



80886



UNICAMP

BC/13112
IB/80886

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pela Sra. Maria Lectícia Firpe Penna e aprovada pela Comissão Julgadora.

M. S. Mello
06/12/90

INSTITUTO DE BIOLOGIA

AÇÃO DO ÁCIDO RETINÓICO SOBRE CULTURAS DE LINFÓCITOS HUMANOS

MARIA LECTÍCIA FIRPE PENNA
ORIENTADORA: PROFA. DRA. MARIA LUIZA S. MELLO

AÇÃO DO ACIDO RETINÓICO SOBRE
CULTURAS DE LINFÓCITOS HUMANOS

Tese apresentada ao Instituto de Biologia
da Universidade Estadual de Campinas para
obtenção do Título de Mestre em Ciências
Biológicas na área de Genética.

9100892

MARIA LECTÍCIA FIRPE PENNA

ORIENTADORA PROF^a. DRA MARIA LUIZA S.MELLO

Campinas-SP

1990

CLASSIF.	T
AUTOR	P381a
V.	EX.
TOMBO BCJ	13112
	I.B. 1031

CM-00010743-1

Para

Sr. Fernando e D. Letícia;

Zé, grande amor da minha vida

e ao que vai chegar ...

Dedico

Para

João Carlos e Fernando César,

com muito carinho

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A Profa. Dra. Maria Luiza Silveira Mello, pela segurança, tranquilidade, competência de sua orientação e mais que isso, pela amizade e carinho.

Ao Prof. Dr. Bernardo Beiguelman, pela confiança e apoio oferecidos desde o início do meu curso de Pós-Graduação.

AGRADECIMENTOS

Aos Profs. Drs. Aquiles Eugênio Piedrabuena, Christine Hackel e Denise Yvonne Janovitz Norato, pela leitura dos manuscritos e sugestões apresentadas quando da realização da pré-banca.

A Profa. Denise Yvonne Janovitz Norato, pela colaboração na análise estatística deste trabalho.

Aos Professores do Departamento de Genética Médica, pelo estímulo e amizade.

Aos Professores do Departamento de Biologia Celular, pelo incentivo.

A Profa. Dra. Lúcia Pereira da Silva, pelo empréstimo do DMSO,

A Profa. Dra. Maria Isabel S.A. Melaragno, da Escola Paulista de Medicina, pela orientação na execução da técnica de trocas de cromátides irmãs.

Aos Funcionários do Departamento de Genética Médica, em especial, a Antonio Conceição Costa, Edi Lúcia Sartorato, Geralda Luzia Alves, Henry Norberto Ciolfi e Jossimar Aparecida Alves do Nascimento, do Laboratório de Citogenética, pela inestimável colaboração.

A secretária do Departamento de Genética Médica, **Maria Cláudia Furlan**, pelos serviços de datilografia.

Aos **Funcionários** do Departamento de Biologia Celular, pela consideração.

A Secretária do Curso de Pós-Graduação em Genética, **Sílvia Helena Crivellenti**, pelo apoio administrativo.

Aos colegas de Pós-Graduação, **Janete Maria Cerutti**, **Marly Magalhães Dantas**, **Paulo Latuf Filho**, **Rogério Carlos Novais**, **Sílvia Regina Pégamo de Miranda**, e em especial, a **Marilda de Souza Gonçalves** e **Nilma Lúcia Viguetti**, pela vivência e convivência.

Ao **CNPq**, pela concessão da bolsa de Mestrado.

ÍNDICE

	pg
I. INTRODUÇÃO.....	1
I.1. O ÁCIDO RETINÓICO.....	1
I.1.1. Caracterização e efeitos a nível da diferenciação celular.....	1
Estrutura química	1
Metabolismo	5
Efeitos sobre a diferenciação celular	8
I.1.2. Indicações e efeitos colaterais do uso do ácido retinóico.....	11
Indicações de uso	11
Efeitos tóxicos	12
Efeitos teratogênicos.....	14
I.1.3. Alterações celulares	16
Alterações Nucleares	16
Alterações Citoplasmáticas.....	16
Alterações a nível da Membrana celular	19
Alterações a nível da Matriz intercelular	20
I.1.4. Ácido retinóico e células tumorais	21
Ação sobre células de carcinoma embrionário	22
Células mielóides	23
Neuroblastomas	25
Ósteo e condrosarcoma	25
Tumores da pele	26

1.2. AVALIAÇÃO DO EFEITO DE AGENTES MUTAGÊNICOS E/OU CLASTOCÊNICOS EM CULTURAS DE LINFÓCITOS HUMANOS.....	28
1.2.1. Instabilidade cromossômica.....	29
TCI.....	29
Aberrações cromossômicas.....	32
1.2.2. Cinética celular.....	35
Índice mitótico.....	35
Células em diferentes gerações.....	36
Fenótipos nucleares.....	37
II. OBJETIVOS	39
III. MATERIAL E MÉTODOS	40
III.1. Casuística	40
III.2. Metodologia	40
III.2.1. Cultura de linfócitos	40
III.2.2. Colorações	43
III.3. Critérios de análise	44
III.4. Métodos estatísticos	50
IV. RESULTADOS	52
V. DISCUSSÃO	75
VI. CONCLUSÕES.....	82

VII. RESUMO	83
VIII. SUMMARY	85
IX. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	87
X. APÊNDICES.....	99

I. INTRODUÇÃO

I.1. O ÁCIDO RETINÓICO

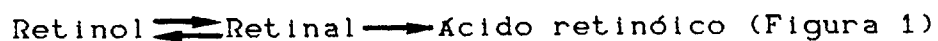
I.1.1. CARACTERIZAÇÃO E EFEITOS A NÍVEL DA DIFERENCIAÇÃO CELULAR

ESTRUTURA QUÍMICA

O ácido retinóico é um produto normalmente obtido a partir do metabolismo humano da vitamina A:

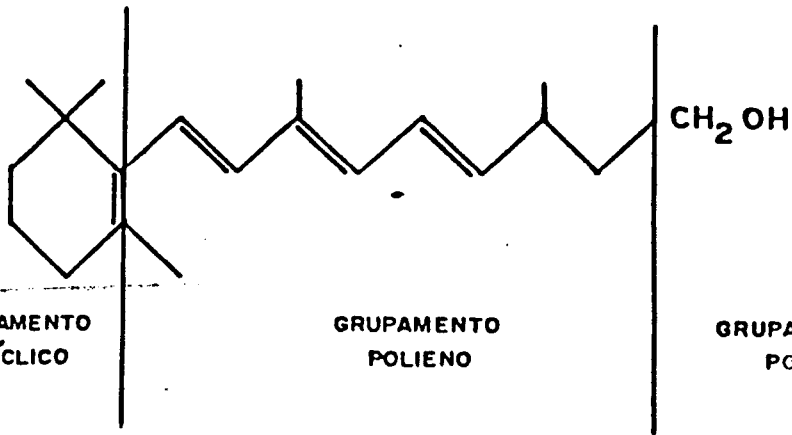
A vitamina A exerce um papel essencial na função da retina, sendo importante para o crescimento e diferenciação do tecido epitelial e necessária para o crescimento dos ossos, para a reprodução e para o desenvolvimento embrionário. Além disso, possui também um efeito estabilizador sobre as várias membranas, atuando de modo a regular a sua permeabilidade (Mandel e Cohn, 1983).

Segundo revisão realizada por Mandel e Cohn, 1983, a vitamina A ocorre numa variedade de formas e o termo é frequentemente utilizado para representar os seus diversos compostos:



Em todos, três partes distintas podem ser identificadas na sua molécula e de seus derivados: grupamentos cíclico, polieno e polar (Figura 1).

O retinol-vitamina A1 - é um álcool primário que está presente na forma esterificada nos tecidos animais especialmente envolvidos em processos reprodutivos. Nos peixes de água salgada, no entanto, tem sido verificado principalmente no fígado.

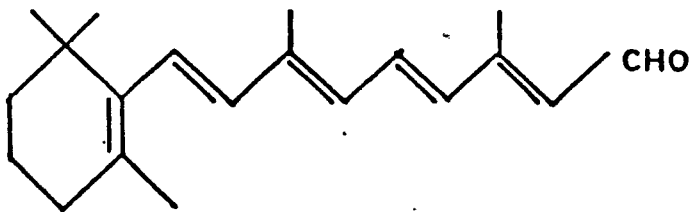


GRUPAMENTO
CÍCLICO

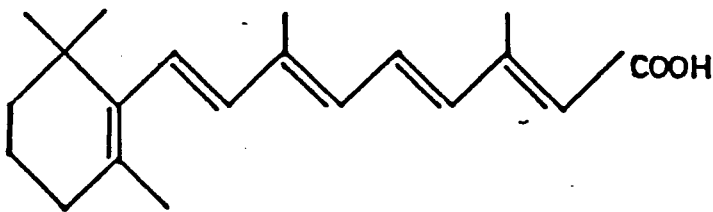
GRUPAMENTO
POLIENO

GRUPAMENTO
POLAR

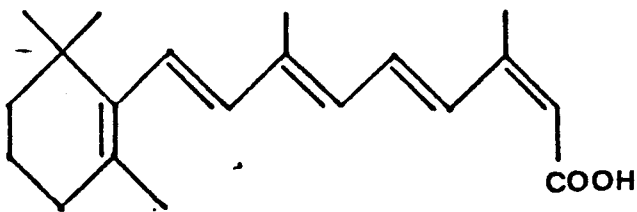
RETINOL
(VITAMINA A1)



RETINAL



ÁCIDO RETINÓICO
CONFIGURAÇÃO ALL-TRANS



ÁCIDO RETINÓICO
CONFIGURAÇÃO 13 - CIS

FIGURA 1 (MANDEL E COHN, 1983)
FÓRMULAS ESTRUTURAIS DA VITAMINA A E SEUS DERIVADOS

Devido às possíveis configurações cis-trans da cadeia lateral que contém duplas ligações no retinol, este exhibe muitos isômeros geométricos. A interconversão entre tais isômeros ocorre prontamente no organismo, sem que haja destruição de sua atividade.

O retinal, um aldeído derivado da vitamina A, sob a forma do seu isômero 11-cis é a vitamina funcional e atuante do ciclo visual responsável pelo processo de adaptação ao escuro que é uma função tanto dos bastonetes quanto dos cones. A adaptação primária é produzida pelos cones e o processo se completa em alguns minutos. Já a adaptação secundária é uma função dos bastonetes e demora cerca de 30 minutos. Essa adaptação secundária é um processo químico e consiste na formação de pigmentos fotossensíveis na retina que, quando da exposição à luz de baixa intensidade, são descorados e sofrem reações químicas que resultam no desencadeamento de um potencial receptor. Após a quebra, o pigmento é ressintetizado. O pigmento fotossensível dos bastonetes dos vertebrados terráqueos é conhecido como rodopsina - uma combinação da proteína opsina e do grupo prostético, 11-cis-retinal. As reações químicas que ocorrem ao nível dos bastonetes estão esquematizadas na Figura 2.

Já o pigmento fotossensível dos cones é a iodopsina, e é provável que muitos outros pigmentos existam, sendo responsáveis pela visão a cores. A iodopsina é uma combinação do retinal com uma proteína muito similar à opsina, denominada fotopsina.

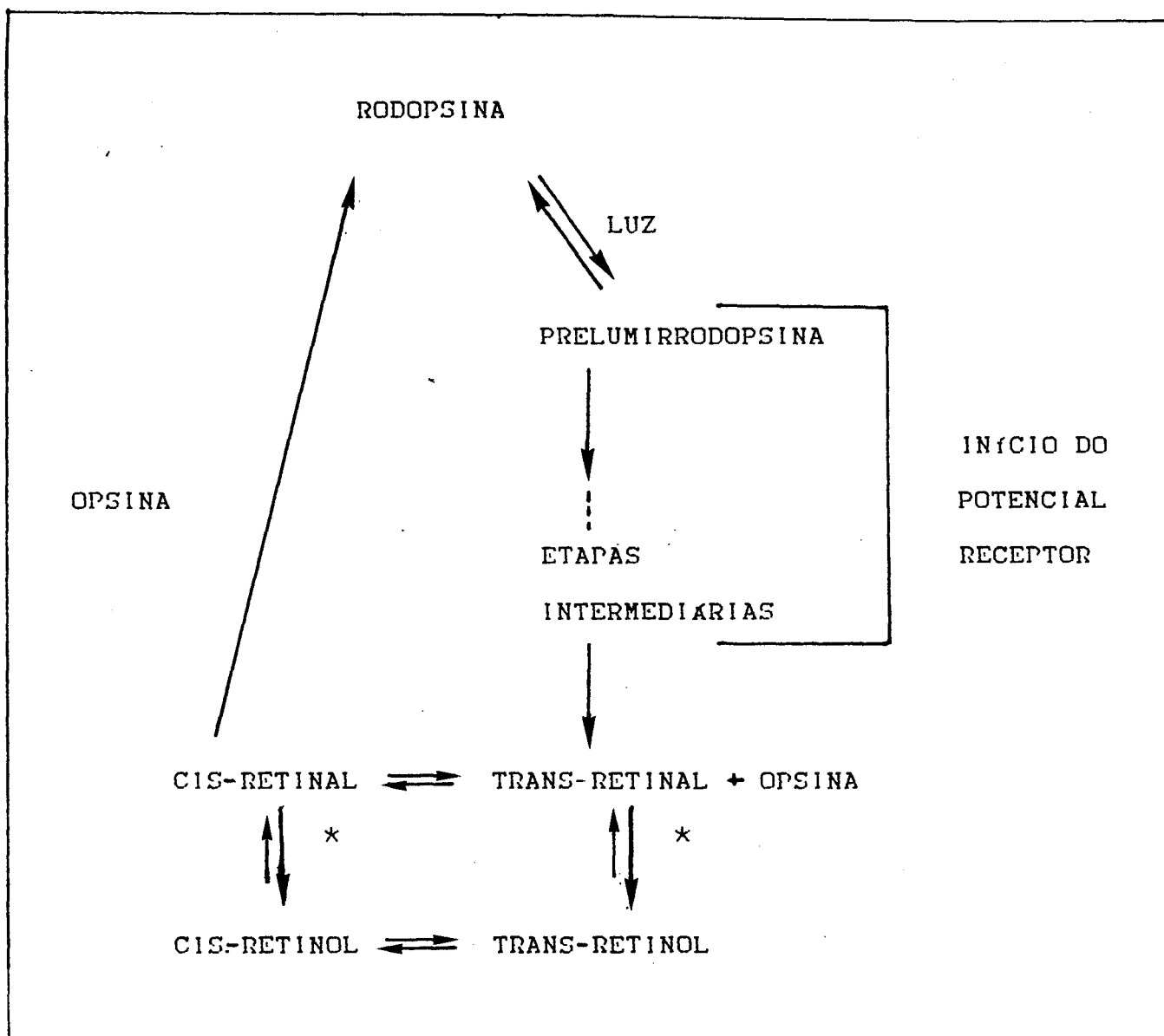


FIGURA 2 - CICLO VISUAL MODIFICADO DE MANDEL E COHN, 1983

Obs.: Os asteriscos (*) referem-se a reações em que a retinol desidrogenase e o NAD ou NADP estão envolvidos.

Por fim, o ácido retinóico - ácido da vitamina A em que o grupo álcool foi oxidado, compartilha de algumas, mas não de todas as ações do retinol. O ácido retinóico é muito potente na promoção do crescimento e no controle da diferenciação e manutenção do tecido epitelial nos animais com deficiência de vitamina A, mas é ineficaz na recuperação visual, auditiva ou da função reprodutiva em certas espécies em que o retinol é eficaz (Gilman *et al.*, 1983).

METABOLISMO

Através de experimentos com radioisótipos realizados na década de 80, Chytil (1984, 1986) obteve algumas observações importantes sobre a atuação do ácido retinóico a nível do metabolismo, tais como:

1. pequena quantidade de ácido retinóico é formada *in vivo* a partir de retinol administrado fisiologicamente;
2. o ácido retinóico é um metabólito normal do retinol;
3. dos metabólitos originados a partir do ácido retinóico nenhum é biologicamente mais ativo do que a substância original, sugerindo assim que a atividade seja devida ao ácido retinóico intacto.

