicas e deficiências também são freqüentes em análises citogenéticas de pacientes com câncer induzido pelo tabaco (Davidson *et al.*, 1993). Adicionalmente, o benzo(a)pireno, um importante carcinógeno presente na fumaça do cigarro, induz mutações do tipo transversões G-T (Vineis e Caparaso, 1995; Zojer *et al.*, 1996).

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

Vários trabalhos mostram que o tabagismo aumenta em 50% a freqüência de mutação no gene supressor de tumor *TP53* em tumores de pulmão e em 40% em tumores de bexiga (Spruck *et al.*, 1993; Williamson *et al.*, 1994; Husgafvel-Pursiainem e Kannio, 1996).

Em estudo pioneiro efetuado por Russell e Feyerabend (1975) foi encontrado um aumento significante da concentração de nicotina no plasma e urina de não-fumantes após a exposição à fumaça do cigarro. Atualmente, já está bem estabelecido que os fumantes passivos absorvem uma quantidade considerável de produtos carcinogênicos provenientes da fumaça do cigarro. Uma relação de causa e efeito tem sido observada entre a inalação involuntária da fumaça e o aumento de várias doenças respiratórias entre crianças ou adultos, uma vez que tais indivíduos estão expostos aos mesmos compostos químicos que os fumantes (Sieminska e Olszewsha, 1997).

De acordo com Au *et al.* (1991), o sistema de reparo do DNA em células de fumantes é menos eficiente, quando comparado ao de não-fumantes. Isto deve-se ao fato de que os carcinógenos do cigarro também são capazes de se ligar às proteínas, formando adutos. Sendo assim, supõe-se que esses adutos ocorram nas enzimas de reparo, impedindo-as de desempenhar o seu papel corretamente.

Além do câncer, outras doenças como derrame, ataque cardíaco, doenças vasculares, aneurisma, bronquite e enfisema pulmonar também decorrem do tabagismo. A nicotina causa distúrbios funcionais e estruturais nas células endoteliais que podem iniciar a arterosclerose (Stammler e Diehm, 1995). A redução da fertilidade é outra conseqüência do cigarro, assim como há a comprovação de que gestantes fumantes têm seus bebês com peso abaixo da média (Phillips, 1996). Um recente estudo realizado por Lackmann *et al.* (1999), notou a presença de dois metabólitos do carcinógeno 4-(metilnitrosamina)-1-(3 piridil)-1-butanona na urina de recém-nascidos de mães fumantes. Adicionalmente, o cigarro aumenta o risco de fraturas ósseas, sendo esse aumento proporcional ao consumo de cigarros (Cornuz *et al.*, 1999).



Somando-se a todas essas informações, os HAPs liberados na fumaça do cigarro, parecem apresentar atividade estrogênica. Entre eles vários outros compostos químicos, como por exemplo alguns componentes de pesticidas (DDT, metoxiclor, kepone, endosulfan), de plásticos (bisfenol A, nonilfenol), de drogas (cimetidina) e outros, também apresentam essa capacidade (Davis e Bradlow, 1995; Rudel, 1997; Zava *et al.*, 1997). Tais substâncias denominadas xenoestrógenos, possuem estruturas semelhantes ao hormônio e, quando em contato com o organismo são capazes de se ligar a receptores estrogênicos, mimetizando a ação do estrógeno e podendo alterar o sistema endócrino, levando a deficiências reprodutivas e cânceres hormônio-dependentes (Zava *et al.*, 1997).

II - Objetivos

Há evidências recentes da ação dos estrógenos sobre o material genético, classificando-os como agentes genotóxicos, aneugênicos e mitogênicos. Sabe-se também, que compostos oriundos da fumaça do cigarro podem mimetizar a ação dos estrógenos (xenoestrógenos), participando no desenvolvimento de cânceres hormônio-dependentes. Desse modo, tendo em vista o impacto da terapia de reposição hormonal (TRH) na melhoria da qualidade de vida da mulher e ainda considerando a associação entre o tabagismo e o câncer, o presente estudo teve por objetivos específicos:

1 – Investigar a possível ação genotóxica dos estrógenos através da monitoração citogenética de mulheres pós-menopáusicas, fumantes e não-fumantes, expostas 180 dias aos hormônios estrogênicos.

2 – Avaliar um possível efeito sinergístico dos hormônios estrogênicos com o cigarro.

3 – Detectar a possibilidade de interferência desses hormônios e dos compostos do cigarro na cinética do ciclo celular.



III – Material e Métodos

1 – Caracterização da amostra

O estudo citogenético foi realizado em 18 mulheres, sendo o grupo exposto representado por nove mulheres pós-menopáusicas, recrutadas pelo médico ginecologista Guaraci Silveira Garcia, do Centro de Avaliação Materno Fetal (CAMF) de São José do Rio Preto. Tais mulheres foram submetidas à TRH, através da ingestão de 0,625 mg de Premarim (Wyeth), estrógenos naturais conjugados, administrado por cinco dias semanais, e suspenso por dois dias (finais de semana). O grupo exposto foi subdividido em não-fumante (ENF), constituído por cinco mulheres, e fumante (EF), composto por quatro mulheres. As participantes foram amostradas em duas etapas, ou seja, antes do início do tratamento e após 180 dias.

Juntamente, foi estudado um grupo controle composto por nove mulheres saudáveis e não-expostas à TRH. O grupo controle também foi subdividido em não-fumante (CNF) e fumante (CF), ambos compostos por cinco e quatro mulheres, respectivamente, amostradas somente uma vez. Os grupos, exposto e controle, foram pareados por idade, sexo e condição social. A caracterização das amostras exposta à TRH, não-fumante e fumante, e das amostras controle, não-fumante e fumante, encontram-se na Tabela 1.

Foram feitas às participantes questões sobre exposição ocupacional a agentes químicos e físicos, bem como exposição à radiação e ao álcool, aparecimento de doenças viróticas ou bacterianas e outros fatores ocorridos até seis meses antes da colheita de sangue. Essas informações foram obtidas e registradas por meio de um amplo questionário aplicado durante entrevista, antes da colheita do sangue. A coleta de células foi realizada somente após a obtenção do termo de consentimento. O trabalho teve a aprovação do Conselho de Ética em Pesquisa (CEP) da instituição onde foi realizado, bem como da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP).



Tabela 1 - Caracterização das amostras exposta à TRH, não-fumante e fumante, e das amostras controle, não-fumante e fumante, quanto a idade, profissão, média de consumo de cigarro por dia e tempo do hábito de fumar

Indivíduos	Idade	Profissão	Cigarro (maço/dia)	Tempo do hábito (anos)
ENF1	52	professora	-	-
ENF2	56	dona de casa	-	-
ENF3	48	dona de casa	-	-
ENF4	56	dona de casa	-	-
ENF5	54	dona de casa	-	-
CNF1	58	empresária	-	-
CNF2	44	secretária	-	-
CNF3	46	professora	-	-
CNF4	54	dona de casa	-	-
CNF5	53	dona de casa	-	-
EF1	54	dona de casa	1/2 a 1	40
EF2	49	dona de casa	1/2 a 1	30
EF3	46	dona de casa	1/2 a 1	20
EF4	50	instrumentadora	1/2 a 1	20
CF1	54	dona de casa	menos 1/2	38
CF2	58	dona de casa	menos 1/2	32
CF3	45	dona de casa	1	29
CF4	45	advogada	1/2 a 1	28

unesp

2 – Metodologia citogenética

Para a execução do estudo foram realizadas culturas temporárias de linfócitos objetivando-se a obtenção de metáfases necessárias para a análise de aberrações cromossômicas.

De cada indivíduo foram puncionados 20 mL de sangue periférico em seringa previamente heparinizada (Liquemine Roche, 5000 U/M), sendo em seguida deixado em repouso para sedimentação das hemácias.

Foram retirados cerca de 0,5 mL de soro autólogo, 0,5 mL de sangue total após ressuspensão, e foram transferidos para um frasco de cultura contendo 5 mL de meio de cultura RPMI 1640 (CULTILAB), suplementado com soro fetal bovino, 0,1 mL de fitoemaglutinina (GIBCO), penicilina G potássica (100 UI/mL), quemicetina (5 μg/mL) e 0,1 de L-glutamina. De cada indivíduo foram feitos dois frascos. Após cuidadosa homogeinização, o material foi incubado a 37°C. Decorridos vinte e quatro horas, adicionou-se 0,05 mL de 5-bromodesoxiuridina (SIGMA), um análogo da timidina, que possibilita a diferenciação de células em 1ª e 2ª divisão, uma vez que somente as células em 1ª divisão foram objetivo deste estudo. Após 50 horas do início da cultura a proliferação foi interrompida, com o objetivo de se obter um maior número de células em primeira divisão.

A interrupção da divisão celular ocorreu aproximadamente 1 hora e 30 minutos antes da colheita, quando foi adicionado, em cada frasco, 0,1 mL de colcemide (GIBCO). Seguido esse período, realizou-se a hipotonização do material (KCl 0,075M a 37°C (MERCK)) e lavagens sucessivas em solução de metanol/ácido acético (3:1) para fixação. A suspensão celular foi gotejada em lâminas banhadas em ácido acético e aquecidas por 5 minutos a aproximadamente 45°C. Após 3 dias, as lâminas foram submetidas à coloração diferencial das cromátides-irmãs, segundo técnica de Korenberg e Freedlender (1974) com modificações, segundo El-Zein *et al.* (1995).

As lâminas foram mergulhadas em solução aquosa de Hoechst 33258-Sigma (LATT, 1973) por 30 minutos, e expostas à luz ultravioleta (Philips UV, 15 W) a uma distância de aproximadamente 5 cm, por 30 minutos com tampão fosfato

(NaH_2PO_4) acrescido de ácido cítrico a uma temperatura de 49 a 53°C; após a exposição, as lâminas foram lavadas em água deionizada. Depois de secas ao ar livre, foram coradas com solução aquosa de Giemsa 10% por 10 minutos e lavadas em água deionizada.

3 – Análise citogenética

As lâminas foram codificadas em teste cego para a realização da análise. De cada indivíduo foram analisadas 200 metáfases, com exceção de 3 indivíduos onde não foi possível completar esse número por problemas relacionados ao crescimento da cultura. As análises foram realizadas em metáfases de 1ª divisão com objetivo de estimar as frequências de aberrações cromossômicas (AC).

Para a análise de aberrações cromossômicas, foram escolhidas metáfases de melhor qualidade, nas quais os grupos cromossômicos pudessem ser identificados com segurança. Computou-se quebras cromossômicas e cromatídicas, assim como os rearranjos estruturais passíveis de detecção sob a referida técnica. Tais eventos anômalos foram classificados conforme os critérios descritos no *International System for Human Cytogenetic Nomenclatura* (ISCN, 1995). Considerou-se quebra, a situação na qual o segmento cromossômico encontrava-se separado do restante do cromossomo por uma distância superior à largura da própria cromátide. Os eventos foram considerados cromossômicos (chrb) quando afetavam ambas as cromátides e cromatídicos (chtb) quando apenas uma das cromátides eram afetadas. Foram considerados ainda, fragmentos com ausência de centrômeros (ace) e cromossomos resultantes de duas quebras em diferentes cromossomos, seguidas de religação inversa dos fragmentos, denominados dicêntricos (dic). Figuras de quatro braços cromossômicos resultantes de rearranjo do material genético, denominadas de quadrirradiais (qr) também foram encontradas.

O parâmetro de índice mitótico (IM) também foi efetuado com o intuito de se detectar possíveis alterações induzidas pelo hormônio, em questão, na duração do ciclo celular. Foram computados, em cada indivíduo, a proporção de células em divisão em um total de 2000 linfoblastos.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

A análise citogenética foi realizada em microscópio Carl Zeiss, modelo Jenaval. Alguns eventos foram fotografados para documentação ou maiores esclarecimentos em microscópio Axioskop Zeiss.

4 – Análise estatística

Para ambos os parâmetros analisados, ou seja, número de alterações cromossômicas e índice mitótico, foi efetuada a análise preliminar dos dados, empregando-se os cálculos das estatísticas descritivas (média, mediana, desvio padrão, quartis e valores máximo e mínimo).

A comparação dos valores obtidos entre os grupos para as duas variáveis de interesse foi feita pela aplicação do teste t-Student em termos de valores médios, tanto para as amostras emparelhadas (ENF0 e ENF180; EF0 e EF180), quanto para as amostras independentes (ENF180 e CNF; EF180 e CF), sendo consideradas diferenças significantes quando o valor de p (probabilidade) foi inferior a 5%.

Os números de alterações cromossômicas obtidos e os valores do índice mitótico sofreram transformação raiz quadrada para a realização do teste, uma vez que esse procedimento melhora a aderência dos dados a uma distribuição normal.

Os testes estatísticos foram aplicados de acordo com Zar (1984). A assessoria foi prestada pelo Prof. Dr. José Antônio Cordeiro, professor do Departamento de Epidemiologia e Saúde Coletiva da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP) e pela Profa. Dra. Adriana Barbosa, professora do Departamento de Ciência da Computação e Estatística da UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto.



IV – Resultados

Para a análise de alterações cromossômicas (AC) observou-se, em média, 200 metáfases por indivíduo, com exceção de três casos, onde foram computadas 128, 39 e 120 metáfases, respectivamente para o indivíduo 2 do grupo ENF180 e indivíduos 2 e 3 do grupo EF180. Nas células analisadas registrou-se qualquer tipo de alteração cromossômica passível de detecção pela técnica empregada. Foi encontrada apenas uma alteração por célula na maioria dos indivíduos estudados.

Os dados referentes à amostra não-fumante exposta à TRH (ENF) com 0 e 180 dias do início do tratamento, bem como a respectiva amostra controle (CNF) encontram-se na Tabela 2. Nessa Tabela, estão apresentados os dados referentes ao número de metáfases analisadas em cada indivíduo, o número de alterações estruturais encontradas e as freqüências relativas (FR). O número total de AC no grupo ENF foi de 38 alterações antes do início do tratamento e de 16 alterações após 180 dias. O grupo controle apresentou um total de 28 alterações. O número de metáfases analisadas para cada grupo foi de respectivamente 1000, 928 e 1000 metáfases. Pode-se observar, que o grupo ENF180 apresentou um número menor de alterações cromossômicas quando comparado aos grupos ENF0 e CNF. Contudo, através da aplicação do teste t-Student que forneceu um valor de $p = 0,097$ ($p>0,05$) para os grupos ENF0 e ENF180 e de $p=0,24$ ($p>0,05$) para os grupos ENF180 e CNF, pode-se constatar que as diferenças existentes entre os grupos não foram significantes estatisticamente. Os valores das freqüências relativas das alterações cromossômicas dos grupos não-fumantes são informações também encontradas na Tabela 2 e observa-se que antes do início do tratamento o valor médio foi de 3,8 e após 180 dias de 1,7. No grupo CNF, o valor encontrado para esse parâmetro foi de 2,8.

Na Tabela 4 encontram-se as estatísticas descritivas do número total de alterações estruturais da amostra não-fumante exposta à TRH . Nessa Tabela, temos $n = 5$ e a média encontrada para o grupo ENF foi de $7,60 \pm 3,05$ antes do

início do tratamento, de 3,13 ± 3,02 após 180 dias e de 5,60 ± 4,22 para o grupo CNF.

