

Edith Alba Luz Segovia Corrales

“Verificação dos efeitos genotóxicos dos agentes antineoplásicos
citrato de tamoxifen e paclitaxel”

Uberlândia - Minas Gerais

Maio de 1997



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA
Campus Umuarama Bloco 2E Sala 37
38.400-902, UBERLÂNDIA - MG

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE
EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

1 - TÍTULO DA TESE: Verificação dos efeitos genotóxicos dos agentes antineoplásicos
citrato de tamoxifen e paclitaxel

2 - ALUNO: Edith Alba Luz Segovia Corrales

3 - PROFESSOR ORIENTADOR: Mário Antônio Spanó

4 - DATA: 30/ 05/ 97

5 - BANCA EXAMINADORA:
Titular Mário Antônio Spanó
Titular Warwick Estevam Kerr
Titular Salvador de Carvalho
Suplente Luiz Ricardo Goulart Filho
Suplente Denise Tavares Crispim

6 - APRESENTAÇÃO: Início - 09:10 Término - 09:55

7 - TEMPO DE ARGUIÇÃO: Início - 09:55 Término - 11:30

8 - CONCEITO ATRIBUÍDO POR EXAMINADOR:
1º Membro da Banca A
2º Membro da Banca A
3º Membro da Banca A
Conceito Final: A

9 - OBSERVAÇÕES: _____

10 - ASSINATURA DOS MEMBROS DA BANCA:
[Assinatura]
[Assinatura]
[Assinatura]

11 - RESERVADO AO COLEGIADO

Ficha Catalográfica

Corrales, Edith Alba Luz Segovia, 1966.
"Verificação dos efeitos genotóxicos dos agentes
antineoplásicos citrato de tamoxifen e paclitaxel".- Uberlândia, 1997.
84f. : il.
Orientador: Spanó, Mário Antônio
Dissertação (Mestrado) Universidade Federal de Uberlândia.
Coordenação de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.
Bibliografia: f. 72 - 84.
1. Mutagenese química - Teses. 2. Agentes antineoplasicos - Teses.
3. Citrato de tamoxifen - Teses. 4. Paclitaxel - Teses. I. Universidade Federal
de Uberlândia. Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.
CDU: 575.224.4

Universidade Federal de Uberlândia
Pós-Graduação em Genética e Bioquímica

“Verificação dos efeitos genotóxicos dos agentes antineoplásicos
citrato de tamoxifen e paclitaxel”

Aluna: Edith Alba Luz Segovia Corrales

Orientador: Prof. Dr. Mário Antônio Spanó

Dissertação apresentada à Universidade
Federal de Uberlândia, como parte das
exigências do Curso de Pós-Graduação em
Genética e Bioquímica, para obtenção do
Título de Mestre em Genética e Bioquímica

Uberlândia - MG - Brasil

1997

Dedicação

À Deus

“Tudo o que pedirdes ao Pai, em oração, crendo
que haveis de alcançar, alcançareis”

(Mateus, 21, 22)

Aos meus pais,

Pelo amor, compreensão e apoio constantes.

Agradecimentos

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Mário Antônio Spanó**, pela sua orientação, paciência e dedicação no decorrer deste trabalho.

Ao **Prof. Dr. Ulrich Graf** do Institute of Toxicology ETH and University of Zürich, Switzerland, pela co-orientação e amizade, e pelo fornecimento das linhagens mutantes de *Drosophila melanogaster* e materiais necessários para a realização dos testes para detecção de mutações e recombinações somáticas em células de asas de *Drosophila melanogaster*.

Ao **Prof. Dr. Hansjörg Frei**, do Institute of Toxicology ETH and University of Zürich, Switzerland, pela realização da análise estatística dos testes para detecção de mutações e recombinações somáticas em células de asas de *Drosophila melanogaster*.

Aos membros da banca examinadora, **Prof. Dr. Warwick Estevam Kerr**, Coordenador do Curso de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia, e **Prof. Dr. Salvador de Carvalho**, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás, pela atenção com que leram a pró forma deste trabalho e valiosas sugestões na elaboração da forma definitiva.

Ao **Prof. Júlio César Nepomuceno**, pela leitura cuidadosa do manuscrito, pelos conselhos oportunos, carinho e apoio em todos os momentos.

Ao **Prof. David George Francis**, pela leitura cuidadosa do “abstract” e sugestões apresentadas.

À **Coordenação e Professores do Curso de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica**, pela oportunidade de realizar este curso.

Ao **Departamento de Biociências**, pela colaboração fornecida por meio do empréstimo de equipamentos de laboratório.

A **Maria Seloísa Gomes**, secretária do DEGEB, e **Cleuber Honorato Pereira**, técnico do DEGEB, pelo auxílio na elaboração dos gráficos desta Dissertação.

Aos Srs. **Anselmo de Oliveira, Péricles Andrade Faria, Lázaro de Maria Perez e Orlando Americano da Silva**, funcionários do Departamento de Biociências, pela colaboração durante a realização da parte experimental.

Ao **Hospital de Clínicas** da Universidade Federal de Uberlândia, pelo fornecimento do citrato de tamoxifen.

Ao **Laboratório Bristol-Myers Squibb** (São Paulo, SP, Brasil), pelo fornecimento do paclitaxel.

A minhas amigas: *Sonia E. Almada, M. Lucila Hernandez e Edna Bruns Navarro*, por fazerem com que tudo seja mais fácil de realizar.

A minhas amigas de república e colegas de profissão: *Marta Martins Barbosa, Juliana São Julião e Wania Rezende Lima*, pelos bons momentos que passamos juntas.

À *Todos* que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito obrigada!

Este trabalho foi realizado com o apoio financeiro das seguintes
Entidades e Instituições:

- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG)
- Universidade Federal de Uberlândia

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Teste em células de medula óssea de roedores, para verificação de efeitos clastogênicos, e alterações no IM.....	3
1.2 Teste em células de medula óssea de roedores, para verificação de efeitos clastogênicos e/ou aneugênicos (Teste do MN).....	5
1.3 Teste para detecção de mutações e recombinações mitóticas induzidas em células de asas de <i>Drosophila melanogaster</i>	6
1.4 Citrato de tamoxifen (TAM).....	8
1.5 Paclitaxel (taxol).....	10
2. OBJETIVOS.....	12
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	13
3.1 Agentes químicos.....	13
3.2 Técnica para obtenção de células de medula óssea de roedores para verificação de AC e cálculo do IM (Ford e Hamerton, 1956).....	14
3.3 Técnica para obtenção de células de medula óssea de roedores para análise de MN (Schmid, 1975).....	16
3.4 Técnica para obtenção de asas de <i>D. melanogaster</i> , para análise de pêlos mutantes (Graf et al., 1984).....	18
3.5 Verificação de efeitos clastogênicos de agentes químicos por meio da análise de AC em células de medula óssea de roedores tratados <i>in vivo</i>	20
3.5.1 Verificação dos efeitos clastogênicos do TAM por meio da análise de AC em células de medula óssea de ratos Wistar tratados <i>in vivo</i>	21

3.5.2 Verificação dos efeitos clastogênicos do taxol por meio da análise de AC em células de medula óssea de camundongos Swiss albinos tratados <i>in vivo</i>	22
3.6 Verificação de efeitos clastogênicos e/ou aneugênicos de agentes químicos por meio do teste do MN em células de medula óssea de roedores tratados <i>in vivo</i>	23
3.6.1 Verificação dos efeitos clastogênicos e/ou aneugênicos do TAM por meio do teste do MN em células de medula óssea de camundongos Swiss albinos tratados <i>in vivo</i>	24
3.6.2 Verificação dos efeitos clastogênicos e/ou aneugênicos do taxol por meio do teste do MN em células de medula óssea de camundongos Swiss albinos tratados <i>in vivo</i>	25
3.7 Verificação dos efeitos mutagênicos e/ou recombinogênicos induzidos por agentes químicos em células somáticas de <i>Drosophila melanogaster</i>	25
3.7.1 Verificação dos efeitos mutagênicos e/ou recombinogênicos induzidos pelo TAM em células somáticas de <i>Drosophila melanogaster</i>	26
3.7.2 Verificação dos efeitos mutagênicos e/ou recombinogênicos induzidos pelo taxol em células somáticas de <i>Drosophila melanogaster</i>	26
4. RESULTADOS	28
4.1 Verificação dos efeitos clastogênicos, aneugênicos, mutagênicos e/ou recombinogênicos do TAM.....	28
4.1.1 Verificação dos efeitos clastogênicos do TAM em células de medula óssea de ratos Wistar tratados <i>in vivo</i>	28

4.1.2 Verificação dos efeitos clastogênicos e/ou aneugênicos do TAM por meio do teste do MN em células de medula óssea de camundongos Swiss albinos tratados <i>in vivo</i>	32
4.1.3 Verificação dos efeitos mutagênicos e/ou recombinogênicos induzidos pelo TAM em células somáticas de <i>Drosophila melanogaster</i>	35
4.2 Verificação dos efeitos clastogênicos, aneugênicos, mutagênicos e/ou recombinogênicos do taxol.....	40
4.2.1 Verificação dos efeitos clastogênicos do taxol em células de medula óssea de camundongos Swiss albinos tratados <i>in vivo</i>	40
4.2.2 Verificação dos efeitos clastogênicos e/ou aneugênicos do taxol por meio do teste do MN em células de medula óssea de camundongos Swiss albinos tratados <i>in vivo</i>	44
4.2.3 Verificação dos efeitos mutagênicos e/ou recombinogênicos induzidos pelo taxol em células somáticas de <i>Drosophila melanogaster</i>	47
5. DISCUSSÃO	52
5.1 Efeitos clastogênicos, aneugênicos, mutagênicos e/ou recombinogênicos do TAM.....	55
5.2 Efeitos clastogênicos, aneugênicos, mutagênicos e/ou recombinogênicos do taxol.....	60
6. CONCLUSÕES	64
7. RESUMO	66
8. SUMMARY	69

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	72
---	-----------

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Médias dos IM, e freqüências de células com AC (cromátide) em células de medula óssea de ratos Wistar tratados com TAM.....	30
Tabela 2: Freqüências (média \pm desvio padrão) de EPCMN, em porcentagem, observadas em camundongos Swiss albinos tratados com TAM.....	33
Tabela 3: Freqüências de manchas observadas nos descendentes MH (<i>mwh/flr³</i>) de <i>D. melanogaster</i> dos cruzamentos ST e HB, tratados com TAM.....	37
Tabela 4: Médias dos índices mitóticos (IM), e freqüências de células com AC (cromátide) e alterações numéricas em células de medula óssea de camundongos Swiss albinos tratados com taxol.....	42
Tabela 5: Freqüências (média \pm desvio padrão) de EPCMN, em porcentagem, observadas em camundongos Swiss albinos tratados com taxol.....	45
Tabela 6: Freqüências de manchas observadas nos descendentes MH (<i>mwh/flr³</i>) de <i>D. melanogaster</i> dos cruzamentos ST e HB, tratados com taxol.....	49

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Fórmulas estruturais do citrato de tamoxifen e do taxol..... 14
- Figura 2: Frequências de AC, em porcentagem, em células de medula óssea de ratos Wistar, tratados com diferentes concentrações de TAM..... 31
- Figura 3: Médias das freqüências totais de EPCMN, em porcentagem, observadas em camundongos Swiss albinos tratados com diferentes concentrações de TAM..... 34
- Figura 4. Distribuição do tamanho das manchas mutantes observadas em descendentes MH, do cruzamento ST, tratados com diferentes concentrações de TAM..... 38
- Figura 5. Distribuição do tamanho das manchas mutantes observadas em descendentes MH, do cruzamento HB, tratados com diferentes concentrações de TAM..... 39
- Figura 6. Frequências de AC (%), em células de medula óssea de camundongos Swiss albinos, tratados com diferentes concentrações de taxol..... 43

Figura 7. Média das frequências totais de EPCMN, em porcentagem, observados em células de medula óssea de camundongos Swiss albinos, tratados com diferentes concentrações de taxol..... 46

Figura 8. Distribuição do tamanho das manchas mutantes observadas em descendentes MH, do cruzamento ST, tratados com diferentes concentrações de taxol..... 50

Figura 9. Distribuição do tamanho das manchas mutantes observadas em descendentes MH, do cruzamento HB, tratados com diferentes concentrações de taxol..... 51

1. INTRODUÇÃO

A quimioterapia citotóxica é rotineiramente empregada no tratamento de doenças neoplásicas desde a década de 50. Apesar de alguns tipos de tumores mostrarem-se refratários a esse tipo de tratamento, a perspectiva de sobrevivência, para pacientes com alguns tipos de tumores, tem aumentado enormemente nos últimos anos. Embora esse aumento possa ser devido a métodos modernos de diagnóstico, muito se deve ao emprego da quimioterapia (Ferguson e Pearson, 1996).

Existe atualmente, disponível no mercado, uma grande variedade de agentes antineoplásicos, com diferentes modos de ação, sendo que a maioria, se não todos, possui efeitos tanto mutagênicos como carcinogênicos. Esses agentes podem ser alquilantes (monofuncional e bifuncional); inibidores topo II (intercalantes e não intercalantes de DNA); inibidores do fuso mitótico; antimetabólitos; enzimas; hormônios sexuais; antagonistas hormonais; agentes que clivam o DNA (geradores de radicais livres) e agentes que inibem a resposta imune (Ferguson e Pearson, 1996).

No entanto, apesar do sucesso alcançado com esses agentes, o tratamento com alguns dos mais efetivos antineoplásicos provê uma traumática experiência para o paciente, assim como um grande número de sintomas de toxicidade direta (Ferguson e Pearson, 1996).

É cada vez maior o número de descrições de indução de cânceres secundários, após a quimioterapia anticâncer. Menos bem documentado são as seqüelas mutagênicas, refletidas como uma variedade de efeitos que variam desde alterações na fertilidade, até câncer ou defeitos congênitos em filhos dos sobreviventes ao câncer (Ferguson e Pearson, 1996).

De acordo com Rabello-Gay (1992) a carcinogênese envolve vários passos, sendo que a iniciação do processo se caracteriza por uma alteração irreversível do material genético. Uma vez que a iniciação se dá por uma alteração genética, parece óbvio que todo agente capaz de danificar o DNA possa ser considerado um carcinógeno potencial.

Atualmente sabe-se que as alterações genéticas podem ser de muitos tipos, e ser induzidas por uma variedade de agentes, por vários mecanismos diferentes, alguns dos quais são parcialmente conhecidos, mas que há muito ainda para ser elucidado (Preston, 1995).

A Genética Toxicológica dedica-se ao estudo das mutações gênicas e aberrações cromossômicas, uma vez que essas mudanças genéticas são consideradas de grande importância na indução de doenças hereditárias, assim como na indução de câncer (Guzmán-Rincón e Graf, 1995).

Devido à grande associação existente entre alterações citogenéticas específicas e a carcinogênese (Mitelman, 1994) (*in* Tucker e Preston, 1996), diferentes testes citogenéticos são utilizados nas avaliações toxicológicas de agentes químicos industriais, assim como no desenvolvimento de novos compostos farmacêuticos e terapêuticos (Tucker e Preston, 1996).

Entre os testes mais utilizados, para monitorar os danos genotóxicos de agentes químicos, estão:

1) Os ensaios de mutagenicidade com:

- Microorganismos (ensaios de mutações gênicas reversas com *S. typhimurium* - Teste de Ames).
- Organismos superiores (pêlos estaminais de *Tradescantia*; meristemas radiculares vegetais, e células somáticas e germinativas de *Drosophila melanogaster*).

2) Os ensaios que detectam alterações cromossômicas numéricas e/ou estruturais em:

- Testes em linfócitos do sangue periférico humano tratados *in vivo* e/ou *in vitro*, para a verificação de efeitos clastogênicos, aneugênicos, trocas entre cromátides irmãs, e a verificação de alterações no índice mitótico (IM).
- Testes em células de medula óssea de roedores, tratados *in vivo*, para a verificação de efeitos clastogênicos, aneugênicos, trocas entre cromátides irmãs, e a verificação de alterações no IM.

Entre os agentes mais utilizados atualmente, no combate às doenças neoplásicas, estão o citrato de tamoxifen (TAM), que é um antagonista hormonal (antiestrogênico), e o paclitaxel (taxol), que é um inibidor do fuso mitótico.

Este trabalho teve como objetivo verificar os efeitos mutagênicos, recombinogênicos, clastogênicos e aneugênicos do TAM e do taxol, utilizando, como organismos testes, ratos Wistar, camundongos Swiss albinos, e linhagens mutantes de *Drosophila melanogaster*.

1.1 Teste em células de medula óssea de roedores, para verificação de efeitos clastogênicos, e alterações no IM

Testes com animais de laboratório oferecem grandes vantagens no estudo do potencial mutagênico de um composto. A primeira é, sem dúvida, o metabolismo do animal, que nunca pode ser totalmente reproduzido num sistema *in vitro*. No organismo intacto, podemos utilizar as condições de exposição a que o homem está sujeito, seja quanto à via de administração, duração do tratamento (agudo ou crônico) ou condições nutricionais. Outro aspecto importante é a especificidade do órgão alvo quanto à atividade mutagênica da substância em estudo. Um mesmo animal pode ser utilizado

simultaneamente para vários testes, dando informações sobre diferentes tipos de danos genéticos (Connor *et al.*, 1979; *in* Rabello-Gay, 1991a).

As aberrações cromossômicas encontradas podem afetar uma ou ambas as cromátides (cromatídicas ou isocromatídicas) que resultam de quebras, ou de quebras seguidas de soldadura. As quebras resultam em diminuição do tamanho do cromossomo e são identificadas por um fragmento deslocado, isto é, não alinhado ao resto da cromátide, ou que apresenta uma descontinuidade em relação ao resto do cromossomo, maior que a largura da própria cromátide. Fragmentos muito pequenos, que parecem pequenos pontos de cromatina, são denominados minutos e resultam de deleções intersticiais (Rabello-Gay, 1991a).