Quando administrado, o ácido all-trans-retinóico adquire a configuração do seu isômero 13-cis. Reciprocamente, quando o ácido 13-cis retinóico é administrado, ele passa a ter a configuração do seu isômero all-trans, entretanto o significado fisiológico de tal fenômeno não é totalmente compreendido (Chytil, 1986).

No organismo humano, a distribuição do retinol e do ácido retinóico seguem caminhos diferentes.

Mais de 90% da ingestão da vitamina A pré-formada encontra-se sob a forma de ésteres de retinol. A vitamina A é imediatamente absorvida a partir do trato gastrointestinal normal. Se a quantidade ingerida não for muito maior do que a necessária, a absorção será completa; contudo, quando uma quantidade excessiva é ingerida, parte da vitamina passa a ser eliminada nas fezes (Goodman *et al.*, 1966; Mandel e Cohn, 1983).

O éster do ácido graxo de cadeia longa da vitamina A entra na circulação através do transporte na fração quilo-micron da linfa. A maior parte da vitamina é armazenada no fígado, principalmente nos hepatócitos parenquimatosos. Existem vários "pools" de vitamina A no fígado, um dos quais é repleto pela vitamina A recentemente absorvida, que supre os outros tecidos preferencialmente, e um outro que funciona como reserva (Goodman *et al.*, 1966).

Antes de entrar na circulação a partir do fígado, o éster de retinol hepático é hidrolisado e quase todo ele é associado a uma α -globulina, que possui um sítio de ligação único para a vitamina. Essa proteína de ligação ao retinol - RBP - circula no sangue humano, conjugada e estabilizada por uma proteína pré-albumina, que também transporta a tiroxina. A formação desse complexo protege o retinol da filtração glomerular e da excreção pelo rim. O retinol é biologicamente inerte, entretanto, quando ligado a RBP, esses ésteres, que são surfactantes, podem ser responsáveis em parte pela toxicidade que é observada (Mandel e Cohn, 1983).

O retinol ligado à RBP é distribuído aos vários órgãos-alvo, onde a vitamina é liberada, passando pela célula e interagindo com uma outra proteína específica, a proteína celular de ligação ao retinol - CRBP (Bashor *et al.*, 1973).

O ácido retinóico não se liga à CRBP, mas sim ao seu próprio receptor específico que é uma proteína celular de ligação - CRABP- distinta da CRBP. Após administração oral, ele atinge a circulação pela veia porta e é transportado no plasma, complexado à albumina. A diferença do retinol, o ácido retinóico não é armazenado no fígado, mas sim eliminado rapidamente. Ele é metabolizado no fígado, sendo vários produtos da sua degradação secretados na bile e excretados na urina e fezes. (Ong e Chytil, 1975).

Utilizando-se técnicas de Engenharia Genética foi possível verificar-se que a sequência do DNA humano responsável pela transcrição da CRABP é um gene de cópia simples, localizado no cromossomo 3 (Nilsson *et al.*, 1988). A CRABP, após se ligar ao ácido retinóico no citosol dos tecidos-alvo, migra para o núcleo onde, provavelmente, inicia uma série de reações bioquímicas em cascata (Sane e Hill, 1976).

Estudos realizados *in vitro*, utilizando ácido retinóico- $[H^3]$ complexado à CRABP, mostraram que existe um ponto de saturação na sua ligação ao núcleo ou cromatina e quando isso não ocorre não há saturação, nem reação ao nível celular (Takase *et al.*, 1986).

Já foi observado em ratos adultos que a CRBP localiza-se preferencialmente na região dos fotorreceptores, enquanto a CRABP localiza-se no cérebro, pele, olho, testículos, útero e ovário. Isso é consistente com a incapacidade do ácido retinóico em substituir o retinol no ciclo visual ou de ser convertido a retinal (Ong e Chytil, 1975).

EFEITOS SOBRE A DIFERENCIAÇÃO CELULAR

A diferenciação celular é o processo através do qual surgem diferenças estáveis entre as células. Em termos moleculares, a diferenciação celular significa uma atividade genética variável em células diferentes do mesmo organismo (De Robertis e De Robertis, 1981).

É axiomático que o desenvolvimento de organismos multicelulares dependa de sinais morfogenéticos trocados entre as células, acerca da expressão gênica. É particularmente aceito que gradientes de concentração químicos produzidos morfogeneticamente sejam os responsáveis por informações que determinam o futuro das células. Vários tipos de estudos já foram e ainda são realizados com o fim específico de se observar os mecanismos celulares e os fatores que os influenciam, envolvidos nos processos (De Robertis e De Robertis, 1981).

Até o início da década de 1980 todos os dados existentes inferiam que substâncias químicas eram as responsáveis pelos sinais trocados entre as células. A partir dessa época, começaram a surgir os primeiros trabalhos que evidenciavam as substâncias responsáveis por tais trocas, e o ácido retinóico foi identificado como sendo uma delas. Posteriormente, após se observar os receptores celulares do

ácido retinóico, foi possível classificá-lo como membro da família de receptores de hormônios esteroidianos e tireoidianos (Robertson, 1987).

Entretanto, estudos complementares foram necessários para se provar que o ácido retinóico realmente estava envolvido no processo de diferenciação celular e somente recentemente foi obtido um excelente sistema biológico capaz de fornecer resultados mais conclusivos, as células de carcinoma de embrião de origem testicular (Strickland e Mahdavi, 1978). Essas células, especialmente a linhagem celular do clone F9, mostram uma taxa de diferenciação espontânea, traduzida em dois fenótipos celulares extra-embrionários, os endodermas parietal e visceral, muito baixa. Entretanto, ao se adicionar ao meio uma pequena quantidade de ácido retinóico, 10^{-8} M, isômero all-trans, houve uma indução precoce dos tipos celulares do embrião para o endoderma parietal (Strickland *et al.*, 1978; Strickland *et al.*, 1980).

Recentemente se provou também que a droga em questão é capaz de promover a síntese de proteínas específicas. Esses achados indicam que a ação do ácido retinóico envolve efeito em genes específicos e da análise das proteínas verificou-se que muitas delas são integrantes do citoesqueleto (Chytil, 1984).

O controle da terminalização da diferenciação celular pode ser estudado efetivamente *in vitro* e um bom modelo são as células leucêmicas humanas HL-60 promielocíticas. Tais células são indicadas para o estudo por várias razões, sendo a principal o fato de serem bipotentes na sua capacidade de diferenciação e precursoras das células mielóides e monocíticas (Yen *et al.*, 1984).

Já é sabido que o ácido retinóico e o dimetil sulfóxido (DMSO) agem preferencialmente na terminalização da diferenciação mielóide, ao passo que a 1,25 dihidroxicalciferol (vitamina D3), o butirato de sódio e o 12-O-tetradecanoilphorbol-13-acetato (TPA) já o fazem na mesma fase dos monócitos (Yen *et al.*, 1987).

O processo de indução da diferenciação mielóide das células HL-60 envolve estágios intermediários identificáveis sendo que um deles, bem estudado e caracterizado, é denominado estágio de pré-a-cometimento. Nesse estágio as células apresentam alteração da estrutura nuclear, alteração no nível de íons cálcio ligados a proteínas e elevado nível de mRNA de *c-myc* (Yen *et al.*, 1984).

O *c-myc* é um proto-oncogene, classe de genes celulares que regulam o crescimento e a diferenciação, expresso em muitos tipos celulares, tanto normais como tumorais e é um dos reguladores da proliferação celular (Dean *et al.*, 1986).

Foi observado também *in vitro* que as células F9 citadas anteriormente, assim como as HL-60, apresentam grande quantidade de mRNA de *c-myc* quando na presença de ácido retinóico e AMP cíclico. Se o ácido retinóico é retirado da cultura ainda no seu início, as células continuam a proliferação sem, no entanto, prosseguir a sua diferenciação (Yen *et al.*, 1987).

1.1.2. INDICAÇÕES E EFEITOS COLATERAIS DO USO DO ÁCIDO RETINÓICO

INDICAÇÕES DE USO

O ácido retinóico, foi inicialmente licenciado nos Estados Unidos, para comercialização, em setembro de 1982, sendo também conhecido pelos nomes Accutane, Isotretinoin e Ácido 13-cis-retinóico (Kenneth, 1987).

Ele e o conjunto dos vários derivados da vitamina A recebem a denominação de retinóides, sendo potentes agentes antineoplásicos e muito eficazes no tratamento de várias doenças dermatológicas.

Em particular, a droga em estudo tem-se mostrado clinicamente boa no tratamento da acne, da psoríasis e de vários problemas que envolvem a queratinização (Kamm, 1982). Apresenta grande efeito na terapia da acne cística, acne globular e acne severa, que não apresentam resposta satisfatória a antibióticos sistêmicos (Zarowny, 1984).

Apesar de seu mecanismo de ação não ser totalmente elucidado, já foi visto que ele possui atividades antibacteriana e anti-inflamatória, inibe a ação de enzimas microbianas e o efeito destas na descamação da pele. Além disso, ele inibe a liberação de enzimas lisossômicas pelos neutrófilos, o que contribui para suprimir a inflamação local presente nos casos de acnes císticas severas (Isotretinoin and Human Teratogenicity, 1986).

Outros estudos já mostram que o ácido retinóico possui efeito inibidor sobre a produção de sebo e sobre a secreção das glândulas sebáceas (Scott, 1983).

A dosagem usualmente recomendada é de 1 a 2 mg/kg/dia, administrada em duas doses. O tratamento costuma se estender por 15 a 20 semanas ou até haver uma redução de aproximadamente 70% da acne total. Quando necessário, costuma-se indicar repetição do tratamento, no mínimo, oito semanas após a realização do primeiro (Scott, 1983).

EFEITOS TÓXICOS

Os efeitos tóxicos dos retinóides foram observados em várias espécies animais, com diferentes vias de administração das drogas e diferentes concentrações das mesmas.

Quando da administração do ácido retinóico em camundongos e ratos, foi verificada uma toxicidade aguda quando o parâmetro considerado era a dose oral simples, capaz de levar a óbito 50% dos animais sob experimentação. Neste grupo tal dose variou de 1 a 8 mg/kg com uma média de 1,9 mg/kg, quando administrada por via oral e sofreu sensível diminuição, quando administrada intraperitonalmente - (Kamm, 1982).

Já a toxicidade subcrônica que se verifica em cães e ratos leva em consideração, além da via de administração e a dose diária, o tempo de tratamento e os sinais clínicos típicos. Tais sinais incluem diminuição do apetite e do crescimento, eritema, alopecia, troca de mucosa, fratura dos ossos longos e diminuição da espermatogê-

nese. Esses animais também apresentaram alteração da atividade da fosfatase alcalina e da concentração de triglicérides (Kamm, 1982).

Por fim, na toxicidade crônica, não foram observados efeitos adversos em ratos e cães no tocante à mortalidade, crescimento e parâmetros hematológicos (hemácias total, total e diferencial de leucócitos, concentração de hemoglobinas e tempo de protrombina). O tempo de tratamento a que foram submetidos estes animais variou de 10 a 18 meses. Grupos de cães submetidos a tratamento com dosagens iguais ou superiores a 60 mg/kg/dia desenvolveram severos sinais de toxicidade, que regrediam quando o tratamento era interrompido ou mantido com dosagens menores. (Kamm, 1982).

As alterações histopatológicas observadas nos grupos tratados com dosagens altas (maiores que 60 mg/kg/dia) foram: degeneração das fibras elásticas, fibrose e/ou focos de calcificação, lesões no trato gastrointestinal, atrofia testicular (com suspensão da espermatogênese) e edema e/ou eritrofagocitose nos nódulos linfáticos.

Os ratos são bem menos tolerantes ao ácido retinóico do que os cães, sendo que até dosagens de 2 mg/kg/dia não lhes causam grandes efeitos. A partir daí são observados focos de fibrose, de inflamação crônica no coração, hiperplasia medular da adrenal, arteriites, calcificação arterial de tecidos e por fim, quebra de ossos (Kamm, 1982).

Em humanos, já foram relatados alguns casos de mulheres que apresentaram amenorréia durante o tratamento com ácido retinóico (Cox, 1988).

Além desse problema, vários outros efeitos colaterais podem ocorrer em humanos. Dentre os de manifestação rápida, que se iniciam de 24 a 48 hs. após a ingestão da primeira dose, temos: sintomas gastrointestinais, conjuntivite, eritema facial, etc (Bruno *et al.*, 1984).

Já entre os efeitos de manifestação tardia, que ocorrem a partir de 1 mês de tratamento, temos: sintomas músculo-esqueléticos, fadiga, depressão, insônia, diminuição da libido, perda de peso, edema, infecções respiratórias, etc (Bruno *et al.*, 1984). Também são referidos pseudo-tumor cerebral, hiperuricemia e opacificação das córneas (Adverse Effects with Isotretinoin, 1983; Conner, 1984).

EFEITOS TERATOGENICOS

Estudos realizados em animais *in vivo* demonstraram que o ácido retinóico é um potente agente teratogênico, tendo sido sua comercialização liberada pela FDA (Food and Drug Administration) nos Estados Unidos, mediante a ressalva de ser contra-indicado durante a gravidez (Sun, 1988).

Atualmente a FDA só tem permitido que se ministre a droga em questão, juntamente a contraceptivo oral e exige que a mulher, além de apresentar exame sorológico negativo para gravidez, realizado duas semanas antes de iniciar a terapia, assine termo de compromisso de que não engravidará durante o tratamento (Stern, 1989).

Existem ainda muitas controvérsias a respeito de malformações que possam vir a ocorrer após a interrupção do tratamento com o ácido retinóico. Alguns autores afirmam que a incidência de

abortos e malformações não é significativamente diferente daquela observada na população total - considerando a meia vida da droga ao redor de 18 horas (Agnish *et al.*, 1984; Dai *et al.*, 1989; Stern, 1989). Outros chegam mesmo a afirmar que a droga ainda pode ser detectada no soro humano 2 anos após cessado o tratamento e que o risco de teratogenicidade pode se estender por um período tão longo ou mesmo maior (Birth Defects Caused by Isotretinoin - New Jersey, 1988).

Apesar disso, vários casos de malformações congênitas, abortamentos e nascimento de prematuros relatados na literatura, a partir de um ano após o lançamento do ácido retinóico, têm sido associados ao uso inadvertido da droga no primeiro trimestre de gravidez (Zarowny, 1984).

A bibliografia existente acerca dos efeitos teratogênicos do ácido retinóico é muito vasta e são muitos os artigos que relatam casos de abortos e/ou de malformações (Benke, 1984; Braun *et al.*, 1984; Conner, 1984; Hill, 1984; Update on Birth Defects with Isotretinoin, 1984; Aubin *et al.*, 1985; Hersh *et al.*, 1985; Robertson *et al.*, 1985; Rosa, 1987; Lancaster *et al.*, 1988; Robert, 1988; Rosa, 1988).

Lammer *et al.* (1985) estimaram um risco relativo de malformações congênitas 26 vezes maior em crianças cujas mães foram expostas ao ácido retinóico durante a gestação, do que na população total.

O quadro de malformações apresentados por essas crianças é característico, já tendo sido inclusive denominado de síndrome de Ácido Retinóico (Kenneth, 1988). Elas geralmente ocorrem em ou mais dos três sistemas orgânicos a seguir: sistema nervoso central, sistema

cardiovascular e estruturas crânio-faciais (Dai *et al.*, 1989).

Os principais tipos de defeitos congênitos apresentados são: malformações do ouvido externo e da face, palato fendido, microcefalia, microftalmia, anomalias cardíacas, arco aórtico malformado, alterações hepatocelulares, malformações cerebrais (excluindo-se defeitos do tubo neural) e diminuição dos membros (Benke, 1984; La Cruz *et al.*, 1984; Update on Birth Defects with Isotretinoin, 1984; McBride, 1985 e Kenneth, 1987).