Os dados da amostra fumante exposta à TRH (EF) antes do início do tratamento e após 180 dias, bem como o respectivo controle estão na Tabela 3. O número de metáfases analisadas por indivíduo, o número de alterações estruturais e as freqüências relativas (FR) são encontrados nessa Tabela. O grupo EF apresentou um número total de 13 alterações antes do início do tratamento e de 6 alterações após 180 dias. No grupo controle, um total de 18 alterações foi registrado. O número de metáfases analisadas para os referentes grupos foi, respectivamente, de 800, 559 e 800 metáfases. As alterações cromossômicas estiveram presentes em menor número no grupo EF180 do que nos grupos EF0 e CF. Todavia, a diferença entre os grupos não foi significante estatisticamente, sendo o valor de p=0,91 (p>0,05) para os grupos EF0 e EF180 e de p=0,51 (p>0,05) para os grupos EF180 e CF, valores esses obtidos através da aplicação do teste t-Student. Quanto às freqüências relativas de alterações estruturais, o grupo EF apresentou o valor médio de 1,62 antes do tratamento e de 1,0 após 180 dias, enquanto que no grupo CF o valor obtido foi de 2,25.

A Tabela 5 mostra as estatísticas descritivas do número total de alterações estruturais da amostra fumante exposta à TRH. Nesse caso, tem-se n=4 e a média foi de 3,25 ± 3,30 para o grupo EF0, de 1,50 ± 1,29 para o grupo EF180 e de 4,50 ± 5,92 para o grupo CF.

As amostras não-fumante e fumante não mostraram diferença significante quanto ao número de AC. Isto pode ser observado através dos valores de p obtidos pela aplicação do teste t-Student, onde para os grupos ENF0 e EF0 o valor de p=0,089 (p>0,05), grupos ENF180 e EF180 p=0,33 (p>0,05) e grupos CNF e CF p=0,77 (p>0,05).

As Figuras 3 e 4 representam graficamente as freqüências relativas das alterações cromossômicas encontradas nas amostras expostas à TRH não-fumante e fumante e seus respectivos controles.



Com relação aos tipos de alterações encontradas, as Tabelas 6 e 7 apresentam as diversas categorias com as respectivas freqüências de ocorrência. Na Tabela 6, encontram-se os dados da amostra não-fumante, onde denota-se que as quebras cromossômicas e cromatídicas foram os eventos anômalos mais freqüentes. As falhas cromossômicas e cromatídicas foram observadas, porém não computadas. Dentre os eventos mais complexos, o fragmento acêntrico encontrou-se em freqüência elevada. Em adição, apenas dois cromossomos dicêntricos e uma figura quadrirradial foram encontradas, sendo um cromossomo dicêntrico no grupo ENF0 e outro no grupo ENF180, enquanto que a figura quadrirradial foi encontrada no grupo CNF.

As alterações observadas na amostra fumante estão representadas na Tabela 7 e nota-se que as quebras cromatídicas foram os eventos mais encontrados no grupo EF0 e no grupo CF, seguidos de quebras cromossômicas e fragmentos acêntricos. No grupo EF180, as quebras cromatídicas, cromossômicas e fragmentos acêntricos ocorreram com a mesma freqüência. As falhas cromossômicas e cromatídicas também foram observadas, mas não registradas. A Figura 5 mostra metáfases parciais com alterações estruturais encontradas no material estudado.

Analisou-se também o parâmetro de índice mitótico (IM). Os valores obtidos para as amostras não-fumante e fumante expostas à TRH encontram-se, respectivamente, nas Tabelas 8 e 9. Em relação à amostra não fumante, os valores médios foram de 20,9‰ para o grupo ENF antes do tratamento e de 3,9‰ após 180 dias e para o grupo CNF o valor foi de 23,5‰ (Tabela 8). A aplicação do teste t-Student mostrou existir uma diferença significante entre os grupos ENF0 e ENF180 ($p=0,021$; $p<0,05$), bem como entre os grupos ENF180 e CNF ($p=0,0071$;$p<0,05$). Na Tabela 9 estão os valores do IM para a amostra exposta à TRH fumante. Observa-se que os valores médios obtidos para os grupos EF0 e CF foram bem próximos, 6,0‰ e 5,6,‰ respectivamente, enquanto que no grupo EF180 o valor foi de 2,6‰. Através da aplicação do teste t-Student os grupos da amostra fumante não mostraram diferença estatística significante quanto ao IM, uma vez que os valores

de p obtidos foram de 0,48 para os grupos EF0 e EF180 e de 0,89 para os grupos EF180 e CF.

As estatísticas descritivas referentes ao IM dos grupos das amostras expostas à TRH não-fumante e fumante encontram-se, respectivamente, nas Tabelas 10 e 11. A Tabela 10 apresenta os dados obtidos da amostra não-fumante. Nesse caso, a média para o grupo ENF0 foi de 20,90 ± 11,97, de 3,90 ± 3,54 para o grupo ENF180 e de 23,50 ± 13,35 para o grupo CNF. Quanto à amostra fumante, a média foi de 6,00 ± 7,08 para o grupo EF0, de 2,62 ± 2,39 para o grupo EF180 e de 5,63 ± 5,15 para o grupo CF.

Quando se compara as amostras não-fumante e fumante com relação ao IM, pode-se observar uma redução nos grupos da amostra fumante quanto a esse parâmetro. O teste t-Student indica que a diferença entre os grupos ENF0 e EF0 e os grupos CNF e CF são estatisticamente significantes, uma vez que os valores de p obtidos foram, respectivamente, 0,030 ($p<0,05$) e 0,040 ($p<0,05$). Já os grupos ENF180 e EF180 não apresentaram diferença estatística significante ($p = 0,54; p>0,05$).

As Figuras 6 e 7 representam graficamente os valores médios dos IMs dos grupos estudados. A Figura 6 apresenta os dados da amostra não-fumante exposta à TRH e seus controles, e a Figura 7 os dados da amostra fumante.

Tabela 2 – Número de alterações estruturais e freqüências relativas (FR) da amostra não-fumante exposta à TRH (ENF) com 0 e 180 dias de tratamento e da amostra não-fumante controle (CNF)

Indivíduos	nº de metáfases analisadas	nº de alterações estruturais	FR (%)
ENF(0)1	200	07	3,50
ENF(0)2	200	12	6,00
ENF(0)3	200	09	4,50
ENF(0)4	200	06	3,00
ENF(0)5	200	04	2,00
Total	**1000**	**38**	$\bar{X}$ **3,8**
ENF(180)1	200	01	0,50
ENF(180)2	128	01	0,78
ENF(180)3	200	04	2,00
ENF(180)4	200	08	4,00
ENF(180)5	200	02	1,00
Total	**928**	**16**	$\bar{X}$ **1,66**
CNF 1	200	13	6,50
CNF 2	200	04	2,00
CNF 3	200	03	1,50
CNF 4	200	03	1,50
CNF 5	200	05	2,50
Total	**1000**	**28**	$\bar{X}$ **2,80**

Tabela 3 – Número de alterações estruturais e freqüências relativas (FR) da amostra fumante exposta à TRH (EF) com 0 e 180 dias de tratamento e da amostra fumante controle (CF)

Indivíduos	nº de metáfeses analisadas	nº de alterações estruturais	FR (%)
EF(0)1	200	0	0
EF(0)2	200	5	2,50
EF(0)3	200	7	3,50
EF(0)4	200	1	0,50
Total	**800**	**13**	$\bar{X}$ **1,62**
EF(180)1	200	1	0,5
EF(180)2	39	0	0
EF(180)3	120	3	2,5
EF(180)4	200	2	1,0
Total	**559**	**6**	$\bar{X}$ **1.0**
CF 1	200	4	2,0
CF 2	200	13	6,5
CF 3	200	1	0,5
CF 4	200	0	0
Total	**800**	**18**	$\bar{X}$ **2,25**

Tabela 4 – Estatísticas descritivas para o número total de alterações estruturais da amostra não-fumante exposta à TRH (ENF) com 0 e 180 dias de tratamento e da amostra não-fumante controle (CNF)

Amostra	N	$\bar{X}$	Md	DP	Min	Max	Q1	Q3
ENF0	5	7,60	7,00	3,05	4,00	12,00	5,00	10,50
ENF180	5	3,13	2,00	3,02	0,64	8,00	0,82	6,00
CNF	5	5,60	4,00	4,22	3,00	13,00	3,00	9,00

N - nº de indivíduos
$\bar{X}$ – média
Md – mediana
DP - desvio padrão
Min - nº mínino
Max - nº máximo
Q1 - 1º quartil
Q3 - 3º quartil

Tabela 5 – Estatísticas descritivas para o número total de alterações estruturais da amostra fumante exposta à TRH (EF) com 0 e 180 dias de tratamento e da amostra fumante controle (CF)

Amostra	N	$\overline{X}$	Md	DP	Min	Max	Q1	Q3
EF0	4	3,25	3,0	3,30	0,00	7,00	0,25	6,50
EF180	4	1,50	1,50	1,29	0,00	3,00	0,25	2,75
CF	4	4,50	2,50	5,92	0,00	13,00	0,25	10,75

N - nº de indivíduos
$\overline{X}$ – média
Md – mediana
DP - desvio padrão
Min - nº mínino
Max - nº máximo
Q1 - 1º quartil
Q3 - 3º quartil

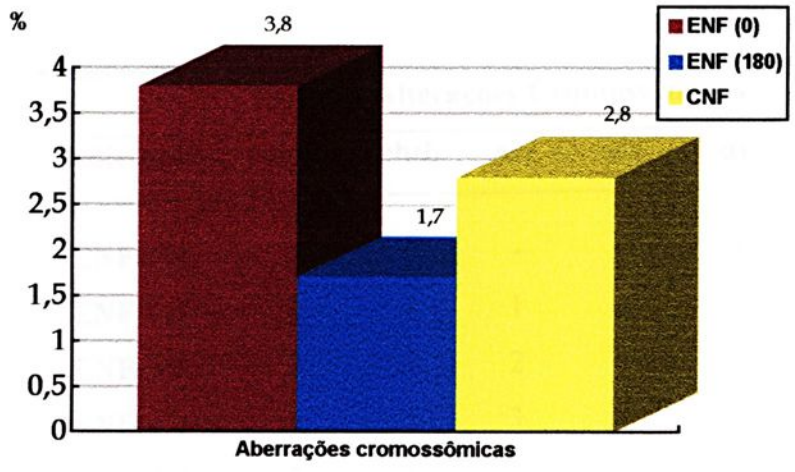


Figura 3 - Caracterização gráfica das freqüências relativas das aberrações cromossômicas da amostra não-fumante exposta à TRH (ENF) com 0 e 180 dias de tratamento e da amostra não-fumante controle (CNF).

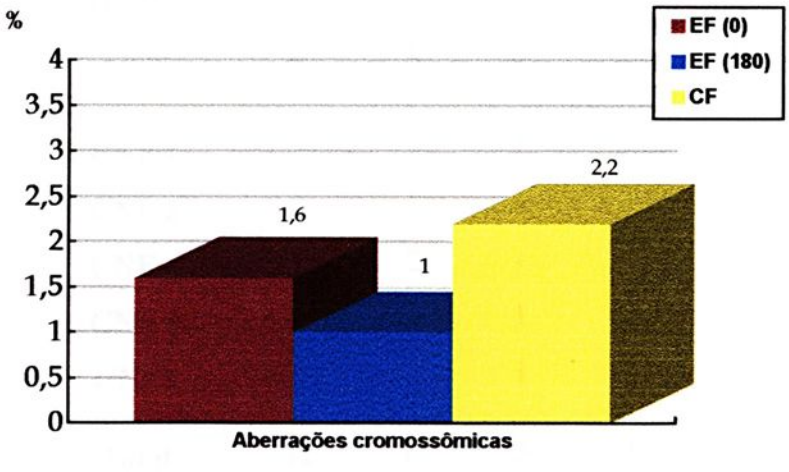


Figura 4 - Caracterização gráfica das freqüências relativas das aberrações cromossômicas da amostra fumante exposta à TRH (EF) com 0 e 180 dias de tratamento e da amostra fumante controle (CF).

Tabela 6 - Distribuição dos diferentes tipos de alterações cromossômicas em metáfases de linfócitos da amostra não-fumante exposta à TRH (ENF) com 0 e 180 dias de tratamento e da amostra não-fumante controle (CNF)

	Tipos de Alterações Cromossômicas*					
Indivíduos	**chrb**	**chtb**	**ace**	**dic**	**qr**	**Total**
ENF(0)1	1	6	-	-	-	7
ENF(0)2	7	4	1	-	-	12
ENF(0)3	5	2	2	-	-	9
ENF(0)4	1	2	3	-	-	6
ENF(0)5	2	1	-	1	-	4
Total	**16**	**15**	**6**	**1**	**0**	**38**
ENF(180)1	1	-	-	-	-	1
ENF(180)2	-	1	-	-	-	1
ENF(180)3	1	2	-	1	-	4
ENF(180)4	4	2	2	-	-	8
ENF(180)5	-	1	1	-	-	2
Total	**6**	**6**	**3**	**1**	**0**	**16**
CNF 1	4	7	1	-	1	13
CNF 2	3	1	-	-	-	4
CNF 3	1	2	-	-	-	3
CNF 4	1	1	1	-	-	3
CNF5	3	1	1	-	-	5
Total	**12**	**12**	**3**	**0**	**1**	**28**

* chrb: quebra cromossômica
chtb: quebra cromatídica
ace: fragmento acêntrico
dic: cromossomo dicêntrico
qr: figura quadrirradial

Tabela 7 - Distribuição dos diferentes tipos de alterações cromossômicas em metáfases de linfócitos da amostra fumante expostas à TRH (EF) com 0 e 180 dias de tratamento e da amostra fumante controle (CF)

	Tipos de Alterações Cromossômicas*					
Indivíduos	**chrb**	**chtb**	**ace**	**dic**	**qr**	**Total**
EF(0)1	-	-	-	-	-	0
EF(0)2	2	2	1	-	-	5
EF(0)3	2	4	1	-	-	7
EF(0)4	-	1	-	-	-	1
Total	**4**	**7**	**2**	**0**	**0**	**13**
EF(180)1	-	1	-	-	-	1
EF(180)2	-	-	-	-	-	0
EF(180)3	-	1	2	-	-	3
EF(180)4	2	-	-	-	-	2
Total	**2**	**2**	**2**	**-**	**-**	**6**
CF 1	3	1	-	-	-	4
CF 2	3	8	2	-	-	13
CF 3	-	1	-	-	-	1
CF 4	-	-	-	-	-	0
Total	**6**	**10**	**2**	**0**	**0**	**18**

* **chrb:** quebra cromossômica
chtb: quebra cromatídica
ace: fragmento acêntrico
dic: cromossomo dicêntrico
qr: figura quadrirradial

