UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
FACULDADE DE MEDICINA
MESTRADO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

ADRIANO ARNÓBIO JOSÉ DA SILVA E SILVA

TESTE DO MICRONÚCLEO IN VITRO: VALIDAÇÃO DO MÉTODO ATRAVÉS DA ATIVAÇÃO METABÓLICA

NITERÓI
2008

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

ADRIANO ARNÓBIO JOSÉ DA SILVA E SILVA

TESTE DO MICRONÚCLEO IN VITRO: VALIDAÇÃO DO MÉTODO ATRAVÉS DA ATIVAÇÃO METABÓLICA

Dissertação submetida ao Curso de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina da Universidade Federal Fluminense como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Mestre em Ciências Médicas.

Orientador: Prof. Dr. LUIZ QUERINO DE ARAUJO CALDAS
Co-orientador: Prof. Dr. GILBERTO PEREZ CARDOSO

Niterói
2008

FICHA CATALOGRÁFICA

S586 **Silva, Adriano Arnóbio José da Silva e**

Teste do micronúcleo in vitro: validação do método através da ativação metabólica / Adriano Arnóbio José da Silva e Silva. – Niterói: [s.n.], 2009.

63 f.:il., 30 cm.

Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas)- Universidade Federal Fluminense, 2009.

1. Testes para micronúcleos-In vitro. 2. Fibrinólise. 3. Linfócitos-Testes de mutagenicidade. I. Título.

CDD 575.292

ADRIANO ARNÓBIO JOSÉ DA SILVA E SILVA

TESTE DO MICRONÚCLEO IN VITRO: INOVAÇÃO DO MÉTODO ATRAVÉS DA ATIVAÇÃO METABÓLICA

Dissertação submetida ao Curso de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina da Universidade Federal Fluminense como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Mestre em Ciências Médicas.

Aprovada em:

BANCA EXAMINADORA

_____
Prof. Dr. Luiz Querino de Araújo Caldas - Orientador
UFF

_____
Prof. Dr. Beni Olej
UFF

_____
Prof. Dr. Silvana Ramos Farias Moreno
UFF

_____
Prof. Dr. Adenilson de Souza da Fonseca
UERJ

_____
Profa. Dra. Silvana Rubano Turci - suplente
INCA

_____
Prof. Dr. Severo de Paoli - suplente
UERJ

Niterói
2008

DEDICO

Aos meus pais, Lourdes e Antonio.

A minha esposa Vall e minha filha Helena.

Aos meus irmãos, Luciano, Edvaldo, Alex.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal Fluminense e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, pela oportunidade de realização do curso.

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

Ao Professor Dr. Luiz Querino de Araújo Caldas, pela dedicada orientação, pelos ensinamentos transmitidos, pelo enorme incentivo, pela amizade, pela confiança, pela paciência.

A Professora Dr. Silvana Ramos Farias Moreno, pela amizade e pelas contribuições para desenvolvimento deste trabalho.

Ao Professor Dr. Heriberto Dias da Silva e Prof. Dr. Jorge de Azevedo Armada pelo auxílio nas análises estatísticas, pelas contribuições na interpretação dos resultados e pelas sugestões.

A Bióloga Lyssa Hoshi pelas exaustivas horas de análise no Laboratório de Citogenética da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

RESUMO

INTRODUÇÃO: Há no cenário científico uma tendência mundial para a reavaliação da necessidade da utilização de animais, apontando para a adoção de modelos alternativos *in vitro e ex vivo*. O Teste do Micronúcleo *in vitro* em linfócitos humanos é um sistema de avaliação de mutagenicidade usado para descoberta de substâncias químicas que possam induzir a formação de fragmentos de DNA e avaliação risco de populações expostas a xenobióticos.

OBJETIVOS: Padronizar a técnica do teste *in vitro* do micronúcleo em linfócitos humanos modificada com a introdução de uma fração de ativação metabólica S9. Identificar o efeito citotóxico e genotóxico dos extratos de: *Solanum lycocarpum* (St. Hill), de *Nectandra membranacea* (Sw) Griseb *e das substâncias:* dimetilnitrosamina e ciclofosfamida sobre a cultura de linfócitos humanos através do teste *in vitro* de micronúcleos modificado.

MÉTODOS: Foram realizadas cultura de linfócitos humanos a partir de sangue total para obtenção das células. Foram utilizados 20 µl da fração humana S9 por grupo de tratamento na cultura de linfócitos para avaliação da ativação metabólica. Para confirmação do fragmento de DNA foi utilizada a técnica citoquímica de Feulgen. As células foram analisadas em microscópio de luz óptica.

RESULTADOS: A fração enzimática humana S9 não apresentou efeito mutagênico de forma isolada (p-valor= 0.0020). Houve atividade mutagênica da Ciclofosfamida na presença da fração S9 humana (p-valor 0.0005) na ausência da fração não houve atividade mutagênica. Houve atividade mutagênica da Dimetilnitrosamina na presença da fração S9 humana (p-valor 0.0005) na ausência da fração não houve atividade mutagênica. O extrato aquoso de *Solanum lycocarpum* (St. Hill) avaliado em teste de micronúcleo modificado *in vitro* não possuiu atividade mutagênica significativa estatísticamente com e sem a presença da fração S9 humana. O extrato etanólico de *Nectandra membranacea* (Sw) Griseb avaliado em teste de micronúcleo modificado *in vitro* não possuiu atividade mutagênica significativa com ou sem a presença da fração S9 humana.

CONCLUSÃO: A inserção da fração S9 humana no método atual de análise de micronúcleos *in vitro* apresentou ter sua implementação viável. Esta inserção amplia a estrutura analítica para descoberta de novas moléculas com ação no DNA e possíveis elucidações de mecanismos de ação dos fitoterápicos, produtos naturais bem como suas substâncias isoladas.

Palavras-chave: micronúcleo, mutagênese, teste *in vitro*.

ABSTRACT

INTRODUCTION: There is in the scientific scenery a world trend for the reavaliation of the need of the use of animals, appearing for the adoption of *in vitro* and *ex vivo* models alternative. The micronuclei *in vitro* test of in human lymphocytes is a mutagenicity system of evaluation used for discovery of chemical substances that can induce the formation of fragments of DNA and evaluation risk of exposed populations the xenobiotics.

PURPOSE: To standardize the technique of the test *in vitro* of the micronucleus in human lymphocytes modified with the introduction of a fraction of metabolic activation S9. To identify the cytotoxic and genotoxic effect of the extracts of: *Solanum lycocarpum* (St. Hill), Nectandra *membranacea* (Sw) Griseb and of the substances: dimethylnitrosamine and cyclophosfamide on the culture of human lymphocytes through the test in vitro of modified micronucleus.

METHODS:. They were accomplished culture of human lymphocytes starting from total blood for obtaining of the cells. 20 µl/ml of the human fraction S9 was used by treatment group in the culture of lymphocytes for evaluation of the activation metabolic. For confirmation of the fragment of DNA the technique cytochemistry of Feulgen was used. The cells were analyzed in microscope of optical light

RESULTS: The human enzymatic fraction S9 didn't present effect mutagenic in an isolated way (p-value = 0.0020). There was activity mutagênica of cyclophosfamide in the presence of the fraction human S9 (p-value 0.0005) in the absence of the fraction there was not activity mutagenic. There was activity mutagenic of dimethylnitrosamine in the presence of the fraction human S9 (p-value 0.0005) in the absence of the fraction there was not activity mutagenic. The test of the micronucleus modified in applied vitro to the aqueous extract of *Solanum lycocarpum* (St. Hill) it didn't possess activity significant mutagênica with and without the presence of the fraction human S9. In the test of the micronucleus in applied vitro the extract etanólico of *Nectandra membranacea* (Sw) Griseb, the extract didn't possess activity significant mutagenic with or without the presence of the fraction human S9.

CONCLUSION: The insert of the fraction human S9 in the current method of analysis of micronucleus in vitro presented to have your viable implementation. It enlarges the analytic structure for discovery of new molecules with action in DNA and possible elucidations of mechanisms of action of the fitoterápicos, natural products as well as your isolated substances

Keywords: micronucleus, mutagenesis, *in vitro* test.

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÃO E QUADRO

LISTA DE TABELAS

RESUMO..... I

ABSTRACT..... II

1. INTRODUÇÃO.....01

1.1. Modelos experimentais *in vitro*.....01

1.2. A mutagênese na carcinogênese humana.....04

1.3. O teste do micronúcleo.....09

1.4. Sistema de ativação metabólica (Biotransformação) *in vitro*.....13

2. OBJETIVOS.....16

3. MÉTODOS.....17

3.1. Infra-estrutura.....17

3.2. . Considerações sobre os aspectos éticos.....18

3.3. Delineamento experimental - Agentes teste.....18

3.4. Culturas de linfócitos humanos a partir do sangue total.....21

3.5. Fração enzimática humana S9.....23

3.6. Técnica de citoquímica para análise dos micronúcleos.....23

3.7. Reação de Feulgen.....25

3.8. Análise e escolha das lâminas.....26

3.9. Critérios para a seleção das células.....26

3.10. Características dos Micronúcleos a serem analisadas.....27

3.11. Análises das lâminas e determinação da freqüência dosMicronúcleos.....27

3.12. Estrutura analítica do protocolo.....28

4. RESULTADOS.....29

5. DISCUSSÃO.....39

5.1 - Aplicação da fração humana S9 e análise de ativação metabólica.....39

5.2 - Análise do extrato etanólico de Nectandra membranacea (Sw) Griseb.....42

5.3 – Análise do extrato aquoso de Solanum lycocarpum (St. Hill).....43

6. CONCLUSÃO.....45

7. REFERÊNCIAS.....47

LISTA DE ILUSTRAÇÃO E QUADRO

			Página
FIGURA	1	Fotomicrografia de linfócitos binucleados portando micronúcleos.	27
Quadro	1	Fluxograma da pesquisa	28

LISTA DE TABELAS

		PÁGINA
TABELA 1	Análise de formação de micronúcleos de linfócitos humaanos expostos a fração enzimática humana S9.	30
TABELA 2	Análise de formação de micronúcleo em linfócitos humanos expostos a ciclofosfamida na presença da fração S9.	31
TABELA 3	Análise de formação de micronúcleo em linfócitos humanos expostos a ciclofosfamida na ausência da fração S9.	32
TABELA 4	Análise de formação de micronúcleo em linfócitos humanos expostos a dimetilnitrosamina na presença da fração S9.	33
TABELA 5	Análise de formação de micronúcleo em linfócitos humanos expostos a dimetilnitrosamina na ausência da fração S9.	34
TABELA 6	Análise de formação de micronúcleo em linfócitos humanos expostos a Extrato etanólico de Nectandra membranacea (Sw) Griseb na presença da fração S9.	35
TABELA 7	Análise de formação de micronúcleo em linfócitos humanos expostos a Extrato etanólico de Nectandra membranacea (Sw) Griseb na ausência da fração S9..	36
TABELA 8	Análise de formação de micronúcleo em linfócitos humanos expostos a Extrato aquoso Solanum lycocarpum (St. Hill) na presença da fração S9 .	37

TABELA 9	Análise de formação de micronúcleo em linfócitos humanos expostos a Extrato aquoso Solanum lycocarpum (St. Hill) na ausência da fração S9.	38

1 INTRODUÇÃO

1.1 - Experimentação *In Vitro*.