De acordo com Brecher (1977), as falhas acromáticas e quebras são diferentes manifestações de um mesmo evento, sendo que falhas acromáticas podem ser quebras incompletas. São consideradas falhas acromáticas, todos os fragmentos não deslocados (alinhados ao resto do cromossomo), com descontinuidade de coloração menor que a largura da cromátide.

Os tipos de aberrações que podem ser detectadas com grande precisão são trocas assimétricas, dicêntricos, anéis, deleções intersticiais e terminais (Turcker e Preston, 1996).

Para a realização deste teste sugere-se a utilização de ratos, camundongos (de 6 a 8 semanas de vida) ou hamster chinês (de 10 a 12 semanas de vida). Machos e fêmeas devem ser incluídos em igual número. O agente pode ser administrado por diferentes vias (oral, intraperitoneal, subcutânea, ou dérmica), com protocolos de tratamento de 6, 12, 24 ou 48 h (Preston *et al.*, 1987).

1.2 Teste em células de medula óssea de roedores, para verificação de efeitos clastogênicos e/ou aneugênicos (Teste do MN)

O teste do MN, *in vivo*, em células de medula óssea de mamíferos, desenvolvido por Schmid (1975) é amplamente aceito como um teste de triagem para a detecção de anomalias cromossômicas estruturais ou numéricas, induzidas por agentes clastogênicos ou aneugênicos.

Os micronúcleos, um ou vários por células, resultam de fragmentos acêntricos ou cromossomos que se atrasam em relação aos demais em sua migração para os polos da célula na anáfase (Rabello-Gay, 1991b). A análise de MN apresenta certas vantagens, quando comparado com a análise de aberrações cromossômicas, por não precisar de células metafásicas, e pela facilidade e velocidade da análise (Tucker e Preston, 1996).

Os eritrócitos jovens, formados pela expulsão do núcleo do eritroblasto, apresentam uma coloração azulada quando corado com Giemsa, porque eles ainda contêm RNA ribossômico no citoplasma e são chamados de eritrócitos policromáticos (EPCs). Eritrócitos maduros apresentam coloração alaranjada, quando corados com Giemsa, e são chamados de eritrócitos normocromáticos (ENCs) (Ribeiro *et al.*, 1993). De acordo com Heddle *et al.* (1983) (*in* Ribeiro *et al.*, 1993), a distinção entre EPC e ENC é de fundamental importância para confirmar quando o aumento na incidência de micronúcleo é realmente devida à exposição a um dado agente químico, desde que haja uma constante migração de células normocromáticas da circulação periférica para a medula óssea.

De acordo com Mavourin *et al.* (1990) (*apud* Ribeiro *et al.*, 1993), a expulsão do núcleo em células de medula óssea ocorre 6 h após a última mitose, e o estágio de EPC dura de 12 a 24 h na medula óssea, e um tempo similar em sangue periférico, antes que as células sejam transformadas em

ENCs. Assim, nenhum micronúcleo induzido por agente químico será detectado antes de 6 h após o tratamento.

O teste do MN, inicialmente descrito para a detecção de efeitos clastogênicos e/ou aneugênicos em células do sistema hematopoiético (eritrócitos) de roedores, tem sido utilizado em outros tipos celulares tais como linfócitos do sangue periférico humano (Ferrari, 1991), células uroteliais ou esfoliadas da mucosa bucal, bexiga urinária, ureter, brônquios, e do cérvix (Ribeiro, 1991), e em eritrócitos nucleados de peixes, como dosímetro biológico de áreas contaminadas (testes *in situ*) e na avaliação da genotoxicidade de compostos após exposição indireta *in vivo* (Nepomuceno e Spanó, 1992; 1995).

1.3 Teste para detecção de mutações e recombinações mitóticas induzidas em células de asas de *Drosophila melanogaster*

Graf *et al.* (1984) descreveram um teste de curta duração, para a detecção de diferentes tipos de manchas mutantes (simples ou gêmeas) que podem ser resultantes tanto de mutação, deleção, recombinação, ou não-disjunção cromossômica, ocorridas no cromossomo nº 3 de *D. melanogaster*. Este teste foi denominado de "Somatic Mutation And Recombination Test" (SMART).

A *D. melanogaster* é considerada um organismo teste ideal, para o estudo de mutações em toxicologia genética, por possuir um sistema enzimático semelhante ao dos mamíferos, que permite o metabolismo de agente xenobióticos (Barrs, 1980; Hällström *et al.*, 1984), e por ser um organismo pequeno, de fácil manutenção, tempo de geração curto, de grande progênie, e baixo número de cromossomos (Graf *et al.*, 1984).

O SMART (Graf *et al.*, 1984) foi desenvolvido para detectar a perda de heterozigose de genes que determinam a expressão de fenótipos detectáveis nas asas das moscas (Gusmán-Rincón e Graf, 1995).

Para a realização deste teste utilizam-se três linhagens mutantes de *D. melanogaster*: 1) Linhagem “multiple wing hairs” (mwh), que possui um gene mutante (*mwh*) no cromossomo nº 3 (3-0,3) em condição homozigota, que corresponde a um mutante recessivo que determina que as células da asa apresentem três ou mais pêlos, no lugar de um; 2) Linhagem “flare-3” (*flr*³), que possui um gene mutante marcador recessivo em hemizigose (*flr*³) no cromossomo nº 3 (3-38,8), que afeta os pêlos das células da asa, modificando-os, parecendo uma chama (Gusman *et al.*, 1994); 3) Linhagem “ORR; flare-3” (ORR; *flr*³), construída por Frölich e Würigler (1989), que possui um marcador recessivo em hemizigose (*flr*³) no cromossomo nº 3 (3-38,8), que afeta os pêlos das células da asa, modificando-os, parecendo uma chama, e um cromossomo nº 2, transferido de uma linhagem selvagem Oregon R (ORR), resistente ao DDT (Dapkus e Merrel, 1977). Esta linhagem “ORR; flare-3” é caracterizada por um aumento na atividade de enzimas citocromo P-450 (Hällström e Blanck., 1985; Gusmán-Rincón e Graf, 1995). A ativação de promutágenos, e de carcinógenos, é realizada pelas enzimas citocromo P-450, que consiste de várias formas de isoenzimas que têm a capacidade de metabolizar uma variedade de substratos (Frölich e Würigler, 1989). García-Bellido e Dapena (1974) e Lindsley e Zimm (1992) apresentam informações detalhadas sobre os marcadores genéticos acima descritos.

O gene *flr*³ das linhagens “flare-3” e “ORR; flare-3” é letal em homozigose. Assim sendo, ambas linhagens possuem o gene *flr*³ em hemizigose, sendo que o cromossomo homólogo, balanceador (TM3, Bd^S), apresenta inversões múltiplas (Graf *et al.*, 1984).

Atualmente, o SMART para detecção de manchas mutantes nas asas de *D. melanogaster*, tem sido realizado por meio de dois cruzamentos: 1) Cruzamento padrão (ST - Standard Cross), no qual fêmeas virgens da linhagem “flare-3” são cruzadas com machos “multiple wing hairs” (Graf *et al.*, 1989); 2) Cruzamento de alta bioativação (HB - High Bioactivation Cross), no qual fêmeas virgens da linhagem “ORR-flare-3” são cruzadas com machos “multiple wing hairs” (Graf e van Schaick, 1992). Desses cruzamentos são obtidos dois tipos de descendentes: marcador trans-heterozigoto (MH), e balanceador heterozigoto (BH). As larvas, de ambos genótipos, são tratadas com diferentes concentrações do agente químico a ser testado.

Nos adultos emergentes MH as manchas mutantes aparecem como manchas simples, apresentando o fenótipo “mwh” ou “flare”, e como manchas gêmeas, mostrando áreas adjacentes “mwh” e “flare”. Essas manchas são produzidas por mutação, deleção, recombinação, ou não-disjunção cromossômica. Nos adultos emergentes BH as manchas mutantes aparecem apenas como manchas simples do tipo “mwh”, devido à presença do cromossomo balanceador, que apresenta inversões múltiplas, o que faz com que todos os eventos recombinacionais sejam eliminados. Assim sendo, apenas os eventos mutacionais levam à formação de manchas mutantes. Durante a análise são registrados o número de manchas, assim como o tipo e o tamanho das mesmas.

1.4 Citrato de tamoxifen (TAM)

O citrato de tamoxifen (TAM) é um anti-estrógeno amplamente utilizado no tratamento de pacientes com câncer de mama, como um

coadjuvante da quimioterapia citotóxica, com o objetivo de conseguir uma atividade antitumoral adicional (Lerner e Jordan, 1990).

Em experimentos com animais, foi verificado que o TAM atua como um agonista de estrógenos no útero de fêmeas de camundongos; como agonista/antagonista de estrógenos no útero de ratas; e antagonista de estrógenos no oviducto de galinhas (Lyman e Jordan, 1985).

O TAM inibe a proliferação de células MCF-7 do câncer de mama humano, por acúmulo de células na fase G₁ do ciclo celular, e com a concomitante depleção de células nas fases S, G₂ e M (Osborne *et al.*, 1983).

Estudos realizados em várias espécies de animais têm demonstrado que o TAM é metabolizado, principalmente no fígado, em três metabólitos (tamoxifen-N-óxido; N-demetiltamoxifen; e 4-hidroxitamoxifen), sendo que metabólitos 4-hidroxitamoxifen são formados por ação de enzimas citocromo P450, e exibem atividade agonista/antagonista de estrógenos mais potente do que o tamoxifen não metabolizado (Kupfer *et al.*, 1994).

O TAM é altamente reativo com o DNA, formando aductos no DNA de fígado de ratos, camundongos e hamster (Han e Liehr, 1992; Hirsimäki *et al.*, 1993; Montandon e Williams, 1994); e leucócitos de pacientes com câncer de mama tratadas (Hemminki *et al.*, 1997).

A formação de aductos está fortemente relacionada com a carcinogenicidade observada em fígado de fêmeas de ratos Sprague-Dawley (Hard *et al.*, 1993; Hirsimäki *et al.*, 1993; Williams *et al.*, 1993; Montandon e Williams, 1994); ratos F344 (Fischer) (Carthew *et al.*, 1995a); ratos LEW (Lewis) (Carthew *et al.*, 1995a) e ratos Wistar (Greaves *et al.*, 1993; Carthew, *et al.*, 1995a; 1995b); e em hamsters sírios (Montandon e Williams, 1994).

O gene supressor de tumor (*p53*) é o elemento central na regulação do ciclo celular (Lane, 1992). Foi verificado que o tratamento com TAM acarreta diminuição no nível de proteínas *p53*, em células de adenocarcinoma de mama humana (Guillot *et al.*, 1996); e uma alta frequência de mutações induzidas no gene *p53* em hepatocarcinomas de fêmeas Sprague-Dawley (Vancutsem *et al.*, 1994).

TAM induziu um aumento na frequência de mutações no gene *lacI* em ratos transgênicos (Big BlueTM); aneuploidia, endoreduplicação, AC e despolimerização de fibras do fuso, em hepatócitos de rato Sprague-Dawley (Sargent *et al.*, 1994); efeitos clastogênicos e/ou aneugênicos em células linfoblastóides humanas (Styles *et al.*, 1994); em células de medula óssea de camundongos (Vijayalaxmi e Padmalatha Rai, 1996); e em células de medula óssea de ratos e células linfoblastóides humanas, transfectadas com P450 cDNAs (células MCL-5) (Styles *et al.*, 1997).

1.5 Paclitaxel (taxol)

O Paclitaxel (taxol) é um agente antineoplásico amplamente utilizado no tratamento de pacientes com câncer de mama metastático, ovários, pulmões, cabeça - pescoço, gastrointestinal e melanomas (Gregory e DeLisa, 1993).

O taxol é um taxano diterpenóide extraído da casca e sementes da planta *Taxus brevifolia*, isolado por Wani *et al.* (1971). Apesar de ser similar a outros alcalóides naturais (vincristina, vinblastina), seu anel taxano, assim como seu mecanismo de ação é único (Gregory e DeLisa, 1993; Wiernik *et al.*, 1987; Kearns *et al.*, 1995; Rowinsky *et al.*, 1990).

Os microtúbulos são componentes celulares importantes para a formação do fuso mitótico, assim como de outras estruturas celulares e elementos funcionais. Evidências experimentais indicam que o receptor celular para o taxol é o microtúbulo, a forma polimerizada da tubulina (Horwitz *et al.*, 1986).

O taxol liga-se aos microtúbulos polimerizados, em proporção estequiométrica (1:1) com as subunidades dímeras da tubulina polimerizada. Na presença de taxol, a concentração crítica de subunidades de tubulina requeridas para polimerização do microtúbulo é reduzida, e os microtúbulos formados são resistentes a despolimerização (Manfredi e Horwitz, 1984; Schiff *et al.*, 1979). Interferindo na polimerização e despolimerização normal dos microtúbulos, o taxol bloqueia a divisão celular nas fases G2 e M (metáfase e anáfase) (Schiff e Horwitz, 1980; Jordan *et al.*, 1993).

Foram descritos efeitos tóxicos hematológicos, cardíacos, gastrointestinais músculo-esqueléticos e neurológicos do paclitaxel (Rowinsky *et al.*, 1990; Gregory e DeLisa, 1993).

Taxol induziu um aumento na frequência de micronúcleos em células de medula óssea de camundongos (Tinwell e Ashby, 1994; Jagetia e Nayak, 1996). Porém não induziu frequência estatisticamente significativa de manchas mutantes em células de asas de *Drosophila melanogaster* (Cunha *et al.*, 1996).

2. OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo verificar os efeitos genotóxicos dos agentes químicos antineoplásicos:

- **Citrato de tamoxifen (TAM)**

A verificação dos efeitos genotóxicos do TAM foi realizada por meio da análise de AC e IM em células de medula óssea de ratos Wistar tratados *in vivo*, e de EPCMN em células de medula óssea de camundongos Swiss albinos tratados *in vivo*, e de manchas mutantes em células de asas de *Drosophila melanogaster*.

- **Paclitaxel (taxol)**

A verificação dos efeitos genotóxicos do taxol foi realizada por meio da análise de AC, IM e de EPCMN em células de medula óssea de camundongos Swiss albinos tratados *in vivo*, e de manchas mutantes em células de asas de *Drosophila melanogaster*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

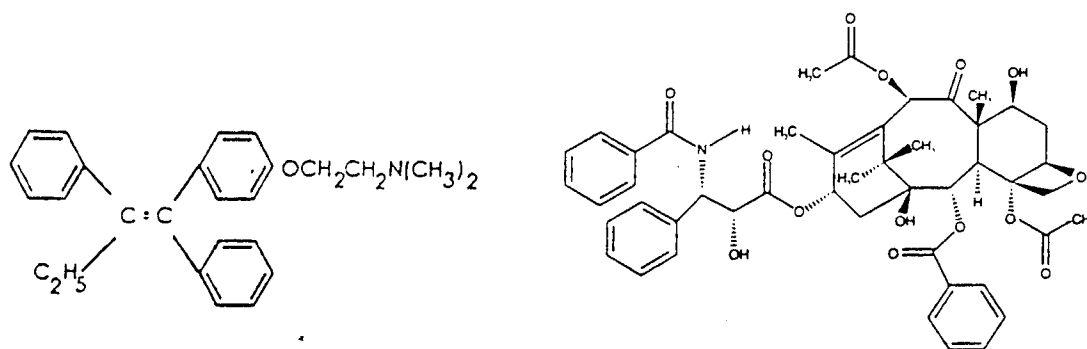
3.1 Agentes químicos

Citrato de tamoxifen (TAM) [Z]-2[4-(1,2-difenil-1-butenil)-fenoxi]-N, N-dimetiletanamino (Figura 1), fabricado pelo Laboratório Wellcome-Zeneca (Cotia, SP, Brasil), conhecido comercialmente como Nolvadex[®], foi dissolvido em água destilada estéril imediatamente antes do uso. A dose empregada na terapêutica humana é de 10 mg, duas vezes ao dia, por um período de 5 anos (Fisher *et al.*, 1989).

Paclitaxel (taxol[®]) 5 β , 20-epoxi-1,2 α ,4,7 β , 10 β , 13 α -hexahidroxitax-11-en-9-ona 4,10-diacetato 2-benzoato 13-éster com (2R, 3S)-N-benzoil-3-feniloserina (Figura 1), fabricado pelo Laboratório Bristol-Myers Squibb (São Paulo, SP, Brasil). As doses empregadas na terapêutica humana variam de 15 a 275 mg / m² (Wiernik *et al.*, 1987); sendo 135 mg / m², i.v. durante 24 h, em 3 semanas, para o tratamento de câncer de ovário metastásico (Gregory e DeLisa, 1993).

Etil carbamato (uretano), CAS N° 51-79-6 (Fluka AG, Buchs, Switzerland), foi dissolvido em água destilada estéril, e usado como controle positivo nos testes para detecção de mutações e recombinações somáticas em células de asa de *Drosophila melanogaster*.

Ciclofosfamida (CP) (2-[bis(2-cloroetil)amino]tetrahydro-2H-1,3,2-oxafosforino 2-óxido), CAS N° 50-18-0, conhecida comercialmente como Enduxan[®], fabricada pelo Laboratório Roche, foi dissolvida em água destilada estéril, e usada como controle positivo nos testes para detecção de AC e MN em células de medula óssea de roedores.



Citrato de tamoxifen (TAM)

Paclitaxel (taxol)

Figura 1: Fórmulas estruturais do citrato de tamoxifen e do taxol.

3.2 Técnica para obtenção de células de medula óssea de roedores para verificação de AC e cálculo do IM (Ford e Hamerton, 1956)

Células metafásicas da medula óssea femural são obtidas de acordo com a técnica de Ford e Hamerton (1956), modificada no Laboratório de Citogenética e Mutagenese da Universidade Federal de Uberlândia.