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

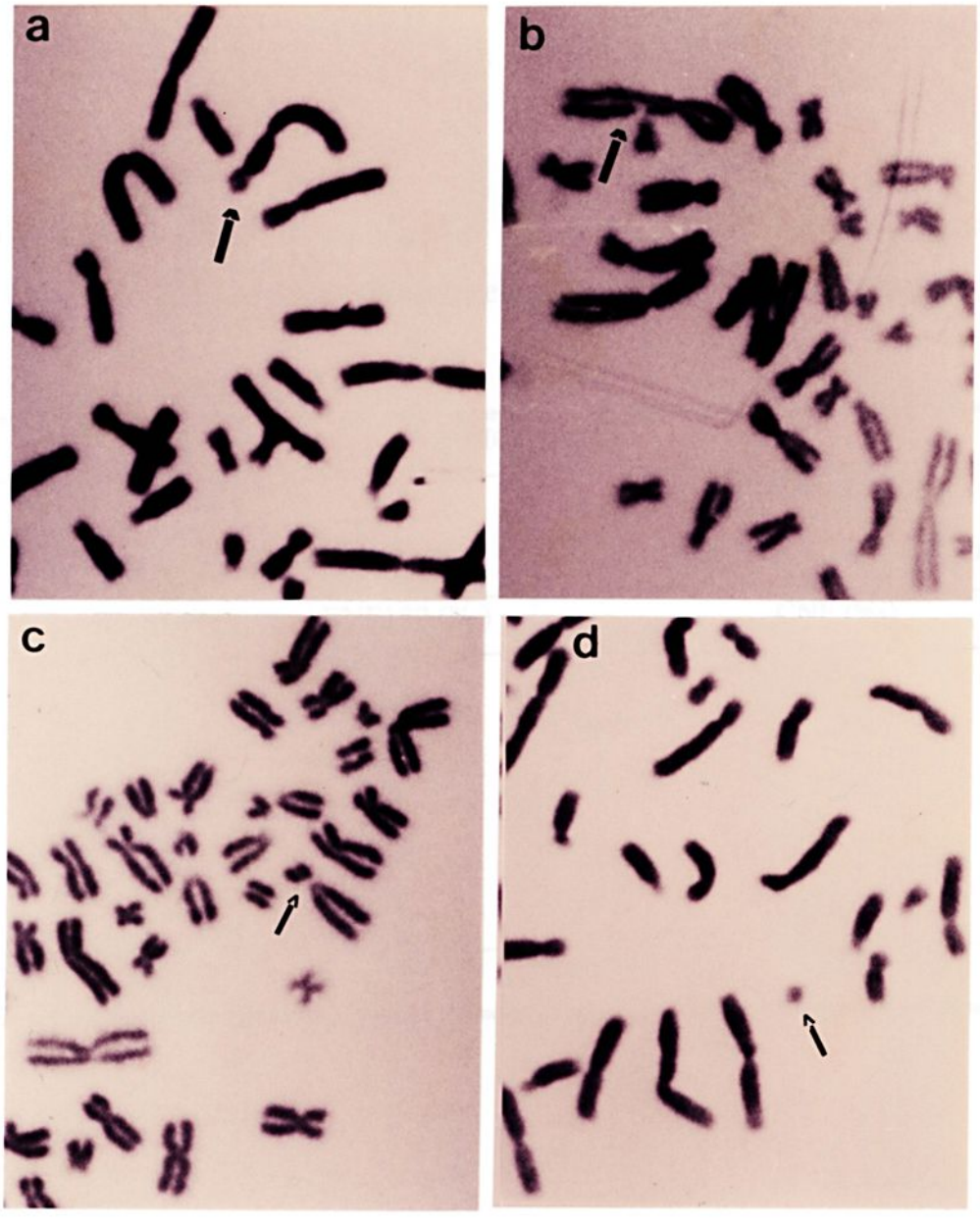


Figura 5 - Fotomicrografias de metáfases parciais evidenciando alguns tipos de alterações cromossômicas estruturais encontradas em linfócitos dos indivíduos estudados: quebra cromatídica (a, b); quebra cromossômica (c); cromossomo acêntrico (d).

Tabela 8 – Valores do índice mitótico para a amostra não-fumante exposta à TRH (ENF) com 0 e 180 dias de tratamento e da amostra não-fumante controle (CNF).

AMOSTRAS				
EXPOSTAS (n° metáfases/2000 linfoblastos)			**CONTROLES** (n° metáfases/2000 linfoblastos)	
	ENF0 (‰)	ENF180 (‰)		CNF (‰)
ENF1	15,0	2,0	CNF1	17,0
ENF2	39,0	2,0	CNF2	8,5
ENF3	21,5	1,5	CNF3	27,5
ENF4	6,5	4,0	CNF4	20,5
ENF5	22,5	10,0	CNF5	44,0
Média	**20,9**	**3,9**	**Média**	**23,5**

Tabela 9 – Valores do índice mitótico para a amostra fumante exposta à TRH (EF) com 0 e 180 dias de tratamento e da amostra fumante controle (CF).

AMOSTRAS				
EXPOSTAS (n° metáfases/2000 linfoblastos)			**CONTROLES** (n° metáfases/2000 linfoblastos)	
	EF0 (‰)	EF180 (‰)		CF (‰)
EF1	0,5	1,5	CF1	0,5
EF2	6,0	0	CF2	11,0
EF3	16,0	3,5	CF3	2,0
EF4	1,5	5,5	CF4	9,0
Média	**6,0**	**2,6**	**Média**	**5,6**

Tabela 10 – Estatísticas descritivas para o índice mitótico da amostra não-fumante exposta à TRH (ENF) com 0 e 180 dias de tratamento e da amostra não-fumante controle (CNF)

Amostra	N	$\bar{X}$	Md	DP	Min	Max	Q1	Q3
ENF0	5	20,90	21,50	11,97	6,50	39,00	10,75	30,75
ENF180	5	3,90	2,00	3,54	1,50	10,00	1,75	7,00
CNF	5	23,50	20,50	13,35	8,50	44,00	12,75	35,75

N - nº de indivíduos
$\bar{X}$ – média
Md – mediana
DP – desvio padrão
Min - nº mínino
Max - nº máximo
Q1 - 1º quartil
Q3 - 3º quartil

Tabela 11 – Estatísticas descritivas para o índice mitótico da amostra fumante exposta à TRH (EF) com 0 e 180 dias de tratamento e da amostra não fumante controle (CF)

Amostra	N	$\bar{X}$	Md	DP	Min	Max	Q1	Q3
EF0	4	6,00	3,75	7,08	0,50	16,00	0,75	13,50
EF180	4	2,62	2,50	2,39	0,00	5,50	0,38	5,00
CF	4	5,63	5,50	5,15	0,50	11,00	0,87	10,50

N - nº de indivíduos
$\bar{X}$ – média
Md – mediana
DP – desvio padrão
Min - nº mínino
Max - nº máximo
Q1 - 1º quartil
Q3 - 3º quartil

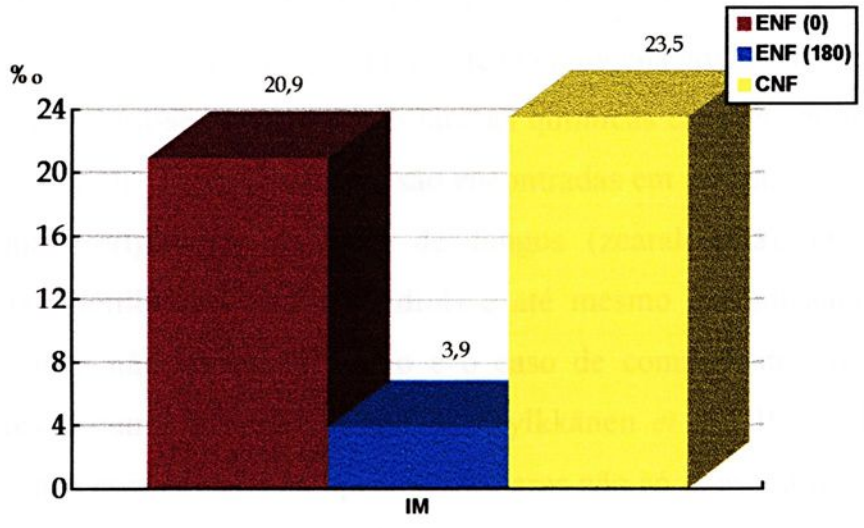


Figura 6 - Valor médio do índice mitótico da amostra não-fumante exposta à TRH (ENF) com 0 e 180 dias de tratamento e da amostra não-fumante controle (CNF).

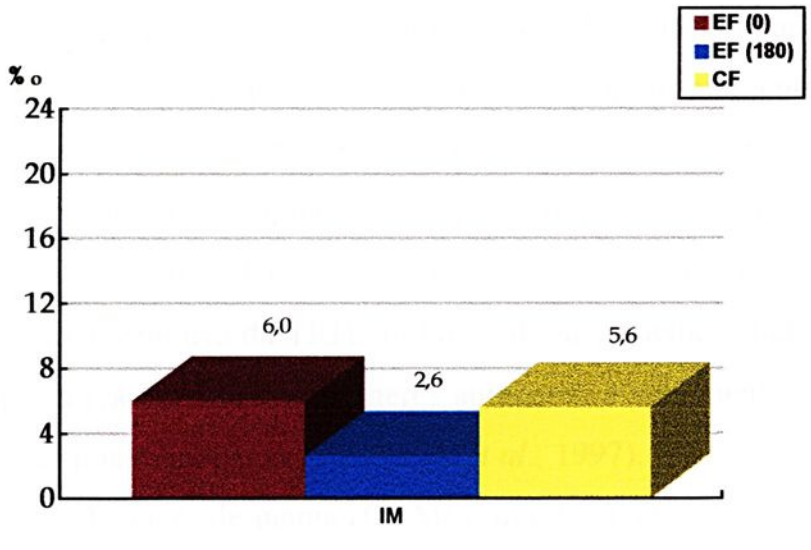


Figura 7 - Valor médio do índice mitótico da amostra fumante exposta à TRH (EF) com 0 e 180 dias de tratamento e da amostra fumante controle (CF).

V – Discussão

1- Os estrógenos como fonte de risco para o homem

Atualmente, além da exposição endógena aos hormônios estrogênicos, o homem encontra-se exposto a substâncias químicas capazes de mimetizar a ação desses hormônios. Tais substâncias são encontradas em plantas (coumestrol, equol), em produtos originários da ação de fungos (zearalenona), em medicamentos hormonais (dietilbestrol, etinilestradiol) e até mesmo em substâncias preparadas com propósito não hormonal, como é o caso de componentes de inseticidas, de detergentes e outros produtos químicos (Pylkkänen *et al.*, 1991). Desse modo, a exposição aos estrógenos e compostos similares não só ocorre através de exposição endógena e terapêutica, como também por meio da alimentação. Essa última pode se dar através do consumo de zearalenonas em alimentos de grãos contaminados por fungos, através de frutas e verduras contaminadas por águas contendo esses compostos e também pelo consumo de carnes, uma vez que sabe-se que de forma clandestina, estrógenos esteroidais e não esteroidais são usados no gado como promotores de crescimento.

Apesar dos estrógenos serem imprescindíveis para a vida, dados epidemiológicos mostram um aumento no risco de cânceres hormônio-dependentes em mulheres expostas a drogas estrogênicas em algum momento da vida (Mills *et al.*,1989; Risch e Howe, 1994; Steinberg *et al.*, 1994; Colditz *et al.*, 1995; Garg *et al.*, 1998), sugerindo, portanto, a participação do hormônio no processo carcinogênico. O fato é bastante preocupante, pois cada vez mais mulheres pós-menopáusicas fazem uso da TRH em busca de uma melhor qualidade de vida, visto que a expectativa de vida das mulheres aumentou e atualmente, elas passam 1/3 de suas vidas na pós-menopausa (Hempling *et al.*, 1997).

O câncer de mama (CAM) é um dos mais importantes entre mulheres nos EUA e responsável por 30% dos novos casos de cânceres (Yu *et al.*, 1998). Estudos epidemiológicos mostram que a incidência de CAM aumenta rapidamente dos 20 anos até a menopausa e que a partir desse evento a taxa é significantemente mais lenta. Modelos biomatemáticos de incidência de CAM indicam que os riscos

crescem mais rapidamente da menarca ao primeiro parto, a multiparidade reduz o risco e a menopausa precoce também (Colditz, 1997). A ooforectomia bilateral aos 35 anos reduz em média 70% o risco de CAM (Pike e Spicer, 1993), sustentando, desse modo, que caminhos hormonais intermediam os fatores de risco para CAM.

Existe uma relação positiva entre duração do uso da TRH e risco de CAM. Pesquisadores da Universidade de Oxford reuniram mais de 52.000 mulheres diagnosticadas com CAM e mais de 100.000 mulheres sem a doença, e puderam observar que para cada ano de uso de hormônio, o risco de CAM aumenta 2,3%. (COLLABORATIVE GROUP, 1997). Segundo Colditz *et al.* (1995) o uso de estrógeno por mais de 5 anos aumenta de 40 a 50% o risco de CAM, e em mulheres com mais de 60 anos esse risco é semelhante em magnitude a uma história familial de CAM.

No entanto, há vários pontos desfavoráveis com relação a estudos observacionais. A duração do tratamento é muito variável de estudo para estudo: em alguns as mulheres são submetidas à terapia de curta duração para controle de sintomas vasomotores e genitourinário, em outros o tratamento é mantido durante longo tempo para que as mulheres usufruam dos benefícios cardiovasculares e protetores da osteoporose. Além disso, as preparações estrogênicas e as doses são muito díspares, o que torna os resultados bastante imprecisos (Campos *et al.*, 1997).

O levantamento de estudos epidemiológicos correlacionando estrógeno e CAM mostra que a maioria dos resultados não relaciona a exposição ao estrógeno e aumento no risco de CAM e quando há essa relação, o aumento no risco é muito pequeno (Newcomb *et al.*, 1995; Campos *et al.*, 1997; Zumoff, 1998). É possível que o metabolismo dos estrógenos conjugados, mais freqüentemente usados como medicamento na TRH, e utilizados neste estudo, seja diferente daquele dos estrógenos sintéticos, uma vez que estudos que mostram uma associação positiva entre o uso de estrógeno a longo tempo (15 anos ou mais) e CAM, tendem a incluir mulheres pré e peri-menopáusicas e usuárias de estrógenos de altas doses ou de formulações diferentes (Newcomb *et al.*, 1995). Confirmando essa idéia, Steinberg *et* al. (1991) em uma meta-análise, só encontraram aumento significante



no risco de CAM em 3 estudos europeus, após 15 anos de exposição a hormônios sintéticos.

Além do mais, na grande maioria dos estudos que detectou relação positiva entre o uso de TRH e aumento no risco de CAM, as diferenças entre os grupos exposto e controle nunca atingiram significância estatística e em quase todos os estudos não se observou um acréscimo no risco superior a 10%. Adicionalmente, alguns pesquisadores não registraram aumento no risco de CAM após a exposição de mulheres pós-menopáusicas aos estrógenos (Buring *et al.*, 1987; Wingo *et al.*, 1987; Kaufman *et al.*, 1991; Stanford *et al.*, 1995).

A incidência aumentada de câncer de ovário em mulheres sob TRH é menos citada na literatura do que o CAM, no entanto, a relação entre estrógeno e câncer de ovário é bem semelhante à encontrada entre estrógeno e CAM. Assim sendo, apesar de alguns estudos mostrarem aumento no risco de câncer de ovário em mulheres sob TRH (Polychronopoulou *et al.*, 1993; Rodriguez *et al.*,1995; Risch, 1996), a maioria não observou tal relação (Hildreth *et al.*, 1981; Hartge *et al.*,1988; Kaufman *et al.*, 1989; Whittemore *et al.*, 1992; Hempling *et al.*, 1997). Além do mais, a estreita relação estabelecida sempre ocorre após 10 anos ou mais de tratamento. Uma das hipóteses com relação ao câncer de ovário induzido pelo estrógeno é a ação direta do hormônio sobre seus receptores, que são encontrados tanto em tecidos ovarianos malignos quanto em tecidos normais (Vierikko *et al.*, 1983). Essa teoria é sustentada pela descoberta de que linhagens de células humanas de câncer de ovário proliferam *in vitro* após exposição ao estrógeno (Chien *et al.*, 1994).