Experimentos realizados com embriões de roedores (principalmente camundongos e hamsters) mostraram que o ácido retinóico exerce sobre eles um efeito teratogênico capaz de provocar malformações semelhantes às observadas em humanos (Willhite *et al.*, 1986 e Anson *et al.*, 1987). Os maiores efeitos observados incluem malformações de membros, orelhas, condrocrânio e viscerocrânio. Nesses animais, em particular, as malformações dos membros são atribuídas à inibição seletiva da diferenciação do mesênquima pré-condrogênico, que resulta em redução ou ausência de formação dos elementos cartilagosos. Em camundongos já foi possível, inclusive, determinar-se que o dia do desenvolvimento embrionário mais susceptível à ação da droga é o 11º, no estágio de 33 a 36 somitos (Anson *et al.*, 1987).

1.1.3. ALTERAÇÕES CELULARES

ALTERAÇÕES NUCLEARES

Estudos realizados *in vitro* mostram que diferentes tipos celulares humanos respondem diferentemente ao tratamento com ácido retinóico.

Christophers e Langner (1974) estudaram a síntese de DNA em três tipos celulares humanos: linfócitos, células epidérmicas crescidas como cultura primária e subculturas de fibroblastos e verificaram respostas diferenciadas. Enquanto a síntese de DNA nas células epidérmicas era muito estimulada pela exposição à droga, em linfócitos e fibroblastos ela era praticamente inibida.

Nordlind e Thyberg em 1983, confirmaram também *in vitro* tais resultados em material humano e de cobaia.

Auerbach *et al.*, (1984) realizaram um estudo acerca da mutagenicidade e/ou clastogenicidade do ácido retinóico em culturas de linfócitos humanos de dois pacientes. Trataram as culturas por 48 horas com duas concentrações de ácido retinóico (7.5 e 15 μ g/ml de meio) e puderam verificar que a droga não é clastogênica, mas é capaz de provocar um aumento na frequência de trocas entre cromátides irmãs (TCI).

A análise citogenética realizada por Juhl *et al.*, (1978) e Tetzner *et al.*, (1980) em fibroblastos humanos submetidos a tratamento com ácido retinóico igualmente mostrou um aumento significativo na frequência de TCI. É importante salientar que somente culturas submetidas a baixas concentrações de ácido retinóico (5 μ g/ml de meio) são descritas como apresentando metáfases de boa qualidade e em número suficiente para análise.

O mecanismo preciso da ação química do ácido retinóico sobre o DNA e o que provocaria esse aumento em TCI, contudo, ainda não está elucidado. Segundo Auerbach *et al.* (1984), os retinóides em geral (inclusive o ácido retinóico) não interagiriam diretamente com o DNA e a indução de TCI ocorreria de maneira indireta. Já Chambon (1990), em

bora considere que os retinóides atuem predominantemente sobre a expressão do DNA via ligação com receptores nucleares proteicos (RARs), não exclui a possibilidade de que o ácido retinóico possa se ligar diretamente ao DNA.

Estudos sobre a ação do ácido retinóico realizados com ratos *in vivo*, no entanto, mostram outro tipo de resultados. Em animais submetidos, por oito dias, à dieta deficiente em vitamina A pôde ser verificada uma sensível diminuição no número de linfócitos no sangue periférico. Quando os animais passaram a receber suplementação alimentar de ácido retinóico foi verificada uma correção rápida e efetiva nos níveis de linfócitos circulantes (Puengtonwatanakul *et al.*, 1985).

ALTERAÇÕES CITOPLASMATICAS

A análise ao microscópio eletrônico de células de cobaia e de células humanas submetidas a tratamento com ácido retinóico evidenciou um entumescimento nas cisternas do complexo de Golgi, dilatação nas mitocôndrias com condensação da matriz e aumento do número de vacúolos autofágicos (Nordlind e Thyberg, 1983; Konohama *et al.*, 1987).

Tammi e colaboradores (1985) realizaram um minucioso estudo com células de pele humana em cultura, submetidas à coloração com hematoxilina-eosina e azul de toluidina e tratamento para análise ao microscópio eletrônico com tetróxido de ósmio, observando que o citoplasma ficava fracamente corado e que havia um número reduzido de desmossomos e tonofilamentos. Ao microscópio eletrônico foi possível

visualizar o retículo endoplasmático mais proeminente do que o das culturas celulares controle, além de entumescimento e rompimento das mitocôndrias, pequenas vesículas com material densamente empacotado no citoplasma e a presença de uma substância nos espaços intercelulares da camada vital de sustentação das células da epiderme, com material de estrutura e composição similar ao presente nos grânulos do citoplasma.

ALTERAÇÕES A NÍVEL DA MEMBRANA CELULAR

Culturas de epiderme humana e de hamsters tratadas com o ácido retinóico, comparadas às não tratadas, geralmente apresentam menor estratificação e células arredondadas. Não são encontrados desmossomos, o tamanho das microvilosidades diminui e os tonofilamentos além de estarem presentes em menor frequência, são esparsamente distribuídos. Essas alterações no padrão de orientação das especializações de membrana pode explicar o formato arredondado das células e sugere que a droga afete o citoesqueleto (Tammi *et al.*, 1985 e Konohama *et al.*, 1987).

Células epiteliais de diversos órgãos como traquéia, esôfago, epiderme, etc, carcinomatosas ou não, mantidas em cultura, na presença do ácido retinóico apresentam proliferação estimulada que pode ser verificada pelo aumento na taxa de índice mitótico, e diminuição da queratinização, (Klann e Marchok, 1982). Não se sabe se essa diminuição é devida a alterações na diferenciação terminal destas células ou se reflete a toxicidade do ácido. A diferenciação terminal para epitélio queratinizado envolve a morte das células das camadas

superiores o que dificulta separar este processo daquele observado na toxicidade (Klann e Marchok, 1982).

ALTERAÇÕES A NÍVEL DA MATRIZ INTERCELULAR

O ácido retinóico induz a distensão do espaço intercelular e acúmulo de material na epiderme humana *in vitro* e *in vivo*. Tem sido sugerido que esse material intercelular pode ser muco mas, isso ainda não foi demonstrado por métodos histoquímicos. Outras possibilidades incluem proteínas do soro ou material citoplasmático vazado através do rompimento da membrana celular (Tammi e Tammi, 1986).

O material acumulado é fino, granular e menos denso e floculado do que aquele presente na camada inferior da epiderme. A análise de glicosaminoglicanos (AGAG) mostra que na epiderme o ácido retinóico eleva a taxa de ácido hialurônico em 70%, enquanto os AGAG sulfatados não apresentam aumento significativo. Na derme nenhum dos dois componentes são estimulados.

A distensão que ocorre na matriz intercelular é, pois, devida a uma diminuição da coesão que ocorre entre as células da epiderme, que acontece devido ao decréscimo nos componentes do citoesqueleto e indução de novos materiais intercelulares (Tammi e Tammi, 1986)

1.1.4. ÁCIDO RETINÓICO E CÉLULAS TUMORAIS

O ácido retinóico inibe a tumorigenicidade em muitas linhagens celulares. Em outras, o seu efeito já é o oposto, ou seja, o tratamento estimula o crescimento celular e aumenta a expressão do fenótipo transformado. Não é claro o que causa estas respostas divergentes à droga e a complexidade do controle da proliferação celular e os múltiplos fatores que regulam o fenótipo transformado, dificultam ainda mais a real determinação do mecanismo de ação da droga sobre as células tumorais (Jetten *et al.*, 1986).

As bases biológicas e bioquímicas do mecanismo de ação do ácido retinóico já foram testadas em vários tipos de culturas celulares, em tumores de diversas origens, tendo se observado uma heterogeneidade de respostas e em algumas subpopulações celulares substanciais resistências (Meyskens *et al.*, 1983).

Se por um lado tem sido mostrado que a droga em questão causa hiperproliferação *in vivo* e em sistemas *in vitro*, por outro lado, verifica-se que ela inibe doenças hiperproliferativas, vários tipos de câncer (pulmão, pele, mama, hepatocelular, ósseo, cabeça e pescoço, leucemias, etc), proliferação de linhagens celulares transformadas ou não e micoses fungóides (Meyskens *et al.*, 1983; Tong *et al.*, 1986).

AÇÃO SOBRE CÉLULAS DE CARCINOMA EMBRIONÁRIO

As células de carcinoma embrionário são células pluri-potentes, capazes de originar teratocarcinomas. Em tumores elas são capazes de se diferenciar em três camadas germinativas embrionárias. Em camundongos foi visto que elas podem contribuir para o desenvolvimento de vários tecidos em mosaico (Koopman e Cotton, 1986).

As células de carcinoma embrionário podem ser cultivadas *in vitro*, diferenciando-se sob certas condições do meio. O ácido retinóico pode induzir essa diferenciação e esse efeito é extensamente estudado, usando-se linhagens que têm uma capacidade pequena ou inexistente de sofrerem diferenciação espontânea (Strickland e Mahdavi, 1978 e Koopman e Cotton, 1986).

Estudos realizados com esse tipo celular originário de humanos e camundongos têm mostrado uma redução da taxa de crescimento devida a um aumento na fase S (Mummery *et al.*, 1984; Mummery *et al.*, 1987).

Em camundongos, Koopman e Cotton (1986) verificaram que linhagens celulares NC2 em cultura diferenciavam-se espontaneamente, em vários tipos celulares, em um período de 20 dias. Na presença de ácido retinóico na concentração de 10^{-7} M essas células diferenciavam-se exclusivamente em endoderma parietal. A mesma droga ainda é capaz de estimular a diferenciação do endoderma em outras linhagens celulares do carcinoma embrionário, indiferentemente à sua capacidade de diferenciação espontânea. Os resultados suportam a hipótese de que a droga estimula a diferenciação das células, facilitando a resposta ce-

lular a um estímulo intrínseco o qual, normalmente, determina a diferenciação espontânea das células NG2 em cultura.

Ainda em camundongos, nas linhagens PC 13, Mummery e colaboradores (1984) verificaram que o ácido retinóico induz a morte celular, principalmente a partir da 3a. geração celular e diminui a taxa de crescimento da colônia. Em humanos, utilizando a linhagem Terra 2 observaram que a redução da taxa de crescimento era devida a um aumento temporal da fase S, já citado, e também na fase G1.

Células de teratocarcinomas humanos, da linhagem P19S1801 A1(01A1), subclone P19, apresentam diferenciação dependente da concentração do ácido retinóico. Culturas expostas a baixas concentrações, (10^{-9} M), são caracterizadas por serem ricas em células do músculo cardíaco. Em uma concentração de 10^{-8} M verifica-se a presença de células do músculo esquelético e em concentrações mais elevadas, 10^{-7} M a 10^{-5} M, têm-se o aparecimento dos neurônios, astróglia e fibroblastos (Edwards e McBurney, 1983).

CÉLULAS MIELOÍDES

As células mielóides, em particular, dão a impressão de serem alvos preferenciais dos retinóides em geral e, em particular, do ácido retinóico. A diferenciação das células normais, linhagem HL-60 promielocítica leucêmica e mielocítica leucêmica pode ser alterada pela exposição à droga (Yen *et al.*, 1984; Murtaugh *et al.*, 1986) e tem sido sugerido também que essa tenha uma importância fisiológica na regulação da maturação terminal das células mielóides (Murtaugh *et al.*, 1986).

Foi verificado que os retinóides podem aumentar drasticamente a síntese da enzima transglutaminase em células mielóides normais e leucêmicas e na ativação de macrófagos. Acredita-se que a droga possa agir a nível da expressão gênica em ambos os tipos celulares - mielóides e macrófagos - devido ao aumento que há de mRNA para transglutaminase no citoplasma após 30 minutos de exposição à mesma (Murtaugh *et al.*, 1986).

Para a linhagem HL-60 foi notado que há necessidade de exposição à droga por cerca de dois ciclos celulares para uma completa diferenciação (Yen *et al.*, 1984).

Além do efeito sobre a diferenciação de células mielóides, foi verificado que o ácido retinóico é capaz de converter células leucêmicas malignas em células funcionalmente normais. Hyodoh (1987) relatou que as linhagens celulares leucêmicas monocíticas THP-1-Cs5 (que apresenta aneuploidia cromossômica) e THP-1-R (com 46 cromossomos), após tratamento, adquirem a capacidade de aderência ao substrato e propagação. Elas adquirem a morfologia de macrófagos normais. A ocorrência deste processo é muito maior em THP-1-Cs5 do que em THP-1-R.

A remissão de malignidade promovida pelo ácido retinóico, embora sem se saber o mecanismo de sua ocorrência, foi relatado em uma paciente que apresentava síndrome mielodisplásica com excesso de blastos e com um clone celular anormal, com translocação cromossômica t(2,11). Esse clone desaparecia durante o tratamento e voltava a se manifestar com a sua suspensão. Tal padrão de resposta sugere que a droga aja inibindo a proliferação desse clone monocítico maligno (Abrahm *et al.*, 1986).

NEUROBLASTOMAS

As linhagens celulares de neuroblastomas mostram-se extremamente sensíveis à ação do ácido retinóico, que além de inibir seu crescimento, induz a alterações fenotípicas importantes (extensões neuríticas, alargamento e vacuolização celular, etc). Essas alterações morfológicas geralmente estão associadas com redução da expressão da malignidade desse tipo de câncer (Sidell, 1983).

Em neuroblastomas e tumores neuroectodermicos humanos é comum a expressão do gene *N-myc*, frequentemente amplificado. Essa sequência geralmente está localizada em regiões homogeneamente coradas (HSR) ou em cromossomos "double minutes" (DM). Foi possível se obter *in vitro* uma diminuição da expressão do gene *N-myc* em células expostas ao ácido retinóico que se diferenciaram; comprovada por ter sido encontrada uma menor diferenciação morfológica e inibição da proliferação celular (Amatruda *et al.*, 1985).

ÓSTEO E CONDROSARCOMA

A habilidade do ácido retinóico de inibir o crescimento de linhagens celulares de ósteo e condrosarcoma humanos foi estudada em cultura, sugerindo que a droga suprime nos tipos celulares tumorais as propriedades associadas às transformações fenotípicas, fazendo as células voltarem à sua morfologia e ao seu crescimento normais (Thein e Lotan, 1982).

TUMORES DA PELE

Nos tumores de pele de camundongo a ação do ácido retinóico não se verifica a nível de prevenção, ou seja, a droga é ineficaz na prevenção inicial de formação do tumor sendo eficaz em um estágio tardio - estágio II, quando o tumor já está formado (Censler *et al.*, 1985).

O estudo dos tumores supra citados, permitiu aos pesquisadores determinar um dos poucos mecanismos conhecidos de ação, do ácido retinóico na inibição do crescimento. Foi verificado que o TPA (12-O-tetradecanóilphorbol-13-acetato), componente do óleo de folhas de papagaio é um potente promotor de tumor de pele em camundongo, só agindo sob a indução da descarboxilase de ornitina (ODC). O ácido retinóico, quando presente, inibe a atividade da ODC (Verma, 1988).

A importância da ODC é que ela é a primeira enzima na biossíntese de poliaminas em mamíferos. Estas poliaminas têm efeitos comprovados na síntese de DNA, RNA e proteínas e está em estudo seu modo de ação no crescimento e diferenciação celular (Verma, 1988).

Os dois tipos mais frequentes de lesões malignas da pele em humanos são os melanomas e os carcinomas de células basais. Em melanomas foi verificado que vários clones celulares cultivados *in vitro* são susceptíveis à inibição de crescimento pelo ácido retinóico. Tentou-se chegar ao seu mecanismo de ação, utilizando-se clones mutantes, ou seja, aqueles resistentes à droga, mas pouco se pôde verificar de suas bases moleculares (Lotan *et al.*, 1983).

Os carcinomas de células basais da pele, por serem tumores de crescimento lento e pouco malignos, são bons modelos para o

estudo dos efeitos da droga *in vivo*. Em pacientes tratados com ácido retinóico observou-se não só a inibição do crescimento, mas também diminuição, podendo mesmo haver desaparecimento total desses tumores (Sankowski *et al.*, 1984).