Procedimentos

Injeta-se i.p., 1 h antes do sacrificio do animal, colchicina 0,16 % (Sigma), na proporção de 0,5 ml para cada 100 g de peso corporal.

Após o sacrificio do animal (com éter ou por deslocamento cervical), procede-se a retirada dos fêmures e cortam-se as epífises. Remove-se a medula óssea femural com auxílio de uma seringa contendo 5,0 ml de

solução hipotônica de KCl 0,075 M. Após homogeneização do material, transfere-se o mesmo para a estufa a 37° C, durante 10 minutos, contados a partir da retirada da medula.

Centrifuga-se o material a 800 r.p.m. durante 5 minutos e despreza-se o sobrenadante.

Ao botão de células precipitadas, adicionam-se 5,0 ml de fixador metanol-ácido acético glacial (proporção de 3:1). Ressuspendem-se as células e centrifuga-se novamente o material. Repete-se este procedimento por mais duas vezes.

Preparação de lâminas

Em lâmina molhada e gelada, pinga-se uma gota da suspensão, mantendo-se a lâmina inclinada para espalhar o material. Passa-se a lâmina em uma chama, tendo o cuidado de não aquecê-la muito. As lâminas são coradas com Giemsa (Merck, Darmstadt, Germany) diluído em tampão fosfato (Na_2HPO_4 0,06 M e KH_2PO_4 0,06 M) pH 6,8 (proporção de 1:30), durante 5 minutos, e codificadas para análise.

Análise de aberrações cromossômicas

São analisadas cem metáfases por animal, quanto à ocorrência de AC (falhas acromáticas, quebras e rearranjos cromossômicos). As falhas acromáticas são definidas como regiões não coradas da cromátide, sem que haja deslocamento do fragmento. O deslocamento caracteriza a quebra cromossômica. Rearranjos resultam de quebras de cromátides ou de cromossomos, seguidas de trocas (Adler, 1984; *in* Nakano *et al.*, 1996).

A análise dos cromossomos metafásicos é realizada em microscópio óptico (objetiva de imersão - 100X), em teste cego, para evitar tendenciosidade de interpretação.

Índice mitótico

O IM é determinado por meio da contagem do número de células metafásicas em 2.000 células por animal.

Análise estatística

As frequências de AC e os IM são analisados estatisticamente pelo teste condicional para a detecção de eventos raros (Pereira, 1991), com nível de significância com $\alpha = 0,05$.

3.3 Técnica para obtenção de células de medula óssea de roedores para análise de MN (Schmid, 1975)

Células da medula óssea fêmural de roedores são obtidas de acordo com a técnica de Schmid (1975), modificada no Laboratório de Citogenética e Mutagênese da Universidade Federal de Uberlândia.

Procedimentos

Sacrificam-se os animais por deslocamento cervical, retiram-se os fêmures e cortam-se as epífises.

Remove-se a medula com 1,0 ml de soro bovino fetal, mantido a 37°C.

Homogeniza-se o material e transfere-se para um tubo cônico de centrífuga.

Centrifuga-se a 1.000 r.p.m. durante 5 minutos.

Despreza-se o sobrenadante e preparam-se as lâminas com o botão de células restantes.

Preparação das lâminas

Em lâminas muito limpas e secas, pinga-se uma gota de soro bovino fetal, contendo a suspensão de células. Faz-se um esfregão, e deixa-se secar ao ar.

Após 24 h, fixa-se o material em metanol absoluto por 5 minutos. Procede-se a coloração com Giemsa (Merck, Darmstadt, Germany) diluído em tampão fosfato (Na_2HPO_4 0,06 M e KH_2PO_4 0,06 M) pH 6,8 na proporção de 1:20, durante 20 minutos.

Análise de micronúcleos

Realiza-se a análise de EPC em microscópio óptico (objetiva de imersão - 100X). Contam-se 1.000 EPC por animal, incluindo, nesta contagem, os EPCMN.

3.4 Técnica para obtenção de asas de *D. melanogaster*, para análise de pêlos mutantes (Graf *et al.*, 1984)

Asas de *D. melanogaster* são obtidas de acordo com técnica de Graf *et al.* (1984), com pequenas modificações realizadas no Laboratório de Citogenética e Mutagênese da Universidade Federal de Uberlândia.

São utilizadas três linhagens mutantes de *D. melanogaster*, portadoras dos marcadores genéticos “multiple wing hair” (*mwh*, 3-0,3) e “flare” (*flr*³, 3-38,8):

1. “Multiple wing hairs” (*mwh*), com constituição genética *y; mwh jv*.
2. “Flare-3” (*flr*³), com constituição genética *flr*³/*In(3LR)TM3, ri p^p sep I(3)89Aa bx*^{34e} e *Bd*^S.
3. “ORR; flare-3” (*ORR; flr*³), com constituição genética *ORR; flr*³/*In(3LR)TM3, ri p^p sep I(3)89Aa bx*^{34e} e *Bd*^S.

Os estoques são mantidos em frascos de ¼ de litro contendo meio de cultura para *Drosophila melanogaster* (820 ml de água, 25 g de fermento de padaria (*S. cerevisiae*), 11 g de ágar, 156 g de banana, 1 g de nipagin).

Cruzamentos entre as linhagens mutantes

1) **Cruzamento padrão** (ST - “Standard Cross”) (Graf *et al.*, 1989):

Fêmeas *flr*³/*In(3LR)TM3, ri p^p sep I(3)89Aa bx*^{34e} e *Bd*^S cruzadas com machos *mwh / mwh*.

2) Cruzamento de alta bioativação (HB - "High Bioactivation Cross")
(Graf e van Schaick, 1992):

Fêmeas *ORR; flr³/In(3LR)TM3, ri p^p sep I(3)89Aa bx^{34e} e Bd^S*,
cruzadas com machos *mwh / mwh*.

Desses cruzamentos são obtidos dois tipos de descendentes: marcador trans-heterozigoto (MH: *mwh + / + flr³*), e balanceador heterozigoto (BH: *mwh + / TM3, Bd^S*). As larvas, de ambos genótipos, emergentes destes cruzamentos, são tratadas com diferentes concentrações do agente químico a ser testado.

Procedimentos

A coleta de ovos é realizada por 8 h em frascos contendo uma base sólida de ágar (3% de ágar em água), e uma camada de fermento com açúcar. Após 72 ± 4 h, retiram-se as larvas por lavagem em água corrente e coleta em peneira de malha fina.

Transferem-se as larvas para frascos contendo 1,5 g de meio de cultura instantâneo (Carolina Biological Supply Company - Burlington, North Carolina, USA) e 5,0 ml de diferentes concentrações do agente a ser testado, assim como dos controles (positivo e negativo) utilizados.

As moscas adultas emergentes são coletadas e fixadas em etanol 70%.

Montagem de asas

As asas são retiradas, embebidas em solução de Faure (30 g de goma arábica, 20 ml de glicerol, 1,5 g de hidrato de cloral, e 50 ml de água destilada), e extendidas sobre uma lâmina seca.

Deixam-se as lâminas secar por 24 h sobre placa aquecedora (40° C), procede-se montagem com laminula, e deixa-se secar por mais 48 h.

Análise de lâminas

A análise das lâminas é realizada em microscópio óptico (objetiva 40X). Registram-se o número e os tipos de manchas encontradas (simples ou gêmeas), assim como o tamanho das mesmas, e a posição em que se encontram na asa.

Análise estatística

A análise estatística é feita de acordo com o teste do X^2 para proporções (Frei e Würigler, 1988).

3.5 Verificação de efeitos clastogênicos de agentes químicos por meio da análise de AC em células de medula óssea de roedores tratados *in vivo*

Trinta ratos da espécie *Rattus norvegicus*, da linhagem Wistar (15 machos e 15 fêmeas), pesando aproximadamente 100 g, e vinte e cinco camundongos Swiss albinos (espécie *Mus musculus*) de 7 a 12 semanas de

vida, todos machos, pesando aproximadamente 30 - 40 g, foram obtidos junto ao biotério da Universidade Federal de Uberlândia (MG). Os animais foram aclimatados por um período de 24 h, antes do início do procedimento experimental, e mantidos em gaiolas de polietileno, com temperatura ambiente variável entre 25 e 27°C, umidade relativa entre 60 e 70 %, e expostos a ciclos de 12 h de claro / 12 h de escuro, durante os períodos de aclimação e de experimentação. Ração e água foram fornecidas *ad libitum*.

3.5.1 Verificação dos efeitos clastogênicos do TAM por meio da análise de AC em células de medula óssea de ratos Wistar tratados *in vivo*

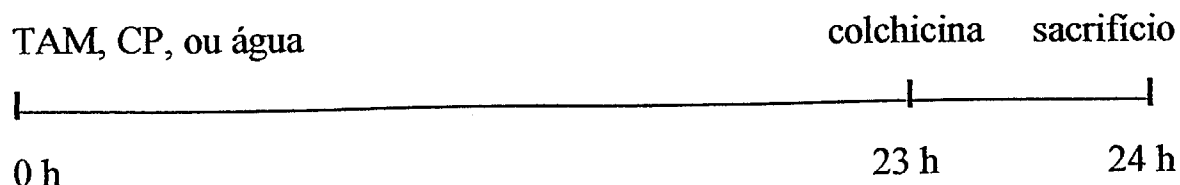
Trinta ratos Wistar foram separados em cinco grupos de seis animais (3 machos e 3 fêmeas). Dezoito ratos foram submetidos a tratamentos com diferentes concentrações de TAM (0,6; 1,2 e 2,4 mg / 100 g de peso do animal), sendo seis animais para cada grupo de tratamento. As concentrações foram baseadas nas doses terapêuticas empregadas em humanos. O TAM foi injetado i.p. em dose única.

Seis animais foram tratados com água destilada estéril e seis foram tratados com uma única concentração de CP (2,0 mg / 100 g de peso do animal), e utilizados, respectivamente, como controles negativo e positivo.

Todos os animais foram sacrificados após 24 h do tratamento.

Os tratamentos foram realizados de acordo com o seguinte protocolo:

Protocolo de tratamento



A técnica utilizada para a obtenção de células de medula óssea de ratos Wistar, para verificação de AC e para o cálculo do IM, foi a de Ford e Hamerton (1956), com modificações, descrita no item 3.2.

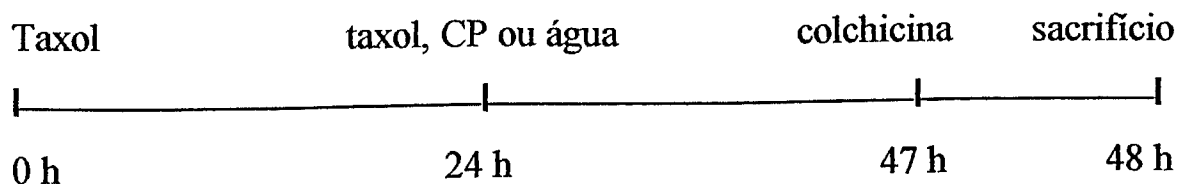
3.5.2 Verificação dos efeitos clastogênicos do taxol por meio da análise de AC em células de medula óssea de camundongos Swiss albinos tratados *in vivo*

Vinte e cinco camundongos Swiss albinos foram separados em cinco grupos de cinco animais (todos machos). Quinze animais foram submetidos a tratamentos com diferentes concentrações de taxol (3,0; 4,5 e 6,0 mg / 100 g de peso do animal), sendo cinco animais por grupo de tratamento. As concentrações foram baseadas nas doses terapêuticas empregadas em humanos. O taxol foi injetado i.p. em duas doses, com intervalo de 24 h entre as mesmas. Os animais foram sacrificados após 24 h do segundo tratamento.

Cinco camundongos foram tratados com água destilada estéril e cinco foram tratados com uma única concentração de CP (2,0 mg / 100 g de peso do animal), e utilizados, respectivamente, como controles negativo e positivo. Todos os animais foram sacrificados após 24 h do tratamento.

Os tratamentos foram realizados de acordo com o seguinte protocolo:

Protocolo de tratamento



A técnica utilizada para a obtenção de células de medula óssea de camundongos, para verificação de AC e para o cálculo do IM, foi a de Ford e Hamerton (1956), com modificações, descrita no item 3.2. Para a realização deste teste foi utilizado material de apenas um dos fêmures de cada animal. O outro fêmur foi utilizado para a verificação dos efeitos clastogênicos e/ou aneugênicos do taxol, por meio do teste do MN.

3.6 Verificação de efeitos clastogênicos e/ou aneugênicos de agentes químicos por meio do teste do MN em células de medula óssea de roedores tratados *in vivo*

Foram utilizados, em cada experimento, vinte e cinco camundongos machos, Swiss albinos, de 7 a 12 semanas de vida, pesando aproximadamente 30 - 40 g. Os animais foram obtidos junto ao biotério da Universidade Federal de Uberlândia (MG) e mantidos nas mesmas condições experimentais descritas no item 3.5.

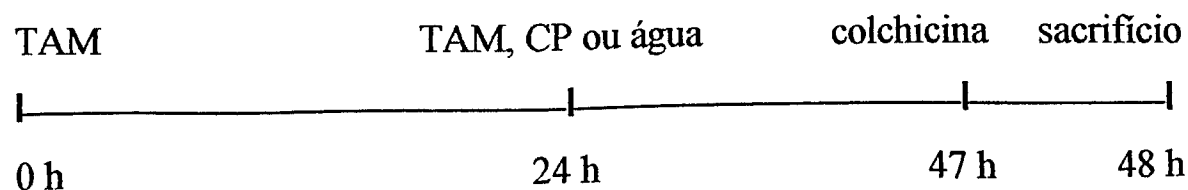
3.6.1 Verificação dos efeitos clastogênicos e/ou aneugênicos do TAM por meio do teste do MN em células de medula óssea de camundongos Swiss albinos tratados *in vivo*

Vinte e cinco camundongos Swiss albinos foram separados em cinco grupos de cinco animais (todos machos). Quinze animais foram submetidos a tratamentos com diferentes concentrações de TAM (1,25; 2,5 e 5,0 mg / 100 g de peso do animal), sendo cinco animais por grupo de tratamento. As concentrações foram baseadas nas doses terapêuticas empregadas em humanos. O TAM foi injetado i.p. em duas doses, com intervalo de 24 h entre as mesmas. Os animais foram sacrificados após 24 h do segundo tratamento.

Cinco camundongos foram tratados com água destilada estéril e cinco foram tratados com uma única concentração de CP (2,0 mg / 100 g de peso do animal), e utilizados, respectivamente, como controles negativo e positivo. Todos os animais foram sacrificados após 24 h do tratamento.

Os tratamentos foram realizados de acordo com o seguinte protocolo:

Protocolo de tratamento



A técnica utilizada para a obtenção de células de medula óssea de camundongos, para análise de MN, foi a de Schmid (1975), com modificações, descrita no item 3.3. Para a realização deste teste foram utilizados ambos os fêmures de cada animal.

3.6.2 Verificação dos efeitos clastogênicos e/ou aneugênicos do taxol por meio do teste do MN em células de medula óssea de camundongos Swiss albinos tratados *in vivo*

Os animais deste experimento foram os mesmos utilizados no teste para verificação dos efeitos clastogênicos do taxol, por meio da análise de AC em células de medula óssea de camundongos Swiss albinos, tratados *in vivo*, descrito no item 3.5.2. A técnica utilizada para a obtenção de células de medula óssea, para verificação dos efeitos clastogênicos e/ou aneugênicos do taxol, por meio do teste do MN, foi a de Schmid (1975) descrita no item 3.3. Para a realização deste teste, foi utilizado apenas um dos fêmures de cada animal.

3.7 Verificação dos efeitos mutagênicos e/ou recombinogênicos induzidos por agentes químicos em células somáticas de *Drosophila melanogaster*

As linhagens mutantes de *D. melanogaster* foram gentilmente fornecidas pelo Dr. Ulrich Graf, do Institute of Toxicology, Swiss Federal Institute of Technology of Zürich, CH-8603 Schwerzenbach, Switzerland. Os estoques foram mantidos em frascos com meio de cultura de banana, suplementado com fermento de padaria, em sala com temperatura ambiente variável entre 25 e 27°C, umidade relativa entre 60 e 70% e expostos a ciclos de 12 h de claro / 12 h de escuro, durante os períodos de manutenção e de experimentação.

3.7.1 Verificação dos efeitos mutagênicos e/ou recombinogênicos induzidos pelo TAM em células somáticas de *Drosophila melanogaster*

A técnica utilizada para a obtenção de asas de *Drosophila melanogaster*, para verificação dos efeitos mutagênicos e/ou recombinogênicos induzidos pelo citrato de tamoxifen, foi a de Graf *et al.* (1984), descrita no item 3.4.

Larvas de 72 ± 4 h (terceiro estágio), provenientes dos cruzamentos ST e HB, foram transferidas para frascos de vidro contendo 1,5 g de meio de cultura instantâneo e 5 ml das seguintes concentrações de TAM: 5,0; 7,5 e 10,0 mg / ml de solvente (água). Como controles negativo e positivo foram utilizados, respectivamente, 5 ml de água, e 5 ml de uretano 10 mM. As larvas foram tratadas por aproximadamente 48 h.

Os adultos emergentes, portadores dos dois tipos de genótipos, foram coletados e fixados em etanol 70%. Procedeu-se a montagem e a análise das asas, de acordo com o descrito no item 3.4.

3.7.2 Verificação dos efeitos mutagênicos e/ou recombinogênicos induzidos pelo taxol em células somáticas de *Drosophila melanogaster*

A técnica utilizada para a obtenção de asas de *Drosophila melanogaster*, para verificação dos efeitos mutagênicos e/ou

recombinogênicos induzidos pelo taxol, foi a de Graf et al. (1984), descrita no item 3.4.