Há no cenário científico uma tendência mundial para a reavaliação da necessidade de utilização de animais, apontando para a adoção de modelos alternativos *in vitro* e *ex vivo*. (SCHECHTMAN, 2002). Este novo paradigma estimula fortemente a incorporação de tecnologias na avaliação de segurança de fármacos, cosméticos e análise de risco das populações humanas (BALLS e colaboradores, 2000; FORNI, 2007).

O uso disseminado de animais em pesquisas tem sido motivo de controvérsias e conflitos, principalmente de caráter ético, em função do grande número de animais requerido e do sofrimento causado durante alguns tipos de experimentos (WHITE, 2001; MEYER, 2003). Esta tendência evidencia-se pela criação de diversas Instituições, que objetivam desenvolver e validar novos

métodos, e da implementação regulatória de testes *in vitro* em diversos países, a fim de padronizar e harmonizar o uso dos mesmos (SCHECHTMAN, 2002; RUSSEL & BURCH, 1992; BALLS, 1994).

Diversas metodologias alternativas *in vitro* já foram implantadas, sendo este um processo complexo que abrange desde o seu desenvolvimento até sua aceitação regulatória e adoção por diversas organizações (ICCVAM, 2008)

Com o início de um programa internacionalmente denominado de 3Rs (Reduction, Refinement, Replacement), que objetiva diminuir o número de animais utilizados em pesquisas, minimizar a dor e o desconforto e buscar alternativas para a redução dos testes *in vivo* (FLECKNELL,1994; OLSSON, 2008).

O programa 3Rs é assim denominado em função das iniciais, em inglês, de seus principais objetivos: 1) redução (Reduction), 2) refinamento (Refinement) e 3) substituição (Replacement), que de forma resumida significam a redução do número de animais utilizados na pesquisa, a melhora na condução dos estudos, no sentido de reduzir o sofrimento ao mínimo possível, e a busca de métodos alternativos que, por fim, substituam os testes *in vivo*. Os dois primeiros representam os objetivos a curto-prazo e o último, a meta máxima a ser alcançada (DIPASQUALE; HAYES, 2001;).

“Uma das metas do terceiro objetivo é desenvolver métodos alternativos à experimentação animal, tais como ensaios *in vitro*, inclusive com utilização de células humanas” (SCHECHTMAN, 2002)

Desta forma, o propósito principal do programa 3 Rs é servir como um conceito unificador, um desafio e uma oportunidade para a obtenção de benefícios científicos, econômicos e humanitários (BALLS e colaboradores, 2000).

A partir desta conjuntura político-social mundial, o Brasil na 2 a. Conferência Nacional de Ciência, Tecnologia e Inovação em Saúde (2004) estabelece como marco regulatório a experimentação *in vitro* como uma estratégia da Política Nacional de Ciência, Tecnologia e Inovação em Saúde. (Ministério da Saúde, 2008). Os modelos de experimentação *in vitro* são enquadrados na política em saúde como incorporações tecnológicas de valor singular para o desenvolvimento da Inovação em Saúde. (GUIMARÃES e colaboradores, 2006).

1.2 - A Mutagenêse na Carcinogênese Humana.

No decorrer da vida, o DNA sofre alterações denominadas de mutações, que podem ser causadas por erros durante a duplicação do DNA, na divisão celular. O aparecimento de mutações ocorre em todos os seres vivos, sendo um processo fundamental para evolução e diversidade das espécies (FUTUYMA, 2005).

Muitas das mutações não implicam em mudanças detectáveis na atividade metabólica da célula ou do organismo e, portanto, passam despercebidas. Outras mutações podem determinar a morte celular e, por conseqüência também, não são detectáveis (YAN, CALDWELL, 2006). Assim, apenas um pequeno número de mutações que ocorrem em genes específicos, pode determinar vantagens biológicas evolutivas ou um crescimento anormal das células. (HORAK e colaboradores, 2008; DARIO e colaboradores, 2008)

Os chamados agentes mutagênicos que alteram as seqüências das bases no DNA, podem acelerar ou aumentar o aparecimento de mutações que estão associadas ao desenvolvimento de neoplasias. Após passar por várias divisões, uma célula poderá acumular mutações que, se em número elevado (freqüência), podem determinar a perda do controle de sua divisão, podendo resultar no aparecimento do câncer. (IARMARCOVAI e colaboradores, 2008)

A mutação no DNA é uma alteração do processo gênico que pode induzir externa ou internamente no organismo alvo, carcinogênese. Os indutores externos são classificados em agentes:

1. Químicos - solventes aromáticos; clorados; agrotóxicos , como por exemplo a aflatoxina B1;
2. Físicos – radiações ionizantes e não ionizantes;
3. Biológicos – vírus (HPV, HBV/HCV) e microorganismos.

Os indutores internos podem ser entre outros, hormonais, imunológicos e enzimáticos que promovem mutações genéticas na estrutura do DNA. (KANAI, 2008)

Os mecanismos de mutagênese e carcinogênese parecem estar intrinsecamente ligados. A mutação é uma conseqüência do dano no DNA e este pode ser o estágio inicial no processo pelo qual a maioria dos carcinógenos químicos inicia a formação do tumor (KANAI, 2008). A literatura tem mostrado que mutações em vários genes (proto-oncogenes e genes supressores) podem ser encontradas nas neoplasias (WENZEL & RÖTHLISBERGER, 2008). Como exemplos podem ser citados os genes BRCA2 (breast cancer 2) e BRCA1 (breast cancer 1), do câncer de ovário hereditário e câncer de mama e o gene APC (adenomatous polyposis coli), da polipose adenomatosa familial (MINAMOTO e colaboradores , 1999).

Os proto-oncogenes são genes celulares normais que atuam no controle positivo, ou seja, estimulam o crescimento e a diferenciação celular (IRISH & BERNSTEIN, 1993). São genes capazes de induzir ou manter a transformação celular em animais experimentais ou em culturas de células. Podem tornar-se oncogenes por meio de mutações resultantes da exposição aos agentes carcinogênicos físicos, químicos ou biológicos (BISHOSP, 1991; JIMÉNEZ e colaboradores, 2008).

Os genes supressores de tumor que codificam proteínas essenciais para o controle do crescimento celular. Quando esses genes são inativados por perda ou mutação, podem resultar em crescimento celular aberrante (JIMÉNEZ e colaboradores, 2008).

Câncer é o conjunto de manifestações clínicas patológicas caracterizadas pela perda do controle do crescimento celular e o ganho de capacidade de invadir tecidos adjacentes ou de espalhar-se (metástase) para outras regiões do corpo (RIBEIRO E COLABORADORES, 2003). As neoplasias são classificadas geneticamente como uma doença multicausal ou multifatorial, isso quer dizer que, dependende tanto de condicionantes biológicos quanto psíco-sócio-ambientais (WENZEL & RÖTHLISBERGER, 2008).

O processo de carcinogênese humana de modo geral ocorre lentamente, ou seja, ao longo de anos. Em certos casos, o período para o surgimento das manifestações clínicas de uma neoplasia pode ser computado em anos (JEFFREY & WILLIANS, 2005).

A maioria dos carcinógenos apresenta uma propriedade em comum: são eletrofílicos altamente reativos que reagem com locais nucleofílicos na célula. Essas reações eletrofílicas podem atacar, nas células alvos, diversos locais ricos em elétrons, porém muitas evidências apontam o DNA como alvo primário (CLARKE e colaboradores, 2001). Nessa ligação são formados os adutos de DNA. A base do DNA mais suscetível a esse tipo de ataque é a guanina, tais adutos podem levar a mutações em proto-oncogenes ou em genes supressores de tumor e iniciar o processo de carcinogênese (LOUREIRO e colaboradores, 2002)

Uma vez que a expressão gênica esteja alterada como conseqüência da instabilidade genômica, as células passam a exibir um crescimento anormal podendo invadir os tecidos vizinhos (FENECH e colaboradores 2002; PAGES & FUCHS, 2002).

As alterações presentes em linfócitos do sangue periférico humano como as aberrações cromossômicas, as trocas entre cromátides irmãs e os micronúcleos (MNs), têm sido consideradas como biomarcadores de exposição genotóxica e de efeitos precoces de carcinógenos genotóxicos. Assumindo que os mecanismos de formação dos danos cromossômicos são similares em diferentes tecidos, espera-se que os níveis de danos em linfócitos reflitam os tecidos propensos ao câncer e assim indiquem o risco ao câncer (ALBERTINI e colaboradores., 2000; NORPPA, 2003).

Entretanto, alguns estudos epidemiológicos sugerem que a alta freqüência de alterações citogenéticas atua como um fator preditivo para o risco ao desenvolvimento de câncer, mesmo em populações não expostas, uma vez que indicam a possível instalação de um processo de instabilidade genômica (HAGMAR e colaboradores, 1998; BONASSI e colaboradores, 2006). Isso sugere um importante papel dos fatores de suscetibilidade individual como os diferentes polimorfismos dos genes metabolizadores de xenobióticos, de reparo do DNA (LINDBERG e colaboradores, 2007).

Considerando todas as informações descritas sobre mutagênese pode-se dizer que a relação entre os efeitos genotóxicos e a carcinogênese aumenta o interesse pelos estudos *in vitro* que têm por objetivo elucidar possíveis moléculas que causem dano no DNA com o risco ao câncer (FENECH e colaboradores, 2002).

1.3 O Teste do Micronúcleo

O Teste do Micronúcleo *in vitro* em linfócitos humanos é um método de avaliação de mutagenicidade usado para avaliação de potencial genotóxico de substâncias químicas que possam induzir a formação de fragmentos de DNA e avaliação de risco de populações expostas a xenobióticos (PACHECO E HACKEL, 2002). O ensaio tem a capacidade de avaliar as capacidades clastogênicas (que quebram cromossomos) e aneugênica (que induzem aneuploidia ou segregação cromossômica anormal) de moléculas (FENECH , 2000).

O micronúcleo se constitui em uma pequena massa nuclear delimitada por membrana e separada do núcleo principal. Os micronúcleos são formados durante a telófase da mitose ou meiose, quando o envelope nuclear é reconstituído ao redor dos cromossomos das células filhas. São resultantes de fragmentos cromossômicos acêntricos ou de cromossomos inteiros que não foram incluídos no núcleo principal. Assim, o micronúcleo representa perda de cromatina em conseqüência de dano cromossômico estrutural (fragmento) ou dano no aparelho mitótico (KIRSCH-VOLDERS, 2002).

A formação de micronúcleos pode ocorrer numa freqüência espontânea no organismo humano. O nível desta freqüência e a área do DNA removido do

núcleo principal são fatores que comprometem com o desfecho, resultando no processo patológico (FENECH, 2000).

É importante ressaltar que os micronúcleos são formados durante a mitose ou de meiose, independentemente do tipo de dano ocorrido durante o ciclo. Por isso, os danos no DNA causados, por exemplo, pela exposição a agentes mutagênicos, somente são expressos em micronúcleos após um ciclo de divisão celular, sendo dependentes da proporção de células que estão se dividindo. (FENECH, 2003). Conseqüentemente, a comparação da freqüência de micronúcleos entre populações de células em divisão só seria segura quando a cinética de divisão nuclear após o dano ao DNA fosse idêntica (FENECH, 1997; CLARE e colaboradores, 2006).