Embora a maior parte dos trabalhos seja realizada no intuito de demonstrar a atividade inibitória da carcinogênese pelo ácido retinóico, alguns pesquisadores têm demonstrado que a droga em questão é também responsável por tumorigênese em animais, principalmente na pele e algumas vezes na mama e no cólon (Gensler *et al.*, 1986 e McCornick *et al.*, 1987)

1.2. AVALIAÇÃO DO EFEITO DE AGENTES MUTAGÊNICOS E/OU CLASTOGÊNICOS EM CULTURAS DE LINFÓCITOS HUMANOS

O modo de ação de uma grande variedade de drogas sobre o ciclo celular vem sendo muito pesquisado nos últimos anos. Inicialmente tais estudos eram realizados com o objetivo primordial de se elucidar principalmente as bases bioquímicas do ciclo celular. Atualmente pesquisam-se com maior ênfase as maneiras através das quais os agentes químicos podem interferir no ciclo celular (Baserga, 1985).

Pela sua ação as drogas podem ser assim subdivididas (Baserga, 1985):

- 1) as que não são capazes de promover alterações no ciclo celular;
- 2) as que promovem um maior número de replicações celulares; e
- 3) aquelas que impedem a progressão do ciclo celular normal levando a uma multiplicação mais lenta ou à morte celular.

No último grupo podemos incluir as drogas que inibem a síntese de substâncias fundamentais ao ciclo celular e aquelas que atuam sobre o material genético levando ao aparecimento de mudanças no DNA (mutações, aberrações cromossômicas, rearranjos etc).

A atividade mutagênica e/ou clastogênica de drogas sobre culturas de linfócitos humanos pode ser avaliada em função da instabilidade cromossômica e da cinética celular.

1.2.1. INSTABILIDADE CROMOSSÔMICA

A instabilidade cromossômica pode ser avaliada utilizando-se como parâmetros as frequências das trocas entre cromátides irmãs (TCI) e das aberrações cromossômicas .

TCI

O fenômeno pode ser definido como a ocorrência de permutas de porções simétricas de DNA entre cromátides irmãs (Melaragno, 1982)

O método de pesquisa de TCI tem sido largamente utilizado com eficácia em experimentos que visam testar a ação mutagênica e/ou clastogênica de substâncias químicas sobre cromossomos de eucariotos. Um grande número de trocas pode ser observado mesmo quando se utilizam concentrações baixas de drogas atuantes, o que mostra sua grande sensibilidade (Wolff, 1977).

Taylor *et al.* (1957, apud Melaragno, 1982) foram os primeiros a verificar a ocorrência de TCI. Cultivando raízes de *Vicia faba* na presença de timidina triciada, puderam observar através de técnicas de autoradiografias que as cromátides sintetizadas nesse meio eram radioativas ao passo que as anteriores não o eram. Ocasionalmente verificaram também cromátides marcadas em apenas uma parte de sua extensão e na porção complementar de sua cromátide irmã (Wolff, 1977; Melaragno, 1982)

Entretanto, somente em 1958 foi possível obter informações acerca do mecanismo de TCI. Após o cultivo de raízes de *Vicia faba* no meio com timidina triciada elas foram transferidas para uma solução de colquicina desprovida do desoxinucleotídeo radioativo em questão. Variando-se o tempo de cultivo das raízes em colquicina, foi possível a obtenção de núcleos diplóides, tetraplóides e octaplóides, de acordo com o número de ciclos de duplicação cromossômica (1,2 ou 3 ciclos). Analisando-se novamente, por técnicas de autoradiografia, o material assim tratado, foi possível verificar, depois do primeiro ciclo de duplicação do DNA na ausência da timidina triciada, que as cromátides irmãs, nos cromossomos metafásicos, apresentavam-se radioativamente marcadas.

Depois do segundo ciclo, essa radioatividade estava presente em apenas uma das cromátides irmãs. Embora com uma frequência menor, alguns cromossomos apresentavam permutas entre partes radioativamente marcadas e partes sem essa característica.

Depois do terceiro ciclo geralmente a metade dos cromossomos apresentava cromátides radioativamente marcadas, enquanto o restante apresentava ao menos parte de uma cromátide com e outra sem marcação. A presença de parte de uma cromátide marcada radioativamente se deve a trocas entre cromátides irmãs (Taylor, 1958 apud Wolff, 1977; Beiguelman, 1982).

A partir da década de 70 a demonstração de TCI tornou-se bem mais simples com o aparecimento de técnicas que utilizam, ao invés da timidina triciada, a 5-bromo-desoxiuridina (BrdU).

A BrdU é uma substância análoga da timidina e pode se incorporar no lugar dessa última quando o DNA está replicando. As técnicas que a utilizam baseiam-se no fornecimento de BrdU às células durante dois ciclos de replicação. Desse modo espera-se que os cromossomos metafásicos resultantes apresentem uma cromátide com DNA contendo BrdU nas suas duas hélices em lugar da timidina e uma cromátide irmã contendo DNA híbrido, isto é, formado por uma cadeia de DNA ancestral (cadeia molde com timidina) e uma cadeia com BrdU. Visto que a cromátide com DNA constituído por duas cadeias contendo BrdU apresenta propriedades tintoriais diferentes, essa característica é utilizada para investigar a troca entre cromátides irmãs. Trabalho pioneiro neste sentido foi realizada por Zakharov e Egolina em 1972 (Beiguelman, 1982).

A partir de então novas variações desse método surgiram, baseadas no mesmo fundamento e com o intuito de tornar sua execução mais simples, de modo a se obter preparações permanentes e que permitissem uma diferenciação entre as cromátides irmãs com bom nível de resolução.

Apesar de já ser uma técnica rotineira em laboratórios de citogenética, os mecanismos moleculares que envolvem as trocas entre cromátides irmãs ainda não estão totalmente elucidados. O único ponto onde todos os trabalhos são concordantes é na necessidade de haver duplicação do DNA para que o mecanismo de troca ocorra (Gebhart, 1981).

A partir de 1970, concomitantemente à descrição de técnicas que demonstrassem TCI, iniciaram-se também as pesquisas acerca da modificação dos padrões de TCI induzida por produtos químicos

(Gebhart,1981). Os resultados sugeriam haver uma grande relação entre a capacidade de um composto induzir TCI e sua capacidade em promover mutações (Wolff,1977).

Em geral, determinando-se a frequência de TCI induzida por drogas, é possível se detectar efeitos significativos na estrutura dos cromossomos, utilizando doses das drogas usualmente normalmente muito mais baixas do que as necessárias para se evidenciar dano genético por outros sistemas de teste (Melaragno,1982).

Auerbach *et al.* (1984), estudaram a capacidade do ácido retinóico em promover alterações nos valores de TCI em culturas de linfócitos humanos e comprovaram que a droga realmente induzia o seu aumento.

ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS

Assim como o método de TCI, a análise de aberrações cromossômicas é de grande utilidade quando se quer verificar a ação mutagênica e/ou clastogênica de qualquer agente físico, químico ou biológico (Gebhart,1981).

Segundo revisão de Beiguelman (1982), as aberrações cromossômicas podem ser classificadas em dois grandes grupos, o das aberrações cromossômicas numéricas e o das aberrações estruturais. As aberrações cromossômicas numéricas incluem os casos em que há aumento ou diminuição no número cariotípico normal da espécie. Elas podem ser subdivididas em dois outros grupos, conforme se refiram ao aumento ou diminuição de cromossomos de um ou mais pares, mas não de todos (aneuploidias), ou ao aumento (de pelo menos um) ou diminuição de um conjunto cromossômico haplóide (euploidias).

Já as aberrações cromossômicas estruturais incluem os casos em que um ou mais cromossomos apresentam alterações de sua estrutura, perceptíveis ao microscópio de luz. Nelas podemos incluir os rearranjos cromossômicos, as falhas e as quebras.

Os rearranjos são alterações resultantes de trocas e reuniões inter-cromossômicas afetando a estrutura dos cromossomos. Desles fazem parte as inversões, deleções e duplicações.

As falhas podem ser definidas como sendo pequena(s) descontinuidade(s) na(s) cromátide(s) onde os segmentos adjacentes proximal e distal estão no mesmo plano e a distância entre eles não é maior do que a espessura de uma cromátide.

Por fim, nas quebras a(s) descontinuidade(s) presente na(s) cromátide(s) além de ser(em) mais larga(s) do que a espessura de uma cromátide pode(m) apresentar os segmentos distais deslocados em relação ao eixo cromossômico.

Todas as aberrações cromossômicas estruturais supra citadas podem ser classificadas como cromatídicas ou cromossômicas conforme ocorram em uma ou em ambas as cromátides e por terem surgido em período posterior ou anterior à fase S, respectivamente.

Na literatura são encontrados vários trabalhos acerca do estudo da mutagenicidade e/ou clastogenicidade de várias drogas, utilizando como parâmetros as TCI e as aberrações cromossômicas. A grande variedade de respostas aos agentes químicos levou os pesquisadores a dividir as drogas em três grupos (Gebhart, 1981):

a) drogas capazes de promover um grande número de TCI e de aberrações cromossômicas estruturais. Nesse grupo estão incluídas todas as substâncias que, independente da concentração utilizada promovem aumentos

na frequência de TCI ou aberrações. São agentes cujo mecanismo molecular de ação é, em geral, pouco conhecido.

b) drogas clastogênicas, entretanto com baixa atividade de indução de TCI. Nesse grupo estão reunidas substâncias químicas que aparentemente podem induzir quebras por um mecanismo molecular ainda não elucidado e geralmente não promovem TCI..

c) drogas capazes de induzir TCI e com baixo efeito clastogênico. Nesse grupo estão reunidas substâncias que além de apresentarem TCI, exibem resultados negativos para outros testes que visam verificar mutagenicidade.

Apesar do grande número de trabalhos já desenvolvidos sobre o assunto, na literatura só há referências ao trabalho de Auerbach *et al.* (1984), acerca da ação do ácido retinóico sobre culturas de linfócitos.

Tais pesquisadores concomitantemente ao método de TCI realizaram contagens de aberrações cromossômicas e só verificaram a ocorrência de falhas e quebras (aberrações estruturais). Entretanto, por terem realizado todas as contagens em preparações obtidas de apenas dois pacientes, os resultados desses autores são pouco conclusivos para se classificar o ácido retinóico em algum dos grupos acima mencionados.

Por fim, comparando-se os métodos utilizados para analisar a instabilidade cromossômica é possível tecer os seguintes comentários:

a pesquisa de TCI e a de aberrações cromossômicas são dois métodos citogenéticos bem diferentes de se testar a ação mutagênica (Gebhart, 1981);

o TCI é um método bem mais sensível para detectar mudanças a nível do DNA (Wolff, 1977; Gebhart, 1981).

1.2.2. CINÉTICA CELULAR

A cinética celular pode ser avaliada em função do índice mitótico, percentual de células em diferentes gerações e fenótipos nucleares.

ÍNDICE MITÓTICO

O índice mitótico fornece informações acerca do número relativo de células em divisão, avaliado através da frequência de metáfases em relação às outras fases do ciclo celular (Melaragno, 1988).

Um aumento ou diminuição nos valores de índice mitótico pode estar relacionado, tanto ao número de células em divisão, como também a uma maior ou menor velocidade do ciclo celular (Melaragno, 1982).

O número de células em divisão pode variar em função de uma maior ou menor inibição da síntese de ácido nucléico e proteínas. Entretanto, a duplicação de DNA não é o único requisito para a divisão celular. Dentro do grupo de agentes que podem alterar os valores de índice mitótico temos aqueles que afetam a produção de energia necessária para a divisão celular (Melaragno, 1982), aqueles que impedem a formação na fase G de proteínas necessárias à entrada da célula em divisão (Baserga, 1985) e outros.

Com relação à ação do ácido retinóico a nível de cinética celular em linfócitos são encontrados na literatura dados controversos.

Alguns autores relatam a capacidade dessa droga em inibir a síntese de DNA (Christophers,1974; Nordlind e Thyberg,1983; Sundar *et al.*, 1984). Outros já descrevem experimentos que demonstram que o ácido retinóico é um potente adjuvante para a proliferação celular humana - linfócitos e fibroblastos - em cultura na presença de substâncias como a fitohemaglutinina ou globulina timocitária de coelho anti-humana (Christophers,1974; Abb e Deinhardt,1980; Valone e Payan,1985). Há ainda um terceiro grupo que relata não ser o ácido retinóico capaz de promover nem a inibição nem a proliferação da multiplicação celular em culturas de linfócitos humanos, onde não tenha ocorrido a separação prévia dos tipos B e T (Abb e Deinhardt,1980; Valone e Payan,1985).

CÉLULAS EM DIFERENTES GERAÇÕES

Juntamente com o índice mitótico, a porcentagem de células em diferentes gerações em cultura são os parâmetros mais utilizados na elucidação do comportamento celular em relação à cinética celular (Melaragno e Smith,1984).

De acordo com a identificação de metafases provenientes de células que se dividiram 1, 2, 3 ou mais vezes, podemos verificar a ação de agentes sobre o ciclo celular. Assim alterações que hajam ocorrido no número de divisões celulares nas culturas submetidas a tratamentos por produtos químicos, em comparação ao seu controle, indicam algum efeito do agente sobre a cinética celular (Gebhart,1981).

A avaliação da porcentagem de células nas diferentes gerações (1ª, 2ª, 3ª ou mais) em cultura é um método que apresenta algumas vantagens em relação à investigação do índice mitótico, pois além de requerer a análise de um menor número de células, parece ser mais preciso na avaliação da cinética celular (Melaragno e Smith, 1984).

FENÓTIPOS NUCLEARES

Os fenótipos nucleares observados em linfócitos humanos em cultura representam na verdade diferentes fases da diferenciação blástica de linfócitos B e T (Tokuyasu *et al.*, 1968; Al-Hamdani 1979). As diferenças observadas se devem a uma maior ou menor descondensação da cromatina. O tipo nuclear que exibe uma maior descondensação cromatínica pode ser denominado 0 e os demais tipos exibindo descondensações crescentes seguidas de aumento dos linfócitos podem ser classificados como 1, 2, e 3.

In vivo, a diferenciação blástica ocorre através da transformação de linfócitos pequenos (tipo 0) para células bem maiores (tipos 2 e 3) após estimulação por qualquer antígeno que leve a uma resposta imune celular (Al-Hamdani, 1979,).

In vitro, a diferenciação blástica pode ser estimulada ou inibida em função das drogas que porventura sejam adicionadas às culturas.

Em culturas tratadas com o estimulador mitogênico conca-navalina A, assim como na presença de fitohemaglutinina, verifica-se um estímulo sobre a diferenciação blástica. A frequência percentual de fenótipos nucleares mais compactados (Tipo 0) é mais baixa do que a

daqueles menos compactados (Tipos 1,2,3)(Tokuyasu *et al.*, 1968, Al-Hamdani, 1979 Setterfield *et al.*, 1983). Na presença de inibidores ocorre uma resposta contrária à acima mencionada, ou seja, a frequência do fenótipo nuclear tipo 0 é mais elevada do que as dos tipos 1, 2 e 3.

II. OBJETIVOS

Considerando a escassez de dados existentes acerca da mutagenicidade e/ou clastogenicidade promovida pelo ácido retinóico em culturas de linfócitos humanos, o presente trabalho teve como objetivos investigar tais itens; através da avaliação da instabilidade cromossômica e da cinética celular.

III. MATERIAL E MÉTODOS

III.1. CASUÍSTICA

A amostra foi constituída por 10 mulheres com idade variável entre 20 e 30 anos. As mulheres seleccionadas para o estudo não estavam em tratamento para qualquer fim utilizando drogas comprovadamente mutagênicas e/ou clastogênicas e também nunca haviam utilizado o ácido retinóico terapêuticamente.

O estudo foi realizado exclusivamente em mulheres com jovens (apêndice 1) por representarem uma amostra da população em idade reprodutiva e por não possírem as alterações do material genético comuns em indivíduos idosos.