Larvas de 72 ± 4 h (terceiro estágio), provenientes dos cruzamentos ST e HB, foram transferidas para frascos de vidro contendo 1,5 g de meio de cultura instantâneo e 5 ml das seguintes concentrações de taxol: 0,009; 0,018, 0,028 e 0,037 mg / ml de solvente (água). Como controles negativo e positivo foram utilizados, respectivamente, 5 ml de água, e 5 ml de uretano 10 mM. As larvas foram tratadas por aproximadamente 48 h.

Os adultos emergentes, portadores dos dois tipos de genótipos, foram coletados e fixados em etanol 70%. Procedeu-se a montagem e a análise das asas, de acordo com o descrito no item 3.4.

4. RESULTADOS

4.1 Verificação dos efeitos clastogênicos, aneugênicos, mutagênicos e/ou recombinogênicos do TAM

4.1.1 Verificação dos efeitos clastogênicos do TAM em células de medula óssea de ratos Wistar tratados *in vivo*

As freqüências de células com AC e as médias dos IM (%), obtidos em células de medula óssea de ratos Wistar tratados i.p. com TAM e sacrificados após 24 h do tratamento são apresentados na tabela 1.

A determinação da freqüência de células com AC foi realizada por meio da análise de 100 células por animal, perfazendo um total de 600 células analisadas por tratamento.

Foram observadas apenas aberrações de cromátides dos seguintes tipos: falhas acromáticas, quebras, e fragmentos.

Não houve diferença estatisticamente significativa ($P > 0,05$) quando foram comparadas as freqüências de AC encontradas nos machos, comparado com as freqüências encontradas nas fêmeas.

O número de falhas acromáticas, de quebras, e de fragmentos, induzidos pelo TAM, foi estatisticamente não significativo ($P > 0,13$), quando comparado com o controle negativo, para todas as concentrações.

Células com mais de três aberrações foram classificadas como células com aberrações múltiplas. No entanto, devido à dificuldade encontrada na determinação precisa das aberrações existentes nessas células, as mesmas foram registradas, mas não foram computadas no total de células com AC. Assim sendo, o cálculo das porcentagens dos totais de células com AC (considerando, e não considerando as falhas acromáticas) foi realizado

subtraindo-se o número de células com aberrações múltiplas do total de células analisadas. Foram, portanto, consideradas 599 células analisadas para o controle negativo (água) e para o tratamento com 1,2 mg de TAM; e 552 células analisadas para o controle positivo (CP).

O número total de células com AC induzidas pelo TAM foi estatisticamente não significativo, para todas as concentrações, quando comparado com o controle negativo, quando foram consideradas as falhas acromáticas (0,6 mg, $P > 0,26$; 1,2 mg, $P > 0,08$; 2,4 mg, $P > 0,50$), e quando não foram consideradas as falhas acromáticas (0,6 mg, $P > 0,38$; 1,2 mg, $P > 0,29$; 2,4 mg, $P > 0,50$).

Foram estatisticamente significativas as freqüências de AC induzidas pela CP, quando foram consideradas, e quando não foram consideradas as falhas acromáticas, quando comparado com o controle negativo ($P < 0,01$).

A determinação do IM foi realizada por meio da análise de 2.000 células por animal, perfazendo um total de 12.000 células analisadas por tratamento. Foi verificado uma redução, estatisticamente significativa ($P < 0,001$), no IM de todos os grupos tratados com TAM e CP.

A Figura 2 apresenta as freqüências de AC, em porcentagem, observadas em células de medula óssea de animais tratados com água (controle negativo), e as diferentes concentrações de TAM, comparando as freqüências obtidas quando foram consideradas, e quando não foram consideradas, as falhas acromáticas.

Tabela 1: Médias dos IM, e freqüências de células com AC (cromátide) em células de medula óssea de ratos Wistar tratados com TAM. Foram analisadas 600 metáfases por tratamento para AC e contadas 12.000 células por tratamento para a determinação do IM

Tratamento mg / 100 g	Tipos de aberrações de cromátides			Total de células com aberrações (%)		Aberrações múltiplas	IM
	Falhas	Quebras	Fragmentos	C/ falhas	S/ falhas		
Água	4	3	2	9 (1,50)	5 (0,83)	1 (0,16)	3,23
TAM							
0,6	6	6	1	13 (2,16)	7 (1,16)	0 (0,00)	2,30*
1,2	9	5	3	17 (2,83)	8 (1,33)	1 (0,10)	1,63*
2,4	4	5	1	10 (1,66)	6 (1,00)	0 (0,00)	1,95*
CP							
2,0	14*	24*	17*	55 (9,96)*	41 (7,42)*	48 (8,00)*	1,78*

* Valores estatisticamente significativos quando comparados com o controle negativo, de acordo com o teste para detecção de eventos raros (Pereira, 1991). Nível de significância com $\alpha = 0,05$.

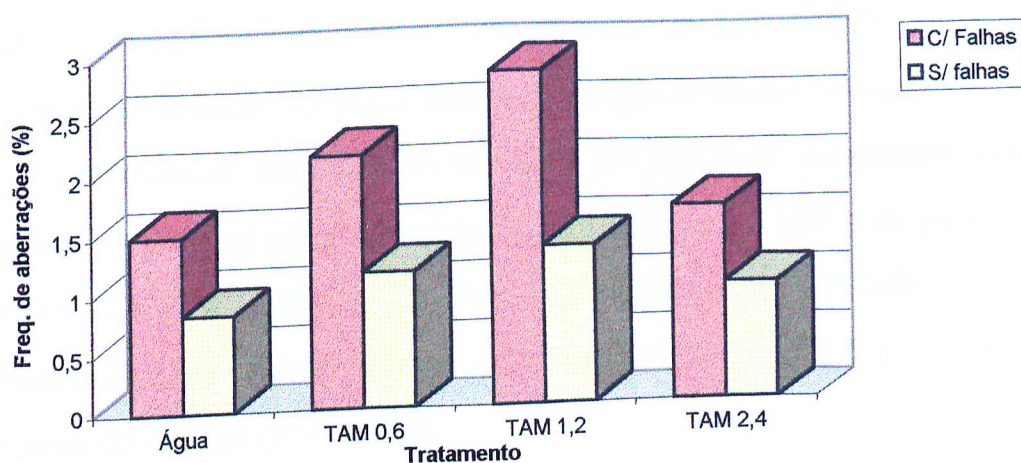


Figura 2: Frequências de aberrações cromossômicas, em porcentagem, em células de medula óssea de ratos Wistar, tratados com diferentes concentrações de citrato de tamoxifen (TAM) (mg / 100 g), quando foram consideradas, e não consideradas, as falhas acromáticas.

4.1.2 Verificação dos efeitos clastogênicos e/ou aneugênicos do TAM por meio do teste do MN em células de medula óssea de camundongos Swiss albinos tratados *in vivo*

Camundongos Swiss albinos foram tratados com duas doses de diferentes concentrações de TAM, com intervalo de 24 h, e sacrificados 24 h após o segundo tratamento. Foram analisados 1.000 EPC por animal, totalizando 5.000 EPC por tratamento. As freqüências de EPCMN (média \pm desvio padrão), expressas em porcentagem, são apresentadas na tabela 2.

O TAM induziu uma freqüência total de EPCMN estatisticamente não significativa para os animais tratados com 1,25 mg / 100 g de peso do animal ($P > 0,3$). No entanto, as freqüências totais de EPCMN foram estatisticamente significativas para os animais tratados com 2,5 e 5,0 mg / 100 g de peso do animal ($P < 0,001$).

Uma grande variabilidade inter-individual pode ser demonstrada pelo desvio padrão obtido nas médias de EPCMN de todos os tratamentos. Assim sendo, os grupos que apresentaram freqüências totais, estatisticamente significativas (2,5 e 5,0 mg / 100 g de peso do animal), apresentaram apenas 2 animais cada, com freqüências individuais de EPCMN estatisticamente significativas (2,5 mg: A_3 , $P < 0,03$ e A_5 , $P < 0,004$; 5,0 mg: A_1 , $P < 0,004$ e A_2 , $P < 0,04$).

A CP induziu freqüências individuais e totais de EPCMN estatisticamente significativas com $P < 0,001$, além de apresentar o maior desvio padrão observado neste experimento.

A Figura 3 apresenta as médias das freqüências totais de EPCMN, em porcentagem, observadas em células de medula óssea de animais tratados com água (controle negativo), e as diferentes concentrações de TAM.

Tabela 2: Frequências (média \pm desvio padrão) de EPCMN, em porcentagem, observadas em camundongos Swiss albinos tratados com TAM. Foram analisados 1.000 EPC por animal

Tratamento (mg / 100 g)	EPCMN / animal					Total EPCMN	EPCMN $\bar{X} \pm dp$
	A ₁	A ₂	A ₃	A ₄	A ₅		
Água	11	4	4	1	1	21	0,42 \pm 0,40
TAM							
2x 1,25	8	6	5	4	2	25	0,50 \pm 0,22
2x 2,50	17	6	13*	5	11*	52*	1,04 \pm 0,49
2x 5,00	29*	12*	7	3	6	57*	1,14 \pm 1,03
CP							
5,0	107*	75*	142*	76*	76*	476*	9,52 \pm 2,94

* Valores estatisticamente significativos quando comparados com o controle negativo, de acordo com o teste para detecção de eventos raros (Pereira, 1991). Nível de significância com $\alpha = 0,05$.

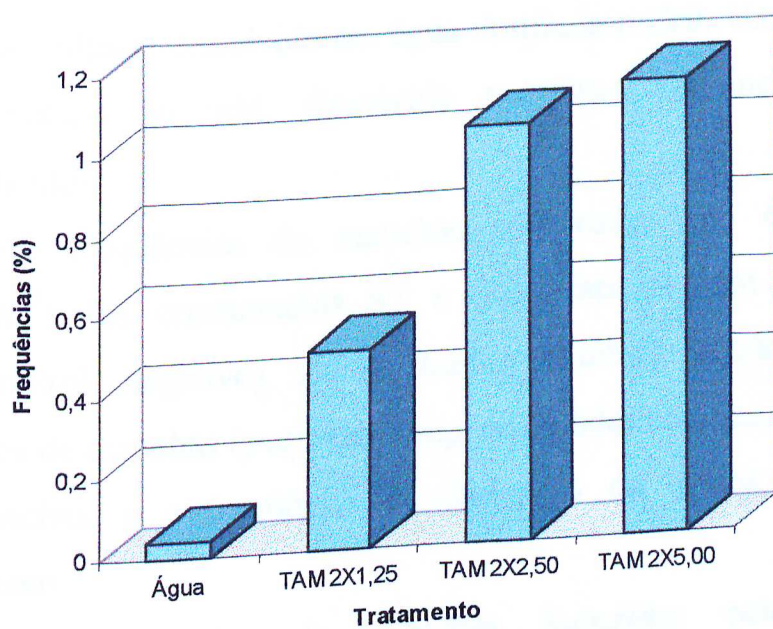


Figura 3: Médias das frequências totais de eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMN), em porcentagem, observadas em camundongos Swiss albinos tratados com diferentes concentrações de citrato de tamoxifen (TAM) (mg / 100 g).

4.1.3 Verificação dos efeitos mutagênicos e/ou recombinogênicos induzidos pelo TAM em células somáticas de *Drosophila melanogaster*

Larvas provenientes dos cruzamentos ST e HB foram tratadas, em paralelo, com diferentes concentrações de TAM (5,0; 7,5 e 10,0 mg / ml de meio de cultura) dissolvido em água destilada estéril. Um controle positivo com uretano 10 mM, dissolvido em água, foi incluído em ambos cruzamentos.

As freqüências de manchas observadas nos descendentes MH (mwh/flr^3) dos cruzamentos ST e HB, tratados com TAM, uretano e água (controle negativo), são mostradas na tabela 3. São apresentados os números de manchas (pequenas simples, grandes simples, e gêmeas), o total de manchas, e a freqüência de formação de clones mwh , para cada tratamento.

As freqüências de manchas induzidas pelo TAM foram estatisticamente não significativas ($P \geq 0,05$) para todas as concentrações testadas, em ambos os cruzamentos. Assim sendo, não justifica-se a análise dos descendentes BH tratados com TAM.

Descendentes do cruzamento ST, tratados com uretano, apresentaram resultados positivos para manchas pequenas simples ($P \leq 0,001$), manchas grandes simples ($P \leq 0,05$), total de manchas ($P \leq 0,001$), e para a freqüência de formação de clones mwh ($P \leq 0,001$). Os descendentes do cruzamento HB, tratados com uretano, apresentaram resultados positivos ($P \leq 0,001$) para todos os tipos de manchas (pequenas simples, grandes simples, e gêmeas), assim como para o total de manchas, e para a freqüência de formação de clones mwh .

Apesar das freqüências de manchas induzidas pelo uretano serem estatisticamente significativas, não justifica-se a análise dos descendentes BH, por não ser o objetivo do presente experimento.

Para a avaliação estatística, os resultados foram comparados com os correspondentes controles negativos, de acordo com o teste do X^2 para proporções (Frei e Würigler, 1988).

As figuras 4 e 5 apresentam, respectivamente, as distribuições nas freqüências de manchas simples por asa, observadas em descendentes MH de *Drosophila melanogaster* dos cruzamentos ST e HB, tratados com diferentes concentrações de TAM.

BIBLIOTECA

Tabela 3: Frequências de manchas observadas nos descendentes MH (mwh/flr^3) de *D. melanogaster* dos cruzamentos ST e HB, tratados com TAM

Tratamento (concentração)	Número de asas	Manchas por asa (n° de manchas) Diag. estatíst.*				Clones <i>mwh</i>
		Pequenas simples (1-2 células) m = 2	Grandes simples (> 2 células) m = 5	Gêmeas		
				total	m = 2	
Cruzamento ST						
Água	120	0,175 (21)	0,075 (9)	0,025 (3)	0,275 (33)	0,258 (31)
Uretano (10 mM)	120	0,758 (91)***	0,133 (16)**	0,050 (6)	0,942 (113)***	0,925 (111)***
TAM						
5,0 (mg/ml)	120	0,158 (19)	0,050 (6)	0,008 (1)	0,217 (26)	0,217 (26)
7,5 (mg/ml)	120	0,242 (29)	0,083 (10)	0,008 (1)	0,333 (40)	0,325 (39)
10,0 (mg/ml)	120	0,192 (23)	0,042 (5)	0,017 (2)	0,250 (30)	0,225 (27)
Cruzamento HB						
Água	120	0,825 (99)	0,200 (24)	0,075 (9)	1,100 (132)	1,083 (130)
Uretano (10 mM)	120	4,750 (570)***	0,925 (111)***	0,392 (47)***	6,067 (728)***	5,900 (708)***
TAM						
5,0 (mg/ml)	120	0,525 (63)	0,142 (17)	0,033 (4)	0,700 (84)	0,700 (84)
7,5 (mg/ml)	120	0,583 (70)	0,158 (19)	0,058 (7)	0,800 (96)	0,775 (93)
10,0 (mg/ml)	120	0,608 (73)	0,125 (15)	0,058 (7)	0,792 (95)	0,750 (90)

* Diagnóstico estatístico de acordo com Frei & Würigler (1988): ** Prob. $\leq 0,05$; *** Prob. $\leq 0,001$; m = fator de multiplicação.

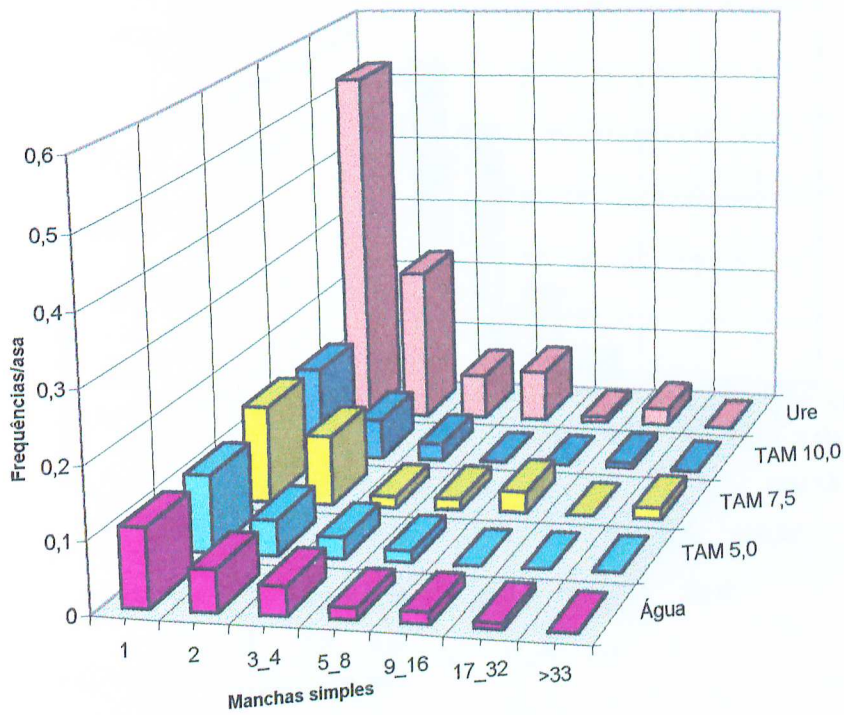


Figura 4. Distribuição do tamanho das manchas mutantes observadas em descendentes trans-heterozigotos (MH), do cruzamento padrão (ST), tratados com diferentes concentrações de citrato de tamoxifen (TAM) (mg / ml).