Diante desse fato, Fenech e Morley (1985a) modificaram a metodologia do ensaio empregando a citocalasina B. A citocalasina B é um inibidor da polimerização da actina requerida para a citocinese (CARTER, 1967). O uso da citocalasina B induz o bloqueio da citocinese, mas não da divisão nuclear, resultando em um acúmulo de células binucleadas a partir de células que passaram por apenas um ciclo de divisão, independentemente do grau de sincronia e da proporção das células em divisão (FENECH, 2000).

Bhattathiri e colaboradores (1996) utilizaram o teste do micronúcleo para investigar a radiossensibilidade de tumores cancerígenos avaliada pelo aumento na freqüência de células micronucleadas após irradiação de 49 pacientes com

carcinoma na cavidade oral. Pacientes com recorrência de novos tumores foram classificados como resistentes à radioterapia em comparação com os sensíveis que não desenvolveram novos tumores. Em ambos os grupos houve uma relação positiva na freqüência de micronúcleos com a dose de radiação. Entretanto, o aumento na contagem de células com micronúcleos ocorreu mais precocemente no grupo resistente em comparação com o sensível (3,3 dias versus 7,6 dias), apresentando os primeiros uma estabilização nesta freqüência, ausente no grupo sensível. A indução relativamente maior de células micronucleadas nos tumores dos indivíduos do grupo sensível sugeriu que o teste do micronúcleo possa ser utilizado como um teste de radiosensibilidade.

Uma tentativa de verificar a extensão do dano genético em linfócitos do sangue periférico como reflexo de eventos pré-clínicos do processo de carcinogênese foi realizada por Hagmar e colaboradores (1998) através da freqüência de aberrações cromossômicas e micronúcleos em linfócitos de indivíduos de países nórdicos com controles pareados quanto as mesmas variáveis. A análise estatística revelou que somente as aberrações cromossômicas teriam uma tendência linear significante quanto ao risco subseqüente do processo carcinogênico, sugerindo a avaliação das quebras cromossômicas como um biomarcador precoce para o risco do desenvolvimento de câncer.

O teste do micronúcleo com o emprego da citocalasina B pode ser utilizado para monitoramento genotóxico de populações, para a avaliação do potencial mutagênico de agentes químicos e físicos e para estudos específicos como a variação interindividual da radiosensibilidade e predição da radiosensibilidade de tumores (SHIBAMOTO e colaboradores, 1991; BURRIL e colaboradores, 2000; KIRSCH-VOLDERS e colaboradores, 2003).

1.4 Sistema de Ativação Metabólica (Biotransformação) *In Vitro*.

A biotransformação de drogas é uma etapa primordial no processo de eliminação e diminuição da toxicidade. Entretanto, ela também é responsável pelo surgimento de metabólitos reativos intermediários, que se ligam às macromoléculas do organismo. Dependendo da estrutura e do tipo de ligação, diferentes efeitos patológicos poderão ocorrer como necrose, fibrose, formação de imunógenos, mutagênese, carcinogênese e teratogênese (MEYER, 1996)

Juntamente com os fenômenos de absorção, distribuição e excreção, a biotransformação participa da regulação de níveis plasmáticos de drogas. A biotransformação é um processo em que os metabólitos formados possuem propriedades diferentes das drogas originais, com características mais hidrofílicas, tendo por objetivo facilitar a excreção pelo organismo.

Apesar de o fígado ser o principal órgão biotransformador, importa ressaltar que as enzimas microssomais expressam-se em vários outros tecidos, como pulmão e rins (LLAMA & AVENDAÑO,1993; HONKAKOSKI & NEGHISHI, 1997; BUTLLETÍ GROC, 1999), pele, cérebro e intestino (WATKINS et al., 1987; PETERS & KREMERS,1989).

Os modelos experimentais *in vitro* têm o objetivo de se aproximar ao máximo das reações metabólicas que ocorrem *in vivo*. Porém algumas vias metabólicas apresentam dificuldades em serem reproduzidas nos ensaios *in vitro*. (JEFFREY, 2005)

Uma possibilidade para a avaliação de moléculas que sofrem biotransformação (ativação metabólica hepática) está baseada no uso associado do ensaio *in vitro* e da fração citosólica enzimática de ratos expostos a Aroclor 1254 (MOLTOX, BOONE, NC), (MARON E AMES, 1983). A técnica consiste em administrar por via oral ao rato o Aroclor 1254 e após 24 horas de exposição, o rato é sacrificado, o fígado retirado para posterior maceração, centrifugação e ultra centrifugação, obtendo assim a fração enzimática de S9.

O Aroclor 1254 é uma mistura de substâncias do grupo das Bifenilas Policloradas restrita, pois apresenta uma grande correlação com tumorigênesi (PENTEADO & VAZ, 2000), (PRESTON e colaboradores, 1981). O acesso ao Aroclor no Brasil é proibido em pela Portaria Interministerial nº 19, de 29 de janeiro de 1981 e no Estado do Rio de Janeiro a proibição do uso e comercialização é regulamentada pela lei Nº 3373 de 24 de março de 1999.

O método atual para análise *in vitro* de agentes testes que possam sofrer ativação metabólica apresenta pequena aplicabilidade, já que o Aroclor possui o uso proibido. O pesquisador que insiste no uso deste modelo se expõe a um alto risco de adquirir neoplasias devido a exposição laboral. Além disso, o resultado obtido com a fração citosólica (fração enzimática S9) do rato possui baixa correlação com as enzimas citosólicas humanas e com o sistema de células humanas *in vitro*. (PLANT, 2004)

Assim, é singular a necessidade de inserção de uma fração enzimática humana (fração S9 humana) no teste do micronúcleo em linfócito humanos *in vitro* para melhor adequação do modelo, com um risco avaliado á saúde do pesquisador e que possa ser usado de forma legal no Brasil

Com a apresentação no mercado americano em 2005 da fração enzimática humana pool S9 (Celsis In vitro Technology ®), vislumbrou se incluir está fração no modelo de ensaio *in vitro* do micronúcleo em linfócitos humanos. Na sua composição contém adequadamente, uma grande variedade de enzimas fase I e fase II de biotransformação e incluem também enzimas de P450, flavinas-monooxigenases, carboxilesterases, epóxido hidrolase, UDP-glucuronosiltransferases, sulfotransferases, metiltransferases, acetiltransferases, glutatione S-transferases (Celsis In vitro Technology , 2006).

A utilização desta fração enzimática em testes *in vitro* é recente, com a sua licença para comercialização (CHOU, 2005). Assim a padronização da técnica modificada, constitui o desenvolvimento de um método alternativo que reproduz ao máximo as condições de biotransformação em humanos e expõe o pesquisador ao mínimo de risco a sua saúde.

2.0 OBJETIVOS:

- Padronizar a técnica do teste *in vitro* do micronúcleo em linfócitos humanos modificada com a introdução de uma fração de ativação metabólica S9.
- Avaliar o efeito citotóxico e genotóxico dos extratos de : *Solanum lycocarpum* (St. Hill), de *Nectandra membranacea* (Sw) Griseb *e das substâncias* Dimetilnitrosamina e ciclofosfamida sobre a cultura de linfócitos humanos através do teste *in vitro* de micronúcleos modificado.

3.0 - MÉTODOS

3.1 Infra-Estrutura

O estudo teve seu desenvolvimento experimental e analítico no Laboratório de Citogenética e Genética Molecular da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

Para o depósito legal das lâminas analisadas foi utilizado o Banco de Lâminas do Departamento de Genética de acordo com o protocolo vigente da Universidade.

3.2 Considerações sobre os Aspectos Éticos

O estudo foi aceito pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, protocolo interno UFRuralRJ 2314/2005. Os voluntários do estudo (n=5) assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, de acordo com a norma vigente.

3.3 Delineamento experimental – Agentes Testes

O delineamento experimental foi baseado nos estudos *in vitro* de Yan e Caldwell, 2004. Validado para tais fins, trata-se de um teste que utiliza um controle negativo, um controle positivo, dois agentes testes com o potencial mutagênico conhecido após ativação metabólica, dois agentes testes com potencial tóxico, porém com o potencial mutagênico não descrito.

Como controle negativo foi utilizado solução NaCl 0.9 % estéril e como controle positivo foi utilizado o fármaco mitomicina C (CAS 50-07-7) .

A mitomicina C é um antimetabólito alquilante bifuncional derivado do *Streptomyces caespitosus* (CALABRESI,1990). Seu mecanismo de ação baseia-se na inibição seletiva da síntese de DNA, recombinação gênica, troca de cromatinas irmãs e fragmentação do DNA. (CARRANO, 1979). A Mitomicina C

possui a capacidade de formação de micronúcleos sem prévia ativação metabólica enzimática. (FENECH, 2002) (CORVI, 2008).

A ciclofosfamida (CAS 50-18-0) e dimetilnitrosamina (CAS 62-75-9) são agentes testes com potencial mutagênico que necessitam de ativação metabólica e foram escolhidos para o presente estudo.

A ciclofosfamida é um agente alquilante inativo da classe química das mostardas nitrogenadas. É um potente imunodepressor, atuando em células com alta atividade mitótica após ativação metabólica, inibindo tanto a resposta imune humoral quanto celular (BACH & STROM, 1986) (SANDERSON, 2001). As concentrações : 160 µg/ml, 80 µg/ml e 40 µg/ml utilizadas para este estudo foram baseadas nos trabalhos de AU,1990.

A dimetilnitrosamina é um composto N-nitroso da classe química das nitrosaminas. Este composto surge como produto da reação de aminas ou aminoderivados com agentes nitrosantes. (SOFUNI, 2000). Esta classe de composto requer ativação metabólica para expressar a atividade mutagênica e carcinogênica (SCHULLER, 2007). O modelo químico para a ação mutagênica e carcinogênica da dimetilnitrosamina foi elucidado por LEÃO & PAVÃO, 2001 e é definido como “modelo combinado de transferência de elétrons” que é baseado na capacidade do DNA doar elétrons e da dimetilnitrosamina de recebê-los

As nitrosaminas são encontradas em várias amostras, como gêneros alimentícios, produtos farmacêuticos, amostras ambientais (água, solo, ar), pesticidas, herbicidas, borracha, cosméticos (DYBING, 2008). Nos alimentos, estão presentes principalmente nos industrializados, como presunto, salsicha, salame e outros produtos cárneos, nos quais são formadas a partir de precursores nitrosáveis do próprio alimento e de agentes nitrosantes (FILHO, 2003).

. As concentrações utilizadas dimetilnitrosamina foram: 90 µg/ml, 45 µg/ml e 23 µg/ml (SOFUNI, 2000).

Os dois agentes testes com potencial tóxico e com seu potencial mutagênico desconhecido e de escolha para o presente estudo foram: o extrato etanólico de *Nectandra membranacea* (Sw) Griseb, e o extrato aquoso de *Solanum lycocarpum* (St. Hill). (AGRIPINO, 2004) (SÁ, 2000).

Segundo Agripino, o extrato etanólico de *Nectandra membranacea* (Sw) Griseb já havia apresentado atividade antifúngica *para Cladosporium sphaerospermum* e moderadamente tóxica para o teste na *Saccharomyces cerevisiae* (Rad+). (AGRIPINO, 2004)

O extrato aquoso de *Solanum lycocarpum* (St. Hill) possui efeito tóxico no sistema reprodutivo de camundongos (SÁ, 2000) e atividade embriotóxica em ratos (MARUO, 2003).