III.2. METODOLOGIA

III.2.1. CULTURA DE LINFÓCITOS

As culturas de linfócitos foram realizadas a partir de modificação da técnica de Moorhead e colaboradores (1960, apud Melaragno, 1988) conforme se segue:

- a) Colheita: de cada paciente foram retirados 5 ml de sangue venoso periférico, em seringa estéril, com paredes heparinizadas - Liquemine Roche 5000 U/ml.
- b) Semeadura e incubação: em cada frasco de cultura foram colocados 5 ml de meio de cultura RPMI ou HAM F-10 suplementado com 20% de soro bovino fetal (CULTILAB), 0,2 ml de fitohemaglutinina e 0,3 ml de sangue total.

Para verificar *in vitro* a mutagenicidade e/ou clastogenicidade da droga em estudo foi adicionada às culturas de linfócitos solução recém preparada de ácido retinóico (Accutane TMRoche® 40) diluído em DMSO (Sigma) (Christophers e Langner, 1974; Abb e Deinhardt, 1980; Nordling e Thyberg, 1983). O ácido retinóico foi adicionado às culturas em duas concentrações: 20 µg/ml de meio e 2 µg/ml de meio, de modo que na primeira a concentração de DMSO foi 0,5% v/v e na segunda 0,05% v/v. Foram realizadas também três culturas controle, sem ácido retinóico. Duas com DMSO nas mesmas concentrações das culturas testes e uma controle sem adição de ácido retinóico e DMSO.

Para cada concentração da droga em teste foram preparados em duplicata frascos contendo BrdU (Cultilab) e frascos sem BrdU (Melaragno e Smith, 1984). As células das culturas com BrdU prestaram-se à análise do número de trocas entre cromátides irmãs (TCI) e as das culturas sem BrdU à análise de aberrações cromossômicas e/ou estruturais e também do índice mitótico e da cinética celular.

O BrdU foi adicionado às culturas desde o seu início e a solução de ácido retinóico diluído em DMSO e o DMSO puro foram adicionados nas últimas 5 horas de cultura (Nordling e Thyberg, 1983).

Foram realizados ensaios preliminares a fim de se estabelecer as condições experimentais ideais para realização deste trabalho. Nestes as culturas de linfócitos foram submetidas a tratamentos por tempos mais longos e com concentrações mais elevadas. Tais tempos e concentrações foram sendo reduzidos até que se obtivesse material adequado para análise.

A fim de se evitar a fotólise do DNA contendo BrdU, os frascos de cultura destinados a este tratamento eram de cor escura e foram envolvidos em papel aluminizado (Melaragno, 1988).

As culturas foram incubadas por 72 horas em estufa a 37°C

O quadro a seguir resume as situações experimentais do trabalho.

TRATAMENTOS	DROGAS ADICIONADAS AS CULTURAS
I	ácido retinóico 20 $\mu\text{g/ml}$ de meio, DMSO 0,5% v/v
II	ácido retinóico 2 $\mu\text{g/ml}$ de meio, DMSO 0,05% v/v
III	DMSO 0,5% v/v
IV	DMSO 0,05% v/v
V	Cultura controle

c) Preparação citológica: após 71 horas de incubação, foi adicionado a todas as culturas 0,1 ml de colquicina (Sigma), na concentração final de 0,8 $\mu\text{g/ml}$. Os tubos foram reincubados por mais 1 hora a 37°C. A seguir o material foi transferido para tubos de centrifuga e centrifugados a 1000 rpm por 7 minutos. O sobrenadante foi desprezado e foi realizada então uma hipotonização progressiva com 5 ml de KCl 0,075 M previamente aquecido a 37°C, por 50 minutos (1 ml de KCl a cada 10 minutos). O material foi ressuspendido a cada 10 minutos com o auxílio de pipeta Pasteur (Pinto Jr., comunicação pessoal)

Após esta hipotonização, os frascos receberam 0,5 ml de fixador metanol:ácido acético (3:1) e foram centrifugados a 1000 rpm por 7 minutos. O sobrenadante foi desprezado.

O procedimento de troca do fixador foi realizado quatro vezes, sendo que as culturas permaneceram, no 2º fixador, no freezer a 20°C por pelo menos 1 hora. Após a última centrifugação permaneceu no fundo do tubo cerca de 0,3 ml do fixador.

Em cada lâmina foram pingadas 2 a 3 gotas do material ressuspendido.

III.2.2. COLORAÇÕES

As lâminas destinadas às contagens de frequência de aberrações numéricas e/ou estruturais, índice mitótico e fenótipo nuclear foram coradas com Giemsa (Gurr) a 6% diluído em tampão Sorensen, a pH 6,8 por 10 minutos (Hackel *et al.*, 1988).

A cinética celular e a frequência de trocas entre cromátides irmãs - TCI (crossing over mitótico) foram analisadas em lâminas coradas segundo modificações das técnicas de Korenberg e Freidlander (1974), e Perry e Wolff (1974) modificadas por Melaragno e Smith (1984) e descritas a seguir:

As lâminas foram cobertas com um filme Hoechst 33258 na concentração de 5µg/ml e expostas à luz UV germicida 30 W por 3 minutos à 10 cm de distância;

Logo após serem lavadas em H₂O destilada e secadas ao ar, as lâminas foram incubadas em solução de NaH₂PO₄ 1M, pH 8,0-8,3 a 87º-89ºC por 1 minuto.

A seguir as lâminas foram lavadas novamente em H₂O destilada, secadas ao ar e coradas em Giemsa (Gurr) a 5% diluída em tampão fosfato, por 7 minutos.

Realizaram-se as análises das lâminas, em teste cego, diretamente ao microscópio de luz. As fotografias de situações que apresentaram maior interesse para análise e documentação foram efetuadas em fotomicroscópio Zeiss, utilizando-se filmes Panatomic X 32ASA e Kodacolor Gold 100 da Kodak.

III.3. CRITÉRIOS DE ANÁLISE

- Para o cálculo da frequência de TCI foram analisadas em cada cultura 20 metáfases de 2a. geração que possuíam uma boa diferenciação entre as cromátides irmãs, sem superposição cromossômica e todas elas contendo 46 cromossomos. Foi computado o número de TCI por célula e para cada um dos sete grupos cromossômicos (A,B,C+X,D,E,F,G).

A frequência de aberrações cromossômicas foi analisada em 40 metáfases, de cada cultura, tendo estas sido separadas quanto ao número de cromossomos (aberrações numéricas) e quanto a presença de aberrações estruturais (falhas e quebras) de acordo com Beiguelman, 1982. (Figuras 3A e 3B).

- O índice mitótico (número total de metáfases/total de células) foi calculado através da contagem ao acaso de 1000 células e concomitante computação das metáfases (Pisciotta *et al.*, 1967; Sinha *et al.*, 1986).

- A frequência relativa (%) de metáfases nas diferentes gerações celulares *in vitro* foi obtida através da contagem de 100 metáfases consecutivas para cada cultura. As metáfases foram classificadas como sendo de 1a., 2a., ou 3a. geração (neste grupo foram reunidas as células de 4a. geração eventualmente presentes na cultura) (figura 4) de

acordo com o padrão de diferenciação das cromátides (Melaragno e Smith, 1986);

Para a avaliação de possíveis alterações na frequência relativa dos diferentes fenótipos nucleares, os linfócitos foram classificados em quatro tipos (0,1,2,3) de acordo com o tamanho nuclear e o grau de compactação cromatínica (figura 5). Foi determinada tal frequência para 20 campos microscópicos (aumento: 400x), escolhidos ao acaso, para cada situação experimental.



FALHA CROMATÍDICA



FALHA ISOCROMATÍDICA
OU CROMOSSÔMICA



FIGURA 3A.

ESQUEMAS E MICROFOTOGRAFIAS APRESENTANDO CROMOSSOMOS
METAFÁSICOS COM FALHAS CROMATÍDICAS E CROMOSSÔMICAS
EM CULTURAS DE LINFÓCITOS HUMANOS

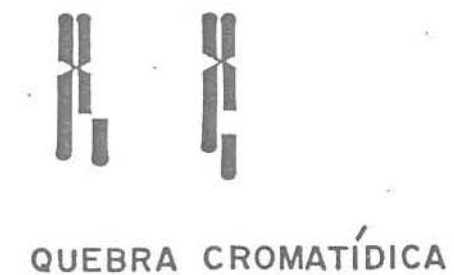
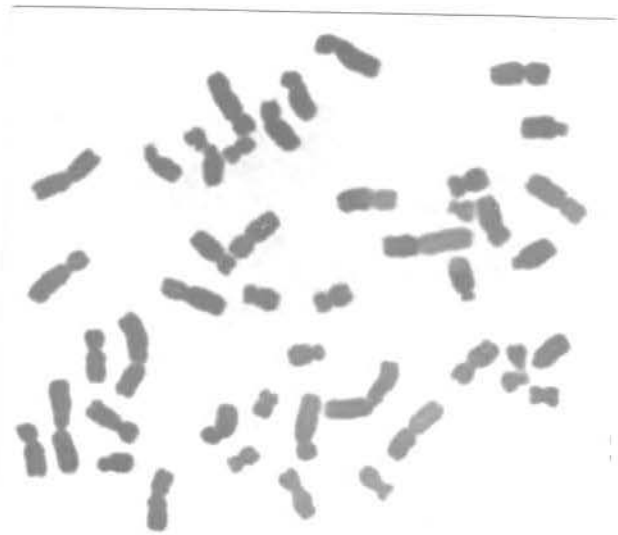
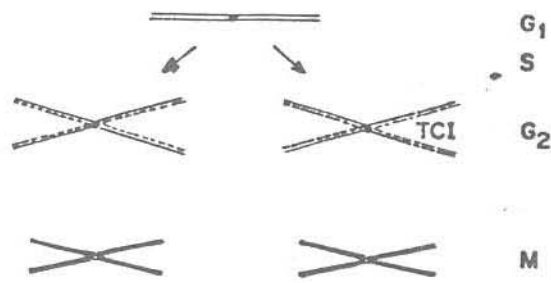
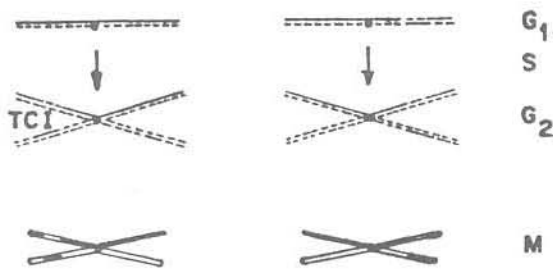


FIGURA 3B
ESQUEMAS E MICROFOTOGRAFIAS APRESENTANDO CROMOSSOMOS
METAFÁSICOS COM QUEBRAS CROMATÍDICAS E
CROMOSSÔMICAS EM CULTURAS DE LINFÓCITOS HUMANOS

1ª GERAÇÃO



2ª GERAÇÃO



3ª GERAÇÃO

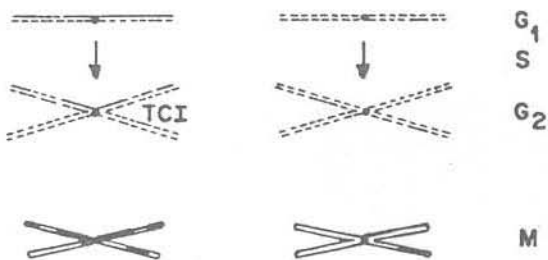


FIGURA 4 ASPECTOS CITOGNÉTICOS DE TCI QUE PERMITEM IDENTIFICAR AS DIFERENTES GERAÇÕES CELULARES EM CULTURAS DE LINFÓCITOS HUMANOS

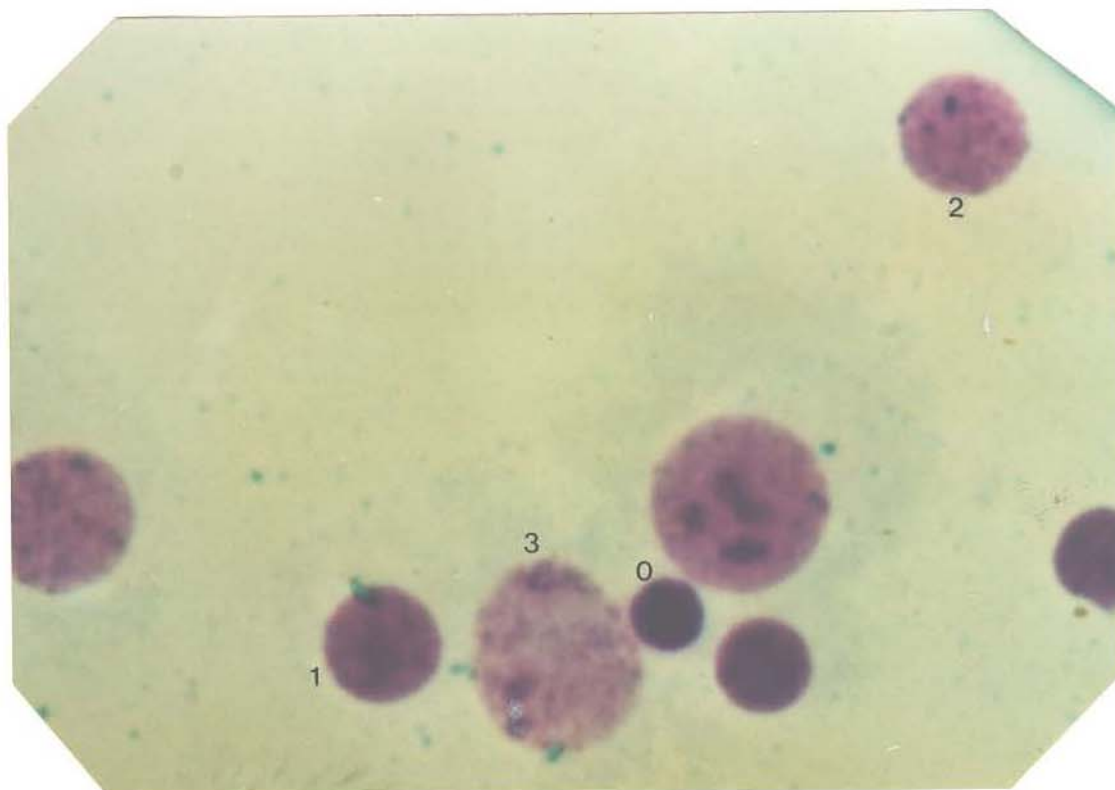
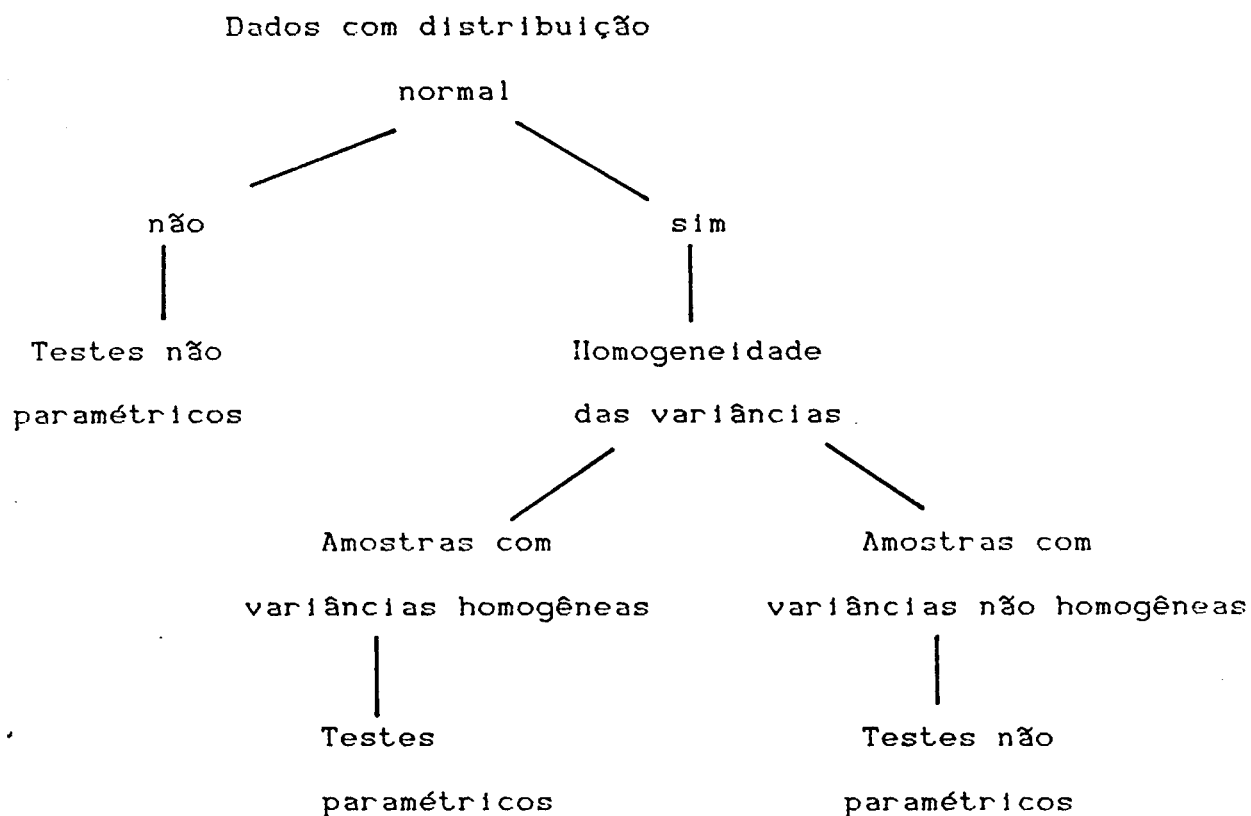


FIGURA 5.
PREPARAÇÃO MOSTRANDO A CLASSIFICAÇÃO DOS FENÓTIPOS
NUCLEARES EM LINFÓCITOS HUMANOS ATIVADOS.