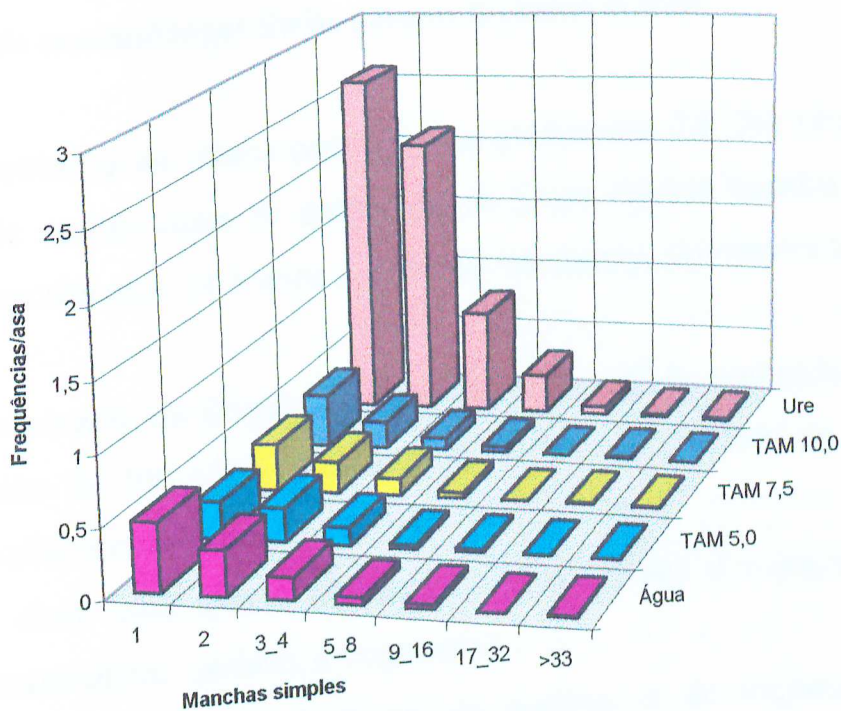


Figura 5. Distribuição do tamanho das manchas mutantes observadas em descendentes trans-heterozigotos (MH), do cruzamento de alta bioativação (HB), tratados com diferentes concentrações de citrato de tamoxifen (TAM) (mg / ml).

4.2 Verificação dos efeitos clastogênicos, aneugênicos, mutagênicos e/ou recombinogênicos do taxol

4.2.1 Verificação dos efeitos clastogênicos do taxol em células de medula óssea de camundongos Swiss albinos tratados *in vivo*

As freqüências de células com AC e as médias dos IM (%), obtidas em células de medula óssea de camundongos Swiss albinos tratados i.p. com taxol e sacrificados 24 h após o segundo tratamento são apresentados na tabela 4.

A determinação da freqüência de células com AC foi realizada por meio da análise de 100 células por animal, perfazendo um total de 500 células analisadas por tratamento.

Foram observadas apenas aberrações de cromátides dos seguintes tipos: falhas acromáticas, quebras, e fragmentos.

O número de falhas acromáticas, de quebras, e de fragmentos, induzidos pelo taxol, foi estatisticamente não significativo ($P > 0,05$), quando comparado com o controle negativo, para todas as concentrações.

Quando foram consideradas as falhas acromáticas, o número total de células com AC induzidas pelo taxol foi estatisticamente significativo ($P < 0,02$), comparado com o controle negativo, para a concentração de 3,0 mg / 100 de peso do animal, e estatisticamente não significativo para as demais concentrações (4,5 e 6,0 mg, $P > 0,5$). Quando não foram consideradas as falhas acromáticas o número total de células com AC induzidas pelo taxol foi estatisticamente não significativo, para todas as concentrações, quando comparado com o controle negativo (3,0 mg, $P > 0,05$; 4,5 mg, $P > 0,5$; 6,0 mg, $P = 1,0$).

O taxol, em todas as concentrações utilizadas, induziu células poliplóides, com freqüências estatisticamente significativas ($P < 0,001$), quando comparadas com o controle negativo. Estas células foram registradas, mas não foram computadas no total de células com AC. Assim sendo, foram analisadas, respectivamente, 533, 536 e 544 células para os tratados com 3,0; 4,5 e 6,0 mg de taxol / 100 g de peso do animal.

Foram estatisticamente significativos os números de células com falhas acromáticas ($P < 0,008$), com quebras cromatídicas ($P < 0,04$), assim como o número total de células com AC, quando foram consideradas ($P < 0,001$), e quando não foram consideradas ($P < 0,008$), as falhas acromáticas induzidas pela CP, quando comparado com o controle negativo. Células com mais de três aberrações foram classificadas como células com aberrações múltiplas. No entanto, devido à dificuldade encontrada na determinação precisa das aberrações existentes nessas células, as mesmas foram registradas, mas não foram computadas no total de células com aberrações. Assim sendo, foram analisadas 541 células para o controle positivo (CP), no entanto, a determinação das freqüências dos totais de células com AC foi realizada considerando-se 500 células analisadas, excluindo-se, portanto, as 41 células com aberrações múltiplas.

A determinação do IM foi realizada por meio da análise de 2.000 células por animal, perfazendo um total de 10.000 células analisadas por tratamento. Foi verificada uma redução estatisticamente significativa ($P < 0,02$) no IM de todos os grupos tratados com taxol e CP.

A Figura 6 apresenta as freqüências de AC, em porcentagem, observadas em células de medula óssea de animais tratados com água (controle negativo), e as diferentes concentrações de taxol, comparando as freqüências obtidas quando foram consideradas, e quando não foram consideradas, as falhas acromáticas.

Tabela 4: Médias dos índices mitóticos (IM), e freqüências de células com AC (cromátide) e alterações numéricas em células de medula óssea de camundongos Swiss albinos tratados com taxol. Foram analisadas 500 metáfases por tratamento para AC e contadas 10.000 células por tratamento para a determinação do

IM

Tratamento mg / 100 g	Tipos de aberrações de cromátides em 500 células analisadas		Total de células com aberrações em 500 células (%)		Aber. múlt. (%)	Pol. (%)	Total de células analis.	IM
	Falhas	Quebras	Fragmentos	C/ falhas S/ falhas				
Água	0	0	0	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	500	2,22
Taxol								
2 X 3,0	2	4	0	6 (1,2)*	4 (0,8)	0 (0,0)	533	1,80*
2 X 4,5	0	1	0	1 (0,2)	1 (0,2)	0 (0,0)	536	1,53*
2 X 6,0	1	0	0	1 (0,2)	0 (0,0)	0 (0,0)	544	1,11*
CP								
2,0	7*	5*	2	14 (2,8)*	7 (1,4)*	41(7,5)*	541	1,71*

* Valores estatisticamente significativos quando comparados com o controle negativo, de acordo com o teste para detecção de eventos raros (Pereira, 1991). Nível de significância com $\alpha = 0,05$. Aber. múlt. = aberrações múltiplas, Pol. = poliplóides.

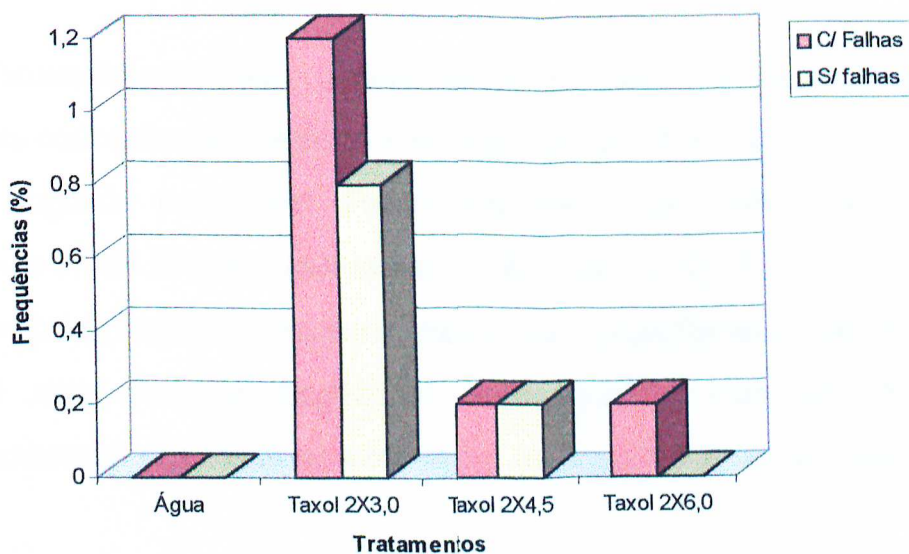


Figura 6. Frequências de aberrações cromossômicas, em porcentagem, em células de medula óssea de camundongos Swiss albinos, tratados com diferentes concentrações de paclitaxel (taxol) (mg / 100 g), quando foram consideradas, e não consideradas, as falhas acromáticas.

4.2.2 Verificação dos efeitos clastogênicos e/ou aneugênicos do taxol por meio do teste do MN em células de medula óssea de camundongos Swiss albinos tratados *in vivo*

Camundongos Swiss albinos foram tratados com duas doses de diferentes concentrações de taxol, com intervalo de 24 h, e sacrificados 24 h após o segundo tratamento. Foram analisados 1.000 EPC por animal, totalizando 5.000 EPC por tratamento. As freqüências de EPCMN (média \pm desvio padrão), expressas em porcentagem, são apresentadas na tabela 5.

O taxol induziu freqüências individuais e totais de EPCMN estatisticamente significativa para todos os grupos de tratamento ($P < 0,001$).

Uma grande variabilidade inter-individual pode ser demonstrada pelo desvio padrão obtido nas médias de EPCMN de todos os tratamentos, sendo que o grupo tratado com 4,5 mg / 100 g de peso do animal apresentou o maior desvio padrão.

A CP induziu freqüências individuais e totais de EPCMN estatisticamente significativas com $P < 0,001$.

A Figura 7 apresenta as médias das freqüências totais de EPCMN, em porcentagem, observadas em células de medula óssea de animais tratados com água (controle negativo), e as diferentes concentrações de taxol.

Tabela 5: Frequências (média \pm desvio padrão) de EPCMN, em porcentagem, observadas em camundongos Swiss albinos tratados com taxol. Foram analisados 1.000 EPC por animal

Tratamento (mg / 100 g)	EPCMN / animal					Total EPCMN	EPCMN $\bar{X} \pm dp$
	A ₁	A ₂	A ₃	A ₄	A ₅		
Água	2	1	2	2	0	7	0,14 \pm 0,08
Taxol							
2x 3,00	53*	69*	50*	51*	66*	289*	5,78 \pm 0,89
2x 4,50	73*	74*	107*	71*	66*	391*	6,42 \pm 3,78
2x 6,00	59*	97*	72*	83*	102*	423*	8,26 \pm 1,77
CP							
2,0	36*	22*	22*	31*	17*	128*	2,56 \pm 0,77

* Valores estatisticamente significativos quando comparados com o controle negativo, de acordo com o teste para detecção de eventos raros (Pereira, 1991). Nível de significância com $\alpha = 0,05$.

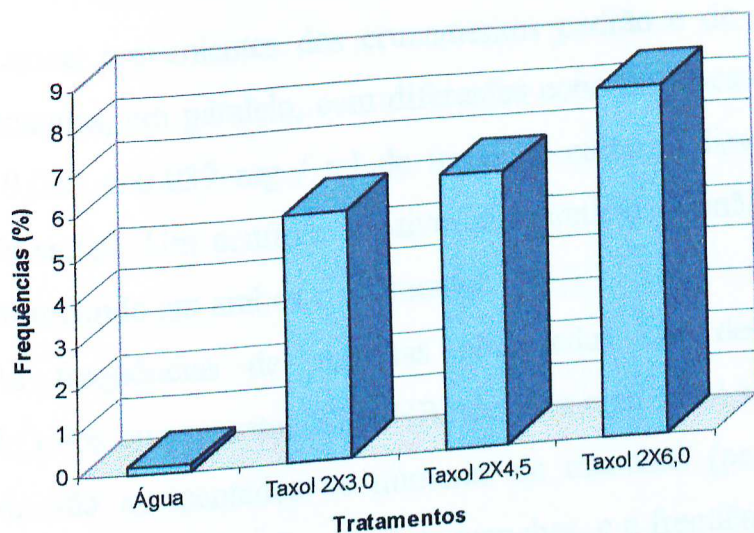


Figura 7. Médias das frequências totais de eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMN), em porcentagem, observadas em células de medula óssea de camundongos Swiss albinos, tratados com diferentes concentrações de paclitaxel (taxol) (mg / 100 g).

4.2.3 Verificação dos efeitos mutagênicos e/ou recombinogênicos induzidos pelo taxol em células somáticas de *Drosophila melanogaster*

Larvas provenientes dos cruzamentos padrão e de alta bioativação foram tratadas, em paralelo, com diferentes concentrações de taxol (0,009; 0,018; 0,028 e 0,037 mg / ml de meio de cultura) dissolvido em água destilada estéril. Um controle positivo com uretano 10 mM, dissolvido em água, foi incluído em ambos cruzamentos.

As freqüências de manchas observadas nos descendentes MH (mwh/flr^3) dos cruzamentos ST e HB, tratados com taxol são mostradas na tabela 6. São apresentados os números de manchas (pequenas simples, grandes simples, e gêmeas), o total de manchas, e a freqüência de formação de clones *mwh*, para cada tratamento.

O cruzamento ST apresentou freqüências de manchas pequenas simples, estatisticamente significativas ($P \leq 0,05$), induzidas pelo taxol, para os tratamentos com 0,009; 0,018 e 0,037 mg / ml de meio de cultura, enquanto que o total de manchas foi estatisticamente significativo ($P \leq 0,05$), apenas para o tratamento com 0,009 mg / ml de meio de cultura. Todos os demais tratamentos apresentaram freqüências de manchas estatisticamente não significativas ($P \geq 0,05$).

As freqüências de manchas (pequenas simples, grandes simples, e gêmeas), assim como o total de manchas, e a freqüência de formação de clones *mwh*, observadas no cruzamento HB, foram estatisticamente não significativas ($P \geq 0,05$) para todos os tratamentos com taxol.

Descendentes do cruzamento ST, tratados com uretano, apresentaram resultados positivos para manchas pequenas simples, para o total de manchas, e para a freqüência de formação de clones *mwh* ($P \leq 0,001$),

enquanto que os descendentes do cruzamento HB, tratados com uretano, apresentaram resultados positivos ($P \leq 0,001$), para todos os tipos de manchas (pequenas simples, grandes simples, e gêmeas), assim como para o total de manchas, e para a frequência de formação de clones *mwh*.

Apesar das frequências de manchas induzidas pelo uretano serem estatisticamente significativas, não justifica-se a análise dos descendentes BH, por não ser o objetivo do presente experimento.

Para a avaliação estatística, os resultados foram comparados com os correspondentes controles negativos, de acordo com o teste do X^2 para proporções (Frei e Würigler, 1988).

As figuras 8 e 9 apresentam, respectivamente, as distribuições nas frequências de manchas simples por asa, observadas em descendentes MH de *Drosophila melanogaster* dos cruzamentos ST e HB, tratados com diferentes concentrações de taxol.

Tabela 6: Frequências de manchas observadas nos descendentes MH (mvh/flr^2) de *D. melanogaster* dos cruzamentos ST e HB, tratados com taxol

Tratamento (concentração)	Número de asas	Manchas por asa (n° de manchas) Diag. estatíst.*				Clones <i>mvh</i>
		Pequenas simples (1-2 células)	Grandes simples (> 2 células)	Gêmeas	total	
		m = 2	m = 5	m = 5	m = 2	
Cruzamento ST						
Água	120	0,083 (10)	0,050 (6)	0,008 (1)	0,142 (17)	0,142 (17)
Uretano (10 mM)	120	0,808 (97)***	0,042 (5)	0,017 (2)	0,867 (104)***	0,867 (104)***
Taxol						
0,009 (mg/ml)	120	0,167 (20)**	0,07(2)	0,025 (3)	0,208 (25)**	0,208 (25)**
0,018 (mg/ml)	120	0,158 (19)**	0,042 (5)	0,017 (2)	0,217 (26)	0,217 (26)
0,028 (mg/ml)	120	0,167 (20)	0,050 (6)	0,008 (1)	0,225 (27)	0,225 (27)
0,037 (mg/ml)	120	0,175 (21)**	0,025 (3)	0,008 (1)	0,208 (25)	0,200 (24)
Cruzamento HB						
Água	124	0,331 (41)	0,177 (22)	0,113 (14)	0,621 (77)	0,573 (71)
Uretano (10 mM)	120	4,567 (548)***	1,383 (166)***	0,767 (92)***	6,717 (806)***	6,550 (786)***
Taxol						
0,009 (mg/ml)	122	0,320 (39)	0,008 (1)	0,016 (2)	0,344 (42)	0,336 (41)
0,018 (mg/ml)	120	0,250 (30)	0,025 (3)	0,000 (0)	0,275 (33)	0,275 (33)
0,028 (mg/ml)	118	0,339 (40)	0,017 (2)	0,000 (0)	0,356 (42)	0,356 (42)
0,037 (mg/ml)	120	0,300 (36)	0,050 (6)	0,017 (2)	0,367 (44)	0,367 (44)

* Diagnóstico estatístico de acordo com Frei & Würigler (1988): ** Prob. $\leq 0,05$; *** Prob. $\leq 0,001$; m = fator de multiplicação.