Os extratos foram fornecidos pelo Departamento de Química Orgânica – Produtos Naturais da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. e processados de acordo com os artigos referenciados (AGRIPINO, 2004) (SÁ, 2000) (MARUO, 2003). Foram utilizadas cinco concentrações do extrato etanólico de *Nectandra membranacea* (Sw) Griseb: 1000 µg/ml, 750 µg/ml, 500 µg/ml, 250 µg/ml, 125 µg/ml. Para o extrato aquoso de *Solanum lycocarpum* (St. Hill), foram utilizadas três concentrações 9%, 6% e 3%.

3.4 - Cultura de Linfócitos Humanos a partir de sangue total.

Com o número de cinco (três homens e duas mulheres) voluntários sadios que nos últimos 3 meses não realizaram ingestão de fármacos, não fumantes, não usuários de bebida alcoólica, e com os exames de rotina (hemograma, EAS, exame de fezes parasitológico), foram coletados 5 ml de sangue periférico em seringa descartável e transferido para cinco tubos estéreis heparinizados. Para o transporte da amostra de sangue, colocou se o tubo em posição vertical, evitando calor e agitação, a fim de prevenir hemólise. (FENECH, 2002)

O material foi processado em 4 horas após a coleta. A fração de 5 ml de sangue coletada de cada voluntário foi disposto em alíquotas de 0.5 ml em tubos individualmente. Foram obtidos 50 frascos no total para a cultura de linfócitos. Desses 50 frascos, foram randomizados de acordo com o ensaio para formar os

grupos de tratamento (controle positivo, controle negativo e agentes testes) assegurando-se a aleatoriedade do ensaio (FENECH, 2000).

Cada tratamento foi realizado com cinco (5) repetições (cinco culturas de linfócitos por tratamento) para análise dos micronúcleos.

Em um frasco de cultura contendo 5 ml de meio RPMI + 10% de soro fetal bovino + 2% de fitohemaglutinina A, adicionou se 0,5 ml de sangue + 20 µL de fração enzimática humana S9 e 280 µL PBS e incubado a 37°C em estufa com 5% de CO_2 , por 44 horas (FENECH, 2000).

Os agentes testes foram adicionadas a cultura de linfócitos humanos no período de 44 horas da cultura. Após 48 horas foram adicionados 6 µg /ml de Citocalasina B na cultura e conservado na estufa por mais 24 horas. No final de 72 horas, a cultura foi transferida para um tubo de centrífuga e centrifugada a 800 rpm, por 5 minutos. Descartou se o sobrenadante, agitando levemente a suspensão de células (sedimento). Foram adicionados vagarosamente pela parede do tubo 5 ml de solução hipotônica gelada (KCl 0,075M) e agitado novamente. Após centrifugação a 800 rpm durante 5 minutos, descartou-se o sobrenadante, agitou-se levemente o sedimento restante e foi adicionado vagarosamente pela parede do tubo, 5 ml de fixador (metanol/ácido acético 5:1) recém-preparado. Acrescentou-se 3 gotas de formaldeído (que auxilia na preservação do citoplasma) e agitou-se novamente o tubo.

O procedimento anterior foi repetido por mais duas vezes, utilizando fixador 3:1, sem o formaldeído. Após a repetição do processo acima descrito foi descartado o sobrenadante deixando aproximadamente 1 ml no tubo, agitando a suspensão de células. Realizando gotejamento da suspensão de células sobre as lâminas previamente lavadas e deixando as lâminas secarem a temperatura ambiente.

3.5 - Fração S9 Humana

A fração enzimática de fígado humano pool S9 possui a sua preparação pronta para uso e deve ser administrado por cultura de linfócitos o volume de 20 µl diluídos em 280 µl PBS (Celsis In vitro Technology, 2006).

3.6 - Técnica de citoquímica para análise de micronúcleos.

Para uma maior segurança das análises dos micronúcleos dos linfócitos humanos, foi utilizada a técnica baseada na reação de Feulgen, já que esta técnica possui a característica de corar apenas o DNA (FENECH, 2002). A reação de Feulgen é uma técnica citoquímica específica para DNA (HARDIE e colaboradores, 2002). Essa técnica se baseia na exposição de grupos aldeído na

molécula de DNA como resultado de uma hidrólise ácida, bem como na posterior ligação da pararosanilina, rosanilina ou mangenta rosa, presentes no reativo de Schiff, aos grupos aldeído formados pelo tratamento com ácido clorídrico (CHIECO & DERENZINI, 1999).

Neste método, o DNA reage com uma solução de ácido clorídrico, que retira as bases púricas e forma grupamentos aldeídos na desoxirribose. Então, é adicionado o reativo de Schiff (fucsina básica descorada pelo anidrido sulfuroso) que se combina com os radicais aldeídos para formar um composto insolúvel e vermelho.

Estudos têm sido realizados no sentido de estabelecer condições ótimas de hidrólise do DNA, uma vez que é um passo determinante para a coloração deste e, posteriormente, para a sua quantificação. No procedimento originalmente descrito por Feulgen e Rossenbeck (1924), citados por Hardie e colaboradores. (2002), recomendou-se a hidrólise a 60 °C, por 4 min, em ácido clorídrico 1 M. Porém, estudos posteriores indicaram que a hidrólise com ácido clorídrico 5 M, em temperatura ambiente (20 °C – 25 °C), por um período de tempo entre 45 e 60 minutos, era mais adequada, tanto para material fresco quanto para fixado, com o argumento de que esse processo minimiza a formação de fragmentos de DNA muito pequenos, que podem ser perdidos (KJELLSTRAND, 1977; BÖCKING e colaboradores, 1995).

3.7 - Reação de Feulgen

A metodologia para realização da reação de Feulgen em lâminas de linfócitos foi adaptada de Haroske e colaboradores (2001). As lâminas foram deixadas, por 60 minutos, em solução fixadora de formaldeído 4%. Decorrido esse tempo, as lâminas foram lavadas em água corrente, durante 10 min, secadas ao ar e colocadas em solução de ácido clorídrico (HCl) 5 M, a 25 °C, pelo tempo de 60 minutos. Após a hidrólise, as lâminas foram lavadas em água destilada por três trocas de 2 min, secadas ao ar e colocadas em câmara úmida, cobertas com Reativo de Schiff (5 g de Fucsina Básica (Merck), 15 mL de HCl 1 M, 2,23 g de K2S2O5, 1 g de carvão ativo e 85 mL de água destilada). Após 12 horas, esse material foi lavado em água sulfurosa (K2S2O5 1%) por três trocas de 2 minutos e em água destilada por 1 minuto. As lâminas foram secas ao ar , montadas com óleo de imersão (Carl Zeiss L25, com índice de refração = 1,525) e cobertas com lamínula.

3.8 – Análise e escolhas das Lâminas.

De cada frasco de cultura de linfócito correspondente ao seu grupo de tratamento foram feitas 4 lâminas para análise das células. As quatro lâminas

foram analisadas pelo método randomizado (Bioestat 5, 2007 Brasil). Assegurando mais uma vez o critério de aleatoriedade do ensaio.

3.9 - Critérios para a seleção das células

Foram consideradas células binucleadas (1000 células/lâmina); núcleos intactos, com tamanhos aproximadamente iguais, mesmo padrão de coloração e dentro do limite citoplasmático; membrana celular intacta; célula claramente distinguível das células adjacentes.

Para análise da freqüência de células micronucleadas, não foram incluídas na amostra de células analisadas aquelas com um ou mais de dois núcleos, as células necróticas e aquelas em apoptose.

3.10 - Características dos Micronúcleos a serem analisadas.

Os parâmetros utilizados para análise dos micronúcleos incluíram morfologia idêntica à dos núcleos principais; diâmetro entre 1/16 até, no máximo,

1/3 dos núcleos principais (ou entre 1/256 a 1/9 da área de um dos núcleos principais); mesma coloração dos núcleos, mas ocasionalmente pode apresentar maior intensidade; não apresentar refringências; não estar ligado ou conectado a um dos núcleos principais, Porém pode estar encostado, mas não sobreposto a um dos núcleos.

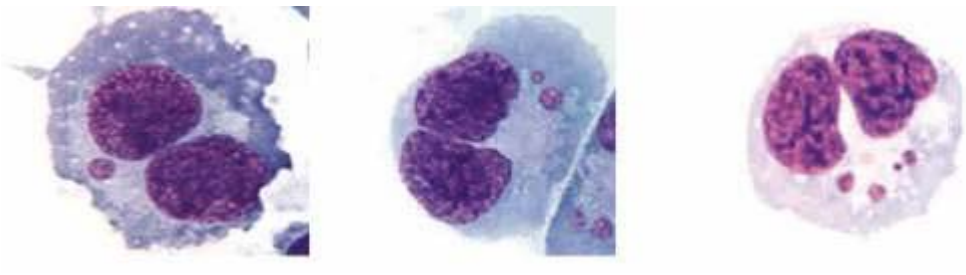


Figura 1 - Fotomicrografia de linfócitos binucleados com micronúcleos.

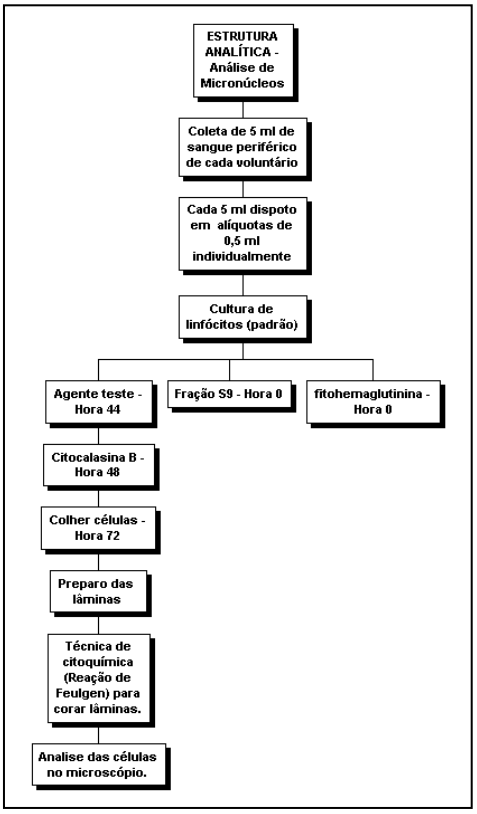
Fonte: Fenech et al. (2003)

3.11 - Análises das lâminas e determinação da freqüência de Micronúcleos

As lâminas previamente codificadas foram analisadas em teste cego, em microscópio óptico de luz, com aumento de 1000 vezes.

3.12 – Estrutura analítica do protocolo

A técnica de visualização de projetos através da Estrutura analítica possui aplicabilidade na pesquisa para facilitar a visualização do protocolo usado e de etapas cronológicas. Foi realizada através do software WBS Chart Pro®. É uma técnica de visualização aplicada no Gerenciamento profissional de projetos. (PMI, 2004).



Quadro 1 - Fluxograma da pesquisa

4.0 - RESULTADOS

A distribuição de probabilidade dos micronúcleos nos grupos analisados não apresenta distribuição normal, ao ser aplicado o teste de Kolmogorov-Smirnof. Para análise dos ensaios foi utilizado o teste não-paramétrico Kruskal-Wallis e pós teste de Student-Newman-Keuls.

Tabela 1 – Análise de formação de micronúcleos de linfócitos humanos expostos a fração enzimática humana S9.

Tratamento	*Cels. Mn*	*Cels. Não Mn*	*KW*	*SNK*
Controle negativo	07	993		
Fração S9	06	994		
Mitomicina C	49**	951	0, 002	0, 9149
Mitomicina C + Fração S9	48**	952	0, 002	0, 9149

Cels. Mn: células com micronúcleos / Cels não Mn: células não micronucleadas

KW: p-valor do teste não-paramétrico Kruskal-Wallis.