Adicionalmente, outros fatores devem ser considerados, como os de que mulheres sob TRH têm habitualmente um maior número de consultas médicas do que o restante da população, o que pode levar a uma maior detecção do câncer; o fato da TRH ser predominantemente utilizada por estratos sócio-econômicos mais elevados e de raça caucasóide, onde a incidência de CAM é maior; e ainda que a maioria dos estudos é baseada em entrevistas domiciliares, apelando à memória das participantes com relação à terapêutica empregada e, portanto, não se pode excluir a

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

hipótese de esquecimento. Esses viéses de memória podem desfavorecer a TRH, na medida em que as mulheres com câncer estarão mais predispostas a recordar o uso prévio de fármacos que possam julgar relacionados com a doença (Campos *et al.*, 1997).

Por outro lado, podemos considerar que o longo tempo de exposição necessário para o desenvolvimento da malignidade pode refletir o mecanismo biológico que o estrógeno necessita para promover o câncer, ou ainda, que os médicos prescrevem a THR primariamente a mulheres com baixo risco de cânceres hormônio-dependentes, as quais só desenvolvem a doença após muitos anos de terapia.

2 – Aberrações cromossômicas como biomarcador na detecção de populações expostas

Estando o homem cada vez mais exposto a um grande número de compostos químicos com capacidade de lesar o material genético, vários estudos vêm sendo realizados com o propósito de identificar tais compostos e conseqüentemente, impedir danos futuros às populações, uma vez que já está bem estabelecido que o câncer origina-se de alterações no material genético.

Desse modo, um dos testes empregados para a detecção da ação genotóxica dos estrógenos é o teste de mutação gênica reversa realizado com *Salmonella typhimurium* denominado teste de Ames. Esse teste é confirmador da atividade mutagênica, sendo freqüentemente considerado como padrão com o qual são comparados outros testes. Muitas drogas estrogênicas, como o etinilestradiol, ciclotriol, ciclodiol entre outras, não mostraram ação mutagênica nesse tipo de teste, tanto com ativação quanto sem ativação metabólica (Lang e Reimann, 1993; Dhillon *et al.*, 1994; Hundal *et al.*, 1997).

As aberrações cromossômicas (AC) também são utilizadas e têm se mostrado um dos biomarcadores mais eficiente na detecção de alterações no DNA decorrentes da ação de compostos químicos. Tais alterações foram associadas com malignidades desde o início do século e atualmente existe a clara associação entre

alterações cromossômicas e câncer, uma vez que quase todas células tumorais apresentam alterações cromossômicas estruturais e/ou numéricas; adicionalmente, alterações cromossômicas são encontradas freqüentemente em fetos abortados, defeitos congênitos e casos de infertilidade (Au, 1991; Legator e Au, 1994; Tucker e Preston, 1996).

O aumento na freqüência de AC pode indicar exposição a um agente genotóxico, fator que aumenta o risco de câncer e doenças genéticas (Carrano e Natarajan, 1988). Várias doenças humanas hereditárias (ataxia telangectasia, anemia de Fanconi e síndrome de Bloom) são associadas com o aumento da freqüência de AC e aumento na incidência de câncer. As populações expostas à radiação ionizante ou substâncias químicas genotóxicas têm uma freqüência aumentada de AC em seus linfócitos.

As lesões cromossômicas instáveis, como fragmentos acêntricos, cromossomos dicêntricos e em anel são rearranjos que, em geral, conduzem à morte celular. Evidências indicam que as células mortas estimulam a divisão de novas células, o que permite o aparecimento de células cancerígenas quiescentes (Au, 1991). Por outro lado, as alterações estáveis, como as translocação balanceada, as inversões e outros rearranjos simétricos, podem ser transmitidas à outra geração de celulas . Tais rearranjos, devido à justaposição dos genes, podem levar à expressão anormal dos mesmos (Carrano e Natarajan, 1988) e ativar protoncogenes (Sorsa *et al.*, 1990).

As quebras cromatídicas consistem na alteração cromossômica mais freqüentemente observada em estudos de mutagênese através da metodologia citogenética. Sua origem deve-se a quebras na cadeia simples de DNA antes de uma fase de duplicação ou na dupla hélice, após a duplicação. As quebras cromossômicas são oriundas de quebras na dupla hélice, após uma passagem pela fase S e podem gerar cromossomos dicêntricos, acêntricos e em anel (Bender *et al.*, 1988). A maioria dos compostos químicos induz quebras na fita simples do DNA, constituindo-se em agentes S-dependentes, pois os danos só podem ser visualizados

após uma passagem pela fase S, onde os danos não reparados são convertidos em lesões cromatídicas (Natarajan, 1993).

O efeito clastogênico dos estrógenos foi observado por alguns autores em células de culturas expostas a drogas estrogênicas. Dzhangulashvili (1982), Dhillon *et al.* (1994), Hundal *et al.* (1997) observaram um aumento de AC e de trocas entre cromátides-irmãs (TCI) em culturas de linfócitos periféricos humanos expostos a dietilbestrol, etinilestradiol, ciclotriol, ciclodiol e outros. As células de ovário de hamster Chinês, quando expostas a etinilestradiol, 17 β-estradiol, estrona e estriol, também mostraram um aumento de AC e de TCI, que foi proporcional ao aumento na concentração de tais substâncias (Kochhar, 1985). Corroborando com esses resultados Dhillon *et al.* (1994), testando o mestranol, uma droga estrogênica amplamente difundida, em células de medula de camundongo puderam observar um aumento na freqüência de AC, de TCI e de micronúcleos.

No entanto, apesar desses resultados aliados aos de Yu *et al.* (1998) de que estrógenos como o 17 β-estradiol e a estrona, após sofrerem ativação, foram capazes de se ligar ao DNA, Reimam *et al.* (1996), testando o potencial clastogênico de vários esteróides sexuais usados como medicamentos, não registraram um aumento de AC em linfócitos humanos, com ou sem ativação metabólica. As mesmas drogas foram testadas em células de medula de camundongo através do teste de micronúcleo e a maioria falhou em aumentar a freqüência de micronúcleo, tanto em fêmeas quanto em machos de camundongos. Os esteróides foram testados acima dos níveis conhecidos para induzir toxicidade em animais experimentais, e no caso dos compostos não tóxicos os animais foram tratados com a dosagem acima do máximo recomendado, sendo de 2 g/Kg de peso corpóreo. Esses resultados foram confirmados em diferentes estudos por outros pesquisadores. Dentre eles temos, Banduhn e Obe (1985) que não registraram aumento de AC estruturais em linfócitos periféricos humanos expostos ao dietilbestrol e estradiol. Tsutsui *et al.* (1987) trabalhando com células embrionárias de hamster Sírio expostas ao 17 β-estradiol não encontraram aumento na freqüência de AC e de TCI. Danos cromossômicos também não foram observados em células

renais de hamster expostos durante 5 meses a estrógenos como o 17 α-estradiol e β-dienestrol (Banerjee *et al.*, 1994). Entretanto, vários estudos experimentais ilustram a complexidade das respostas biológicas associadas com a exposição crônica a baixas doses de agentes potencialmente perigosos. Segundo Legator (1995), os cientistas ao se concentrarem em pesquisas que utilizam altas doses de compostos químicos ignoram mudanças metabólicas perigosas que ocorrem na presença de baixas doses desses compostos. Adicionalmente, doses não tóxicas de agentes aparentemente inócuos podem aumentar o efeito genotóxico de carcinógenos conhecidos (Au, 1991). Além do mais, muitos compostos químicos não são classificados como clastogênicos em testes citogenéticos convencionais, sendo necessário a utilização de testes mais acurados para a detecção do efeito do agente sobre o material genético.

O presente trabalho apresenta dados de um estudo *in vivo*, onde os indivíduos amostrados sofreram exposição terapêutica aos estrógenos conjugados (Premarin). No entanto, não se observou aumento na freqüência de AC nas células de mulheres pós-menopáusicas expostas 180 dias aos hormônios estrogênicos, tanto na amostra não-fumante, quanto na amostra fumante. Um evento bastante importante detectado neste estudo, foi a redução do IM observado nas células de mulheres não-fumantes e fumantes, expostas aos hormônios estrogênicos. Em estudos realizados por Hill e Wolff (1983), linfócitos do sangue periférico expostos ao estradiol e ao DES registraram um atraso da cinética celular decorrente de uma extensão da fase G2. Segundo os autores, as células podem ser bloqueadas em G2 quando ocorrem danos no material genético. Da mesma forma, o 17 β-estradiol foi responsável pela inibição significante da proliferação celular em uma linhagem de células leucêmicas humana, sendo a inibição decorrente de um bloqueio em G2 (Mossuz *et al.*, 1998). O bloqueio em G2 é a principal resposta da célula à danos ao DNA; parece que o bloqueio tem função protetora, e ocorre para que a célula possa reparar seu material genético (Bunz *et al.*, 1998; Theron e Bohm, 1998). Uma variedade de agentes genotóxicos promove um atraso na progressão do ciclo celular (Kaufmann e Kaufmann, 1993). Ao observar-se as Tabelas 2 e 3 (AC) e as Tabelas

8 e 9 (IM), pode-se notar uma relação positiva entre a diminuição do número de AC e os valores do IM, tanto na amostra não-fumante quanto na amostra fumante. Desse modo, pode ter havido uma seleção diferencial, ou seja, analisou-se, no grupo exposto, somente células normais ou com poucas alterações, já que as células contendo lesões maiores estariam atrasadas em sua divisão, para que pudessem ser reparadas, o que explicaria o menor número de alterações encontradas nas amostras não-fumantes e fumantes, após a exposição aos estrógenos.

Deve-se salientar ainda, que o tempo de exposição ao qual as mulheres foram submetidas foi curto, e que se se pudesse avaliar essas mesmas mulheres alguns anos após o início do tratamento, poder-se-ia obter resultados diferentes, uma vez que encontra-se estabelecido que os benefícios da TRH só são adquiridos com o uso contínuo e prolongado. Além do mais, a associação entre exposição aos estrógenos e cânceres hormônio-dependentes geralmente ocorrem após 10 anos ou mais.

Um outro fato a ser considerado, é que o risco conhecido em uma população exposta pode ser usado como um guia geral na extrapolação do risco para outra população similarmente exposta, mas pode ser um erro assumir que os riscos para populações com diferentes exposições sejam idênticos, porque existem muitos fatores que podem alterar o resultado. Um deles, é a coexistência de agentes de uma segunda exposição que aumentam ou reduzem o efeito dos primeiros agentes; outro é a composição étnica da população. Diferenças genéticas na metabolização de compostos químicos deveriam ser avaliadas quando da estimativa de tal risco. Os fatores genéticos não agem isoladamente de outras variáveis biológicas, tais como imunológicas, bioquímicas, nutricionais, étnicas e ambientais, incluindo nessa última, a intensidade da exposição e o estresse (Ong *et al.*, 1993). Adicionalmente, subpopulações de linfócitos diferem na sua capacidade de reparo (Reitz *et al.*, 1992). Portanto, não só diferentes populações com diferentes etnias, como também indivíduos de uma mesma população, podem ter diferentes respostas, ainda que expostos a agentes muito parecidos.



O esquema encontrado na Figura 2 mostra que estrógenos como o estradiol e a estrona, após sofrerem ativação dão origem aos metabólitos 16 α-hidroxiestrona e 2 α-hidroxiestrona; a 16 α-hidroxiestrona é capaz de se ligar tanto a receptores estrogênicos como ao DNA e proteínas, e a 2 α-hidroxiestrona pode produzir metabólitos com a mesma capacidade. Em adição, esses metabólitos podem originar radicais livres promotores de danos oxidativos. Todavia, de modo alternativo, o caminho da inativação metabólica também pode ser seguido, e assim, não haver atividade estrogênica (Yager e Liehr, 1996). Desse modo, se se consider a variabilidade genética, pode-se supor que as mulheres participantes deste estudo apresentam genótipos favoráveis à inativação metabólica dos estrógenos e, portanto, estão menos expostas a ação genotóxica dos hormônios estrogênicos, este fato, justificaria a ausência da freqüência aumentada de AC nas mulheres pós-menopáusicas expostas aos estrógenos. Seguindo a mesma linha de raciocínio, estudos realizados por Schneider *et al.* (1982) observaram um aumento da reação de 16 α-hidroxilação em mulheres com CAM. Da mesma forma, Bradlow *et al.* (1986) registraram um aumento da reação da 16 α-hidroxilação em mulheres com história familial de CAM. Levando-se em conta essas observações, Zumoff (1998) propõe que o aumento na capacidade da 16 α-hidroxilação pode ser um marcador útil na detecção do aumento da suscetibilidade genética ao CAM e também seria um ponto de ataque para terapia, uma vez que Bradlow *et al.* (1991) mostraram um decréscimo farmacológico da 16 α-hidroxilação em camundongos.

Estudos realizados com animais têm demonstrado que os estrógenos podem induzir ou aumentar a carcinogenicidade em muitos órgãos de roedores, incluindo glândula mamária (Li e Li, 1990; Nandi *et al.*, 1995), útero (Newbold *et al.*, 1990), pituitária (Walker e Kurth, 1993), próstata (Leav *et al.*, 1989), cérvix uterino (Jones e Pacillas-Verjan, 1980), testículo (Huseby, 1980) e fígado (Coe *et al.*, 1990). Entretanto, deve-se ressaltar que esses resultados são obtidos, geralmente, após a exposição dos animais a altas doses de estrógenos sintéticos, algo que não condiz com a exposição terapêutica humana, uma vez que mulheres pós-menopáusicas sob TRH, na maioria das vezes, estão expostas a pequenas doses

de hormônios naturais, como é o caso deste estudo. Um fato que contribui para ausência de alterações no DNA das mulheres aqui estudadas, pode ser a forma de administração do hormônio adotada, já que houve uma suspensão do medicamento durante os finais de semanas, havendo, dessa forma, uma pausa na medicação durante 2 dias a cada semana.

Uma outra explicação com relação à ausência de genotoxicidade dos hormônios estrogênicos é a de que esses podem agir na carcinogênese não como iniciadores e sim como promotores, aumentando a proliferação celular que é essencial para o processo carcinogênico, pois tal evento aumenta o risco de erros genéticos no DNA, podendo ativar oncogenes por mutação, translocação ou amplificação (Preston *et al.*, 1990). Os mecanismos celulares e moleculares pelos quais os eventos neoplásicos induzidos pelos estrógenos ocorrem, ainda não foram totalmente elucidados, mas existe uma forte evidência de que os estrógenos são carcinógenos epigenéticos, que agem através do mecanismo de promoção aumentando a proliferação celular, mediado pelos receptores de estrógenos (Tsutsui e Barret, 1997). Os estrógenos aumentam o processo mitótico por desencadearem uma série de eventos chamados de "cascata mitótica", que consequentemente aumenta a divisão celular (Lupulescu, 1995).

O principal efeito do estrógeno é sua ação direta sobre as células cancerígenas, uma vez que o hormônio afeta a síntese de DNA e expressão gênica através de receptores intracelulares específicos. As moléculas de estrógenos ligam-se a receptores nucleares formando um complexo receptor-estrógeno, tal complexo liga-se ao DNA promovendo a síntese de RNAm (transcrição), que estimula a síntese de proteínas (tradução) e consequentemente desencadeia a resposta hormonal na célula (Figura 8). Uma droga anti-estrogênica, como o tamoxifen, exerce sua ação por competir com os ligantes naturais dos receptores e assim bloqueia a formação do complexo receptor-estrógeno (Lupulescu, 1995).