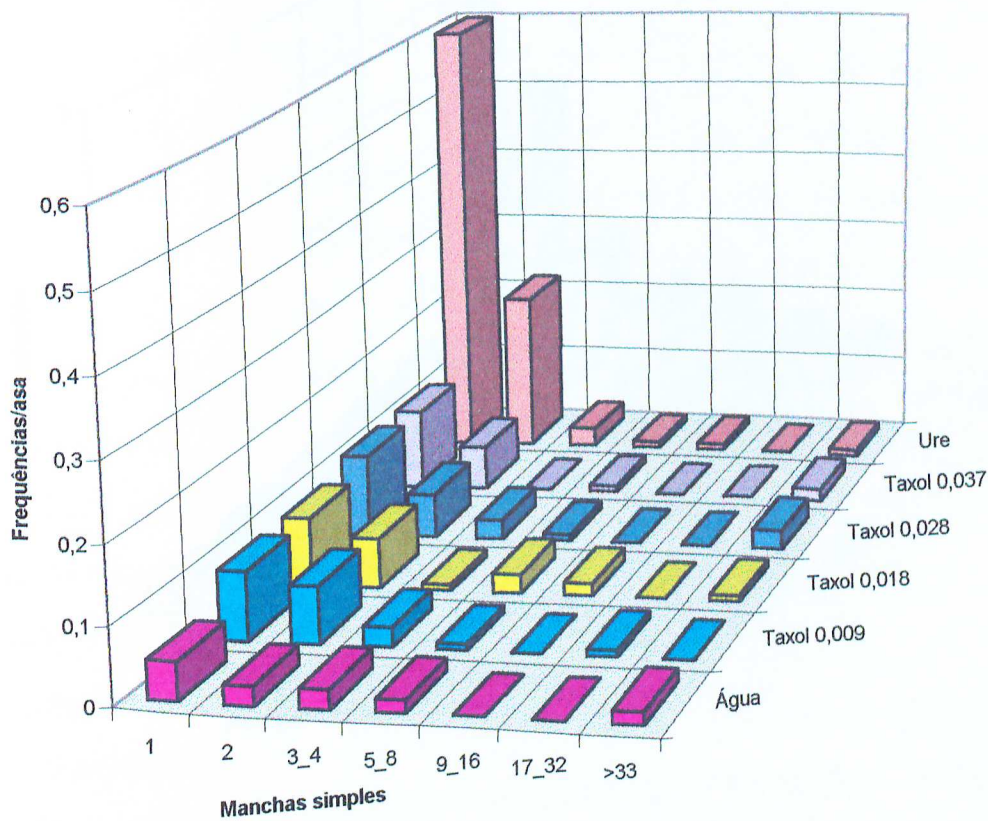


Figura 8. Distribuição do tamanho das manchas mutantes observadas em descendentes trans-heterozigotos (MH), do cruzamento padrão (ST), tratados com diferentes concentrações de paclitaxel (taxol) (mg / ml).

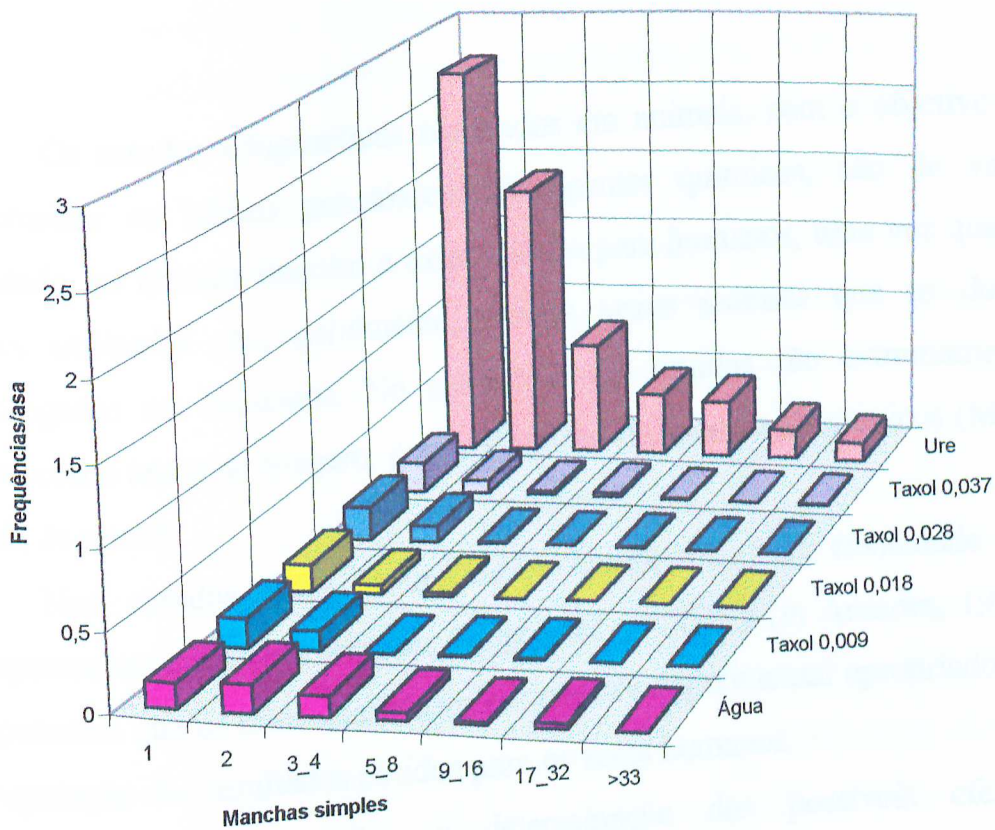


Figura 9. Distribuição do tamanho das manchas mutantes observadas em descendentes trans-heterozigotos (MH), do cruzamento de alta bioativação (HB), tratados com diferentes concentrações de paclitaxel (taxol) (mg / ml)

5. DISCUSSÃO

Os estudos citogenéticos realizados em animais, com o objetivo de determinar os efeitos genotóxicos de agentes químicos, são de valor limitado, no que diz respeito à extrapolação para humanos, uma vez que as doses utilizadas são, geralmente, muitas vezes maiores que as doses empregadas em humanos. No entanto, esses estudos são extremamente úteis, como testes de triagem, para a detecção de agentes genotóxicos (Melo *et al.*, *in press*).

Nos estudos sobre a avaliação comparativa da toxicidade de compostos químicos em animais, Huggett *et al.* (1996) (*in* Antunes, 1997) propuseram que os ratos constituem um modelo experimental apropriado na extrapolação dos resultados obtidos para os seres humanos.

No presente trabalho, a determinação dos possíveis efeitos genotóxicos do TAM e do taxol foi realizada em células de medula óssea de ratos Wistar, camundongos Swiss albinos, e em células de asas de *Drosophila melanogaster*.

As concentrações empregadas nos testes realizados com roedores, para a verificação de AC, de EPCMN e de alterações no IM, foram baseadas nas doses terapêuticas empregadas em humanos. A via i.p. foi escolhida pela sua simplicidade, e por maximizar a exposição da medula óssea aos agentes químicos (Preston *et al.*, 1987); enquanto que as doses empregadas nos testes para detecção de mutações e recombinações mitóticas em células de asas de *Drosophila melanogaster*, as concentrações foram escolhidas aleatoriamente, e de acordo com a toxicidade, estabelecida em testes pilotos.

De acordo com Preston *et al.* (1987), para se obter uma medida precisa da frequência de A.C. induzidas por agentes genotóxicos, as células devem ser analisadas em sua primeira metáfase após o tratamento. Devido ao fato de muitos agentes químicos induzirem aberrações cromatídicas durante a fase S, independentemente do estágio do ciclo celular em que a célula se encontra durante o tratamento, pelo menos uma das populações analisadas deve ser constituída de células que passaram pela fase S do ciclo celular. Neste experimento os animais foram sacrificados após 24 h de tratamento. Este tempo está de acordo com o proposto por Preston *et al.* (1987).

As AC podem ser de vários tipos (falhas acromáticas, quebras, fragmentos diminutos, trocas assimétricas, dicêntricos, aneis, deleções intersticiais e terminais) e afetar uma ou ambas as cromátidas (cromatídicas ou isocromatídicas) (Turcker e Preston, 1996). Ocasionalmente, as células apresentam múltiplas aberrações. Deve ser feita uma tentativa, no sentido de analisar completamente tais células, e não registrá-las simplesmente como células com múltiplas aberrações, uma vez que tal classificação significará a perda de informações importantes. Nos casos em que é impossível fazer a identificação precisa de tais aberrações, tais células devem ser registradas, mas não incluídas no total de células analisadas (Preston *et al.*, 1987).

De acordo com Brecher (1977), as falhas acromáticas e quebras são diferentes manifestações de um mesmo evento, sendo que falhas acromáticas podem ser quebras incompletas. Gebhart (1970) demonstrou que o aparecimento das falhas acromáticas depende da concentração do agente químico testado e da duração do tratamento. Hsu (1983), estabeleceu que, desde que a frequência, tanto de quebras como de falhas, aumenta sob a influência do agente mutagênico, ambas devem ser consideradas como lesões cromossômicas, sem que se faça distinção entre elas. No entanto, de

acordo com Preston *et al.* (1987), as falhas acromáticas devem ser registradas, mas devido ao fato de seu significado citogenético ser muito questionável, as mesmas não devem ser incluídas no cálculo das frequências de aberrações. Assim sendo, é prática comum representar a frequência total de aberrações incluindo, e não incluindo, as falhas acromáticas (Vijayalaxmi e Padmalatha Rai, 1996).

A indução de danos cromossômicos em células da medula óssea de roedores, por determinados agentes mutagênicos, pode resultar em respostas diferentes, quando machos e fêmeas são analisados (Preston *et al.*, 1987). Assim sendo, o teste para verificação de AC em células de medula óssea de ratos Wistar foi realizado com grupos de 6 animais, sendo 3 machos e 3 fêmeas.

Com o objetivo de obter uma correlação entre a indução de micronúcleos e a carcinogenicidade humana, foi realizado um estudo colaborativo, no qual o potencial genotóxico, de carcinógenos humanos conhecidos, foi avaliado pelo teste do MN. Como requerimentos mínimos para o estudo colaborativo, 5 machos de camundongos foram tratados i.p., ou via gavagem, com uma ou duas doses de cada agente químico, em três concentrações diferentes, e foram analisadas células da medula óssea femural ou do sangue periférico (Morita *et al.*, 1997). Assim sendo, os testes realizados com camundongos, para a verificação dos efeitos clastogênicos e/ou aneugênicos do TAM e do taxol, obedeceram os requerimentos mínimos estabelecidos no estudo colaborativo descrito por Morita *et al.* (1997).

A verificação de mutações e recombinações mitóticas, por meio do teste da mancha da asa em *Drosophila melanogaster*, foi realizada por meio dos cruzamentos padrão (ST) (Graf *et al.*, 1989), e de alta bioativação (HB), uma vez que este último possui uma sensibilidade aumentada a agentes

xenobióticos (Graf e van Schaik, 1992). Desses cruzamentos foram obtidos descendentes trans-heterozigotos (MH), e balanceadores heterozigotos (BH). Os descendentes MH apresentam manchas mutantes devido à ocorrência de mutação, deleção, recombinação mitótica, ou não-disjunção cromossômica; enquanto que nos descendentes BH todos os eventos recombinacionais são eliminados, devido a inversões múltiplas no cromossomo balanceador. As larvas, de ambos os genótipos, emergentes desses cruzamentos, foram tratadas com diferentes concentrações do TAM e do taxol. Os descendentes MH, devem ser analisados primeiro devido ao fato de possuírem um espectro de eventos genéticos, possíveis de induzir manchas mutantes, maior que os descendentes BH. Caso os descendentes MH apresentem frequências de manchas estatisticamente significativas, os descendentes BH devem ser analisados. A comparação entre as frequências de manchas obtidas nos dois tipos de descendentes, permite saber qual é a porcentagem devida exclusivamente à recombinação.

5.1 Efeitos clastogênicos, aneugênicos, mutagênicos e/ou recombinogênicos do TAM.

Ratos Wistar tratados com TAM apresentaram apenas aberrações de cromátides (falhas acromáticas, quebras, e fragmentos). O número de falhas, de quebras, e de fragmentos, assim como o número total de células com AC, foi estatisticamente não significativo, quando comparado com o controle negativo, para todas as concentrações.

Não houve diferença, estatisticamente significativa, quando foram comparadas as frequências de aberrações encontradas nos machos, comparado com as frequências encontradas nas fêmeas.

Células com mais de três aberrações foram classificadas como células com aberrações múltiplas. No entanto, devido à dificuldade encontrada na determinação precisa das aberrações existentes nessas células, as mesmas foram registradas, mas não foram computadas no total de células com aberrações.

Foi verificado uma redução estatisticamente significativa no IM de todos os grupos tratados com TAM. Esses resultados estão relacionados com os efeitos citotóxicos desse agente, sendo que os dados obtidos por Osborne *et al.* (1983), em células de câncer de mama humano, sugerem que o TAM reduz o IM por meio de um bloqueio precoce na fase G1 do ciclo celular.

Devido aos resultados negativos observados no teste de AC em células de medula óssea de ratos Wistar, foi realizado o teste para verificação de efeitos clastogênicos e/ou aneugênicos, por meio do teste do MN em células de medula óssea de camundongos, tratados com duas doses de diferentes concentrações de TAM, com intervalo de 24 h, e sacrificados 24 h após o segundo tratamento.

Neste teste foi verificado que o TAM induziu uma frequência total de EPCMN estatisticamente não significativa para os animais tratados com 1,25 mg / 100 g de peso do animal. No entanto, as frequências totais de EPCMN foram estatisticamente significativas para os animais tratados com 2,5 e 5,0 mg / 100 g de peso do animal, além de uma grande variabilidade inter-individual que pode ser demonstrada pelo desvio padrão obtido nas médias de EPCMN de todos os tratamentos.

Os resultados negativos obtidos no teste de AC e os positivos obtidos no teste de MN, podem ser explicados pelo fato de que, no teste de AC foram utilizados ratos Wistar, enquanto que no teste de MN foram utilizados camundongos. De acordo com Vijayalaxmi e Padmalatha Rai

(1996), as principais vias metabólicas do TAM, em várias espécies, são tanto qualitativamente quanto quantitativamente diferentes. Isto oferece uma plausível explicação para a diferença de resposta ao TAM, inclusive genotóxica, obtida em diferentes espécies.

Além disso, as concentrações de TAM, empregadas no teste para detecção de EPCMN, foram maiores que as utilizadas no teste de AC, e os animais foram injetados com duas doses, enquanto que no teste de AC os animais foram injetados com apenas uma dose.

O mecanismo de indução de AC e MN pelo TAM não é conhecido. No entanto, a formação de produtos covalentemente adicionados ao DNA (aductos) por metabólitos do TAM tem sido bem estabelecida (Vijayalaxmi e Padmalatha Rai, 1996). Liehr *et al.* (1986) acreditam que, se os aductos de DNA formados não são removidos por meio de mecanismos de reparo, subsequentemente podem produzir mutações de ponto e AC.

Vijayalaxmi e Padmalatha Rai (1996), trabalhando com camundongos Swiss albinos, verificaram um aumento estatisticamente significativo nas frequências de AC e MN, com doses muito menores (0,1; 0,2; 0,4 e 0,8 mg / Kg / dia) que as empregadas neste experimento. No entanto, no experimento desses pesquisadores, o TAM foi administrado durante um período de 10 dias, e as preparações citológicas foram feitas após 24, 48, 72 e 96 h da última administração.

Han e Liehr (1992) verificaram que o DNA de células de fígado de ratas Sprague-Dawley, continham dois aductos, após uma simples injeção de 20 mg de TAM / kg. Após três e seis injeções de 20 mg de TAM / kg / dia, foram formados quatro aductos adicionais, enquanto que a concentração de aductos aumentou, respectivamente, 5-7 e 10-15 vezes mais que em uma dose única.

Carthew *et al.* (1995) trabalhando com fêmeas de ratos F344 (Fischer), Wistar (LAC-P) e LEW (Lewis), verificaram que o TAM, administrado na dieta (420 p.p.m.), induziu um aumento de aductos de DNA, cumulativo com o tempo, de 500 aductos / 10^8 nucleotídios após 30 dias de tratamento, para quase 3.000 aductos / 10^8 nucleotídios após 180 dias de tratamento, com pouca diferença entre as espécies estudadas.

A diferença existente entre o tempo de tratamento dos animais (número de administrações de TAM), pode explicar as diferenças nas freqüências de AC e EPCMN observadas neste experimento e no experimento de Vijayalaxmi e Padmalatha Rai (1996).

Sargent *et al.* (1994) verificaram quebras cromossômicas, aneuploidia, endoreduplicação e despolimerização do fuso mitótico em hepatócitos de ratas Sprague-Dawley tratadas com doses que variavam de 0,3 a 35 mg / Kg de TAM; e Styles *et al.* (1997), verificaram que o TAM possui efeitos clastogênicos e aneugênicos em hepatócitos de ratos, e em células linfoblastóides humanas transfectadas com P450 cDNAs (células MCL-5). Esses resultados podem também explicar o aumento na freqüência de EPCMN, observada no experimento com camundongos tratados com TAM.

A eficácia dos testes utilizados para detecção de AC, EPCMN e alterações do IM, é confirmada pelos resultados obtidos com a CP, que é um agente comprovadamente mutagênico. Uma revisão completa sobre os efeitos genotóxicos da CP é apresentada por Anderson *et al.* (1995). Devido aos efeitos genotóxicos comprovados, a CP é usada, rotineiramente, como controle positivo, em testes citogenéticos para detecção de danos cromossômicos induzidos.

A análise de manchas mutantes em células de asas de *Drosophila melanogaster* foi realizado por meio da análise de descendentes

provenientes dos cruzamentos St e HB, realizados em paralelo, nos quais foram utilizadas diferentes concentrações de TAM.

Um controle positivo com uretano 10 mM, dissolvido em água, foi incluído em ambos cruzamentos, por ser um agente com propriedades genotóxicas comprovadas (Frölich e Würigler, 1990).

Primeiramente foram analisadas as freqüências de manchas observadas nos descendentes MH de ambos cruzamentos, e registrados os números de manchas (pequenas simples, grandes simples, e gêmeas), o total de manchas, e a freqüência de formação de clones *mwh*, para cada tratamento.

Foi verificado um aumento na freqüência de manchas nas asas dos descendentes do cruzamento HB, quando comparado com as freqüências observadas nos descendentes do cruzamento ST. No entanto, apesar do aumento observado, as freqüências de manchas induzidas pelo TAM foram estatisticamente não significativas, para todas as concentrações testadas, em ambos os cruzamentos, quando comparado com o controle negativo (água), não justificando-se, portanto, a análise dos descendentes BH, nos quais todos os eventos recombinacionais são eliminados, devido à inversão cromossômica existente no cromossomo balanceador.