III.4. MÉTODOS ESTATÍSTICOS

A análise estatística foi realizada considerando-se a natureza dos dados e segundo o esquema a seguir.



Foram aplicados os seguintes testes:

1. Teste não paramétrico para análise da variância por postos de Kruskal Wallis com o objetivo de serem comparadas as amostras tratadas com ácido retinóico, as tratadas somente com DMSO e as controle, com relação às falhas e quebras cromatídicas e isocromatídicas (Sokal e Rohlf, 1981).

2. Análise da variância - modelo inteiramente casualizado - com o objetivo de serem comparadas as amostras tratadas com ácido retinóico, as tratadas somente com DMSO e as controle com relação aos valores de índice mitótico, os fenótipos nucleares, percentagem de células nas diferentes gerações *in vitro* e a frequência de TCI por células (Beiguelman, 1988).

3. Análise da variância - modelo hierárquico - com o objetivo de verificar se os tratamentos a que as culturas foram submetidas promovem alterações nos valores de TCI por grupo cromossômico e se há interação entre eles (Beiguelman, 1988).

4. Teste "t" com o objetivo de serem comparadas as amostras tratadas com ácido retinóico, as tratadas somente com DMSO e as controle com relação aos valores de índice mitótico, percentagem de células nas diferentes gerações *in vitro* e a frequência de TCI por células (Beiguelman, 1988).

5. Teste não paramétrico da soma das ordens - Teste de Wilcoxon - para averiguar a existência de uma maior frequência de aparecimento de TCI de uma geração celular em relação às outras (Campos, 1979).

6. Teste do qui-quadrado para verificar se há alteração na frequência e distribuição de TCI nos grupos cromossômicos submetidos aos diferentes tratamentos.

Em todos os testes, fixou-se em 0,05 ou 5%, o nível de rejeição da hipótese de nulidade e assinalou-se com um asterisco (*) os valores significativos.

IV. RESULTADOS

Nas tabelas 1 a 18 acham-se apresentados os resultados obtidos neste trabalho. Elas foram divididas de acordo com a característica a ser analisada.

IV.1. INSTABILIDADE CROMOSSÔMICA

IV.1.1. TCI

Na tabela 1 estão descritos os dados referentes ao número total de trocas entre cromátides irmãs em 20 células analisadas por indivíduo.

Os valores de TCI obtidos por grupos cromossômicos e por cromossomos em separado acham-se descritos nas tabelas 2 e 3.

Com base nos resultados obtidos pelo teste estatístico do modelo hierárquico da análise da variância (tabela 3) podemos concluir que:

as médias de TCI, em todos os tratamentos, dos diversos grupos cromossômicos não são iguais, sendo que os cromossomos do grupo A são os que apresentam uma maior média de TCI por cromossomos, seguidos em ordem decrescente pelos grupos B e C+X, D, E, F e G. Isto estaria de acordo com a idéia de que grupos em que os cromossomos apresentam maior tamanho possuem um maior número de TCI (Latt, 1974; Alhadeff e Cohen, 1976; Morgan e Crossen, 1977; Pina Neto e Ferrari, 1981; Melaragno e Smith, 1984).

ocorreu diferença significativa entre as médias das TCI em linfócitos de cultura submetidos aos diferentes tratamentos, mas não houve interação significativa entre o uso de drogas em cultura e o valor de trocas entre os grupos cromossômicos, mostrando assim que o ácido retinóico não promove trocas entre cromátides irmãs preferencialmente

Nas tabelas 4 a 8 estão os resultados e testes estatísticos que demonstram que as TCI que ocorreram neste experimento não são preferenciais, já que em todos os tratamentos o grupo cromossômico que apresentou um maior número de trocas foi o C+X com exceção dos tratamentos IV e V onde além do grupo supra citado foi observado um número significativo de TCI também no grupo A.

Da análise da tabela 9 é possível verificar que o ácido retinóico promove um aumento de TCI em linfócitos em cultura. A diferença em concentração do ácido retinóico não afetou os resultados. Por outro lado, o uso de DMSO nas duas concentrações descritas não introduziu alterações significativas no número das trocas entre cromátides irmãs.

TABELA 1. Total de TCI em linfócitos humanos em cultura (20 células analisadas por indivíduo).

TRATAMENTOS	INDIVÍDUO										\bar{x}	s
	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10		
TOTAL DE TCI												
I	202	193	206	220	209	192	241	191	232	179	206,5	19,55
II	234	239	208	208	257	169	199	170	164	208	205,6	31,56
III	171	203	197	148	216	157	212	182	196	192	187,4	22,68
IV	173	217	194	193	183	178	209	158	199	203	190,7	17,85
V	173	154	188	136	154	132	213	192	218	152	171,2	30,55

F = 3,382

P = 0,0168*

CL = 4,45

TABELA 2. Dados referentes às TCI por grupos cromossômicos em culturas de linfócitos humanos: valores absolutos.

Tratamentos e Grupos cromossômicos	INDIVÍDUOS										
	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	
	VALORES DE TCI POR GRUPOS CROMOSSÔMICOS										
I	A	45	37	48	52	60	49	54	46	64	41
	B	27	18	14	23	20	29	30	15	13	19
	C + X	95	84	107	92	81	83	111	84	110	92
	D	18	27	16	28	18	16	22	19	21	19
	E	13	20	16	20	26	11	20	21	08	07
	F	02	02	03	0	02	02	0	02	03	0
	G	02	05	02	05	02	02	04	04	05	01
II	A	39	55	52	56	59	21	40	37	40	55
	B	38	25	25	25	22	22	17	24	22	22
	C + X	118	106	77	91	126	92	102	82	70	95
	D	23	36	33	16	18	19	23	14	21	23
	E	16	13	15	16	29	09	10	09	05	08
	F	0	0	06	02	01	01	02	04	04	01
	G	0	04	0	02	02	05	05	0	02	04
III	A	32	58	37	40	46	25	65	55	43	50
	B	22	22	26	14	22	14	19	15	23	18
	C + X	93	87	93	72	91	73	100	84	92	90
	D	12	18	23	13	23	28	15	12	25	18
	E	10	16	13	08	24	13	12	08	09	12
	F	02	0	0	0	01	01	0	02	02	0
	G	0	02	05	01	09	03	01	06	02	04
IV	A	39	64	49	37	36	39	58	41	53	60
	B	25	23	18	21	33	18	28	20	22	24
	C + X	90	89	82	101	82	78	80	73	88	85
	D	08	21	21	22	18	25	20	14	26	12
	E	11	17	14	09	14	11	21	06	07	18
	F	0	01	01	0	0	02	01	02	02	01
	G	0	02	09	03	0	05	01	02	01	03
V	A	38	46	50	40	36	32	67	53	47	35
	B	23	13	24	15	27	16	21	19	24	22
	C + X	93	70	79	53	67	60	102	83	104	75
	D	15	08	18	19	11	10	10	21	25	12
	E	04	15	12	06	13	06	12	13	12	07
	F	0	0	03	02	0	01	0	01	0	0
	G	0	02	02	01	0	07	01	02	06	01

TABELA 3. Valores médios e média geral de TCI por cromossomos, referentes aos dados dos grupos cromossômicos da Tabela 2. 56

		01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	\bar{x}	s
INDIVÍDUOS													
VALORES MÉDIOS E MÉDIA GERAL DE TCI POR CROMOSSOMOS													
I	A	7.5	6.17	8.0	8.67	10.0	8.17	2.0	7.67	10.67	6.83	11.8.27	1.37
	B	6.75	4.5	3.5	5.75	5.0	7.25	7.5	3.75	3.25	4.75	11.5.2	1.55
	C + X	5.94	5.25	6.62	5.75	5.06	5.19	6.94	5.25	7.37	5.75	11.5.92	0.81
	D	3.0	4.5	2.67	4.67	3.0	2.67	3.67	3.17	3.5	3.17	11.3.4	0.70
	E	2.17	3.33	2.67	3.33	4.33	1.83	3.33	3.5	1.33	1.17	11.2.7	1.04
	F	0.5	0.5	0.75	0	0.5	0.5	0	0.5	0.75	0	11.0.4	0.29
	G	0.5	1.25	0.5	1.25	0.5	0.5	1.0	1.0	1.25	0.25	11.0.8	0.39
	A	6.5	2.17	8.67	2.33	2.83	3.5	6.67	6.17	6.67	2.17	11.7.57	1.99
	B	3.5	6.25	6.25	6.25	5.5	5.55	4.25	6.0	5.5	5.5	11.6.05	1.35
	C + X	7.37	6.62	4.81	5.62	7.87	5.75	6.37	5.13	4.37	5.94	11.5.99	1.1
	D	3.83	6.0	5.5	2.67	3.0	3.17	3.83	2.33	3.5	3.83	11.3.77	1.17
	E	2.67	2.17	2.5	2.67	4.83	1.5	1.67	1.5	0.83	1.33	11.2.17	1.12
	F	0	0	1.5	0.5	0.25	0.25	0.5	1.0	1.0	0.25	11.0.52	0.49
	G	0	1.0	0	0.5	0.5	1.25	1.25	0.5	0.5	1.0	11.0.6	0.5
	A	5.33	2.67	6.17	6.67	7.67	4.17	10.83	3.17	7.17	6.33	11.7.52	2.04
	B	5.5	5.5	6.5	3.5	5.5	3.5	4.75	3.75	5.75	4.5	11.4.88	1.04
	C + X	5.81	5.44	5.81	4.5	5.62	4.56	6.25	5.25	5.75	5.62	11.5.47	0.56
	D	2.0	3.0	3.83	2.17	3.83	4.67	2.5	2.0	4.17	3.0	11.3.12	0.96
	E	1.67	2.67	2.17	1.33	4.0	2.17	2.0	1.33	1.5	2.0	11.2.08	0.79
	F	0.5	0	0	0	0.25	0.25	0	0.5	0.5	0	11.0.2	0.25
	G	0	0.5	1.25	0.25	2.25	0.75	0.25	1.5	0.5	1.0	11.0.83	0.79
	A	6.5	10.67	8.17	6.17	6.0	6.5	2.67	6.83	8.83	10.0	11.7.33	1.76
	B	6.25	5.75	4.5	5.25	8.25	4.5	7.0	5.0	5.5	6.0	11.5.8	1.16
	C + X	5.63	5.56	5.12	6.31	5.12	4.88	5.0	4.56	5.5	5.31	11.5.3	0.48
	D	1.33	3.5	3.5	3.67	3.0	4.17	3.33	2.33	4.33	2.0	11.3.12	0.96
	E	1.83	2.83	2.33	1.5	2.33	1.83	3.5	1.0	1.17	3.0	11.2.13	0.81
	F	0	0.25	0.25	0	0	0.5	0.25	0.5	0.5	0.25	11.0.25	0.2
	G	0	0.5	2.25	0.75	0	1.25	0.25	0.5	0.25	0.75	11.0.65	0.68
	A	6.33	7.67	8.33	6.67	6.0	5.33	11.17	8.83	7.83	5.83	11.7.39	1.76
	B	5.75	3.25	6.0	3.75	6.75	4.0	5.25	4.75	6.0	5.5	11.5.1	1.13
	C + X	5.82	4.38	4.94	3.31	4.12	3.75	6.37	5.19	6.5	4.69	11.4.91	1.07
	D	2.5	1.33	3.0	3.17	1.83	1.67	1.67	3.5	4.17	2.0	11.2.48	0.94
	E	0.67	2.5	2.0	1.0	2.17	1.0	2.0	2.17	2.0	1.17	11.1.67	0.64
	F	0	0	0.75	0.5	0	0.25	0	0.25	0	0	11.0.18	0.26
	G	0	0.5	0.5	0.25	0	1.75	0.25	0.5	1.50	0.25	11.0.55	0.59
GRUPOS CROMOSSÔMICOS													
TRATAMENTOS													
INTERAÇÃO													
RESÍDUO													
GL = 315													
F = 4,140													
P = 2,774 x 10 ⁻³ *													
GL = 4													
F = 329,676													
P = 0 *													
GL = 6													

Tabela 4. Frequência e distribuição de TCI de acordo com os grupos cromossômicos nos diferentes indivíduos estudados no tratamento I.

Indivíduos	GRUPOS CROMOSSÔMICOS							Total TCI	Freq. TCI/cel
	A	B	C+X	D	E	F	G		
1	45	27	95	18	13	02	02	202	10,1
2	37	18	84	27	20	02	05	193	9,65
3	48	14	107	16	16	03	02	206	10,3
4	52	23	92	28	20	0	05	220	11
5	60	20	81	18	26	02	02	209	10,45
6	49	29	83	16	11	02	02	192	9,6
7	54	30	111	22	20	0	04	241	12,05
8	46	15	84	19	21	02	04	191	9,55
9	64	13	118	21	08	03	05	232	11,6
10	41	19	92	19	07	0	01	179	8,95
TOTAL	496	208	947	204	162	16	32	2065	10,33

Obs: para todos os indivíduos foram analisadas 20 células.

Teste de distribuição de TCI em relação ao tamanho relativo dos cromossomos metafásicos.

Grupo cromossômico	Comprimento relativo dos cromossomos(+)	TCI observadas	TCI esperadas	X ² calculado (X ² crit. 3,84)
A	46,58	496	457,56	3,23
B	24,76	208	243,22	5,13*
C+X	79,94	947	785,25	33,32*
D	21,52	204	211,39	0,26
E	19,08	162	187,42	3,45
F	10,46	16	102,75	73,24*
G	7,88	32	77,41	26,64*
TOTAL	210,22	2065		

(+) DE ACORDO COM A CONFERÊNCIA DE PARIS

Cálculo do TCI esperado= $2065 \times \frac{\text{comprimento relativo}}{210,22}$

Tabela 5. Frequência e distribuição de TCI de acordo com os grupos cromossômicos nos diferentes indivíduos estudados no tratamento II.

Indivíduos	GRUPOS CROMOSSÔMICOS							Total TCI	Freq. TCI/cel
	A	B	C+X	D	E	F	G		
1	39	38	118	23	16	0	0	234	11,7
2	55	25	106	36	13	0	04	239	11,95
3	52	25	77	33	15	06	0	208	10,4
4	56	25	91	16	16	02	02	208	10,4
5	59	22	126	18	29	01	02	257	12,85
6	21	22	92	19	09	01	05	169	8,45
7	40	17	102	23	10	02	05	199	9,95
8	37	24	82	14	09	04	0	170	8,5
9	40	22	70	21	05	04	02	164	8,2
10	55	22	95	23	08	01	04	208	10,4
TOTAL	454	242	959	226	130	21	24	2056	10,28

Obs: para todos os indivíduos foram analisadas 20 células.