Experimentos realizados por Lupulescu (1980), utilizando a técnica de marcação de DNA com timidina radioativa, demostraram um aumento significante na síntese de DNA em células pré-neoplásicas e neoplásicas da epiderme de ratos e

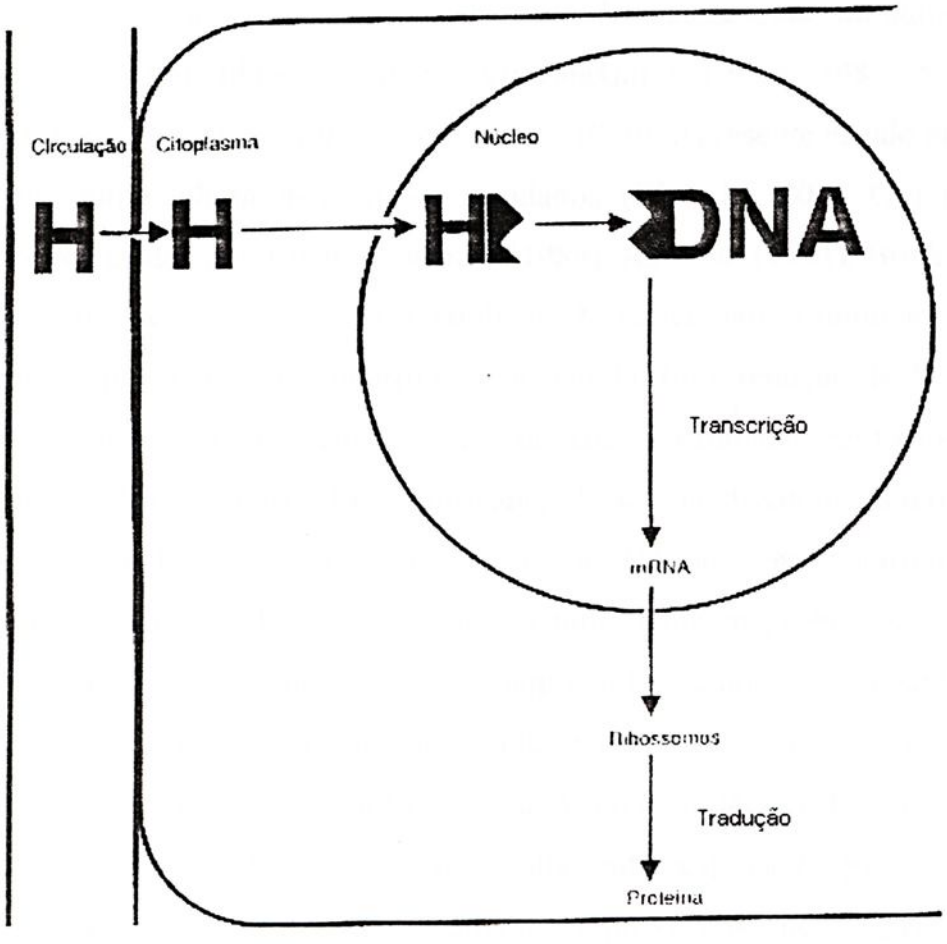


Figura 8 - Mecanismo de ação dos hormônios esteróides. (Adaptado de Speroff *et al.*, 1995)

Inst. de Biociências, Letras e Ciências Exatas - UNESP
BIBLIOTECA
S. J. Rio Preto

camundongos após a administração do estrógeno. O hormônio também altera o *pool* de células quiescentes fazendo com que elas saiam do estado G0 e entrem na fase G1 e S, retomando o ciclo celular e comportando-se como células cancerígenas (Lupulescu, 1995). Adicionalmente, os estrógenos estimulam a síntese de enzimas, tais como os ativadores de plasminogênios e catepsina D, que podem degradar a matriz extracelular e, portanto, acelerar a invasão do tumor e a formação de metástases (Rochefort *et al.*, 1987).

Quanto ao cigarro, apesar de estudos registrarem um aumento de AC em células de indivíduos fumantes (Vijayalaxmi e Evans, 1982; Nakayama *et al.*,1985; Kao-Shan *et al.*, 1987; Sinues *et al.*, 1990), o presente estudo não registrou tal evento em nenhum dos grupos estudados (EF0, EF180 e CF) no entanto, trabalhos realizados por Tawn e Cartmell (1989), Au *et al.* (1991), Brinkworth *et al.* (1992) e Van Diemen *et al.* (1995), também não relacionam o fumo ao aumento de AC. Um evento interessante ocorrido neste estudo, foi a redução de AC observada na amostra fumante quando comparada a amostra não-fumante em todos os grupos, entretanto, a diferença não foi significante. Como já discutido anteriormente, a hipótese levantada com relação a redução do IM pode ter contribuído para a obtenção desses resultados, uma vez que o fumo também promoveu uma redução significante do IM, fato que pode ser comprovado quando se compara a amostra fumante com a amostra não-fumante, antes da exposição aos estrógenos. Desse modo, sugere-se que o cigarro promoveu danos no material genético que resultaram no atraso da divisão celular. Além disso, uma outra explicação para os resultados obtidos, pode ser o fato de que as alterações provocadas pelo cigarro são mais precisamente detectadas quando se utiliza testes moleculares mais acurados, como os que empregam a técnica de hibridização *in situ* fluorescente (FISH), com capacidade de rastrear o DNA de forma mais precisa, como demonstrada por Conforti-Froes *et al.* (1997).

A ausência de genotoxicidade dos compostos em questão, pode também ser atribuída ao polimorfismo genético existente entre as enzimas que são responsáveis pelo metabolismo de compostos químicos. Tem sido relatado que

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

indivíduos que apresentam versões hereditárias desfavoráveis de genes polimorficos, tais como *CYP2D6* e *CYP2E1* para a ativação e *GSTM1* e *GSTT1* para a destoxificação de compostos químicos têm respostas farmacológicas anormais (Guengerich *et al.*, 1991; Daly *et al.*, 1993). Além do mais, têm-se associado o desenvolvimento de uma variedade de cânceres com indivíduos possuidores dos genótipos desfavoráveis para os genes do biometabolismo (Kadlubar *et al.*, 1992; Hirvonen *et al.*, 1995; Bell *et al.*, 1995; Bartsch e Hietanen, 1996).

Estudos realizados por Conforti-Froes *et al.* (1997) mostraram uma freqüência aumentada de AC em indivíduos fumantes com genótipos desfavoráveis para os genes *GSTM1* e *GSTT1*. Esses genes são responsáveis pela destoxificação de compostos químicos, como o benzo(a)pireno, presente na fumaça do cigarro e referido como agente causal de mutações no gene *TP53*. Adicionalmente, El-Zein *et al.* (1997) observaram alterações desfavoráveis nos *CYPs* em indivíduos fumantes que apresentavam maior número de alterações no seu material genético decorrentes do tabagismo. Essas alterações levam a uma super-expressão do gene, desse modo, esses estudos nos mostram que variações genotípicas podem ser responsáveis por respostas diferentes entre indivíduos expostos aos carcinógenos do tabaco.

O presente estudo não registrou um efeito sinergístico entre o cigarro e os estrógenos, tal fato pode ser observado pela ausência de um aumento na freqüência de AC quando se compara as amostras não-fumante e fumante, após 180 dias de exposição aos hormônios estrogênicos.

Um fato considerável é que o cigarro está relacionado com um importante efeito anti-estrogênico. Key *et al.* (1996) observaram uma redução na eliminação do estriol na urina de mulheres pós-menopáusicas fumantes comparada a de não fumantes. Michnovicz *et al.* (1986) mostraram que o cigarro induz um marcante aumento da 2-hidroxilação em mulheres. Esse caminho metabólico irreversível produz 2-hidroxiestrona (Figura 2), um metabólito que possui uma atividade estrogênica mínima e é eliminado rapidamente da circulação. Resultado semelhante foi obtido pelos mesmos pesquisadores dois anos depois, onde pode ser observado um aumento da 2-hidroxiestrona na urina, bem como um decréscimo do

estradiol (Michnovicz *et al.*, 1988). Esses dados indicam que o aumento da 2-hidroxilação do estradiol induzido pelo cigarro diminui a formação de 16 α-hidroxiestrona, um metabólito altamente estrogênico. Dessa forma, as mulheres fumantes podem estar menos expostas à ação genotóxica da 16 α-hidroxiestrona. Somados à essas informações, observa-se também uma redução de câncer de endométrio em mulheres fumantes (Dahlgren *et al.*, 1991; Austin *et al.*, 1993; Brinton *et al.*, 1993), bem como uma redução de doença benigna da mama, a antecipação da menopausa e um aumento da osteoporose (Berkowitz, 1985; Baron *et al.*, 1990). Confirmando o papel anti-estrogênico do cigarro, Kiel *et al.* (1992) demostraram ausência de proteção quanto às fraturas ósseas em mulheres fumantes expostas aos estrógenos e Cornuz *et al.* (1999) observaram um aumento no risco de fraturas ósseas em mulheres fumantes, sendo esse risco proporcional ao consumo do cigarro. Adicionalmente, as globinas carregadoras de hormônios sexuais (SHBG, *sex hormone binding globulin*) foram encontradas em níveis mais elevados no plasma de mulheres fumantes (Daniel *et al.*, 1992). Quanto maior a quantidade de SHBG no plasma, uma menor quantidade de moléculas de hormônio está disponível para desempenhar suas funções, o que possibilitaria uma menor exposição das mulheres fumantes aos hormônios.

Com o advento de novas técnicas moleculares e com a descoberta de genes polimórficos envolvidos no processo de metabolização, sabe-se que a variabilidade genética tem um peso considerável no desenvolvimento do câncer e que um indivíduo exposto a um determinado composto químico genotóxico sofrerá uma maior ou menor consequência do mesmo dependendo do seu genótipo.

3 – Cinética Celular

Houve uma drástica redução do índice mitótico (IM) nas culturas de linfócitos de mulheres não-fumantes sob TRH por 180 dias. A diferença foi estatisticamente significante quando se comparou os valores obtidos antes do início do tratamento com aqueles obtidos 180 dias após. Na prática, essa redução pode ser

observada por um maior número de lâminas analisadas por indivíduo, para que se pudesse obter as 200 metáfases propostas.

A redução do IM também foi registrada por Dhillon *et al.* (1995) expondo culturas de linfócitos humanos ao hormônio esteroidal sintético fluoximesterona, observando-se no mesmo estudo um atraso do ciclo celular. Chrisman e Lasley (1975) relataram redução do IM em linfócitos bovinos após exposição ao dietilbestrol. Adicionalmente, Hill e Wolff (1983) expondo linfócitos do sangue periférico, estimulados com fitoemaglutinina, ao estradiol registraram um atraso do ciclo celular; sendo esse atraso decorrente de uma extensão da fase G2. A inibição significante da proliferação também foi observada pelos pesquisadores, tanto em linfócitos de homens quanto de mulheres grávidas expostas ao dietilbestrol. Da mesma forma, a supressão do IM de linfócitos periféricos de mulheres cultivados na presença de várias concentrações de estradiol foi observada por Herrera *et al.* (1992).

Estudos *in vitro* mostram que os estrógenos inibem a incorporação de timidina radioativa em linfócitos do sangue periférico estimulados com fitoemaglutinina (Mendelson *et al.*, 1977; Wyle e Kend, 1977). Adicionalmente, o estradiol foi capaz de inibir a síntese de proteína e DNA em fibroblastos de camundongos, fato esse que pode resultar na inibição da proliferação celular (Hill e Wolff, 1983).

Embora em alguns estudos os estrógenos levem a um efeito bloqueador semelhante ao obtido pela colchicina, devido sua interação com o fuso mitótico, no trabalho realizado por Hill e Wolff (1983), os linfócitos humanos cultivados com dietilbestrol não sofreram bloqueio mitótico, uma vez que o IM nas culturas tratadas não foi maior do que nas culturas controles. Da mesma forma, este trabalho não registrou essa ação dos hormônios estrogênicos. Contudo, mesmo os estrógenos não se comportando como bloqueadores metafásicos neste e em outros estudos, eles parecem interagir com o fuso mitótico de alguma forma, pois Banduhn e Obe (1985) registraram freqüências aumentadas de metáfases poliplóides após contínuas exposições a altas doses de estrógenos como o dietilbestrol e estradiol.



Segundo Wheeler *et al.* (1986) os estrógenos são bloqueadores metafásicos, levam a divisões celulares anormais e aneuploidias. O dietilbestrol é tubulina-ativo, isto é, liga-se a essas proteínas impedindo a polimerização dos microtúbulos (Sharp e Parry, 1985). Tucker e Barrett (1986) observaram um decréscimo no número de fusos e de fibras dos microtúbulos citoplasmáticos de células embrionárias de hamster tratadas com dietilbestrol. As mudanças conformacionais e funcionais na organização dos microtúbulos podem levar a não disjunção cromossômica e indução de aneuploidia. Desse modo, as aneuploidias foram registradas por Tsutsui *et al.* (1983) e Tsutsui *et al.* (1987) em células embrionárias de hamster Sírio expostas a estrógenos como o dietilbestrol e 17 β-estradiol. Resultados semelhantes foram encontrados em células renais de hamster Sírio tratadas com os mesmos estrógenos (Banerjee *et al.*, 1994). Da mesma forma, os metabólitos do tipo quinona dos estrógenos também são capazes de se ligar covalentemente às regiões C-terminais das β-tubulinas e alterar a polimerização dos microtúbulos (Epe *et al.*, 1987). Portanto, uma das prováveis participações dos estrógenos na carcinogênese é a indução de aneuploudia, já que esse tipo de alteração está associada com uma variedade de tumores humanos.

Quanto à amostra fumante, apesar de ter ocorrido uma redução do IM após 180 dias de tratamento, a diferença não foi estatisticamente significante quando esses valores foram comparados aos obtidos antes do tratamento. Provavelmente, este resultado decorre do efeito anti-estrogênico do cigarro, como já discutido, uma vez que estas mulheres estão menos expostas aos estrógenos e, consequentemente, sofrem menos suas ações.

Podemos ainda observar que quando comparamos as amostras não-fumante e fumante encontramos uma redução estatisticamente significante do IM nos grupos fumantes, tanto comparando os grupos ENF0 e EF0 quanto os grupos CNF e CF. Todavia, resultados contraditórios são encontrados na literatura com relação à influência do cigarro sobre o IM. Segundo Husgafvel-Pursiainen (1987) e Rupa *et al.* (1989), o cigarro eleva o IM de linfócitos do sangue periférico de indivíduos fumantes quando camparados aos de não-fumantes. Contudo, o cigarro

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

não teve influência sobre o IM no estudo realizado por Ganguly (1993) trabalhando com linfócitos do sangue periférico, sendo este resultado corroborado por Homén *et al.* (1995).

Embora a literatura sobre a carcinogenicidade dos estrógenos mostre tanto um efeito genotóxico direto, que se observa através da formação de adutos de DNA, quanto um efeito genotóxico indireto, observado através da produção de radicais livres, este estudo não detectou um aumento de AC nas células de mulheres pós-menopáusicas expostas 180 dias aos hormônios estrogênicos, nem tampouco houve um efeito sinergístico entre os estrógenos e o cigarro. No entanto, os estrógenos interferiram no ciclo celular, uma vez que se obteve uma drástica redução do IM nas células de mulheres expostas aos hormônios. Com relação ao cigarro, apesar de já ter sido identificado aproximadamente 43 compostos carcinogênicos em sua composição, os resultados deste estudo não mostraram aumento de AC nas células de mulheres fumantes, todavia, a cinética do ciclo celular foi alterada pelo cigarro, pois houve uma redução significante do IM nas células de mulheres fumantes. Desse modo, estudos adicionais devem ser realizados, para que se possa entender a participação dos hormônios estrogênicos e dos componentes do cigarro no desenvolvimento do câncer, bem como esclarecer qual o significado da redução do IM verificada. Além disso, também são sugeridos testes mais acurados para a detecção de anomalias cromossômicas, como a metodologia de hibridização *in situ* fluorescente.