A eficácia dos testes utilizados para detecção de manchas mutantes em células de asas de *Drosophila melanogaster*, tratadas com TAM, é confirmada pela análise de descendentes dos cruzamentos ST e HB, tratados com uretano, que apresentaram resultados positivos para as freqüências de manchas, indicando que os resultados negativos obtidos com o TAM são verdadeiros, e não falsos negativos.

Apesar das freqüências de manchas induzidas pelo uretano serem estatisticamente significativas, não justifica-se a análise dos descendentes BH, por não ser o objetivo do presente experimento.

5.2 Efeitos clastogênicos, aneugênicos, mutagênicos e/ou recombinogênicos do taxol.

O potencial clastogênico do taxol foi avaliado por meio de um protocolo combinado de análise de AC em células metafásicas, e de EPCMN em células de medula óssea de camundongos tratados i.p. com duas doses de diferentes concentrações de taxol, com intervalo de 24 h, e sacrificados após 24 h do segundo tratamento.

Foram observadas apenas aberrações de cromátides dos tipos falhas acromáticas, quebras, e fragmentos, sendo que o número de tais aberrações foi estatisticamente não significativo, quando comparado com o controle negativo, para todas as concentrações.

Quando foram consideradas as falhas acromáticas, o número total de células com AC induzidas pelo taxol foi estatisticamente significativo, comparado com o controle negativo, para a concentração de 3,0 mg / 100 de peso do animal, e estatisticamente não significativo para as demais concentrações. Quando não foram consideradas as falhas acromáticas o número total de células com aberrações induzidas pelo taxol foi estatisticamente não significativo, para todas as concentrações, quando comparado com o controle negativo. A redução na frequência de AC, com o aumento da concentração de taxol, demonstra o efeito citotóxico deste quimioterápico.

O taxol induziu células poliplóides dose-dependente, com frequências estatisticamente significativas, para todas as concentrações utilizadas, quando comparadas com o controle negativo. Estas células foram registradas, mas não foram computadas no total de células com aberrações.

Esses resultados estão de acordo com o mecanismo de ação do taxol, por meio da inibição da polimerização, ou da função do fuso mitótico

(Horwitz *et al.*, 1986; Rowinsky e Donehower, 1991; Long e Fairchild, 1994; Nicolaou *et al.*, 1994).

De acordo com Long e Fairchild (1994), células sincronizadas em mitose mostraram-se sensíveis a baixas concentrações de taxol, após um tempo inferior a 30 min., que é o tempo requerido para a formação do fuso celular. Os resultados obtidos por esses autores sugerem que o taxol inibe a formação do fuso mitótico, sem afetar a função de fusos pré-formados, e sem impedir a divisão mitótica. Exposição contínua a baixas concentrações de taxol, por mais de um ciclo, resulta em células com conteúdo de DNA maior que 4C ou 8C. Esses resultados suportam a hipótese de que, não sendo capaz de segregar as cromátides irmãs, as células tratadas com taxol podem eventualmente reconstruir a membrana nuclear ao redor de cromossomos individuais, ou grupos de cromossomos; reverter as células para a fase G1, contendo 4C de DNA; e entrar na fase S, resultando em célula com 8C de DNA. Foi proposto, que este é o mecanismo citotóxico primário do taxol.

Além da diminuição da frequência de AC, de acordo com o aumento na concentração de taxol, o efeito citotóxico pode ainda ser comprovado, no nosso experimento, pela redução, estatisticamente significativa, no IM de todos os grupos tratados.

O taxol induziu frequências individuais e totais de EPCMN, dose-dependente, estatisticamente significativas para todos os grupos de tratamento.

Esses resultados estão de acordo com observações anteriores feitas com outros agentes antimicrotúbulos, nos quais as frequências de EPCMN aumenta de maneira dose-dependente (Salassidis *et al.*, 1992), e com Tinwell e Ashby (1994), que observaram aumento na frequência de EPCMN em células de medula óssea de camundongos tratados com taxol; e

com Jagetia e Nayak (1996) que observaram aumento na frequência de EPCMN em células de medula óssea de camundongos tratados com taxol, associado ou não à radiação gamma.

Uma grande variabilidade inter-individual pode ser demonstrada pelo desvio padrão obtido nas médias de EPCMN de todos os tratamentos, sendo que o grupo tratado com 4,5 mg / 100 g de peso do animal apresentou o maior desvio padrão. Grandes variabilidades inter-individuais foram também encontradas por outros autores, e com diferentes agentes químicos, quando utilizaram o teste do MN (Nepomuceno e Spanó, 1992; Nepomuceno e Spanó, 1995; Nakano *et al.*, 1996).

A CP induziu frequências de AC, de EPCMN, e reduziu o IM, de forma estatisticamente significativa, quando comparado com o controle negativo, confirmando a eficácia dos testes realizados com camundongos.

A análise de manchas mutantes em células de asas de *Drosophila melanogaster* foi realizado por meio da análise de descendentes provenientes dos cruzamentos padrão e de alta bioativação, realizados em paralelo, nos quais foram utilizadas diferentes concentrações de taxol.

De forma similar ao experimento realizado com TAM, um controle positivo com uretano 10 mM, dissolvido em água, foi incluído em ambos cruzamentos, por ser um agente com propriedades genotóxicas comprovadas (Frölich e Würigler, 1990).

Primeiramente foram analisadas as frequências de manchas observadas nos descendentes MH de ambos cruzamentos, e registrados os números de manchas (pequenas simples, grandes simples, e gêmeas), o total de manchas, e a frequência de formação de clones *mwh*, para cada tratamento.

Foi verificado um aumento na frequência de manchas pequenas simples, estatisticamente significativo, nas asas dos descendentes do

cruzamento ST, tratados com 0,009; 0,018 e 0,037 mg de taxol / ml de água; enquanto que o total de manchas foi estatisticamente significativo apenas para os tratados com 0,009 mg de taxol / ml de água. Todas as demais frequências foram estatisticamente não significativas, quando comparado com as frequências observadas no controle negativo (água). Os descendentes do cruzamento HB apresentaram um aumento nas frequências de manchas induzidas pelo taxol, quando comparadas com as frequências observadas nos descendentes do cruzamento ST. No entanto, essas frequências foram estatisticamente não significativas, para todas as concentrações testadas, quando comparado com o controle negativo (água).

Estes resultados estão de acordo com Cunha et al (1996), que obtiveram frequências de manchas estatisticamente não significativas, em ambos cruzamentos, demonstrando que o taxol não possui atividade genotóxica direta ou indireta, em células somáticas de *D. melanogaster*.

A eficácia dos testes utilizados para detecção de manchas mutantes em células de asas de *Drosophila melanogaster*, tratadas com taxol, é confirmada pela análise de descendentes dos cruzamentos ST e HB, tratados com uretano, que apresentaram resultados positivos para as frequências de manchas, indicando que os resultados negativos obtidos com o taxol são verdadeiros, e não falsos negativos.

6. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtido neste trabalho, podemos concluir que:

O antineoplásico citrato de tamoxifen (TAM):

- Não possui efeito clastogênico em células de medula óssea de ratos Wistar;
- Possui efeito citotóxico em células de medula óssea de ratos Wistar, demonstrado pela redução significativa no IM.
- Possui efeito aneugênico em células de medula óssea de camundongos Swiss albinos, demonstrado pelo aumento estatisticamente significativo na frequência de MN;
- Não possui efeito mutagênico e recombinogênico em células de asas de *Drosophila melanogaster*.

O antineoplásico paclitaxel (taxol):

- Não possui efeito clastogênico em células de medula óssea de camundongos Swiss albinos;
- Possui efeito citotóxico em células de medula óssea de camundongos Swiss albinos, demonstrado pela redução significativa no IM.
- Possui efeito aneugênico em células de medula óssea de camundongos Swiss albinos, demonstrado pelo aumento estatisticamente significativo na frequência de MN e de células poliplóides;

- Não possui efeito mutagênico e recombinogênico em células de asas de *Drosophila melanogaster*.

Os resultados acima são válidos para as concentrações, assim como para as condições experimentais utilizadas. Apesar de alguns dados estatisticamente não significativos, obtidos neste trabalho, os dados positivos obtidos, assim como os da literatura especializada, nos permitem concluir que é essencial que pacientes submetidos a quimioterapia com o TAM e o taxol sejam rigorosamente monitorados para efeitos genotóxicos, e que os oncologistas trabalhem sob a suposição de que os agentes químicos antineoplásicos apresentam um risco genotóxico potencial.

7. RESUMO

O citrato de tamoxifen (TAM), e o paclitaxel (taxol) são agentes químicos utilizados no tratamento de doenças neoplásicas. O potencial genotóxico do TAM foi avaliado em células de medula óssea de ratos Wistar, com a finalidade de verificar o potencial clastogênico, por meio da análise de aberrações cromossômicas (AC). Camundongos Swiss albinos, foram utilizados com a finalidade de avaliar o potencial clastogênico e/ou aneugênico, de ambos os agentes, por meio do teste do micronúcleo (MN); e o potencial clastogênico do taxol por meio da análise de AC. Linhagens de mutantes de *Drosophila melanogaster* foram utilizadas para a detecção de mutações e recombinações mitóticas, por meio do teste da mancha da asa. Foram utilizados os cruzamentos padrão (ST) e de alta bioativação (HB). Desses cruzamentos foram obtidos descendentes trans-heterozigotos (MH), e balanceadores heterozigotos (BH). Os descendentes MH apresentam manchas mutantes devido à ocorrência de mutação, deleção, recombinação mitótica, ou não-disjunção cromossômica; enquanto que nos descendentes BH todos os eventos recombinacionais são eliminados, devido a inversões múltiplas no cromossomo balanceador TM3. As larvas, de ambos os genótipos, emergentes desses cruzamentos, foram tratadas com diferentes concentrações do TAM e do taxol.

Ratos tratados intraperitonealmente (i.p.) com diferentes concentrações de TAM (0,6; 1,2 e 2,4 mg / 100 g de peso do animal) (3 machos e 3 fêmeas para cada concentração) apresentaram frequências de AC, estatisticamente não significativas, e redução no índice mitótico (IM), estatisticamente significativa, para todas as concentrações, quando comparadas com o controle negativo.

Camundongos tratados i.p. com duas doses de diferentes concentrações de TAM (1,25; 2,5 e 5,0 mg / 100 g de peso do animal), com intervalo de 24 h, e sacrificados 24 h após o segundo tratamento (5 machos para cada concentração), apresentaram frequência total de eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMN), estatisticamente não significativa, para os animais tratados com 1,25 mg / 100 g de peso do animal. No entanto, essas frequências foram estatisticamente significativas para os animais tratados com 2,5 e 5,0 mg / 100 g de peso do animal, quando comparadas com o controle negativo.

Descendentes MH dos cruzamentos ST e HB, tratados com diferentes concentrações de TAM (5,0; 7,5 e 10,0 mg / ml de água), apresentaram frequências de manchas, estatisticamente não significativas, para todas as concentrações testadas. Desta forma, não justificava-se a análise dos descendentes BH.

O potencial genotóxico do taxol foi avaliado por meio de um protocolo combinado, de análise de AC e de EPCMN. Camundongos tratados i.p. com duas doses de diferentes concentrações de taxol (3,0; 4,5 e 6,0 mg / 100 g de peso do animal), com intervalo de 24 h, e sacrificados 24 h após o segundo tratamento (5 machos para cada concentração), apresentaram frequências de AC, estatisticamente significativas, quando foram consideradas as falhas acromáticas, apenas para o tratados com 3,0 mg / 100 g de peso do animal; e frequências de células poliplóides; de EPCMN, assim como redução no IM, estatisticamente significativos, para todas as concentrações, quando comparados com o controle negativo.

Descendentes MH, do cruzamento ST, tratados com diferentes concentrações de taxol (0,009; 0,018; 0,028 e 0,037 mg / ml de água) apresentaram frequências de manchas simples, estatisticamente significativas, para os tratamentos com 0,009; 0,018 e 0,037 mg / 100 g de

peso do animal, enquanto que a frequência total de manchas foi estatisticamente significativa apenas para o tratamento com 0,009 mg / 100 g de peso do animal. Descendentes MH, do cruzamento HB, apresentaram frequências de manchas, estatisticamente não significativas, para todos os tratamentos. Desta forma, não justificava-se a análise dos descendentes BH.

Em todos os experimentos foram incluídos controles positivos, que apresentaram frequências estatisticamente significativas, corroborando a eficácia dos testes utilizados.

8. SUMMARY

Tamoxifen citrate (TAM) and paclitaxel (taxol) are chemical agents used in the treatment of neoplastic diseases. The genotoxic potential of TAM was studied by submitting Wistar rat bone marrow to the chromosome aberration (CA) assay. Swiss albino mice were employed to examine clastogenicity and/or aneugenicity of both agents by the micronucleus test (MN), and clastogenicity of taxol by the CA assay. *Drosophila melanogaster* mutant strains were employed for mitotic mutation and recombination by the wing spot test using the Standard Cross (ST) and the High Bioactivation Cross (HB). From these crosses were obtained trans-heterozygous (MH) and balancer heterozygous (BH) descendents. The MH showed mutant spots due to mutation, deletion, mitotic recombination, or chromosomal non-disjunction, while in the BH descendents all recombinational events were eliminated due to the presence of multiple inversions on the balancer chromosome. Larvae from both genotypes were treated with different concentrations of TAM and taxol.

Rats treated intraperitoneally (i.p.) with different concentrations of TAM (0.6; 1.2 e 2.4 mg / 100 g body weight, administered to 3 males and 3 females for each concentration), did not show an increase in the frequency of CA, however the reduction in the mitotic index was statistically significant for all concentrations when compared to the negative control.

Mice i.p. treated with two doses (24 hours apart) of TAM concentrations (using 1.25; 2.5 e 5.0 mg / 100 g body weight, administered to 5 males at each concentration) and sacrificed 24 hours after the second treatment, did not show an increase in the total frequency of micronucleated polychromatic erythrocytes (MNPCEs) among the animals treated with 1.25

mg. However, these frequencies were statistically significant for animals treated with 2.5 and 5.0 mg / 100 g body weight when compared to the negative control.

The MH *Drosophila* descendents from ST and HB crosses, treated with different concentrations of TAM (5.0; 7.5 and 10.0 mg / ml of water), did not present statistically significant increases in the frequency of spots for all tested concentrations. Because no positive effects were obtained for this compound in the MH wings of both crosses, the corresponding BH wings were not analysed.

The genotoxic potential of taxol was evaluated by using the combined protocol of metaphase analysis and the micronucleus test. A group of i.p. treated mice were subjected to two doses of taxol 24 hours apart (3.0; 4.5 and 6.0 mg / 100 g body weight administered to 5 males at each concentration), and sacrificed 24 hrs after the second treatment. These animals presented significantly increased frequencies of CA, when gaps were considered, only for animals treated with 3.0 mg. The frequency of polyploid cells and MNPCEs as well as a mitotic index reduction were also statistically significant for all tested concentrations, when compared to the negative control.

The MH *Drosophila* descendents, from the ST cross, treated with different concentrations of taxol (0.009; 0.018; 0.028 and 0.037 mg / ml of water) presented statistically significant single spot frequencies for those treated with 0.009; 0.018 and 0.037 mg, however the total of spot frequencies was statistically significant only for the treatment with 0.009 mg. The MH descendentes from the HB cross did not present statistically significant spot frequencies for any of the treatments. For this reason the corresponding BH wings were not analysed.

For all experiments a positive control was included to facilitate statistical analysis and determine the efficacy of the employed assays.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anderson, D., Bishop, J. B., Garner, R. C., Ostrosky-Wegman, P. and Selby, P. B.** (1995). Cyclophosphamide: Review of its mutagenicity for an assessment of potential germ cell risks. *Mutation Res.* 330: 115-181.
- Antunes, L. M. G.** (1997). Efeito protetor das vitaminas C e E sobre os danos cromossômicos induzidos pelo antitumoral doxorubicina em células de mamíferos *in vivo* e *in vitro*. Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo, para a obtenção do grau de Doutor em Ciências (Área: Genética). Ribeirão Preto. pp:100.
- Barrs, A. J.** (1980). Biotransformation of xenobiotics in *Drosophila melanogaster* and its relevance for mutagenicity testing. *Drug. Metab. Rev.* 11: 191-221.
- Brecher, S.** (1977). Ultrastructural observations of X-ray induced chromatid gaps. *Mutation Res.* 42: 249-268.
- Carthew, P., Rich, K. J., Martin, E. A., De Matteis, F., Lim, C-K., Manson, M. M., Festing, M. F. W., White, I. N. H. and Smith, L. L.** (1995a). DNA damage as assessed by 32 P-postlabelling in three rat strains exposed to dietary tamoxifen: the relationship between cell proliferation and liver tumour formation. *Carcinogenesis* 16: 1299-1304.