SNK: p-valor do pós-teste Student-Newman-Keuls.

Na tabela 1 observa-se que há uma maior freqüência de micronúcleos nos grupos tratados com Mitomicina C (p-valor= 0,0020) . Quando comparado pelo post teste de Student-Newman-Keuls os dois grupos tratados com Mitomicina C são semelhantes quanto à formação de micronúcleos (p-valor = 0,9149). O grupo tratado com apenas a fração enzimática humana S9 é semelhante ao controle negativo (p-valor= 0.9149).

Tabela 2 - Análise de formação de micronúcleo em linfócitos humanos expostos a ciclofosfamida na presença da fração S9.

Tratamento	*Cels. Mn*	*Cels. Não Mn*	*KW*	*SNK*
Controle negativo	06	994		
Mitomicina C	48*	952	0,0036	0,1974
Ciclofosfamida 160 µg/ml	52*	948	0,0036	0,3230
Ciclofosfamida 80 µg/ml	51*	949	0,0036	0.7636
Ciclofosfamida 40 µg/ml	49*	951	0,0036	0,3445

Cels. Mn: células com micronúcleos / Cels não Mn: células não micronucleadas

KW: p-valor do teste não-paramétrico Kruskal-Wallis.

SNK: p-valor do pós-teste Student-Newman-Keuls.

Observa-se na tabela 2 que os grupos tratados com ciclofosfamida na presença da fração S9 humana obtiveram uma maior freqüência de micronúcleos (p-valor= 0,0005). O grupo tratado com ciclofosfamida não possui diferença estatisticamente significativa comparada ao controle positivo - Mitomicina C .

Tabela 3 - Análise de formação de micronúcleo em linfócitos humanos expostos a ciclofosfamida na ausência da fração S9.

Tratamento	*Cels. Mn*	*Cels. Não Mn*	*KW*	*SNK*
Controle negativo	05	995		0,002
Mitomicina C	47*	953	0,0023	
Ciclofosfamida 160 µg/ml	04	996		0,0072
Ciclofosfamida 80 µg/ml	03	997		0,0018
Ciclofosfamida 40 µg/ml	04	996		0,0072

Cels. Mn = células com micronúcleos / Cels não Mn = células não micronucleadas

KW: p-valor do teste não-paramétrico Kruskal-Wallis.

SNK: p-valor do pós-teste Student-Newman-Keuls

Observa-se na tabela 3 que os grupos tratados com ciclofosfamida na ausência da fração S9 humana possuem a freqüência de formação de micronúcleos semelhante ao controle negativo (p-valor= 0,0023). E a maior freqüência de micronúcleos é observada no controle positivo – Mitomicina C.

Tabela 4 - Análise de formação de micronúcleo em linfócitos humanos expostos a dimetilnitrosamina na presença da fração S9.

Tratamento	*Cels. Mn*	*Cels. Não Mn*	*KW*	*SNK*
Controle negativo	06	994		
Mitomicina C	50*	950	0,0060	0,4918
Dimetilnitrosamina 90 µg/ml	46*	954	0,0060	0,7473
Dimetilnitrosamina 45 µg/ml	44*	956	0,0060	0,7149
Dimetilnitrosamina 23 µg/ml	43*	957	0,0060	0,5192

Cels. Mn = células com micronúcleos / Cels não Mn = células não micronucleadas

KW: p-valor do teste não-paramétrico Kruskal-Wallis.

SNK: p-valor do pós-teste Student-Newman-Keuls.

Observa-se na tabela 4 que os grupos tratados com Dimetilnitrosamina na presença da fração S9 humana possuem a freqüência de micronúcleos estatisticamente significativa (p-valor= 0,0060). O grupo tratado com Dimetilnitrosamina não possui diferença estatisticamente significativa comparada ao controle positivo - Mitomicina C.

Tabela 5 - Análise de formação de micronúcleo em linfócitos humanos expostos a dimetilnitrosamina na ausência da fração S9.

Tratamento	*Cels. Mn*	*Cels. Não Mn*	*KW*	*SNK*
Controle negativo	06	994		0, 0018
Mitomicina C	50*	950	0, 0063	
Dimetilnitrosamina 90 µg/ml	07	993		0, 0072
Dimetilnitrosamina 45 µg/ml	08	992		0, 0141
Dimetilnitrosamina 23 µg/ml	07	993		0, 0072

Cels. Mn = células com micronúcleos / Cels não Mn = células não micronucleadas
KW: p-valor do teste não-paramétrico Kruskal-Wallis.
SNK: p-valor do pós-teste Student-Newman-Keuls.

Observa se na tabela 5 que os grupos tratados com Dimetilnitrosamina na ausência da fração S9 humana não possuem diferença estatisticamente significativa quanto a freqüência de micronúcleos (p-valor= 0,0063). Os grupos tratados com Dimetilnitrosamina são semelhantes na freqüência de micronúcleos ao controle negativo – Solução NaCl 0,9%.

Tabela 6 – Análise de formação de micronúcleo em linfócitos humanos expostos a Extrato etanólico de *Nectandra membranacea* (Sw) Griseb na presença da fração S9.

Tratamento	*Cels. Mn*	*Cels. Não Mn*	*KW*	*SNK*
Controle negativo	07	993		0,0004
Mitomicina C	52*	948	0,0073	
Ext.Nec 1000 µg/ml	09	991		0,0063
Ext.Nec 750 µg/ml	10	990		0,0168
Ext.Nec 500 µg/ml	10	990		0,0168
Ext.Nec 250 µg/ml	09	991		0,0063
Ext.Nec 125 µg/ml	10	990		0,0168

Cels. Mn = células com micronúcleos / Cels não Mn = células não micronucleadas

KW: p-valor do teste não-paramétrico Kruskal-Wallis.

SNK: p-valor do pós-teste Student-Newman-Keuls.

Observa-se na tabela 6 que apenas o controle positivo Mitomicina C possui maior freqüência na formação de micronúcleos (p-valor= 0,0073). Os grupos tratados com extrato de extrato etanólico de *Nectandra membranacea* (Sw) Griseb nas suas cinco concentrações e na presença de fração S9 foram semelhantes ao controle negativo na formação de micronúcleos.

Tabela 7 – Análise de formação de micronúcleo em linfócitos humanos expostos a Extrato etanólico de *Nectandra membranacea* (Sw) Griseb na ausência da fração S9.

Tratamento	*Cels. Mn*	*Cels. Não Mn*	*KW*	*SNK*
Controle negativo	07	993		0,0001
Mitomicina C	52*	948	0,0009	
Ext.Nec 1000 µg/ml	11	989		0,0175
Ext.Nec 750 µg/ml	12	988		0,0183
Ext.Nec 500 µg/ml	11	989		0,0175
Ext.Nec 250 µg/ml	11	989		0,0175
Ext.Nec 125 µg/ml	09	991		0,0016

Cels. Mn = células com micronúcleos / Cels não Mn = células não micronucleadas

KW: p-valor do teste não-paramétrico Kruskal-Wallis.

SNK: p-valor do pós-teste Student-Newman-Keuls.

Observa-se na tabela 7 que apenas o controle positivo Mitomicina C possui maior freqüência na formação de micronúcleos (p-valor= 0,0009). Os grupos tratados com extrato etanólico de *Nectandra membranacea* (Sw) Griseb nas suas cinco concentrações foram semelhantes ao controle negativo na formação de micronúcleos.

Tabela 8 - Análise de formação de micronúcleo em linfócitos humanos expostos ao Extrato aquoso *Solanum lycocarpum* (St. Hill) na presença da fração S9 .

Tratamento	*Cels. Mn*	*Cels. Não Mn*	*KW*	*SNK*
Controle negativo	06	994		0,0002
Mitomicina C	49*	951	0,0017	
Sl lycocarpum 9%	11	989		0,0168
Sl lycocarpum 6%	10	990		0,0141
Sl lycocarpum 3%	08	992		0,0035

Cels. Mn = células com micronúcleos / Cels não Mn = células não micronucleadas
KW: p-valor do teste não-paramétrico Kruskal-Wallis.
SNK: p-valor do pós-teste Student-Newman-Keuls.

Observa-se na tabela 8 que apenas o controle positivo Mitomicina C possui maior freqüência na formação de micronúcleos (p-valor= 0,0017). Os grupos tratados com Extrato aquoso *Solanum lycocarpum* (St. Hill) na presença da fração S9 nas suas três concentrações foram semelhantes ao controle negativo na formação de micronúcleos

Tabela 9 - Análise de formação de micronúcleo em linfócitos humanos expostos ao Extrato aquoso *Solanum lycocarpum* (St. Hill) na ausência da fração S9.

Tratamento	*Cels. Mn*	*Cels. Não Mn*	*KW*	*SNK*
Controle negativo	06	994		0,0008
Mitomicina C	50*	950	0,0044	
Sl lycocarpum 9%	09	991		0,0198
Sl lycocarpum 6%	09	991		0,0198
Sl lycocarpum 3%	07	993		0,0032

Cels. Mn = células com micronúcleos / Cels não Mn = células não micronucleadas

KW: p-valor do teste não-paramétrico Kruskal-Wallis.

SNK: p-valor do pós-teste Student-Newman-Keuls

Observa-se na tabela 9 que apenas o controle positivo Mitomicina C possui maior freqüência na formação de micronúcleos (p-valor= 0,0044). Os grupos tratados com Extrato aquoso *Solanum lycocarpum* (St. Hill) nas suas três concentrações foram semelhantes ao controle negativo na formação de micronúcleos

5.0 - DISCUSSÃO

O ensaio realizado com as substâncias ciclofosfamida e dimetilnitrosamina e os extratos de *Nectandra membranacea* (Sw) Griseb e *Solanum lycocarpum* (St. Hill) apresentou resultados estaticamente significantes de acordo com a expectativa teórica que a fração humana S9 realiza o processo de ativação metabólica *in vitro* na cultura de linfócitos e não interfere na formação de micronúcleos na cultura de linfócitos. A presente discussão aprecia criticamente os mecanismos genotóxicos relacionados aos extratos e a aplicação da fração S9 humana no teste *in vitro* do micronúcleo em linfócitos humanos.

5.1 - Aplicação da fração humana S9 e análise de ativação metabólica.

A fração humana S9 não apresentou efeito mutagênico de forma isolada (p-valor= 0,0020). Não potencializou a ação da Mitomicina C, pois quando comparada os tratamentos com Mitomicina C e Mitomicina C com adição de fração humana S9 foram estaticamente semelhantes (p-valor= 0,9149).

Assegurando o seu uso no teste do Micronúcleo em culturas de linfócitos, já que não configura um fator gerador de micronúcleos. SIDDIQUE E AFZAL, (2004) ao analisarem a formação de aberrações cromossômicas estruturais através da exposição de linfócitos humanos ao contraceptivo oral - diacetato de etinodiol – verificaram também que a fração S9 humana não potencializou as aberrações cromossômicas analisadas *in vitro*.

A hipótese que a fração S9 humana no sistema *in vitro* é um fator coadjuvante a este sistema de análises e que não há uma interferência é corroborada por CHOU, (2005) que em seu estudo de células tumorais humanas verificou não haver potencialização desta fração.