VI . Resumo

No decorrer da vida, a mulher passa por uma fase de transição entre o período reprodutor e o não reprodutor, fase essa denominada climatério. Durante o climatério a mulher sofre seu último ciclo menstrual (menopausa) e experimenta diversas alterações somáticas, endócrinas e psicológicas. O decréscimo dos hormônios estrogênicos, característico dessa fase, está associado ao risco aumentado de diversas doenças, tais como, arteriosclerose, infarto do miocárdio e derrame. Na tentativa de melhorar a qualidade de vida de mulheres pós-menopáusicas, hormônios exógenos são administrados. Apesar de se obter benefícios substancias a partir da terapia de reposição hormonal (TRH), estudos mostram um aumento na incidência de cânceres hormônios-dependentes em mulheres sujeitas a tal procedimento. Somando-se a isto, as mulheres podem ter suas taxas estrogênicas aumentadas através de substâncias encontradas na natureza, conhecidas como xenoestrógenos, e que mimetizam a ação dos hormônios. Os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, presentes na fumaça do cigarro, parecem atuar como xenoestrógenos. Adicionalmente, o cigarro possui carcinógenos que, quando ativados ligam-se covalentemente ao DNA formando adutos que podem interferir na transcrição, resultando em mutações que são responsáveis por 90% dos cânceres de pulmão, bem como 30% de outros tipos de cânceres. Desse modo, o presente estudo teve por objetivo a monitoração citogenética de mulheres pós-menopáusicas, fumantes e não-fumantes, expostas 180 dias aos hormônios estrogênicos, através dos parâmetros de freqüência de aberrações cromossômicas e de índice mitótico em linfócitos de sangue periférico, a fim de se detectar uma possível ação genotóxica dos estrógenos, bem como um efeito sinergístico dos mesmos com o tabaco, além da detecção da possível interferência dos compostos na cinética do ciclo celular.

Os hormônios estrogênicos e o cigarro não se mostraram genotóxico, nem tampouco houve um efeito sinergístico entre ambos. No entanto, tanto os estrógenos quanto o cigarro interferiram no ciclo celular, uma vez que se obteve uma drástica redução do índice mitótico nas células de mulheres fumantes e de

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

mulheres expostas aos hormônios. Desse modo, estudos adicionais devem ser realizados para que se possa entender a participação dos hormônios estrogênicos e dos componentes do cigarro no desenvolvimento do câncer, bem como esclarecer qual o significado da redução do IM verificada.

VII - Abstract

In course of life, the woman go through a transition phase between the reproductive and the non-reproductive period, which is called climacteric . During the climacteric women experience her last menstrual cycle (menopause) and suffer several somatic, endocrine and psychological alterations. A remarkable characteristic of this period is the progressive estrogenic hormone drop which is associated with an increased risk of several diseases, such as arteriosclerosis, myocardian infarction and stroke. In an attempt to improve the quality life of post-menopausal women, exogenous hormone have been administered. In spite of the obtained benefits from the hormone replacement therapy (TRH), studies have been showed an increased incidence of hormone dependent cancer in women submitted to such procedure. Furthermore, women can have their estrogenic rate increased by natural substances known as xenoestrogens, that can mimic the hormone action. Polycyclic aromatic hydrocarbons, encountered in cigarette smoking, resemble to act like xenoestrogens. Additionally, there are many carcinogens in cigarette that, when activated, are linked to DNA forming adducts that may interfere in transcription, resulting in mutations, wich are responsible for 90% of all lung cancer cases, as well as 30% of other types of the cancer. In accord of that, this study aimed to monitor, in a cytogenetically approach, post-menopausic women, smokers and non-smokers, under estrogenic replacement treatment during 180 days. The parameters focused were chromosome aberration frequencies and mitotic index using peripheral lymphocytes, in order to detect a genotoxic effect induced by HRT, besides a sinergistic effect due to smoke habit, as well. Our results did not show a genotoxic or a sinergistic effect either induced by HRT. However, both estrogen and smoke habit did disturb the cinetic of cell cycle, once it was observed a drastic mitotic index reduction in smoker women under HRT. It has to be pointed out that additional studies has to by conducted seeking for the better understanding of tobacco compounds and the estrogenic role in cancer process and in the cell cycle, as well.



VIII - Referências Bibliográficas

ALBERTINI, R. Why use somatic mutations for human biomonitoring? *Envriron. Mol. Mutagen.*, v.23, p.18-22, 1994.

ALEXANDROV, K., ROJAS, M., GENEST, O., CAMUS, A. M., PETRUZZWLLI, S., GIUNTINI, C., BARTSCH, H. An improved fluorimetric assay for dosimetry of benzo[a]pyrene diol-epoxide-DNA adducts in smokers lung: comparisons with total bulky adducts and aryl hydrocarbon hydroxylase activity. *Cancer Res.*, v.52, p.6248-53, 1992.

AMES, B.N., GOLD, L.S., WILLETT, W.C. The causes and prevention of cancer. *Proc. Nalth. Acad. Sci.*, v.92, p.5258-65, 1995.

AU, W.W. Monitoring human populations for effects of radiation and chemical exposures using cytogenetic techniques. *Occup. Med.*, v.6, n.4, p.597-611, 1991.

AU, W.W., WALKER, D.M., WARD JR., J.B., WHORTON, E., LEGATOR, M.S., SINGH, V. Factor contributing to chomosome damage in lymphocytes of cigarette smoker. *Mutat. Res.*, v.260, p.137-144, 1991.

AU, W.W., WILKINSON, G.S., TYRING, S.K., LEGATOR, M.S. EL-ZEIN, R., HALLBEG, L., HEO, M.Y. Monitoring populations for DNA repair deficiency and for cancer susceptibility. *Environ. Health Perspect.*, v.104, suppl.3, p.579-84, 1996.

AUSTIN, H., DREWS, C., PARTRIDGE, E.E. A case-control study of endometrial cancer in relation to cigarette smoking, serum estrogen levels, and alcohol use. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, v.169, n.5, p.1089-91, 1993.

BANDUHN, N., OBE, G. Mutagenicity of methyl 2-benzimidazolecarbamate, diethulstilbestrol and estradiol: structural chromosomal aberrations, sister-

chromatid exchanges, C-mitosis, polyploidies and micronuclei. *Mutat. Res.*, v.156, n.3, p.199-218, 1985.

BANERJEE, S.K., BANERJEE, S., LI, S.A., LI, J.J. Induction of chromosome aberrations in Syrian hamster renal cortical cells by various estrogens. *Mutat. Res.*, v.311, p.191-7, 1994.

BARON, J.A., LA-VECCHIA, C., LEVI, F. The antiestrogenic of cigarette smoking in women. *Am. J. Obstent. Gynecol.*, v.162, n.2, p.502-14, 1990.

BARTSCH, H., HIETANEN, E. The role of individual susceptibility in cancer burden related to environmental exposure. *Environ. Health Perspect.*, v.104, suppl.3, p.569-78, 1996.

BELL, D.A., STEPHENS, E.A., CASTRANIO, T., UMBACH, D.M., WATSON, M., DEAKIN, M., ELDER, J., HENDRICKSE, C., DUNCAN, H., STRANGE, R. Polyadenylation polymorphism in the acetyltransferase 1 gene (NAT1) increases risk of colorectal cancer. *Cancer Res.*, v.55, p.3537-41, 1995.

BENDER, M.A., AWA, A.A., BROOKS, A.L., EVANS, H.J., GROER, P.G., LITTLEFIELD, L.G., PEREIRA, C., PRESTON, R.J. Current status of cytogenetic procedures to detect and quantify previous exposures to radiation. *Mutat. Res.*, v.196, p.103-59, 1988.

BERKOWITZ, G.S., CANNY, P.F., VIVOLSI, V.A., MERINO, M.J., O'CONNOR, T.Z., KELSEY, J.L. Cigarette smoking and benign breast disease. *J. Epidemiol. Community Health*, v.39, n.4, p.308-13, 1985.

BRADLOW, H.L., HERSHCOPF, R., MARTUCCI, C., FISHMAN, J. 16 α-hydroxylation of estradiol: a possible risk marker for breast cancer. *Ann NY Acad Sci.*, v.464, p.138-151, 1986.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

BRADLOW, H.L., MICHNOVICZ, J., TELANG, N.T., OSBORNE, M.P. Effects of dietary indole-3-carbinol on estradiol metabolism and spontaneous mammary tumors in mice. *Carcinogenesis*, v.12, p.1571-1574, 1991.

BRINKWORTH, M.H., YARDLEY-JONES, A., EDWARDS, A.J., HUGHES, J.A., ANDERSON, D. A comparison of smoker and non-smokers with respect to oncogene products and cytogenetic parameters. *J. Occup. Med.*, v.34, p.1181-8, 1992.

BRINTON, L.A., BARRETT, R.J., BERMAN, M.L., MORTEL, R., TWIGGS, L.B., WILBANKS, G.D. Cigarette smoking and the risk of endometrial cancer. *Am. J. Epidemiol.*, v.137, n.3, p.281-91, 1993.

BRUNELLI, R., FRASCA, D., PERRONE, G., PIOPLI, C., FATTOROSSI, A., ZICHELLA, L., DORIA, G. Hormone replacement therpy affects various immune cell subsets and natural cytotoxicity. *Gynecol. Obstet. Invest.*, v.41, n.2, p.128-31, 1996.

BUNZ, F., DUTRIAUX, D., LENGAUER, C., WALDMAN, T., ZHOU, S., BROWN, J.P., SEDIVY, J.M., KINZLER, K.W., VOGELSTEIN, B. Requeriment for p43 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage. *Sience*, v.282, n.5393, p.1497-501, 1998.

BURING, J.E., HENNEKENS, C.H., LIPNICK, R.J., WILLETT, W., STAMPFER, M.J., ROSNER, B., PETO, R., SPEIZER, F.E. A prospective cohort study of postmenopausal hormone use and risk of breast cancer in US women. *Am. J. Epidemiol.*, v.125, n.6, p.939-47, 1987.

CAMPOS, D.A., BARROS, H., MARTINEZ, J.O. Terapêutica hormonal de substituição e cancro da mama. *Acta Med. Port.*, v.10, p.697-704, 1997.

CARRANO, A.V., NATARAJAN, A.T. Considerations for population monitoring using cytogenetic tecniques. *Mutat. Res.*, v.204, p.379-406, 1988.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

CHIEN, C.H., WANG, F.F., HAMILTON, T.H. Transcriptional activation of *c-myc* proto-oncogene by estrogen in human ovarian cancer cells. *Mol. Cell Endocrinol.*, v.99, p.11-9, 1994.

CHRISMAN, C.L., LASLEY, J.F. Effect of diethylstilbestrol diphosphate on mitotic activity in bovini lymphocyte cultures. *Cytologia*, v.40, p.817-21, 1975.

COE, J.E., ISHAK, K.G., ROSS, M.J. Estrogen induction of hepatocellular carcinomas in American hamsters. *Hepatology*, v.11, p.570-7, 1990.

COHEN, S. M., ELLWEIN, L. B. Genetic errors, cell proliferation, and carcinogenesis. *Cancer Res.*, v.51, p.6493-505, 1991.

COLDITZ, G.A. Hormone replacement therapy increases the risk of breast cancer. *Ann. NY Acad. Sci.*, v.833, p.129-36, 1997.

COLDITZ, G.A., HANKINSON, S.E., HUNTER, D.J., WILLETT, W.C., MANSON, J.E., STAMPFER, M.J., HENNEKENS, C., SPEIZER,F.E. The use of estrogens and progestins and the risk of breast cancer in postmenopausal women. *N. Engl. J. Med.*, v.332, p.1589-93, 1995.

COLLABORATIVE GROUP ON HORMONAL FACTORS IN BREAST CANCER Breast cancer and hormone replacement therapy: collaborative reanalysis of data from 51 epidemiological studies of 52,705 women with breast cancer and 108,411 women without breast cancer. *Lancet*, v.350, n.9084, p.1047-59, 1997.

CONFORTI-FROES, N., EL-ZEIN, R., ABDEL-RAHMAN, S., ZWISCHENBERGER, J.B., AU, W.W. Predisposing genes and increased chromosome aberration in lung cancer cigarette smokers. *Mutat. Res.*, v.379, p.53-9, 1997.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

CORNUZ, J., FESKANICH, D., WILLETT, W.C., COLDITZ, G.A. Smoking, somoking cessation, and risk of hip fracture in women. *Am. J. Med.*, v.106, n.3, p.311-4, 1999.

DAHLGREN, E., FRIBERG, L.G., JOHANSSON, S., LINDSTRÖM, B., ODÉN, A., SAMSIOE, G., JANSON, P.O. Endometrial carcinoma: ovarian dysfunction - - a risk factor in young women. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.*, v.41, n.2, p.143-50, 1991.

DALY, A.K., CHOLERTON, S., WENDY, G., IDLE, J.R. Metabolic polymorphism. *Pharmacol. Ther.*, v.57, p.129-60, 1993.

DANIEL, M., MARTIN, A.D., FAIMAN, C. Sex hormone and adipose tissue distribution in premenopausal cigarette smokers. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.*, v.16, n.4, p.245-54, 1992.

DAVIDSON, B.J., HSU, T.C., SCHANTZ, S.P. The genetics of tobacco-induces malignancy. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.*, v.119, p.1198-205, 1993.

DAVIS, D.L., BRADLOW, H.L. Can environmental estrogens cause breast cancer? *Scien. American*, v.273, n.4, p.167-72, 1995.

DAVIS, D.L., BRADLOW, H.L., WOLFF, M., WOO, D.R., USS, T., HOEL, D.G., ANTON-CULVER, H. Medical hypothesis xenoestrogens as preventable causes of breast cancer. *Environ. Health Perspect.*, v.101, n.5, p.372-7, 1993.

DEFAIS, M. Mechanisms of repair in mammalian cells. In: COOPER, C. S., GROVER, P. L. (Ed.). *Chemical carcinogenesis and mutagenesis II.* Berlin: Springer- Verlag., 1990. p. 51-69.

DHILLON, V.S., SINGH, J., SINGH, H., KLER, R.S. *In vivo* and *in vitro* genotoxicity of hormonal drugs. VI. Fluoxymesterone. *Mutat. Res.*, v.342, n.3-4, p.103-11, 1995.

DHILLON, V.S., SINGH, J.R., SINGH, H., KLER, R.S. *In vitro* and *in vivo* genotoxicity evaluation of hormonal drugs V. Mestranol. *Mutat. Res.*, v.322, n.3, p.173-83, 1994.

DIPPLE, A. DNA adducts of chemical carcinogens. *Carcinogenesis*, v.16, p.437-41, 1995.

DOERJER, G., BEDELL, M.A., OESCH, F. DNA adducts and their biological relevance. In: OBE, G. (Ed.) *Mutations in man.* Berlin: Springer Verlag, 1984. p.20-34.

DZHANGULASHVILI, N.A. Chromosome aberrations and sister chromatid exchanges in a human lymphocyte culture exposed to diethylstilbestrol dipropionate. *Tsitol. Genet.*, v.16, n.2, p.24-9, 1982.

EL-ZEIN, R., CONFORTI-FROES, N., AU, W.W. Interactions between genetic predisposition and enviromental toxicants for development of lung cancer. *Envir. Molec. Mutagenesis*, v.30, p.196-204, 1997.

EL-ZEIN, R., SMAW, R., TYRING, S., AU, W.W. Chromosomal radiosensivity of lymphocytes from skin cancer-prone patiens. *Mutat. Res.*, v. 335, p.143-9, 1995.