Teste de distribuição de TCI em relação ao tamanho relativo dos cromossomos metafásicos.

Grupo cromossômico	Comprimento relativo dos cromossomos(+)	TCI observadas	TCI esperadas	X ² calculado (X ² crit.3,84)
A	46,58	454	455,56	0,005
B	24,76	242	242,16	0,0001
C+X	79,94	959	781,83	40,15*
D	21,52	226	210,47	1,15
E	19,08	130	186,61	17,17*
F	10,46	21	102,30	64,61*
G	7,88	24	77,07	36,54*
TOTAL	210,22	2056		

(+) DE ACORDO COM A CONFERÊNCIA DE PARIS

Cálculo do TCI esperado = $2056 \times \frac{\text{comprimento relativo}}{210,22}$

Tabela 6. Frequência e distribuição de TCI de acordo com os grupos cromossômicos nos diferentes indivíduos estudados no tratamento III.

Indivíduos	GRUPOS CROMOSSÔMICOS							Total TCI	Freq. TCI/cel
	A	B	C+X	D	E	F	G		
1	32	22	93	12	10	02	0	171	8,55
2	58	22	87	18	16	0	02	203	10,15
3	37	26	93	23	13	0	05	197	9,85
4	40	14	72	13	08	0	01	148	7,4
5	46	22	91	23	24	01	09	216	10,8
6	25	14	73	28	13	01	03	157	7,85
7	65	19	100	15	12	0	01	212	10,6
8	55	15	84	12	08	02	06	182	9,1
9	43	23	92	25	09	02	02	196	9,8
10	50	18	90	18	12	0	04	132	9,6
TOTAL	451	195	875	187	125	08	33	1874	9,37

Obs: para todos os indivíduos foram analisadas 20 células.

Teste de distribuição de TCI em relação ao tamanho relativo dos cromossomos metafásicos.

Grupo cromossômico	Comprimento relativo dos cromossomos(+)	TCI observadas	TCI esperadas	X ² calculado (X ² crit. 3,84)
A	46,58	451	415,24	3,08
B	24,76	195	220,72	2,99
C+X	79,94	875	712,63	36,99*
D	21,52	187	191,84	0,12
E	19,08	125	170,09	11,95*
F	10,46	8	93,25	77,94*
G	7,88	33	70,25	19,75*
TOTAL	210,22	1874		

(+) DE ACORDO COM A CONFERÊNCIA DE PARIS

Cálculo do TCI esperado = $1874 \times \frac{\text{comprimento relativo}}{210,22}$

Tabela 7. Frequência e distribuição de TCI de acordo com os grupos cromossômicos nos diferentes indivíduos estudados no tratamento IV

Indivíduos	GRUPOS CROMOSSÔMICOS							Total TCI	Freq. TCI/cel
	A	B	C+X	D	E	F	G		
1	39	25	90	08	11	0	0	173	8,65
2	64	23	89	21	17	01	02	217	10,85
3	49	18	82	21	14	01	09	194	9,7
4	37	21	101	22	09	0	03	193	9,65
5	36	33	82	18	14	0	0	183	9,15
6	39	18	78	25	11	02	05	178	8,9
7	58	28	80	20	21	01	01	209	10,45
8	41	20	73	14	06	02	02	158	7,9
9	53	22	88	26	07	02	01	199	9,95
10	60	24	85	12	18	01	03	203	10,15
TOTAL	476	232	848	187	128	10	26	1907	9,53

Obs: para todos os indivíduos foram analisadas 20 células.

Teste de distribuição de TCI em relação ao tamanho relativo dos cromossomos metafásicos.

Grupo cromossômico	Comprimento relativo dos cromossomos(+)	TCI observadas	TCI esperadas	X ² calculado (X ² crit. 3,84)
A	46,58	476	422,55	6,76*
B	24,76	232	224,61	0,24
C+X	79,34	848	725,17	20,80*
D	21,52	187	195,22	0,35
E	19,08	128	173,08	11,74*
F	10,46	10	94,89	75,94*
G	7,88	26	71,48	28,94*
TOTAL	210,22	1907		

(+) DE ACORDO COM A CONFERÊNCIA DE PARIS

Cálculo do TCI esperado= $1907 \times \frac{\text{comprimento relativo}}{210,22}$

Tabela 8. Frequência e distribuição de TCI de acordo com os grupos cromossômicos nos diferentes indivíduos estudados no tratamento V

Indivíduos	GRUPOS CROMOSSÔMICOS							Total TCI	Freq. TCI/cel
	A	B	C+X	D	E	F	G		
1	38	23	93	15	04	0	0	173	8,65
2	46	13	70	08	15	0	02	154	7,7
3	50	24	79	18	12	03	02	188	9,4
4	40	15	53	19	06	02	01	136	6,8
5	36	27	67	11	13	0	0	154	7,7
6	32	16	60	10	06	01	07	132	6,6
7	67	21	102	10	12	0	01	213	10,65
8	53	19	83	21	13	01	02	192	9,6
9	47	24	104	25	12	0	06	218	10,9
10	35	22	75	12	07	0	01	152	7,6
TOTAL	444	204	786	149	100	7	22	1712	8,56

Obs: para todos os indivíduos foram analisadas 20 células.

Teste de distribuição de TCI em relação ao tamanho relativo dos cromossomos metafásicos.

Grupo cromossômico	Comprimento relativo dos cromossomos(+)	TCI observadas	TCI esperadas	X ² calculado (X ² crit.3,84)
A	46,58	444	379,34	11,02*
B	24,76	204	201,64	0,03
C+X	79,94	786	651,02	27,99*
D	21,52	149	175,26	3,93*
E	19,08	100	155,38	19,74*
F	10,46	7	85,18	71,75*
G	7,88	22	64,17	27,71*
TOTAL	210,22	1712		

(+) DE ACORDO COM A CONFERÊNCIA DE PARIS

Cálculo do TCI esperado= $1712 \times \frac{\text{comprimento relativo}}{210,22}$

TABELA 9. Análise estatística para os valores de TCI em culturas de linfócitos humanos descritos na Tabela 1.

TESTE DE HIPÓTESES PARA AS MÉDIAS

Diferença entre as médias dos grupos 1 e 2						
	\bar{x}	s	N	GL	Teste T	Probabilidade
Grupo 1	206,5	19,55	10	18	0,0767	0,9378
Grupo 2	205,6	31,56	10			

Diferença entre as médias dos grupos 3 e 4						
	\bar{x}	s	N	GL	Teste T	Probabilidade
Grupo 3	187,4	22,68	10	18	-0,3616	0,7218
Grupo 4	190,7	17,85	10			

Diferença entre as médias dos grupos (1+2) e (3+4)						
	\bar{x}	s	N	GL	Teste T	Probabilidade
Grupos (1+2)	206,05	25,55	20	38	2,3460	0,0242*
Grupos (3+4)	189,05	19,93	20			

Diferença entre as médias dos grupos (1+2) e 5						
	\bar{x}	s	N	GL	Teste T	Probabilidade
Grupos (1+2)	206,05	25,55	20	28	3,3017	0,0026*
Grupo 5	171,2	30,55	10			

Diferença entre as médias dos grupos (3+4) e 5						
	\bar{x}	s	N	GL	Teste T	Probabilidade
Grupos (3+4)	189,05	19,93	20	28	1,9316	0,0636
Grupo 5	171,2	30,55	10			

IV.1.2. ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS

Não foram observadas aberrações cromossômicas numéricas mas somente aberrações estruturais (falhas e quebras). Estas aparecem catalogadas por tipo e grupos cromossômicos, de acordo com o tratamento a que as culturas foram submetidas, nos apêndices II a V. Na tabela 10 temos a frequência absoluta de aberrações por tratamento.

Não houve diferenças significativas na frequência de aberrações cromossômicas nos diferentes tratamentos. As médias, desvio padrão e os resultados do teste de Kruskal-Wallis encontram-se na tabela 11.

Não foi realizada análise estatística em separado para cada aberração verificada, devido à baixa frequência observada.

TABELA 10. Aberrações cromossômicas em culturas de linfócitos humanos.

Tratamentos e tipos de aberrações cromossômicas	INDIVÍDUOS										
	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	
	FREQUÊNCIA ABSOLUTA DAS ABERRAÇÕES										
I	FC	15	14	08	14	03	06	14	18	07	08
	FI	03	03	01	0	1	01	01	0	01	0
	QC	01	0	01	03	03	01	0	02	01	01
	QI	01	0	0	01	0	01	0	0	0	01
II	FC	11	14	07	07	06	08	08	13	08	08
	FI	04	07	03	05	01	01	0	0	0	02
	QC	0	0	02	0	01	01	0	0	01	01
	QI	0	0	02	0	02	02	02	0	0	0
III	FC	09	10	03	08	05	08	12	13	09	10
	FI	0	0	01	01	0	0	0	01	0	01
	QC	02	0	0	0	01	0	01	02	0	0
	QI	0	0	0	01	01	0	0	0	0	0
IV	FC	10	08	13	05	01	06	09	09	06	06
	FI	0	0	0	01	01	0	0	0	0	0
	QC	02	02	0	01	0	01	0	02	01	01
	QI	0	0	01	03	01	0	0	02	0	0
V	FC	07	11	05	07	06	04	07	12	06	08
	FI	0	01	01	0	0	0	0	01	0	01
	QC	0	0	0	01	01	02	0	02	01	0
	QI	0	0	0	02	0	0	01	0	0	0

FC: Falha cromatídica

FI: Falha isocromatídica

QC: Quebra cromatídica

QI: Quebra isocromatídica

TABELA 11. Teste Kruskal-Wallis para os dados de aberrações cromossômicas em linfócitos humanos em cultura.

TRATAMENTOS	ABERRAÇÕES							
	FC		FI		QC		QI	
I	10,7	4,88	1,1	1,1	1,3	1,06	4,0	0,51
II	9,0	2,71	2,3	2,41	0,6	0,69	0,8	1,03
III	9,3	2,21	0,4	0,52	0,6	0,84	0,2	0,42
IV	7,3	3,27	0,2	0,42	1,0	0,82	0,7	1,06
V	7,3	2,50	0,4	0,52	0,7	0,82	0,3	0,67
	H = 6,868		H = 9,202		H = 3,815		H = 1,963	
	P = 0,143		P = 0,056		P = 0,432		P = 0,743	
	GL = 4		GL = 4		GL = 4		GL = 4	

FC = falha cromatídica

FI = falha isocromatídica

QC = Quebra cromatídica

QI = Quebra isocromatídica

IV.2. CINÉTICA CELULAR

IV.2.1. ÍNDICE MITÓTICO

Os dados apresentados na Tabela 12 nos permitem concluir que não houve diferenças significativas nos valores percentuais dos índices mitóticos.

IV.2.2. FREQUÊNCIAS DAS CÉLULAS EM DIFERENTES GERAÇÕES (G)

As frequências absolutas das células em diferentes gerações acham-se apresentadas na tabela 13. A análise estatística destes dados se encontra nas tabelas 14 e 15.

Pela tabela 14 pode-se verificar que não existe diferença significativa entre as médias das três gerações celulares, obtidas em cultura de linfócitos humanos, quando os diferentes tratamentos são comparados entre si.

Comparando-se a seguir as frequências das células entre diferentes gerações, pode-se concluir pela diferença entre estas, ou seja, a média de células em 2a. geração é maior do que a de células de 1a. geração. Esta, por sua vez, é maior do que a média das células de 3a. geração (Tabela 15).

TABELA 12. Índices mitóticos em culturas de linfócitos humanos.

TRATAMENTOS	INDIVÍDUOS										\bar{x}	s
	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10		
ÍNDICES MITÓTICOS (%)												
I	3,3	2,1	3,8	2,9	2,6	3,1	2,8	2,4	4,0	4,0	3,1	0,67
II	3,0	2,4	3,6	3,3	2,8	3,0	3,8	2,2	4,8	4,1	3,3	0,79
III	4,0	3,2	3,4	3,1	2,9	3,9	3,5	2,0	5,0	4,2	3,5	0,82
IV	3,7	4,0	3,0	2,8	3,0	3,4	3,7	2,2	5,0	3,4	3,4	0,76
V	4,3	4,3	4,0	3,1	3,5	3,4	4,2	1,9	5,4	4,6	3,8	0,95

F = 1,262

P = 0,2988

CL = 4,45

TABELA 13. Frequências de células em diferentes gerações (G): dados absolutos para linfócitos humanos em cultura.

Tratamentos e gerações (G) celulares	INDIVÍDUOS										
	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	
	FREQUÊNCIAS CELULARES ABSOLUTAS										
I	1a. G	36	41	26	28	16	35	29	54	35	31
	2a. G	34	35	50	42	30	42	57	41	63	56
	3a. G*	30	24	24	30	54	23	14	05	02	13
II	1a. G	33	12	26	19	17	48	28	56	51	26
	2a. G	46	40	43	35	34	34	62	35	43	59
	3a. G*	21	48	31	46	49	18	10	09	06	15
III	1a. G	15	18	14	22	25	38	21	52	52	39
	2a. G	27	58	50	34	31	50	57	40	40	51
	3a. G*	58	24	36	44	44	12	22	08	08	10
IV	1a. G	39	20	19	08	16	49	37	44	48	35
	2a. G	52	61	38	27	25	38	56	50	45	57
	3a. G*	09	10	43	65	59	13	07	06	07	08
V	1a. G	41	12	25	31	16	41	37	53	35	44
	2a. G	34	37	41	44	25	42	57	41	65	48
	3a. G*	25	51	34	25	59	17	06	06	00	08

- OBS.: 1. Para todas as situações e para todas as pacientes o número de células contadas foi igual a 100.
2. 3a. G*: neste grupo foram reunidas as células de 4a. geração, eventualmente presentes na cultura.

TABELA 14. Teste Kruskal-Wallis para verificar diferenças entre as médias das frequências de gerações celulares observadas em culturas de linfócitos humanos em função dos diferentes tratamentos.

Tratamentos	GERAÇÕES					
	1a. Geração		2a. Geração		3a. Geração	
	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s
I	33,1	10,03	45,0	11,02	21,9	14,89
II	31,6	15,18	43,1	10,14	25,3	16,96
III	29,6	14,55	43,8	10,93	26,6	17,92
IV	31,5	14,58	44,9	12,55	22,7	23,45
V	33,5	12,76	43,4	11,32	23,1	19,34
	H = 0,721 P = 0,9487 GL= 4		H = 0,244 P = 0,9931 GL= 4		H = 0,244 P = 0,8951 GL= 4	

TABELA 15. Teste de Kruskal-Wallis para verificar a existência de diferenças entre as médias das frequências das gerações celulares observadas em culturas de linfócitos humanos e comparadas entre gerações.

GERAÇÃO(G)	\bar{x}	s	DISTRIBUIÇÃO	GL	H	PROBABILIDADE
1a. G	31,86	13,06	Normal	1		
2a. G	44,04	10,78	Normal	2	36,414	$1,238 \times 10^{-8}$ *
3a. G	23,92	18,16	Não Normal	1		

N por geração = 50 (10 pacientes x 5 tratamentos)

GERAÇÕES (G)	GL	H	PROBABILIDADE
1a. G x 2a. G	1	18,68	$1,54 \times 10^{-5}$ *
2a. G x 3a. G	1	28,43	$9,70 \times 10^{-8}$ *
1a. G x 3a. G	1	8,54	$3,47 \times 10^{-3}$ *

N por geração = 50 (10 pacientes x 5 tratamentos)

IV.2.3. FENÓTIPO NUCLEAR

Os dados referentes a esta característica encontram-se descritos nas tabelas 16 e 17.

Como se pode verificar pela análise dos dados, o fenótipo nuclear tipo 1 foi o que apresentou a maior frequência relativa percentual e o tipo 3, a menor, em todos os indivíduos estudados (Tabela 17).

A análise estatística da frequência relativa (%) desses fenótipos permitiu demonstrar não existir diferença significativa entre as médias de cada um dos fenótipos nucleares, analisados em separado, submetidos aos diferentes tratamentos (Tabela 18).