A atividade mutagênica apresentada pela ciclofosfamida na presença da fração S9 humana (p-valor 0.0005) é semelhante ao que THYBAUD, (2006) encontraram no estudo *in vitro* de células dérmicas humanas, em que o grupo tratado com ciclofosfamida após ativação metabólica apresentou atividade mutagênica significativa (p-valor = 0.001). Estes autores ratificam que o uso da fração S9 humana deve ser utilizado como uma técnica para elucidação de mecanismos mutagênicos em que o agente teste requer o uso de ativação metabólica.

A característica do grupo tratado com ciclofosfamida na ausência de fração S9 humana ser semelhante ao tratamento do controle negativo (p-valor= 0,0023), não apresentando atividade mutagênica, é confirmado por CORVI, (2008) ao avaliar retrospectivamente a validação do teste do micronúcleo *in*

vitro, afirma a necessidade de um sistema de ativação metabólica para ensaios que utilizem ciclofosfamida na formação de micronúcleos em modelos *in vitro*.

WAGNER, (1981) ao elucidar e discutir o mecanismo farmacocinético da ciclofosfamida demonstra que a molécula é inativa até ser metabolizada no fígado pelas oxidases de função mista. E após esta ativação apresenta a ação alquilante e imunossupressora.

A dimetilnitrosamina apresentou comportamento semelhante ao da ciclofosfamida o que é corroborado por BONASSI (2001) e IARMARCOVAI, (2008). BONASSI ao discutir os efeitos da dimetilnitrosamina no risco ao câncer confirma a necessidade de um sistema enzimático para que sejam realizados testes *in vitro* na classe química das nitrosaminas. IARMARCOVAI, (2008) em seu estudo meta-analítico ratifica o uso de um sistema de ativação metabólica para a dimetilnitrosamina, no qual descreve que o efeito da dimetilnitrosamina está relacionado à fase II do sistema de ativação metabólica.

SCHULLER, (2007) ao discutir o mecanismo de ligação das nitrosaminas nos receptores nicotínicos ratifica a hipótese apresentada que a expressão de toxicidade das nitrosaminas possui relação direta com ativação metabólica que ocorre no fígado.

O teste do micronúcleo aqui modificado com a presença da fração S9 humana aplicada aos dois agentes testes – ciclofosfamida e dimetilnitrosamina –

demonstrou ser eficaz na ativação metabólica destas moléculas para que apresentem seus efeitos mutagênicos no modelo *in vitro.*

Um sistema de ativação metabólica que possui um maior grau de semelhança com o que ocorre na metabolização de moléculas (xenobióticos) do organismo humano beneficia e favorece a extrapolação para o valor preditivo sobre as análises de risco em mutagenicidade é confirmado por PLANT, (2004) em seu estudo que discuti as áreas do DNA relacionadas aos micronúcleos.

5.2 - Análise do extrato de *Nectandra membranacea* (Sw) Griseb.

O teste do micronúcleo *in vitro* modificado aplicado ao extrato etanólico de *Nectandra membranacea* (Sw) Griseb demonstra que o extrato não possuiu atividade mutagênica estatisticamente significativa com ou sem a presença da fração S9 humana sobre os linfócitos humanos. Assim, a toxicidade apresentada anteriormente no estudo de Agripino, (2004) atividade antifúngica (*Cladosporium sphaerospermum*) e atividade tóxica moderada para o teste de *Saccharomyces cerevisiae* (Rad+) não possui correlação com uma ação no DNA.

VARANDA, (2006) apresenta alguns mecanismos tóxicos não relacionados diretamente ao núcleo celular. Estes mecanismos podem ser relacionados à ação no potencial das proteínas transmembranas e ou processo redutivo nas mitocôndrias.

5.3 – Análise do extrato de *Solanum lycocarpum* (St. Hill).

O teste do micronúcleo modificado *in vitro* aplicado ao extrato aquoso de *Solanum lycocarpum* (St. Hill) demonstrou não haver atividade mutagênica significativa com e sem a presença da fração S9 humana sobre os linfócitos humanos. Os efeitos tóxicos apresentados anteriormente no sistema reprodutivo de camundongos (SÁ, 2000) e atividade embriotóxica em ratos (MARUO, 2003) não devem estar relacionados diretamente a ação no núcleo celular.

MARUO, (2003) ao realizar um estudo com tratamento crônico por via oral com extrato aquoso de *Solanum lycocarpum* (St. Hill) com ratos machos e fêmeas não observou efeitos tóxicos em órgãos alvo e alterações metabólicas (alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), albumina, creatinina, fosfatase alcalina.

O teste do micronúcleo com a presença da fração S9 humana aplicada aos dois agentes testes – extrato etanólico de *Nectandra membranacea* (Sw) Griseb e extrato aquoso de *Solanum lycocarpum* (St. Hill) sugere que os mecanismos de toxicidade destes compostos não possuem sua ação tóxica envolvendo a ação direta no núcleo celular.

ELGORASHI e colaboradores (2003) afirmam a necessidade de estudos de mutagenicidade para elucidar possíveis efeitos de produtos naturais e fitoterápicos com o objetivo de descoberta de novos farmacos, de caracterização

biológica e pesquisa sobre os efeitos colaterais e com a análise dos princípios ativos isolados de plantas (ELBLING e colaboradores., 2005; MEI e colaboradores., 2005; RIETJENS e colaboradores., 2005). Deste modo o presente estudo além de representar uma inovação no método do micronúcleo para o estudo de genotoxicidade.

6.0 - CONCLUSÃO

A inserção da fração S9 humana no método atual de análise de micronúcleos *in vitro* foi padronizado e demonstrou ser sua implementação viável e inovadora devido as seguintes vantagens:

1 - Pode aumentar a sensibilidade na avaliação de moléculas com potencial tóxicas após a ativação pelo sistema enzimático.

2 – Amplia a análise de moléculas com ação no DNA e possíveis elucidações de mecanismos de ação dos fitoterápicos, produtos naturais bem como suas substâncias isoladas.

3 – Permitiu verificar a ausência de genotoxicidade dos extratos de *Solanum lycocarpum* (St. Hill), *Nectandra membranacea* (Sw) Griseb.

4 – Permitiu analisar o efeito genotóxico das substâncias: dimetilnitrosamina e Ciclofosfamida através da técnica do micronúcleo modificada.

7.0 - REFERÊNCIAS

AGRIPINO D G, LIMA M E L, SILVA M R, MEDA C I, BOLZANI V S, CORDEIRO I, YOUNG M C M, MORENO P R H (2004) Screening of Brazilian Plants for Antimicrobial and DNA-Damaging Activities. I. Atlantic Rain Forest - Ecological Station Juréia-Itatins. Biota Neotropical 4: 1-15.

AYDEMIR N, ÇELIKLER S, BILALOGLU R (2005) In vitro genotoxic effects of the anticancer drug gemcitabine in human lymphocytes. Mutation research. 582: 35-41.

ALBERTINI R J ,ANDERSON D, DOUGLAS G R, HAGMAR L, HEMMINK K, MERLO F, NATARAJAN A T, NORPPA H, SHUKER D E G, TICE R, WATERS M. D, AITIO A (2000) IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. Mutation Research, v. 463, n. 2, p. 111-172.

AMES BN (1983) Dietary carcinogens and anticarcinogens: oxygen radicals and degenerative diseases. Science. 4617:1256-64.

ARORA S, BRITS E, KAUR K, SOHI RS, KUMAR S, VERSCHAEVE L (2005) Evaluation or genotoxicity of medicinal plant extracts by the comet and Vitotox (R) tests. J Environ Pathol Toxicol Oncol. 24:193-200.

AUA W, SOKOVAB O I, KOPNINB B, ARRIGHIA FE (1990) Cytogenetic toxicity of cyclophosphamide and its metabolites in vitro. Cytogenet Cell Genet. 26:108-116.

BALLS, M (1994) Replacement of animal procedures: alternatives in research, education and testing. Lab. Animals. 28: 193-211.

BALLS M, VAN ZELLER A M, HALDER M (2000) Progress in the reduction, refinement and replacement of animal experimentation. Amsterdam: Elsevier. pp 1795.

BISHOP J M (1991) Molecular theme is oncogenesis. Cell. 64: 235-248.

BÖCKING A, GIROUD F, REITH A (1995) Consensus report of ESACP task force on standardization of diagnostic DNA image cytometry. Analytical Cellular Pathology. 8: 67-74.

BONASSI S, ZNAOR A, CEPPI M, LANDO C, CHANG WP, HOLLAND N, VOLDERS MICHELINE, ZEIGER E, BAN S, BARALE R, BIGATTI MP, BOLOGNESI C, CEBULSKA-WASILEWSKA A, FABIANOVA E, FUCIC A, HAGMAR L, JOKSIC G, MARTELLI A, MIGLIORE L, MIRKOVA E, SCARFI MR, ZIJNO A, NORPPA H, FENECH M (2006) An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. Carcinogenesis. 14: 10-1093.

BRAMBILLA G, MARTELLI A (2006) Genotoxicity and carcinogenicity studies of antihypertensive agents. Mutation research. 612: 115-149.

BRASIL. Portaria Interministerial nº 19, de 29 de janeiro de 1981. Uso, distribuição e comercialização de bifenilas policloradas. Mistério do Interior.

BRITO A S (1994) Manual de ensaios toxicológicos in vivo. Campinas, SP: Editora Unicamp pp15-50.

BROCK N (1967) Pharmacologic characterization of cyclophosphamide and cyclophosphamide metabolites. Cancer Chemoter. Rep. 51: 315-325.

BRODE S, COOKE A (2008) Immune-potentiating effects of the chemotherapeutic drug cyclophosphamide. Crit Rev Immunol. 28(2):109-126.

BURRIL W, LEVINE E.L, HINDOCHA P, ROBERTS S A, SCOTT D (2000) Technica report: the use of cryopreserved lymphocytes in assessing inter-individual radiosensitivity with the micronucleus assay. Int. J. Radiat. Biol. 76: 375-382.

BUTLLETÍ G (1999) Reacciones adversas relacionadas con la metabolización de los fármacos. Pamplona, Butlletí Groc, Barcelona. 12(3): 9-11.

CALABRESI P, CHABNER B A (1990) Antineoplastic agents. In: Goodman Gilman A, Rall TW, Nies AS, Taylor P, editors. Pharmacological basis of therapeutics. 8th ed. New York: Pergamon Press; p.1247-8.

CALDAS L Q A, OLEJ B (2004) Universidade Federal Fluminense. Centro de Pesquisa Clínica, Unidade de Farmacologia e Toxicologia Clínica. Avaliação clínica de composto fitoterápico para o tratamento de herpes labial: relatório final. ANVISA. Rio de Janeiro, pp1-150.

CARRANO A V, THOMPSON L H, STRETKA D G, MINKLER J L, FRONG S (1979) DNA crosslinking sister chromatid exchange and specific locus mutation. Mutation research. 63: 175-88.

CARTER S B (1967) Effects of cytochalasin on mammalian cells. Nature. 213: 261-264.

CELSIS IN VITRO TECHNOLOGY ® (2006). In Vitro Technologies Reference List. In press 3 ed. USA

CHIECO P, DERENZINI M (1999) The Feulgen reaction 75 years on. Histochemistry and Cellular Biology. 111: 345-358,

CHOU T C, DONG H, ZHANG X, TONG WP, DANISHEFSKY S J (2005) Therapeutic cure against human tumor xenografts in nude mice by a microtubule stabilization agent Fludelone, via Parenteral or Oral Route. Cancer Research. 65: 9445-9454

CLARE M G, LOREZON G., AKHURST L C, MARZIN D, DELFT J, MONTERO R, BOTTA A, BERTENS A, CINELLI S, THYBAUD V, LORGE E (2006) SFTG international collaborative study on in vitro micronucleus test II. Using human lymphocytes. Mutation research. 607:37-60.