EPE, B., HEGLAR, J., METZLER, M. Site-specific covalent binding of stilbene-type and steroidal estrogens to tubulin following metabolic activation *in vitro*. *Carcinogenis*, v.8, p.1271-5, 1987.

FEDERAÇÃO BRASILEIRA DAS SOCIEDADES DE GINICOLOGIA E OBSTETRÍCIA. *Climatério*: manual de orientação. Rio de Janeiro, 1995.

FOILES, P.G., AKERKAR, S.A., CARMELLA, S.G., KAGAN, M., STONER, G.D., RESAU, J.H., HECHT, S.S. Mass spectrometric analysis of tobacco-

specific nitrosamine-DNA adducts in smokers and nonsmokers. *Chem. Res. Toxicol.*, v.4, p.364-8, 1991.

FOILES, P.G., MURPHY, S.E., PETERSON, L.A., CARMELLA, S.G., HECHT, S. S. DNA and hemoglobin adducts as markers of metabolic activation of tobacco-specific carcinogens. *Cancer Res.*, v.52, suppl.9, p.2698-701, 1992.

GANGULY, B.B. Cell division, chromosomal damage and micronucleus formation in pheripheral lymphocytes of healty donors: related to donor`s age. *Mutat. Res.*, v.295, n.3, p.135-48, 1993.

GANT, N.F., CUNNINGHAM, F.G. Menopause. In--, *Basic gynecology and obstetrics*. Norwalk: Appleton & Lange, 1993. cap.25, p.192-5.

GARG, P.P., KERLIKOWSKE, K., SUBAK, L., GRADY, D. Hormone replacement therapy and the risk of epithelial ovarian carcinoma: a meta analysis. *Gynecol*, v.92, p.472-9, 1998.

GREENBERG, E.R., BARNES, A.B., RESSEGUIE, Z., BARRET, J.A., BURNSIDE, S., LANZA, L.L., NEFF, R.K., STEVENS, M., YOUNG, R.H., COLTON, T. Breast cancer in mothers given diethylstilbestrol in pregnancy. *N. Engl. J. Med.*, v.311, p.1393-8, 1984.

GUENGERICH, F.P., KIM, D.H., IWASAKI, M. Role of human cytochrome P-450IIe1 in the oxidation of many low molecular weight cancer suspects. *Chem. Res. Toxicol.*, v.4, p.168-79, 1991

HAGMAR, L., BROGGER, A., HANSTEEN, I.,L., HEIM, S., HOGDTEADT, B., KNUDSEN, I., REUTERWALL, C., SOLAMAA, S., SKERFVING, S., SORSA, M. Cancer risk in humans predicted by increase levels of chromosomal aberrations in lymphocytes: Nordic study group on the health risk of chromosome damage. *Cancer Res.*, v.54, p.2119-22, 1994.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

HALBE, H.W. Climatério descompensado. In--, *Tratado de ginicologia.* São Paulo: Livraria Roca, 1987. cap.71, p.933-51.

HARTGE, P., HOOVER, R., McGOWAN, L., LESHER, L., NORRIS, H.J. Menopause and ovarian cancer. *Am. J. Epidemiol.*, v.127, p.990-8, 1988.

HARTLEY-ASP, B., DEINUM, J., WALLIN, M. Diethylstilbestrol induces metaphase arrest and inhibits microtube assembly. *Mutat. Res.*, v.143, p.231-5, 1985.

HEFLICH, R.H. Chemical mutagens. In: LI, A.P., HEFLICH, R.H. (Ed.) *Genetic toxicology.* New Jersey: CRC Press, 1991. p.143-95.

HEMPLING, R.E., WONG, C., PIVER, M.S., NATAJARN, N., METTLIN, C.J. Hormone replacement therapy as a risk factor for epithelial ovarian cancer: results of a case-control study. *Obstet. Gynecol.*, v.89, n.6, p.1012-6, 1997.

HERRERA, L.A., MONTERO, R., LEÓN-CÁZARES, J.M., ROJAS, E., GONSEBATT, M.E., OSTROSKY-WEGMAN, P. Effects of progesterone and estradiol on the proliferation of phytohemagglutinin-stimulated human lymphocytes. *Mutat. Res.*, v.270, n.2, p.211-8, 1992.

HILDRETH, N.G., KELSEY, J., LIVOLSI, V.A., FISCHER, D.B., HOLFORD, T.R., MOSTOW, E.D.. SCHWARTZ, P.E., WHITE, C. An epidemiologic study of epithelial carcinoma of the ovary. *Am. J. Epidemiol.*, v.114, p.398-405, 1981.

HILL, A., WOLFF, S. Sister chromatid exchanges and cell division delay induced by diethylstilbestrol, estradiol e estriol in human lymphocytes. *Cancer Res.*, v.43, p.4114-8, 1983.

HIRVONEN, A., PELIN, K., TAMMILEHTO, L., KARARJALAINEN, A., MATTSON, K., LINNAINMAA, K. Inherited GSTM1 and NAT2 defects as

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

concurrent risk modifiers in asbestos-related human malignant mesothelioma. *Cancer Res.*, v.55, p.2981-3, 1995.

HOFFMANN, D., HECHT, S.S., MELIKIAN, A.A., HALEY, N.J., BRUNNEMANN, K.D., ADAMS, J.A., WYNDER, E.L. Tumorigenic agents in tobacco products and their uptake by chewers, smokers, and nonsmokers. *Biochem. Mol. Epidemiol. Cancer*, p.191-204, 1986.

HOLMÉN, A., KARLSSON, A., BRATT, I., HÖGSTEDT, B. Increase frequencies of micronuclei in T8 lymphocytes of smokers. *Mutat. Res.*, v.334, n.2, p.205-8, 1995.

HUNDAL, B.S., DHILLON, V.S., SIDHU, I.S. Genotoxic potential of estrogens. *Mutat. Res.*, v.389, n.2-3, p.173-81, 1997.

HUSEBY, R.A. Demonstration of a direct carcinogenic effect of estradiol on Leyding cells of the mouse. *Cancer Res.*, v.40, p.1016-13, 1980.

HUSGAFVEL-PURSIAINEN,K. Sister-chromatid exchange and cell proliferation in cultured lymphocytes of passively and actively smoking restaurant personnel. *Mutat. Res.*, v.190, n.3, p.211-5, 1987.

HUSGAFVEL-PURSIAINEN, K., KANNIO, A. Cigarette smoking and p53 mutations in lung cancer and bladder cancer. *Environ. Health Perspect.*, v.104, suppl.3, p.553-6, 1996.

ISCN 1995: na international system for human cytogenetic nomenclature. Basel: Karger, Cytogenetics and Cell Genetics, 1995.

JACOBS, E.J., WHITE, E., WEISS, N.S. Exogenous hormone, reproductive, and colon cancer. *Cancer Cause Control*, v.5, p.359-66, 1994.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

JONES, L.A., PACILLAS-VERJAN, R. Transplantability and sex steroid hormone responsiveness of cervicovaginal tumors derived from female BALB/cCrgl mice neonatally treated with ovarian steroids. *Cancer Res.*, v.39, p.2591-4, 1980.

KADLUBAR, F.F., BUTLER, M.A., KADERLIK, K.R., CHOU, H.C., LANG, N.P. Polymorphisms for aromatic metabolism in humans: relevance for human carcinogenesis. *Environ. Health Perspect.*, v.98, p.69-74, 1992.

KAO-SHAN, C.S., FINE, R.L., WHANG-PENG, J., LEE, E.C., CHABNER, B.A. Increased fragile sites and sister chromatid exchanges in bone marrow and peripheral blood of young cigarette smokers. *Cancer Res.*, v.47, p.6278-82, 1987.

KASE, N.G. Menopausa. In: KASE, N.G., WEINGOLD, A.B. (Ed.) *Ginicologia clínica*. Rio de Janeiro: Editora Guanabara, 1987. cap.22, p.250-60.

KAUFMAN, D.W., KELLY, J.P., WELCH, W.R., ROSENBURG, L., STOLLEY, P.D., WARSHAUER, M.E., LEWIS, J., WOODRUFF, J., SHAPIRO, S. Noncontraceptive estrogen use and epithelial ovarian cancer. *Am. J. Epidemiol.*, v.130, p.1142-51, 1989.

KAUFMAN, D.W., PALMER, J.R., MOUZON, J., ROSENBERG, L., STOLLEY, P.D., WARSHAUER, M.E., ZAUBER, A.G., SHAPIRO, S. Estrogen replacement therapu and the risk of breast cancer: results from the case-control surveillance study. *Am. J. Epidemiol.*, v.134, n.12, p.1375-85, 1991.

KAUFMANN, W.K., KAUFMANN, D.G. Cell cycle control, DNA repair and initiation of. carcinogenesis. *FASEB*, v.7. n.12, p.1188-91, 1993.

KEY, T.J., PIKE, M.C., BROWN, J.B., HERMON, C., ALLEN, D.S., WANG, D.Y. Cigarette smoking and urinary oestrogen excretion in premenopausal and post-menopausal women. *Br. J. Cancer*, v.74, n.8, p.1313-6, 1996.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

KIEL, D.P., BARON, J.A., ANDERSON, J.J., HANNAN, M.T., FELSON, D.T. Smoking eliminates the protective effect of oral estrogens on the risk for hip fracture among women. *Ann. Intern. Med.*, v.116, n.9, p.716-21, 1992.

KOCHHAR, T.S. Inducibility of chromosome aberrations by steroid hormones in cultured chinese hamster ovary cells. *Toxicol. Lett.*, v.29, n.2-3, p.201-6, 1985.

LACKMANN, G.M., SALZBERGER, U., TOLLNER, Q., CHEN, M., CARMELLA, S.G., HECHT, S.S. Metabolites of a tobacco-especific carcinogen in urine from newborns. *J. Nat. Cancer Inst.*, v.5, n.91, p.459-65, 1999.

LANG, R., REIMANN, R. Studies for genotoxic potential of some endogenous and exogenous sex steroids. I. Communication: examination for the enduction of gene mutations using the Ames *Salmonella*/Microsome Test and the HGPRT Test in V79 cells. *Environ. Mol. Mutagen.*, v.21, p.272-304, 1993.

LEAV, I., MERK, F.B., KWAN, P.W., HO, S.W. Androgen-supported estrogen-enhanced epithelial proliferation in the prostates of intact noble rats. *Prostate*, v.15, p.23-40, 1989.

LEGATOR, M.S. When less is more dangerous. *Biomedical Investigator*, v.1, n.1, p.2, 1995.

LEGATOR, M.S., AU, W.W. Application of integrated genetic monitoring: the optimal approach for detecting environmental carcinogens. *Environ. Health Perspect.*, v.102, suppl.9, p.125-32, 1994.

LI, J.J., LI, S.A. Estrogen carcinogenesis in hamster tissues: a critical review. *Endocr. Rev.*, v.11, p.524-31, 1990.

LUPULESCU, A. Estrogen use and cancer incidence: a review. *Cancer Invest.*, v.3, n.3, p.287-95, 1995.

LUPULESCU, A. Hormone regulation of DNA synthesis in cancer epidermal cells. *J. Cell Biol.*, v.87, p.103, 1980.

McLACHLAN, J.A., WONG, A., DEGEN, G.H., BARRET, J.C. Morphological and neoplastic transformation of Syrian hamster embryo cells by diethylstilbestrol and its analogs. *Cancer Res.*, n.42, p.3040-5, 1982.

MENDELSON, J. MULTER, M.M., BERNHEIM, J.L. Inhebition human stimulation by steroid hormones: citokinetic mechanisms. *Clin. Exp. Immunol.*, v.27, p.127-34, 1977.

MICHNOVICZ, J.J., HERSHCOPF, R.J., NAGANUMA, H., BRADLOW, H.L., FISHMAN, J. Increased 2-hydroxylation of estradiol as a possible mechanism for the anti-estrogenic effect of cigarette smoking. *N. Engl. J. Med.*, v.315, n.21, p.1305-9, 1986.

MICHNOVICZ, J.J., NAGANUMA, H., HERSHCOPF, R.J., BRADLOW, H.L., FISHMAN, J. Increased urinary catechol estrogen excretion in female smokers. *Steroids*, v.52, n.1-2, p.69-83, 1988.

MILLER, T.L., HUZEL, N.J., DAVIE, J.R., MURPHY, L.C. C-myc gene chromatin of estrogen positive and negative breast cancer cells. *Mol. Cell Endocrinol*, v.91, n.1-2, p. 83-89, 1993.

MILLS, P.K., BEESON, W.L., PHILLIPS, R.L., FRASER, G.E. Prospective study of exogenous hormone use and breast cancer in Seventh-day Adventists. *Cancer*, v.64, n.3, p.591-7, 1989.

MOSSUZ, P., COUSIN, F., CASTINEL, A., CHAUVET, M., SOTTO, M.F., POLACK, B., SOTTO, J.J., KOLODIE, L. Effects of. two sex steroids (17 beta estradiol and testosterone) on proliferation and clonal growth of. the human monoblastic leukemia cell line, U937. *Leuk. Res.*, v.22, n.11, p.1063-72, 1988.

MURAD, F., HAYNES, R.C.Jr. Estrogênios e progestogênios. In: GILMAN, A.G. *et al.* (Ed.) *As bases farmacológicas da terapêutica.* 7.ed. Rio de Janeiro. Editora Guanabara, 1987. cap.61, p.926-42.

NAKAYAMA, T., KANEKO, M., KODAMA, M., NAGATA, C. Cigarette smoke induces DNA single-strand breaks in human cells. *Nature*, v.314, p.462-464, 1985.

NANDI, S., GUZMAN, R.C., YANG, J. Hormone and mammary carcinogenesis in mice, rats and humans humans: a unifying hypothesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 92, p. 3650-7, 1995.

NATARAJAN, A.T. Mechanisms for induction of mutations and chromosome alterations. *Environ. Health Perspect.*, v.101, p.225-9, 1993.

NATARAJAN, A.T., BOEI, J.J.W.A., DARROUDIE, F., DIEMEN, P.C.M.V., DULOUT, F., HANDE, M.P., RAMALHO, A.T. Current cytogenetic methods for detecting exposure and effectd of mutagens and carcinogens. *Environ. Health Perspect.*, v.104, suppl.3, p.445-7, 1996.

NEWBOLD, R.R., BULLOCK, B.C., McLACHLAN, J.A. Uterine adenocarcinoma in mice following developmental treatment with estrogen. *Cancer Res.*, v.50, p.7677-81, 1990.

NEWCOMB, P.A., LONGNECKER, M.P., STORER, B.E., MITTENDORF, R., BARON, J., CLAPP, R.W., BOGDAN, G., WILLETT, C. Long term hormone replacement therapy and risk of breast cancer in postmenopausal women. *Am. J. Epidemiol.*, v.142, n.8, p.788-95, 1995.

NEWCOMB, P.A., STORER, B.E. Postmenopausal hormone use and risk of langer-bowel cancer. *J. Natl. Cancer Inst.*, v.87, n.14, p.1067-71, 1995.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

NUTTER, L.M., WU, Y.Y., NGO, E.O., SIERRA, E.E., GUTIERREZ, P.L., ABUL-HAJJ, Y.J. An o-quinone form of estrogen produces free radicals in human breast cancer cell: correlation with DNA domage. *Chem. Res. Toxicol.*, v.7, n.1, p.23-28, 1994.

ONG, C.N., JEYARATNAM, J., KOH, D. Factors influencing the assessment and control of occupational hazards in developing coutries. *Environ. Res.*, v.60, p.112-23, 1993.