- Carthew, P., Martin, E. A., White, I. N. H., De Matteis, F., Edwards, R. E., Dorman, B. M., Heydon, R. T. and Smith, L. L. (1995b).** Tamoxifen induces short-term cumulative DNA damage and liver tumors in rats: Promotion by phenobarbital. *Cancer Res.* 55: 544-547.
- Cunha, K. S., Schwartzmann, G. and Andrade, H. H. R. de (1996).** Ausência de efeito genotóxico em células somáticas de *Drosophila melanogaster* tratadas com taxol. *Revista Brasileira de Genética.* 19: 178.
- Dapkus, D. and Merrel, D. J. (1977).** Chromosomal analysis of DDT-resistance in a long-term selected population of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 87: 685-697.
- Ferguson, L. R. and Pearson, A. E. (1996).** The clinical use of mutagenic anticancer drugs. *Mutation Res.* 335: 1-12.
- Ferrari, I. (1991).** Teste do micronúcleo em cultura temporária de linfócitos. In: Rabello-Gay, M. N., Rodrigues M. A. R., Monteleone-Neto R. (eds.): *Mutagênese, Teratogênese e Carcinogênese. Métodos e Critérios de Avaliação.* Ribeirão Preto, SP, Brasil: Sociedade Brasileira de Genética / Revista Brasileira de Genética. pp. 107-112.
- Fisher, B., Constantino, J., Redmond, C., Poisson, R., Bowman, D., Couture, J., Dimitrov, N., Wolmark, N., Wigkerham, L., Fisher, E., Margolese, R., Robidoux, A., Shibata, H., Terz, J., Paterson, A. H. G., Feldman, M. I., Farrar, W., Evans, J., Ligkley, H. L., Ketner, M. and others (1989).** A randomized clinical trial evaluating tamoxifen

in the treatment of patients with node-negative breast cancer who have estrogen-receptor-positive tumors. *N. Engl. J. Med.* 320: 479-484.

Ford, C. E. and Hamerton, J. L. (1956). A colchicine, hypotonic citrate, squash sequence for mammalian chromosomes. *Stain Technol.* 31: 247-251.

Frei, H. and Würgler, F. E. (1988). Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative, or inconclusive result. *Mutation Res.* 203: 297-308.

Frölich, A. and Würgler, F. E. (1989). New tester strains with improved bioactivation capacity for the *Drosophila* wing-spot test. *Mutation Res.* 216: 179-187.

Frölich, A. and Würgler, F. E. (1990). Genotoxicity of ethyl carbamate in the *Drosophila* wing test: Dependence on genotype-controlled metabolic capacity. *Mutation Res.* 244: 201-208.

Gebhart, E. (1970). The treatment of human chromosomes *in vitro*. in: F. Vogel and G. Rohrborn (Eds.), *Chemical mutagenesis in mammals and man.* Springer-Verlag, N. Y., pp: 367-382.

Garcia-Bellido, A. and Dapena, J. (1974). Induction, detection and characterization of cell differentiation mutants in *Drosophila*. *Mol. gen. Genet.* 128: 117-130.

- Graf, U., Würgler, F. E., Katz, A. J., Frei, H., Juon, H., Hall, C. B. and Kale, P. G.** (1984). Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environ. Mutagen.* 6: 153-188.
- Graf, U., Frei, H., Kägi, A., Katz, A. J. and Würgler, F. E.** (1989). Thirty compounds tested in the *Drosophila* wing spot test. *Mutation Res.* 222: 359-373.
- Graf, U. and van Schaik, N.** (1992). Improved high bioactivation cross for the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Res.* 271: 59-67.
- Greaves, P., Goonetilleke, R., Nunn, G., Topham, J. and Orton, T.** (1993). Two years carcinogenicity study of tamoxifen in Alderley Park Wistar-derived rats. *Cancer Res.* 53: 3919-3924.
- Gregory, R. E. and DeLisa, A. F.** (1993). Paclitaxel: A new antineoplastic agent for refractory ovarian cancer. *Clinical Pharmaceutics* 12: 401-415.
- Guillot, C., Falette, N., Courtois, S., Voeltzel, T., Garcia, E., Ozturk, M. and Puisieux, A.** (1996). Alteration of p53 damage response by tamoxifen treatment. *Clinical Cancer Res.* 2: 1439-1444.
- Gusmán-Rincón, J. and Graf, U.** (1995). *Drosophila melanogaster* somatic mutation and recombination test as a biomonitor. In: *Biomonitoring and Biomarkers as Indicators of Environmental Change*, Edited by F. M. Butterworth et al., Plenum Press, N. Y., pp. 169-181.

- Guzmán, J., Graf, U., Varela, A., Policroniades, R. and Delfín, A.** (1994). Mutación y recombinación somáticas inducidas por neutrones rápidos en la prueba de la mancha del ala de *Drosophila melanogaster*. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 10: 29-30.
- Hällström, I., Blanck, A. and Atuma, S.** (1984). Genetic variation in cytochrome P-450 and xenobiotic metabolism in *Drosophila melanogaster*. *Biochem. Pharmacol.* 33: 13-20.
- Hällström, I. and Blanck, A.** (1985). Genetic regulation of the cytochrome P-450 system in *Drosophila melanogaster*. I. Chromosomal determination of some cytochrome P-450-dependent reactions. *Chem. Biol. Interact.* 56: 157-171.
- Han, X. and Lierh, J. G.** (1992). Induction of covalent DNA adducts in rodents by tamoxifen. *Cancer Res.* 52: 1360-1363.
- Hard, G. C., Iatropoulos, M. J., Jordan, K., Radi, L., Kaltenberg, O. P., Imondi, A. R. and Williams G. M.** (1993). Major difference in the hepatocarcinogenicity and DNA adduct forming ability between toremifene and tamoxifen in female Crl: CD (BR) rats. *Cancer Res.* 53: 4534-4541.
- Hemminki, K., Rajanmiemi, H., Koskinen, M. and Hansson, J.** (1997). Tamoxifen-induced DNA adducts in leucocytes of breast cancer patients. *Carcinogenesis* 18: 9-13.

- Hirsimäki, P., Hirsimäki, Y., Nieminen, L. and Payne, B. J. (1993).** Tamoxifen induces hepatocellular carcinoma in rat liver: a 1 year study with two antiestrogens. *Arch. Toxicol.* 67: 49-54.
- Horwitz, S. B., Lothstein, L., Manfredi, J. J., Mellado, W., Parness, L., Roy, S. N., Schiff, P. B., Sorbara, L. and Zeheb, R. (1986).** Taxol: mechanisms of action and resistance. *Annals New York Academy of Sciences.* pp:733- 744.
- Hsu, T.C. (1983).** Cytogenetics assays of environmental mutagens. Allanheld Osmum Publishers, Totowa, N. J., pp: 1-9.
- Jagetia, G. C. and Nayak, V. (1996).** Treatment of mice with a novel antineoplastic agent taxol before irradiation increases the frequency of micronuclei in the bone marrow. *Mutation Res.* 349: 219-227.
- Jordan, V. C. (1993).** A current view of tamoxifen for the treatment and prevention of breast cancer. *Br. J. Pharmacol.* 110: 507-517.
- Jordan, M. A., Toso, R. T. and Thrower, D. (1993).** Mechanism of mitotic block and inhibition of cell proliferation by taxol at low concentrations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 9552-9556.
- Kearns, C. M., Gianni, L. and Egorin, M. L. (1995).** Clinical implications of Paclitaxel. Pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Bristol-Myers Squibb Company*, Princeton, N. Y. pp: 1-18.

- Kupfer, D., Mani, C., Lee, C. A. and Rifkind, A. B.** (1994). Induction of tamoxifen-4-hydroxylation by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD), β -naphthoflavone (β NF), and phenobarbital (PB) in avian liver: identification of P450 TCDD_{AA} as catalyst of 4-hydroxylation induced by TCDD and β NF¹. *Cancer Res.* 54: 3140-3144.
- Lane, D. P.** (1992). Cancer: *p53*, guardian of the genome. *Nature* (Lond.), 358: 15-16.
- Lerner, J. and Jordan, V. C.** (1990). Development of antiestrogens and use in breast cancer: Eighth Cain Memorial Award Lecture. *Cancer Res.* 50: 4177-4189.
- Liehr, J. G., Avitts, T. A., Randerath, E. and Randerath, K.** (1986). Estrogen induced endogenous DNA adduction, possible mechanism of hormonal cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83: 5301-5305.
- Lindsley, D. L. and Zimm, G. G.** (1992). (Eds.). The genome of *Drosophila melanogaster*, Academic Press, San Diego CA, USA, p. 1133
- Long, B. H. and Fairchild, C. R.** (1994). Paclitaxel inhibits progression of mitotic cells to G₁ phase by interference with spindle formation without affecting other microtubule functions during anaphase and telophase. *Cancer Res.* 54: 4355-4361.
- Lyman, S. D. and Jordan, V. C.** (1985). Metabolism of tamoxifen and uterotrophic activity. *Biochemical Pharmacology* 34: 2787-2794.

- Manfredi, J. J. and Horwitz, S. B.** (1984). Taxol: an antimitotic agent with a new mechanism of action. *Pharmacol. Ther.* 25: 83-125.
- Melo, S. M. A., Spanó, M. A. and Nepomuceno, J. C.** Ausência de efeitos genotóxicos do antibiótico amicacina em células de medula óssea de ratos Wistar, *in vivo*. *R. Cent. Ci. Bioméd. Univ. Fed. Uberlândia* (in press).
- Montandon, F. and Willians, G. M.** (1994). Comparison of DNA reactivity of the polyphenylethylene hormonal agents diethylstilbestrol, tamoxifen and toremifene in rat and hamster liver. *Arch. Toxicol.* 68: 272-275.
- Morita, T., Asano, N., Tukumi, A., Sasaki, Y. F., Sato, S., Shimada, H., Sutou, S., Suzuki, T., Wakata, A., Sofuni, T. and Hayashi, M.** (1997). Evaluation of rodent micronucleus assay in the screening of IARC carcinogens (Groups 1, 2A and 2B). The summary report of the 6th collaborative study by CSGMT / JEMS. *MMS. Mutation Res.* 389: 3-122.
- Nakano, E., Rabello-Gay, M. N. and Pereira, C. A. B.** (1996). Evaluation of the genotoxic potential of flumethrin in mouse bone marrow by chromosomal analysis and micronucleus test. *Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis* 16: 37-48.
- Nepomuceno, J. C. and Spanó, M. A.** (1992). Incidência de micronúcleos em eritrócitos periféricos de tilápias (*Oreochromis mossambicus*)

provindas de diferentes estações de piscicultura. *R. Cent. Ci. Bioméd. Univ. Fed. Uberlândia* 8: 7-16.

Nepomuceno J. C. and Spanó M. A. (1995). Induction of micronuclei in peripheral erythrocytes of *Cyprinus carpio* fish by methyl parathion. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 11: 9-12.

Nicolaou, K. C., Dai, W. and Guy, R. K. (1994). Chemistry and biology of taxol. *Angew. Chem. Int. Engl.* 33: 15-44.

Osborne, C. K., Boldt, D. H., Clark, G. M. and Trent, J. M. (1983). Effets of tamoxifen on humam breast cancer cell cycle kinetics: accumulation of cells in early G₁ phase. *Cancer Res.* 43: 3583-3585.

Pereira, C. A. B. (1991). Teste estatístico para comparar proporções em problemas de citogenética. In: Rabello-Gay, M. N., Rodrigues, M. A. R., Monteleone-Neto, R. (eds.): *Mutagênese, Teratogênese e Carcinogênese. Métodos e Critérios de Avaliação*. Ribeirão Preto, SP, Brasil: Sociedade Brasileira de Genética / Revista Brasileira de Genética. pp. 113-121.

Preston, R. J., Dean, B. J., Galloway, S., Holden, H., McFee, A. F. and Shelby, M. (1987). Mammalian *in vivo* cytogenetic assays. Analysis of chromosome aberrations in bone marrow cells. *Mutation Res.* 189: 157-165.

- Preston, R. J.** (1995). Genetic injury, in: J. E. Craighead (Ed.) *Pathology of Environmental and Occupational Disease*, St. Louis, Mosby-Year Book Inc.
- Rabello-Gay, M. N.** (1991a). Teste de metáfases da medula óssea. In: Rabello-Gay, M. N., Rodrigues, M. A. R., Monteleone-Neto, R. (eds.): *Mutagênese, Teratogênese e Carcinogênese. Métodos e Critérios de Avaliação*. Ribeirão Preto, SP, Brasil: Sociedade Brasileira de Genética / Revista Brasileira de Genética. pp. 77-82.
- Rabello-Gay, M. N.** (1991b). Teste do micronúcleo em medula óssea. In: Rabello-Gay, M. N., Rodrigues, M. A. R., Monteleone-Neto, R. (eds.): *Mutagênese, Teratogênese e Carcinogênese. Métodos e Critérios de Avaliação*. Ribeirão Preto, SP, Brasil: Sociedade Brasileira de Genética / Revista Brasileira de Genética. pp. 83-90.
- Rabello-Gay, M. N.** (1992). Análise crítica de alguns testes de curta duração como previsores do potencial carcinogênico de compostos químicos. In: Reyes, F. G. R., Almeida, W. F. (eds): *Toxicología: prospectiva y seguridad química*. Metepec, Estado de México, México. pp. 187-196.
- Ribeiro, L. R.** (1991). Teste do micronúcleo em células esfoliadas. In: Rabello-Gay, M. N., Rodrigues, M. A. R., Monteleone-Neto, R. (eds.): *Mutagênese, Teratogênese e Carcinogênese. Métodos e Critérios de Avaliação*. Ribeirão Preto, SP, Brasil: Sociedade Brasileira de Genética / Revista Brasileira de Genética. pp. 91-96.

- Ribeiro, L. R., Takahashi, C. S., Erdtman, B., Oliveira, S. V., Da Costa, C. T. A. and Gimmeler-Luz, M. C. (1993).** Inter-laboratory calibration program for the mouse micronucleus test. *Rev. Brasil. Genet.* 16: 631-638.
- Rowinsky, E. K., Cazenave, L. A. and Donehower, R. C. (1990).** Taxol: A novel investigational antineoplastic agent. *J. Natl. Cancer Inst.* 82: 1247-1258.
- Rowinsky, E. K. and Donehower, R. C. (1991).** The clinical pharmacology and use of antimicrotubule agents in cancer chemotherapeutics. *Pharmac. Ther.* 52: 35-84.
- Salassidis, K., Huber, R., Zitzelsberger, H. and Bauchinger, M. (1992).** Centromere detection in vinblastine and radiation induced micronuclei of cytokinesis blocked mouse cells by using *in situ* hybridization with a mouse gamma (major) satellite DNA probe. *Environ. Mol. Mutagen.* 19: 1-6.
- Sargent, L. M., Dragan, Y. P., Bahnub, N., Wiley, J. E., Sattler, C. A., Schoeder, P., Sattler, G. L., Jordan, V. C. and Pitot, H. C. (1994).** Tamoxifen induces hepatic aneuploidy and mitotic spindle disruption after a single *in vivo* administration to female Sprague-Dawley rats. *Cancer Res.* 54: 3357-3360.
- Schiff, P. B., Fant, J. and Horwitz, S. B. (1979).** Promotion of microtubule assembly *in vitro* by taxol. *Nature* 277: 665-667.

- Schiff, P. B. and Horwitz, S. B.** (1980). Taxol stabilizes microtubules in mouse fibroblast cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77: 1561-1565.
- Schmid, W.** (1975). The micronucleus test. *Mutat Res.* 31: 9-15.
- Styles, J. A., Davies, A., Lim, C. K., DeMattis, F., Stanley, L. A., White, I. N. H., Yuan, Z. X. and Smith, L. L.** (1994). Genotoxicity of tamoxifen, tamoxifen epoxide and toremifene in human lymphoblastoid cells containing human cytochrome-P450s. *Carcinogenesis* 15: 5-9.
- Styles, J. A., Davies, A., Davies, R., White, I. N. H. and Smith, I. I.** (1997). Clastogenic and aneugenic effects of tamoxifen and some of its analogues in hepatocytes from dosed rats and human lymphoblastoid cells transfected with human P540 cDNAs (MCL-5) cells. *Carcinogenesis* 18: 303-313.
- Tinwell, H. and Ashby, J.** (1994). Genetic toxicity and carcinogenicity of taxol. *Carcinogenesis* 15: 1499-1501.
- Tucker, J. D. and Preston, R. J.** (1996). Chromosome aberrations, micronuclei, aneuploidy, sister chromatid exchanges, and risk assesment. *Mutation Res.* 365: 147-159.
- Vancutsem, P. M., Lazarus, P. and Williams, G. M.** (1994). Frequent and specific mutations of the rat *p53* gene in hepatocarcinomas induced by tamoxifen. *Cancer Res.* 54: 3864-3867.

Vijayalaxmi, K. K. and Padmalatha Rai, S. (1996). Studies on the genotoxicity of tamoxifen citrate in mouse bone marrow cells. *Mutation Res.* 368: 109-114.

Wani, M. C., Taylor, H. L., Wall, M. E., Coggon, P. and McPhail, A. T. (1971). The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *J. Am. Chem. Soc.* 93: 2325-2327.

Wiernik, P. H., Schwartz, E. L., Strauman, J. J., Dutcher, J. P., Lipton, R. B. and Paietta, E. (1987). Phase I. Clinical and pharmacokinetic study of taxol. *Cancer Res.* 47: 2486-2493.

Williams, G. M., Iantropoulos, M. J., Djordjevic, M. V. and Kaltenberg, O. P. (1993). The triphenylethylene drug tamoxifen is a strong liver carcinogen in rat. *Carcinogenesis.* 14: 315-317.

CURRICULUM VITAE

Nome: Edith Alba Luz Segovia Corrales

Local e data de nascimento: Asunción- Paraguay, 12/01/1966

Estado civil: Solteira

Endereço particular: R. Camilo Recalde, No 1267 Asunción - Paraguay

Formação acadêmica: Ciências Biológicas (Bacharelado e Licenciatura)
1990-1994. Universidade Federal de Uberlândia

Pós-Graduação (Mestrado em Genética e Bioquímica) 1994-1997.
Universidade Federal de Uberlândia.

Estágios: Laboratório de Citogenética: março/93 - maio/97

Participação em reuniões científicas e congressos: 10

Cursos de extensão universitária: 09

Trabalhos apresentados em reuniões científicas e simposios: 04

Resumo de trabalhos publicados: 06

Bolsas: Iniciação científica (projeto No: 124/93 -PIBIC-CNPq): agosto/93-
julho/94

Mestrado (processo No: 830340-96-5 - CNPq): março/94-fevereiro/97

Monitorias: 03

Idiomas: Espanhol e Português