CLARKE R, LEONESSA F, WELCH J N, SKAAR TC. (2001). Cellular and molecular pharmacology of antiestrogen action and resistance. Pharmacol. Rev., 53: 25-72.

CORVI R, S. ALBERTINI T, HARTUNG S, HOFFMANN D, MAURICI S, PFUHLER J V, BENTHEM P (2008) ECVAM retrospective validation of in vitro micronucleus test (MNT). Mutagenesis. 23: 271–283,

Compendium of Pharmaceuticals and Specialties. (2006) Cytoxan®. Canadian Pharmacists Association. pp 25-150.

DARIO L S, ROSA M A, MARIELA E, ROBERTO G, CATERINA C (2008) Chromatin remodeling agents for cancer therapy. Rev Recent Clin Trials. 3:192-203.

DIPASQUALE L C, HAYES A W (2001) Acute toxicity and eye irritancy. In: HAYES, A. W. Principles and methods of toxicology. 4.ed. London: Taylor & Francis,. cap. 18, p. 853-916.

DYBINGA E, O'BRIENB J, RENWICKC AGT (2008) Sannerd Risk assessment of dietary exposures to compounds that are genotoxic and carcinogenic—An overview, Toxicology Letters. 180: 110–117.

ELBLING L, WEISS RM, TEUFELHOFER O, UHI M, KNASMUELLER S, SCHULTE-HERMANN R, BERGER W, MICKSHE M (2005) Green tea extract and (-)-epigallocatechin-3-gallate,the major tea catechin, exert oxidant but lack antioxidant activities. FASEBJ 19: 248-437.

ELGORASHI EE, TAYLOR JLS, MAES A, VAN STADEN J, DE KIMPE N, VERSCHAEVE L (2003) Screening of medicinal plants used in South African traditional medicine for genotoxic effects. Toxicology Letters.143:195-207.

FENECH M, MORLEY A (1985) Solutions to the kinetic problem in the micronucleus test. Cytobios, 43: 223-246.

FENECH M (1997) The advantages and disadvantages of the cytokinesis-block micronucleus method. Mutation research. 392: 11-18

FENECH M, CROTT J, TURNER J, BROWN S (2002) Necrosis, apoptosis, cytostasis and DNA damage in human lymphocytes measured simultaneously within the cytokinesis-block micronucleus assay: description of the method and results for hydrogen peroxide, Mutagenesis 14 (6): 605–612.

FENECH M, HOLLAND N, CHANG W P, ZEIGER E, BONASSI S (1999) The HUMN project—an international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans, Mutation research. 428: 271–283.

FENECH M (2000) The in vitro micronucleus technique. Mutation research. 455: 81–95.

FENECH M, BONASSI S, TURNER J, LANDO C, CEPPI M, CHANG W P, HOLLAND N et al (2003) Intra- and inter-laboratory variation in the scoring of micronuclei and nucleoplasmic bridges in binucleated human lymphocytes. Results of an international slide-scoring exercise by the HUMN project, Mutation research. 534 (1–2): 45–64.

FERREIRA-MACHADO SC, RODRIGUES M P, NUNES A P M, DANTAS F J S, MATTOS J C P, SILVA C R, MOURA E G, BEZERRA R J A C, CALDEIRA ARAÚJO A (2004) Genotoxic potentiality of aqueous extract prepared from *Chrysobalanus icaco* L. leaves. Toxicology Letters.151: 481-487.

FILHO PJ S, ZANIN K D, CARAMÃO E B, RIOS R C G A, VALCÁRCEL M (2003) Pré-Concentração De Nitrosaminas A Partir De Amostras Aquosas Por Extração Em Fase Sólida E Cromatografia Capilar Eletrocinética Micelar . Quimica. Nova, 26: 193-196.

FLECKNELL P A (1994) Refinement of animal use – assessment and alleviation of pain and distress. Lab. Animals. 28: 222-231.

FONSECA C A, PEREIRA D G (2004) Aplicação da genética toxicológica em plantas com atividade medicinal. Rev. Pharm. Bras. 16: 51-54.

FORNI M (2007) Laboratory animal science: a resource to improve the quality of science. Vet Res Commun. 31 1:43-47.

FUTUYMA D (2005) Evolution. 2°ed, Boston : Sinauer Associates. cap. 1,2, p.5 – 17

GUIMARAES R, SANTOS L M P, ANGULO-TUESTA A (2006) Defining and implementing a National Policy for Science, Technology, and Innovation in Health: lessons from the Brazilian experience. Cad. Saúde Pública. 22: 9-5

HARDIE D C, GREGORY T R, HEBERT P D N (2002) From pixels to picograms: a beginners' guide to genome quantification by Feulgen image analysis densitometry. Journal of Histochemistry and Cytochemistry. 50: 735-749.

HAGMAR L, BONASSI S, STRÖMBERG U, MIKOCZY Z, LANDO C, HANSTEEN I-L, MONTAGUD A H, KNUDSEN L, NORPPA H, REUTERWALL C, TINNERBERG H, BROGGER A, FORNI A, HÖGSTEDT B, LAMBERT B, MITELMAN F, NORDENSON I, SALOMAA S, SKERFVING S (1998). Cancer predictive value of cytogenetic markers used in occupational health surveillance programs: A report from an ongoing study by the European Study Group on Cytogenetic Biomarkers and Health. Mutation Research, 405:171-178.

HAROSKE G, BAAK, J P A, DANIELSEN H, GIROUD F, GSCHWENDTNER A, OBERHOLZER M, REITH A, SPIELER P, BÖCKING A (2001) Fourth updated ESACP consensus report on diagnostic DNA image cytometry. Analytical Cellular Pathology 23: 89-95.

HEALTH EFFECTS TEST GUIDELINES OPPTS 870.5395 (1998) Mammalian Erythrocyte Micronucleus EPA Test. pp 1-10.

HONKAKOSKI P & NEGHISHI M (1997) The structure, function and regulation of cytochrome P450 2A enzymes. Drug Metab. Rev. 29: 977-996.

HORAK C E, LEE J H, MARSHALL JC, SHREEVE S M, STEEG P S (2008) The role of metastasis suppressor genes in metastatic dormancy. APMIS. 116(7-8):586-601.

HOUTGRAAF J H, VERSMISSEN J, VAN DER GIESSEN W J (2006) A concise review of DNA damage checkpoints and repair in mammalian cells. Cardiovasc. Revasc. Med. 7: 165-172.

IARMARCOVAI G, CEPPI M, BOTTA A, ORSIE RE, BONASSI S (2008) Micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes of cancer patients: A meta-analysis . Mutation research .659(3):274-83.

Interagency Coordinating Committee on the Validation Of Alternative Methods (ICCVAM). (2008) Evaluation of the validation status of toxicological methods: General guidelines for submissions to ICCVAM. [S.l.]: National Institute of Health, rev., 2008. NIH Publication No. 99-4496. Disponível em: <http://iccvam.niehs.nih.gov/about/accept/USvEur.htm >. Acesso em: 05 jun.

IRISH J C, BERNSTEIN A (1993) Oncogenes in head and neck cancer. Laryngoscope, 103:42-52.

JIMENEZA J, RIVERÓN-NEGRETE L, ABDULLAEV F, ESPINOSA-AGUIRRE J, RODRIGUEZ-ARNAIZA R (2008) Cytotoxicity of the b-carboline alkaloids harmine and harmaline in human cell assays in vitro. Experimental and Toxicologic Pathology. 60: 381–389.

JEFFREY A M, WILLIAMS G M (2005) Risk Assessment of Dna-Reactive Carcinogens in Food. Toxicol. Appl. Pharm. 207: 628-S635.

KANAI Y (2008) Alterations of DNA methylation and clinical pathological diversity of human cancers. Pathol Int. 58(9):544-58.

KJELLSTRAND P P T (1977) Temperature and acid concentration in the search for optimum Feulgen hydrolysis conditions. Journal of Histochemistry and Cytochemistry. 25: 129-134.

KIRSCH-VOLDERS M, VANHAUWAERT A, DE BOECK M, DECORDIER I (2002) Importance of detecting numerical versus structural chromosome aberrations. Mutation research. 504: 137-148.

KIRSCH-VOLDERS M, VANHAUWAERT A, EICHENLAUB-RITTER U, DECODIER I (2003) Indirect mechanisms of genotoxicity. Toxicology Letters. 140/141: 63 74.

LLAMA E.F. & AVENDAÑO C (1993) Principios de farmacocinética y metabolismo de fármacos. In: AVENDAÑO C (ed.). Introducción a la Química Farmacéutica. Madri: Interamericana-McGraw Hill. 15-25 pp.

LINDBERG H K, XU W, JÄRVENTAUS H, FALCK G C.-M, NORPPA H, FENECH M (2007) Origin of nuclear buds and micronuclei in normal and folate-deprived human lymphocytes. Mutation research. 617: 33-45

LOHMAN P H M, GENTILE J M, GENTILE G, FERGUSON L R (2001) Antimutagenesis/anticarcinogenesis: screening, methods and biomarkers. Mutation research. 496:1-4.

LOUREIRO A P M, Di Mascio P , Medeiros M H G (2002) . Formação de adutos exocíclicos com bases de DNA: implicações em mutagênese e carcinogênese. Química Nova, São Paulo, v. 25, n. 5, p. 777-793.

MARON D M, AMES B N (1983) Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. Mutation Research. 113:173-215.

MARUO V M, BERNARDI M M, SPINOSA H S (2003a) Toxicological evaluations of long-term consumption of Solanum lycocarpum St. H fruits in male and female adult rats. Phytomedicine. 10: 48–52.

MARUO V M, SOARES M.R, BERNARDI M M, SPINOSA H S (2003 b) Embryotoxic effects of Solanum lycocarpum St. Hill fruits consumption during preimplantation and organogenesis in rats. Neurotoxicology and Teratology. 25 627–631.

MEYER O (2003) Testing and assessment strategies, including alternative and new approaches. Toxicology Letters. 140-141: 21-30.

MINAMOTO T, MAI M, RONAI Z (1999) Environmental factors as regulators and effectors of multistep. Carcinogenesis. 20: 519–527.

MOORE M M, HONMA M, CLEMENTS A T, BOLCSFOLDI G, COLE J, GOLLAPUDI B, HARRINGTON-BROCK K, MITCHELL A, MUSTER W, MYHR B, O'DONOVAN M, OULDELHKIM M-C, SAN R, SHIMADA H, STANKOWSKI L F J (2000) Mouse lymphoma thymidine kinase locus gene mutation assay: International worshop on genotoxicity test procedures workgroup report. Environ. Mol. Mutagen 35: 185-190.

MORALES-RAMÍREZ P, MIRANDA-PASSAYE S, CRUZ-VALLEJO V L, VALLARINO-KELLY T, MENDIOLA-CRUZ M T (2006) Kinetic of genotoxic expression in the pharmacodynamics of busulfan. Arch. Med. Res. 37:316-321.

MOREIRA R R D, SANTOS L E, VARELLA S D, VARANDA E A, VILEGAS W (2002) Avaliação da atividade mutagênica do extrato etanólico bruto de (*Paepalanthus latipes* Eriocaulaceae) e dos compostos flavonoídicos 7-metoxilados relacionados. Rev. Bras. Farmacognosia.12: 11-19.