PERERA, F.P., MOONEY, L.A., DICKEY, C., SANTELLA, R.M., BELL, D., BLANER, W., TANG, D., WHYATT, R.M. Molecular epidemiology in environmental carcinogenesis. *Environ. Health Perspect.*, v.104, suppl.3, p.441-3, 1996.

PHILLIPS, D.H. DNA adducts in human tissues: biomarkers of exposure to carcinogens in tobacco smoke. *Environ. Health Perspect.*, v.104, suppl.3, p.453-8, 1996.

PIKE, M.C., SPICER, D.V. The chemoprevention of breast cancer by reducing sex steroid exposure: perspectives from epidemiology. *J. Celular Biochemistry*, v.17, p.26-36, 1993.

POLYCHRONOPOULOU, A., TZONOU, A., HSIEH, C.C., KAPRINIS, G., REBELAKOS, A., TOUPADAKI, N., TRICHOPOULOS, D. Reproductive variables, tobacco, ethanol, coffee and somatometry as risk factor for ovarian cancer. *Int. J. Cancer*, v.55, p.402-7, 1993.

PRESTON, R.J. Mechanisms of induction of specific chromosomal alterations. In: SUTHERLAND, B. M., WOODHEAD, A. D. (Ed.). *DNA damage and repair in human tissues*. New York: Plenum Press, 1990.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

PRESTON, M.S., PIKE, M.C., ROSS, R.K., JONES, P.A., HENDERSON, B.E. Increased cell division as a cause of human cancer. *Cancer Res.*, v.50, n.23, p.7415-21, 1990.

PYLKKÄNEN, L., JAHNUKAINEN, K., PARVINEN, M., SANTTI, R. Testicular toxicity and mutagenicity of steroidal and non-steroidal estrogens in the male mouse. *Mutat. Res.*, v.261, n.3, p.181-91, 1991.

RABELLO-GAY, M.N. Teste com linfócito do sangue periférico. In: RABELLO-GAY, M.N., RODRIGUES, M.A.L.R., MONTELEONE-NETO, R. (Ed.) *Mutagênese e teratogênese e carcinogênese*. Riberão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1991a. p.97-105.

RABELLO-GAY, M.N. Teste do micronúcleo em medula óssea. In: RABELLO-GAY, M.N., RODRIGUES, M.A.L.R., MONTELEONE-NETO, R. (Ed.) *Mutagênese e teratogênese e carcinogênese*. Riberão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1991b. p.83-90.

REIMANN, R., KALWEIT, S., LANG, R. Studies for a genotoxic potential of some endogenous and exogenous sex steroids. II. Communication: examinationfor the induction of cytogenetic damage using the chromosomal aberration assay on human lymphocytes *in vitro* and the mouse bone marrow micronucleus test *in vitro*. *Environ. Mol. Mutagen.*, v.28, n.2, p.133-44, 1996.

REITZ, M., DASGUPTA, K., BRANDT, L. Detection of DNA damage in stimulated human lymphocytes after enflurane exposure *in vitro*. *Environ. Res.*, v.59, p.476-84, 1992.

RISCH, H.A. Estrogen replacement therapy and risk of epithelial ovarian cancer. *Gynecol. Oncol.*, v.63, p.254-7, 1996.

RISCH, H.A., HOWE, G.R. Menopausal hormone usage and breast cancer in Saskatchewan: a record-linkage cohort study. *Am. J. Epidemiol*, v.139, n.7, p.670-83, 1994.

ROCHEFORT, H., CAPONY, F., GARCIA, M., CAVAILLÈS, V., FREISS, G., CHAMBON, M., MORISSET, M., VIGNON, F. Estrogen-induced lysosomal proteases secreted by breast cancer cells: a role in carcinogenesis? *J. Cell Biochem.*, v.35, n.1, p.17-29, 1987.

RODRIGUEZ, C., CALLE, E.E., COATES, R.J., MIRACLE-McMAHILL, H.L., THUN, M.J., HEATH, C.W.J. Estrogen replacement therapy and fatal ovarian cancer. *Am. J. Epidemiol*, v.141, p.828-35, 1995.

RUDEL, R. Predicting health effects of exposures to compounds with estrogenic activity: methodological issues. *Environ. Health Perspect.*, v.105, suppl.3, 1997.

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.*, v.223, n.2, p.253-8, 1989.

RUSSELL, M.A.H., FEYERABENS, C. Blood and urinary nicotina in non-smoker. *Lancet*, p.179-81, 1975.

SANCHEZ, P.S. Ensaio de mutação gênica reversa com *Salmonella typhimurium* - Teste de Ames. In: RABELLO-GAY, M.N., RODRIGUES, M.A.L.R., MONTELEONE-NETO, R. (Ed.) *Mutagênese e teratogênese e carcinogênese*. Riberão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1991. p.13-33.

SCHNEIDER, J., KINNE, D., FRACCHIA, A., PIERCE, V., ANDERSON, K.E., BRADLOW, H.L., FISHMAN, J. Abnormal oxidative metabolism of estradiol in women with breast cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v.79, p.3047-3051, 1982.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

SHARP, D.C., PARRY, J.M. Diethylbestrol: the binding and effects of diethylbestrol upon the polymerization and depolymerization of purified microtubule protein *in vitro*. *Carcinogenesis*, v.6, p.865-71, 1985.

SHIU, R.P., WATSON, P.H., DUBIK, D. C-myc oncogene expression in estrogen-dependent and-independent breast cancer. *Clin. Chem.*, v.39, n.2, p.353-355, 1993.

SIEMINSKA, A., OESZEWSKA, A. The influence of passive smoking on the respiratory tract. *Przegl. Lek.*, v.5, n.54, p.353-5, 1997.

SINGH, H., SINGH, J.R., DHILLON, V.S., BELI, D., PAUL, H. *In vitro* and *in vivo* genotoxicity evaluation of hormonal drugs. II. Dexamethasone. *Mutat. Res.*, v.308, n.1, p.89-97, 1994.

SINUES, B., IZQUIERDO, M., PEREZ-VIGUERA, J. Chromosome aberrations and urinary throethers in smokers. *Mutat. Res.*, v.240, p.289-93, 1990.

SOLBERG, Y., ROSNER, M., BELKIN, M. The association between cigarette smoking and ocular diseases . *Surv. Ophthalmol.* v.6, n.42, p.535-47, 1998.

SORSA, M., OJAJÄRVI, A., SALOMAA, S. Cytogenetic surveillance of workers exposed to genotoxic chemicals. *Teratog. Carcinog. Mutag.*, v.10, p.215-21, 1990.

SPEROFF, L., GLASS, R.H., KASE, N.G. Fisiologia reprodutiva. In:--- *Endocrinologia ginecológica clínica e infertilidade*. 5.ed. São Paulo: Editora Manole Ltda, 1995. cap.2, p.31-93.

SPRUCK, C.H., RIDEOUT, W.M. OLUMI, A.F., OHNESEIT, P.F., YANG, A.S., TSAI, Y.C., NICHOLS, P.W., HORN, T., HERMANNG, G., STEVEN, K., ROSS, R.K., YU, M.C., JONES, P.A. Distinct pattern of p53 mutations in

bladder cancer: relationship to tabacco usage. *Cancer Res.*, v.53, p.1162-6, 1993.

STAMMLER, F., DIEHM, C. Smoking and peripheral vascular disorders. *Z. Arztl. Fortbild (jena)*, v.5, n.89, p.459-66, 1995.

STANFORD, J.L., WEISS, N.S., VOIGT, L.F., DALING, J.R., HABEL, L.A., ROSSING, M.A. Combined estrogen and progestin hormone replacement therapy in relation to risk of breast cancer in middle-aged women. *JAMA*, v.274, n.2, p.137-42, 1995.

STEINBERG, K.K., SMITH, S.J., THACKER, S.B., STROUP, D.F. Breast cancer risk and duration of estrogen use: the role of study design in meta-analysis. *Epidemiology*, v.5, p.415-421, 1994.

STEINBERG, K.K., THACKER, S.B., SMITH, S.J., STROUP, D.F., ZACK, M.M., FLANDERS, W.D., BERKELMAN, R.L. A meta-analysis of effect of estrogen replacement therapy on the risk of breast cancer. JAMA, v.265, n.15, p.1985-90, 1991.

TANG, M., JACOBS, D., STERN, Y. MARDER, K., SCHOFIELD, P., GURLAND, B., ANDREWS, H., MAYEUX, P. Effect of oestrogen during menopause on risk and age at onset of Alzheimer's disease. *Lancet*, v.348, p.429-32, 1996.

TAWN, E.J., CARTMELL, C.L. The effect of smoking on the frequencies of asymmetrical and symmetrical chromosome exchanges in human lymphocytes. *Mutat. Res.*, v.224, p.151-6, 1989.

TELANG, N.T., SUTO, A., WONG, G.Y. Induction by strogen metabolite 16α-hydroxy-estrone of genotoxic damage and aberrant proliferation in mouse mammary epithelial cell. *J. Natl. Cancer Inst.*, v.84, p.634-638, 1992.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

THERON, T., BOHM, L. Cyclin B1 expression in response to abrogation of. the radiation-induced G2/M block in HeLa cells. *Cell Prolif.*, v.31. n.2. p.49-57, 1998.

TSUTSUI, T., BARRETT, J.C. Neoplastic transformation of cultured mammalian cells by estrogens and estrogenlike chemicals. *Environ. Health Perspect.*, v.105, supll.3, p.619-24, 1997.

TSUTSUI, T., MAIZUMI, H., McLACHLAN, J.A., BARRETT, J.C. Aneuploidy induction and cell transformation by diethylstilbestrol: a possible chromosomal mechanism in carcinogenesis. *Cancer Res.*, v.43, p.3814-21, 1983.

TSUTSUI, T., SUZUKI, N., FUKUDA, S., SATO, M., MAIZUMI, H. McLACHLAN, J.A., BARRETT, J.C. 17 beta-estradiol-induced cell transformation e aneuploidy of Syrian hamster embryo cells in culture. *Carcinogenesis*, v.8, n.11, p.1715-9, 1987.

TUCKER, J.D., PRESTON, R.J. Chromosome aberrations, micronuclei, aneuploidy, sister chromatid exchanges, and cancer risk assessment. *Mutat. Res.*, v.365, p.147-59, 1996.

TUCKER, R.W., BARRETT, J.C. Decreased numbers of spindle and cytoplasmic microtubules in hamster embryo cells treated with a carcinogen, diethylstilbestrol. *Cancer Res.*, v.46, p. 2088-95, 1986.

VAN-DIEMEN, P.C.M., MAASDAM, D., VERMEULEN, S., DARROUDI, F., NATARAJAN, A.T. Influence of smoking habits on the frequencies of structural and numerical chromosome aberrations in human peripheral blood lymphocytes using the fluorescence *in situ* hybridization (FISH) technique. *Mutagenesis*, v.10, p.487-95, 1995.

VAN-SCHOOTEN, F.J., HERVONEN, A., MAAS, L.M., DE MOL, B.A., KLEINJANS, J.C., BELL, D.A., DURRER, J.D. Putative susceptibility

markers of coronary artery disease: association between VDR genotype, smoking, and aromatic DNA adducts levels in human right atrial tissue. *FASEB J.*, v.13, n.12, p.1409-17, 1998.

VIERIKKO, P., KAUPPILA, A., VIHKO, R. Cytosol and nuclear estrogen and progestin receptors and progestin receptors and 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity in non-diseased tissue and in benign and malignant tumors of the human ovary. *Int. J. Cancer*, v.32, p.413-22, 1983.

VIJAYALAXMI, EVANS, H.J. *In vivo* and *in vitro* effects of cigarette smoke on chromosomal damage and sister-chromatid exchange in human peripheral blood lymphocytes. *Mutat. Res.*, v.92, p.321-32, 1982.

VINEIS, P., CAPORASO, N. Tobacco and cancer: epidemiology and laboratory. *Environ. Health Perspect.*, v.2, n.103, p.156-60, 1995.

ZAR, J.H. *Bioestatistical analysis*. 2ª ed., Englewood Cliffs, Prentice-Hall International Editions, 1984, p.718.

ZAVA, D.T., BLEN, M., DUWE, G. Estrogenic activity of natural and synthetic estrogens in human breast cancer cells in culture. *Environ. Health Perspect.*, v.105, suppl.3, 1997.

ZOJER, N., FRITSCHE, R., FIEGL, M., SCHULTE-HERMANN, R., MANNHALTRE, C., HBER, H. Molecular biology of tobacco smoke associated neoplasia. *Wien. Klin. Wochenschr.*, v.18, n.108, p.574-81, 1996.

ZUMOFF, B. Does postmenopausal estrogen administration increase the risk of breast cancer? Contribuitions of animal, biochemical, and clinical investigative studies to a resolution of the controversy. *Proc. Soc. Exp. Biol. Medicine*, v.217, n.1, p.30-37, 1998.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

WALKER, B.E., KURTH, L.A. Pituitary tumors in mice exposed prenatally to diethylstilbestrol. *Cancer Res.*, v.53, p.1546-9, 1993.

WEINBERG, R.A. The integration of molecular genetics into cancer management. *Carcer*, v.70, p.1653-8, 1992.

WEINBERG, R.A. How cancer arises. *Scien. American*, v.275, n.3, p.62-70. 1996.

WHEELER, W.J., CHERRY, L.M., DOWNS, T., HSU, T.C. Mitotic occurring and aneuploidy induction by naturally occurring and synthetic estrogens in Chinese hamster cell *in vitro*. *Mutat. Res.*, v.171, p.31-41, 1986.

WHITTEMORE, A.S., HARRIS, R., ITNYRE, J., COLLABORATION OVARIAN CANCER GROUP. Characteristics relating to ovarian cancer risk: collaborative analysis of 12 US case-control studies. *Am. J. Epidemiol.*, v.136, p.1184-203, 1992.

WILLET, W.C., COLDITZ, G.A., MUELLER, N.E. Strategies for minimizing cancer risk. *Scien. American.*, v.275, n.3, p.88-95, 1996.

WILLIAMSON, M.P., ELDER, P.A., KNOWLEL, M.A. The spectrum of tp53 mutations in bladder carcinoma. *Gene Chromosome Cancer*, v.9, p.108-118, 1994.

WINGO, P.A., LAYDE, P.M., LEE, N.C., RUBIN, G., ORY, H.W. The risk of breast cancer in postmenopausal women who have used estrogen replacement therapy. *JAMA*, v.257, n.2, p.209-15, 1987.

WITT, D.M., LOUSBERG, T.R. Controversies surrounding estrogen use in postmenopausal women. *Ann. Pharmacother.*, v.31, p.745-55, 1997.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

WREN, B.G. The menopause. In: HACKER, N.F., MOORE, J.G. (Ed.) *Essentials of obstetrics and gynecology.* 2.ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 1992. cap.50, p.543-50.

WYLE, F.A., KENT, J.R. Immunosuppression by sex steroid hormones. *Clin. Exp. Immunol.*, v.27, p.407-15, 1977.

YAGER, J.D., LIEHR, J.G. Molecular mechanisms of estrogen carcinogenesis. *Annu. Ver. Pharmacol. Toxicol.*, v.36, p.203-232, 1996.

YU, F.L., WANG, M.Y., LI, D.H., BENDER, W., ZHENG, W.Y. Evidence for the DNA binding and adduct formation of estrone and 17 β-estradiol after dimethyldioxirane activation. *Chem. Biol. Interact.*, v.110, p.173-87, 1998.


cm 1 2 3 4 5 6 7
unesp
11 12 13 14 15 16 17 18