NG A K, TAYLOR G M, EDEN O B (2006) Genotoxicity of etoposide: greater susceptibility of MLL than other target genes. Cancer Genet. Cytogen.164:164-167.

NORPPA H, FALCK G C-M (2003) What do human micronuclei contain? Mutagenesis. 18: 221 - 233.

PAGES V, AND FUCHS R P. (2002) How DNA lesions are turned into mutations within cells? Oncogene, 21, 8957-8966.

OLSSON I A S, HANSEN A K, SANDOE P (2008) Animal welfare and the refinement of neuroscience research methods - a case study of Huntington's disease models, Lab Anim. 42: 277-283.

OECD [ORGANISATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT] (2004) Draft Proposal for a New Guideline: In Vitro Micronucleus Test, Paris: OECD. 13 pp.

PACHECO A O, HACKEL C (2002) Instabilidade cromossômica induzida por agroquímicos em trabalhadores rurais da região de Passo Fundo. Cadernos de Saúde Pública. 18: 1675-1683.

PAES-LEME A A, MOTTA E S, MATTOS J C P, DANTAS F J S, BEZERRA, R J A C, CALDEIRA-ARAÚJO A (2005) Assessment of *Aloe vera* (L.) genotoxic potential on *Escherichia coli* and plasmid DNA. J. Ethnopharmacol. 102: 197-201.

PENTEADO J C P, VAZ J M (2001) O legado das bifenilas policloradas. Revista Química Nova. 24:.390-398.

PETERS W H M & KREMERS P G (1989) Cytocromes P450 in the intestinal mucosa of man. Biochem. Pharmacol.38: 1.535-1.538.

PLANT N (2004) Strategies for using in vitro screens in drug metabolism. Drug Discovery Today. 9: 328-336.

PMI PROJECT MANAGEMENT INSTITUTE, (2004) PMBOK Guide 3th Edition. Pensilvania- USA: PMI, pp115.

PRESTON B D, MILLER J P, MOORE R W, ALLEN J R (1981) Promoting effects of polychlorinated biphenyls (Aroclor 1254) and polychlorinated dibenzofuran-free Aroclor 1254 on diethylnitrosamine-induced tumorogênesis in the rat. J. nat. Cancer Inst. 66:509-15.

SCHUTTE S M F, ALINK E M (2005) Flavonoids and akenylbenzenes: Mechanisms of mutagenic action and carcinogenic risk. Mutation Research.. 574:124-38.

RIBEIRO L R, SALVADORI D M F, MARQUES E K. Mutagênese Ambiental. Editora da ULBRA, Edição Única, 173-198, 2003

RIO DE JANEIRO. LEI Nº 3373 DE 24 DE MARÇO DE 1999 – Proíbe o uso de substância denominada ascarel no território do Estado do Rio de Janeiro. Governo do Estado do Rio de Janeiro.

ROMERO-JIMÉNEZ M, CAMPOS-SÁNCHEZ J, ANALLA M, MUNOZ-SERRANO A, ALONSO-MORAGA A (2005) Genotoxicity and anti-genotoxicity of some traditionalmedicinal herbs. Mutation Research. 585:147-155.

RUSSEL W M S, BURCH R L (1992) The principles of humane experimental technique. London: Universities Federation for Animal Welfare (UFAW) Special Edition. Disponível em: <http:// altweb.jhsph.edu/publications/humane_exp/het-toc.htm>. Acesso em: 14 agosto.

SÁ R C S, VIREQUE A A, REIS J E , GUERRA M O (2000) Evaluation of the toxicity of Solanum lycocarpum in the reproductive system of male mice and rats. Journal of Ethnopharmacology. 73: 283-287.

SÁNCHEZ-LAMAR A, FUENTES J L, FONSECA G, CAPIRO N, FERRER M, ALONZO A, BALUJA L, COZZI R, DE SALVIA R, FIORE M, LLAGOSTERA M (2002) Assessment of the potential genotoxic risk of *Phyllantus orbicularis* HBK aqueous extract using in vitro and in vivo assays. Toxicology Letters. 136: 87-96.

SANDERSON B J S, KARA J J, HENNER W D (2001) Induction of mutant lymphocytes in cyclophosphamide- and chlorambucil-treated patients. Mutagenesis.16:197–202,

SOMASUNDARAM S, EDMUND N A, MOORE D T, SMALL G W, SHI Y Y, ORLOWSKI R Z (2002) Dietary curcumin inhibits chemotherapy-induced apoptosis in models of human breast cancer. Cancer Research. 62:3868-3875.

SCHECHTMAN L M (2002) Implementation of the 3Rs (Refinement, reduction, and replacement): Validation and regulatory acceptance considerations for alternative toxicological test methods. ILAR Journal. 43: S85-S94.

SCHULLER H M (2007) Nitrosamines as nicotinic receptor ligands. Life Sciences 80: 2274–2280.

SHIBAMOTO Y, STREFFER C, FUHRMANN C, BUDACH V (1991) Tumor radiosensitivity prediction by the cytokinesis-block micronucleus assay. Radiat. Res. 128: 293-300.

SIDDIQUE Y H, AFZAL M (2004) Evaluation of Genotoxic Potential of Ethynodiol Diacetate in Human Lymphocytes In Vitro. Current Science. 86: 1161-1165.

SLUPPHAUG G, KAVLI B, KROKAN H E (2003) The interacting pathways for prevention and repair of oxidative DNA damage. Mutation Research. 531: 231-251.

SNYDER R D, GREEN, J W (2001) A review of the genotoxicity of marketed pharmaceuticals. Mutation Research. 488:151-169.

SOFUNI T, HAYASHI M, NOHMI T, MATSUOKA A,YAMADA M, KAMATA E (2000) Semi-quantitative evaluation of genotoxic activity of chemical substances and evidence for a biological threshold of genotoxic activity. Mutation Research. 464: 97–104.

STEENKAMP V, GRIMMER H, SEMANO M, GULUMIAN M (2005) Antioxidant and genotoxic properties of South African herbal extracts. Mutation Research. 581: 35-42.

TAYLOR J L, ELGORASHI E E, MAES A, VAN GORP U, DE KIMPE N, VANSTADEN J, VERSCHAEVE L (2003) Investigating the safety of plants used in South Africantraditional medicine: testing for genotoxicity in the micronucleus and alkaline comet assays. Environ. Mol. Mutagen. 42:144-154.

THYBAUD V, AARDEMA M, CASCIANO D, DELLARCO V, EMBRY MR, GOLLAPUDI BB, HAYASHI M, HOLSAPPLE MP, JACOBSON-KRAM D, KASPER P, MACGREGOR JT, REES R (2007) Relevance and follow-up of positive results in *in vitro* genetic toxicity assays: an ILSI-HESI initiative. Mutation Research. 633(2):67-79.

TRAORE F, GASQUET M, LAGET M, GUIRAUD H, DI GREAGÓRIO C, AZAS N, DOUMBO O, TOMON-DAVID P (2000) Toxicity and genotoxicity of antimalarial alkaloid rich extracts derived from *Mitragyna inermis*. Phytother Res. 14: 608-611.

TRIPATHI R, MOHAN H, KAMAT J P (2007) Modulation of oxidative damage by natural products. Food Chem.100: 81-90.

VARANDA E A, RADDI M S G, DIAS F L, ARAÚJO M C P, GIGRAN S C A, TAKAHASHI C S, VILEGAS W (1997) Mutagenic and cytotoxic activity of an isocoumarin (paepalantine) isolated from *Paepalanthus vellozioides*. Teratogen. Carcin. Mut. 17: 85-95.

VARGAS V M F, MOTTA V E P, LEITÃO A C, HENRIQUES J A P (1990) Mutagenic and genotoxic effects of aqueous extracts of Achyrocline satureioides in prokaryotic organisms. Mutation Research. 240: 13-18.

VERSCHAEVE L, KESTENS V, TAYLOR J L, ELGORASHI E E, MAES A, VANPUYVELDE L, DE KIMPE N, VAN STADEN J (2004) Investigation of the antimutageniceffects of selected South African medicinal plant extracts. Toxicology in vitro. 8: 29-35

WAGNER T, HEYDRICH D, JORK T, VOELCKER G, HOHORST H J (1981) Comparative Study on Human Pharmacokinetics of Activated Ifosfamide and Cyclophosphamide by a Modified Fluorometric Test. J Cancer Res Clin Oncol 100:95-104.

WATKINS P B, WRINGTON S A, SCHUETZ E G, MOLOWA D T, GUZELIAN P S (1987) Identification of glucocorticoid-inducible cytochromes P450 in the intestinal mucosa of rats and man. J. Clin. Invest. 80: 1.029-1.036.

WENZEL F, RÖTHLISBERGER B (2008). Impact of tumorcytogenetics in tumor diagnostics. Ther Umsch. 65(9):473-80.

WOGAN G N, HECHT S S, FELTON J S, CONNEY A H, LOEB L A (2004) Environmental and chemical carcinogenesis. Semin. Cancer Biol.14: 473-486.

WHITE W J (2001) The use of laboratory animals in toxicology research. In: HAYES, A. W. Principles and methods of toxicology. 4.ed. London: Taylor & Francis,. cap.16, p. 773-818.

WUNSCH FILHO V, GATTAS G J F (2001) Biomarcadores moleculares em câncer: implicações para a pesquisa epidemiológica e a saúde pública. Cadernos de Saúde Pública. v. 17: 467-480.

YAN Z, CALDWELL G W (2006) Methods in Pharmacology And Toxicology – Optimization In Drug Discovery In Vitro Methods. New Jersey, 2.ed. Humana Press Inc. cap.1,15,24,25.

ZHANG H Y, YANG D P, TANG GY (2006) Multipotent antioxidants: from screening to design. Drug Discovery Today. v 11:749-754,.

Livros Grátis

(http://www.livrosgratis.com.br)

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração
Baixar livros de Agronomia
Baixar livros de Arquitetura
Baixar livros de Artes
Baixar livros de Astronomia
Baixar livros de Biologia Geral
Baixar livros de Ciência da Computação
Baixar livros de Ciência da Informação
Baixar livros de Ciência Política
Baixar livros de Ciências da Saúde
Baixar livros de Comunicação
Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE
Baixar livros de Defesa civil
Baixar livros de Direito
Baixar livros de Direitos humanos
Baixar livros de Economia
Baixar livros de Economia Doméstica
Baixar livros de Educação
Baixar livros de Educação - Trânsito
Baixar livros de Educação Física
Baixar livros de Engenharia Aeroespacial
Baixar livros de Farmácia
Baixar livros de Filosofia
Baixar livros de Física
Baixar livros de Geociências
Baixar livros de Geografia
Baixar livros de História
Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura
Baixar livros de Literatura de Cordel
Baixar livros de Literatura Infantil
Baixar livros de Matemática
Baixar livros de Medicina
Baixar livros de Medicina Veterinária
Baixar livros de Meio Ambiente
Baixar livros de Meteorologia
Baixar Monografias e TCC
Baixar livros Multidisciplinar
Baixar livros de Música
Baixar livros de Psicologia
Baixar livros de Química
Baixar livros de Saúde Coletiva
Baixar livros de Serviço Social
Baixar livros de Sociologia
Baixar livros de Teologia
Baixar livros de Trabalho
Baixar livros de Turismo