Estes dados são sugestivos de que o ácido retinóico não tenha alterado a cinética de diferenciação blástica nas condições de tratamento descritas neste trabalho.

TABELA 16. Fenótipos nucleares em culturas de linfócitos humanos: frequências absolutas

Tratamentos e fenótipos nucleares	INDIVÍDUOS										
	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	
	FREQUÊNCIA ABSOLUTA DOS DIFERENTES FENÓTIPOS										
I	0	129	84	150	223	137	223	164	158	295	170
	1	272	202	317	216	340	322	354	214	421	378
	2	174	129	149	125	162	80	114	91	70	115
	3	54	38	39	64	47	25	30	11	26	33
	Total	629	453	655	628	686	650	662	474	812	696
II	0	125	137	185	237	149	278	172	169	431	161
	1	184	215	217	271	434	361	421	301	423	457
	2	132	131	102	158	111	63	93	56	63	86
	3	52	38	32	59	21	12	10	8	22	15
	Total	493	521	536	725	715	714	696	534	939	719
III	0	130	132	99	264	122	237	227	166	348	163
	1	159	225	208	263	374	464	425	297	450	463
	2	142	103	130	135	82	56	97	72	62	73
	3	66	24	46	29	11	4	16	5	20	20
	Total	497	484	483	691	589	761	765	540	880	719
IV	0	125	159	127	211	159	218	251	199	394	151
	1	176	298	245	307	378	484	409	271	470	458
	2	159	136	160	82	117	63	74	66	57	79
	3	60	25	36	21	20	5	19	12	13	15
	Total	520	618	568	621	674	770	753	548	934	703
V	0	170	137	254	248	162	285	243	220	394	183
	1	312	229	226	284	420	431	416	281	494	470
	2	199	103	83	88	70	44	78	38	26	66
	3	65	20	24	20	5	1	18	3	23	19
	Total	746	489	587	640	657	761	755	542	937	738

TABELA 17. Fenótipos nucleares em culturas de linfócitos humanos: frequências relativas

Tratamentos e fenótipos nucleares	PACIENTES									
	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10
	FREQUENCIA RELATIVA (%) DOS DIFERENTES FENÓTIPOS									
I	20.52	18.54	22.20	35.51	19.97	34.30	24.78	33.33	36.33	24.42
	43.24	44.52	48.40	34.33	49.56	49.54	53.47	45.15	51.85	54.32
	27.66	28.48	22.75	19.91	23.61	12.31	17.22	19.20	8.62	16.52
	8.58	8.33	5.95	10.19	6.86	3.85	4.53	2.32	3.20	4.74
II	25.35	26.30	34.52	32.70	20.84	38.34	24.71	31.65	45.90	22.39
	37.32	41.27	40.48	37.38	60.70	50.56	60.43	56.37	45.05	63.56
	26.78	25.14	19.03	21.73	15.52	8.82	13.36	10.48	6.71	11.26
	10.55	7.23	5.37	8.13	2.94	1.68	1.44	1.50	2.34	2.02
III	25.16	27.27	20.50	38.20	20.71	31.14	23.67	30.74	32.55	22.67
	31.93	46.43	43.10	38.06	63.50	60.27	55.56	55.00	51.14	64.40
	20.57	21.28	26.21	19.54	13.92	7.36	12.68	13.33	7.04	10.15
	13.20	4.26	2.52	4.20	1.87	0.53	2.03	0.93	2.27	2.78
IV	24.04	25.73	22.36	34.00	23.58	28.31	33.33	36.31	42.18	21.48
	33.85	40.22	43.13	42.40	56.10	62.85	54.32	49.45	50.32	65.14
	30.57	22.01	28.17	13.20	17.36	8.19	9.83	12.05	6.11	11.24
	11.54	4.04	6.34	3.40	2.96	0.05	2.52	2.13	1.32	2.14
V	22.73	28.02	43.27	38.75	24.66	37.45	32.18	40.53	42.05	24.80
	41.82	46.83	38.51	44.37	63.33	56.64	55.10	51.85	52.72	63.70
	26.67	21.06	14.14	13.75	10.65	5.78	10.33	7.01	2.78	8.23
	8.71	4.02	4.02	3.13	0.76	0.13	2.32	0.55	2.45	2.57

TABELA 18. Análise estatística referente à frequência relativa dos fenótipos nucleares .

Tratamentos	FENÓTIPOS NUCLEARES							
	Tipo 0		Tipo 1		Tipo 2		Tipo 3	
	x (%)	s	x (%)	s	x (%)	s	x (%)	s
I	27,06	0,07	47,49	0,06	19,63	0,06	5,86	0,03
II	30,33	0,08	49,32	0,1	15,96	0,07	4,39	0,03
III	28,66	0,07	51,02	0,11	16,08	0,08	4,24	0,04
IV	29,13	0,07	51,28	0,09	15,87	0,08	3,71	0,03
V	33,45	0,08	51,54	0,09	12,11	0,07	2,89	0,02
	F = 1,069		F = 0,356		F = 1,308		F = 1,175	
	P = 0,3828		P = 0,8387		P = 0,2814		P = 0,3347	
	GL = 4,45							

V. DISCUSSÃO

V.1. INSTABILIDADE CROMOSSÔMICA

V.1.1. TCI

Apesar dos mecanismos moleculares envolvidos nas TCI não estarem ainda totalmente elucidados, este método tem se mostrado muito sensível para se verificar a ação mutagênica e/ou clastogênica de uma grande variedade de drogas e em vários sistemas de teste, inclusive as culturas de linfócitos humanos (Wolff, 1977; Gebhart, 1981).

Dados do presente trabalho indicam um pequeno, mas significativo aumento na frequência de TCI nas células expostas às soluções do ácido retinóico quando comparadas às culturas controle (com DMSO puro). Tal aumento pôde ser verificado nas culturas independente das concentrações de ácido retinóico utilizadas (20 e 2 $\mu\text{g/ml}$ de meio).

Estes resultados estão em concordância com dados da literatura. Resultados semelhantes foram encontrados em culturas de linfócitos de dois indivíduos, apesar da diferença existente na metodologia experimental (tratamento das culturas por um período de 48 horas, porém com uma concentração menor da droga, 15 e 7,5 $\mu\text{g/ml}$ de meio, Auerbach *et al.*, 1984).

Aumento na frequência em TCI foi também reportado para culturas de fibroblastos humanos tratadas por 6 horas (e depois retiradas da cultura através de troca de meio) a uma concentração que não excedia 12 $\mu\text{g/ml}$ de meio de ácido retinóico (Juhl *et al.*, 1978; Tetzner *et al.*, 1980).

Os resultados da presente investigação mostram, por outro lado, que o aumento comprovado em TCI ocorreu de forma global nas culturas e que o ácido retinóico não atuou preferencialmente sobre nenhum grupo ou par cromossômico, ao se considerar os cinco tratamentos conjuntamente.

Quando foi(ram) pesquisada(s) eventual(is) troca(s) preferencial(is) por algum grupo cromossômico detectou-se um aumento significativamente maior de trocas nos cromossomos do grupo C+X submetidos a qualquer um dos tratamentos do que seria esperado pelos seus comprimentos metafásicos e também nos do grupo A nos tratamentos IV e V. Este achado em relação ao grupo C+X está em concordância com de Pina Neto e Ferrari(1981) e Melaragno (1984). O aumento verificado em C+X, ocorreu em todos os tratamentos, em detrimento aos valores dos grupos D, E, F, G. Não encontramos explicações para o aumento observado no número de TCI no grupo A nos tratamentos IV e V.

Os dados do presente trabalho foram computados levando-se em consideração as TCI que ocorrem nas regiões centroméricas. Essas exibem elevada incidência e segundo Tice *et al.* (1976) podem ser incluídas nas investigações que utilizam a análise de TCI, por se acreditar que o cômputo das trocas que ocorre nessa região é relativamente preciso.

Dois pontos merecem ainda ser discutidos. O primeiro seria quanto à potencialidade da droga em causar alterações no DNA, já que apesar das concentrações da droga utilizadas neste trabalho terem sido pequenas (2 e 20 $\mu\text{g/ml}$ de melo) e por um curto espaço de tempo (5 horas finais da cultura o que engloba final da fase S e fase G2 da interfase) foram obtidas alterações significativas.

Isto conduz ao segundo ponto, que neste tópico é o mais significativo em ser considerado. A importância em se enfatizar que as lesões primárias visualizadas através da troca entre cromátides irmãs trarão efeitos para a célula sobre a qual atuarem, durante todo o seu ciclo vital, o que poderia causar danos irreversíveis. Resultados obtidos *in vitro* podem levar à inferência do que pode ocorrer em células somáticas e germinativas. Em células germinativas poderá levar ao aparecimento de indivíduos portadores de algum tipo de anomalia de origem estrutural. Em células somáticas poderá propiciar o aparecimento de células tumorais se durante o processo de TCI ocorrer deleções, inserções, ativação de sítios frágeis etc o que poderia explicar o efeito carcinogênico da droga, que já foi comprovado em células humanas e animais *in vitro* (Smith *et al.*, 1975; Lotan *et al.*, 1983; Gensler *et al.*, 1985; Tammi *et al.*, 1985; Konohama *et al.*, 1987).

V.1.2. ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS

As aberrações cromossômicas observadas neste trabalho limitam-se a falhas e quebras cromossômicas ou cromatídicas. Tais aberrações ocorreram igualmente tanto nas culturas tratadas com ácido retinóico como nas controle (com DMSO puro).

Nos experimentos realizados por Auerbach *et al.* (1984) em culturas de linfócitos submetidas a tratamento com ácido retinóico, apesar do pequeno número de indivíduos e das condições experimentais terem sido diferentes, conforme citado anteriormente, os resultados obtidos foram semelhantes aos deste trabalho.

Para explicarmos a baixa capacidade do ácido retinóico em promover o aparecimento de aberrações cromossômicas estruturais, especialmente as cromatídicas neste trabalho podemos levantar três hipóteses:

- 1ª) a droga em estudo teria grande capacidade de indução de TCI e baixa clastogenicidade;
- 2ª) a droga não teria atuado na fase do ciclo celular necessária à evidenciação do seu efeito clastogênico;
- 3ª) as aberrações ocorridas seriam de tal grandeza que teriam levado a célula à morte em uma fase final da intérfase, não podendo, pois, serem detectadas.

Em relação à primeira hipótese os presentes resultados só permitem concluir que o ácido retinóico tem grande capacidade de indução de TCI. A respeito da clastogenicidade em relação às aberrações do tipo cromatídicas os presentes resultados permitem inferir que seu efeito foi muito baixo nas condições do experimento; podendo ser devido a não atuação na fase do ciclo celular necessária a evidenciação do seu efeito clastogênico. Para se poder concluir algo acerca da clastogenicidade do tipo cromossômico, novos experimentos deveriam ser realizados, onde a droga permanecesse agindo na cultura de linfócitos humanos por um período mais longo, mas com concentrações de ácido retinóico menores, dada a sua capacidade de inibir a síntese de DNA.

Já em relação à terceira hipótese, ela parece não ter ocorrido, considerando-se concomitantemente a estes resultados aqueles obtidos nas contagens de índice mitótico, os quais mostraram não haver diferença significativa entre as culturas tratadas e as controles.

Os resultados deste trabalho indicam que nas condições utilizadas o ácido retinóico parece pertencer ao grupo de drogas capazes de induzir TCI e com baixo efeito clastogênico.

V.2. CINÉTICA CELULAR

V.2.1. ÍNDICE MITÓTICO

Os resultados obtidos estariam de acordo com o relato de um grupo de pesquisadores de que o ácido retinóico não seria capaz de promover nem a inibição nem a proliferação da multiplicação celular, em culturas de linfócitos humanos onde não houvesse ocorrido a separação prévia dos tipos T e B (Abb e Deinhardt, 1980; Valone e Paryan, 1985).

É importante ressaltar que a ausência de modificações nos valores de índice mitótico só ocorreu devido às condições de tempo de incubação e concentração de ácido retinóico a que foram expostas as culturas nesta investigação. Os estudos preliminares indicam que o maior tempo de exposição ou maior concentração do ácido retinóico determinou destruição total ou parcial das culturas.

O fato do ácido retinóico não ter promovido nenhum tipo de alteração sobre as culturas de linfócitos pode ser explicado pelos seus efeitos antagônicos sobre linfócitos B e T. Ao agir sobre linfócitos T o ácido retinóico promove sua ativação com intensa multiplicação celular. Em contrapartida, quando atua sobre linfócitos B há intensa inibição da síntese de DNA e, conseqüentemente, da proliferação celular.

V.2.2. FREQUÊNCIA DAS CÉLULAS EM DIFERENTES GERAÇÕES

O percentual de células em diferentes gerações em cultura permite uma melhor elucidação do comportamento celular em relação à cinética (Melaragno, 1982).

Neste trabalho, a comparação das culturas tratadas com ácido retinóico, com as controle não revelou diferenças significativas quanto à frequência de células em diferentes gerações. Para todos os tratamentos os testes estatísticos mostraram haver um predomínio das células em 2ª geração, seguidas pelas de 1ª e de 3ª ou mais gerações.

Apesar dos dados controversos existentes na literatura acerca do tempo ideal de cultura para se obter um grande número de células em 2ª geração, um grande número de pesquisadores concordam com o tempo de 72 horas, inclusive Auerbach *et al.* (1984), no trabalho que realizaram sobre ácido retinóico e culturas de linfócitos. Tais autores, no entanto, não relataram o percentual encontrado de células em cada geração.

V.2.3. FENÓTIPOS NUCLEARES

A análise dos fenótipos nucleares de linfócitos em cultura foi realizada no intuito de se demonstrar alterações que eventualmente houvessem ocorrido em decorrência do uso do ácido retinóico e que não pudessem ser detectadas através da análise de metáfases (Carvalho *et al.*, 1988).

Auerbach *et al.* (1984), apesar de não terem realizado contagens, sugeriam que talvez o ácido retinóico fosse capaz de promover mudanças nos fenótipos nucleares.

Neste trabalho, no entanto, não foram detectadas alterações em frequências relativas de nenhum dos fenótipos nucleares em função do tratamento pelo ácido retinóico. Isto pode ter sido ocasionado pelo fato da droga nem inibir nem estimular a diferenciação blástica ou ao curto espaço de tempo de sua atuação sobre a cultura e/ou ainda a concentração da droga utilizada ter sido insuficiente.

VI. CONCLUSÕES

1. Houve um discreto, mas significativo aumento na frequência de trocas entre cromátides irmãs (TCI) em linfócitos humanos de culturas tratadas com ácido retinóico, independente da concentração usada.

2. Não foram promovidas TCI preferenciais sobre nenhum par ou grupo cromossômico nas células tratadas.

3. Não se constatou que o ácido retinóico fosse capaz de provocar aberrações cromossômicas numéricas e/ou estruturais, com significância estatística nas condições utilizadas no trabalho.

4. O ácido retinóico não foi capaz de promover alterações nos valores de índice mitótico nem interferiu na velocidade da multiplicação celular;

5. Não foram encontradas alterações nas frequências relativas dos fenótipos nucleares dos linfócitos ativados no material tratado com ácido retinóico. Para todos os tratamentos analisados, o fenótipo 1 apresentou a maior frequência relativa, seguido pelos tipos 0, 2, 3.

6. Embora em diversos dos aspectos estudados o ácido retinóico não tenha provocado alterações, ao afetar o padrão de frequências de TCI candidata-se a potencializar anomalias a nível da expressão gênica.

VII. RESUMO

A possibilidade de provocar instabilidade e alterações na cinética celular pelo ácido retinóico, ácido derivado da vitamina A, em cromossomos humanos, foi pesquisada em culturas de linfócitos de 10 indivíduos do sexo feminino entre 20 e 30 anos de um grupo considerado controle.

Para tal foram utilizadas culturas incubadas nas últimas 5 horas com ácido retinóico em concentrações de 20 μ g/ml de meio e 2 μ g/ml de meio. O ácido retinóico foi diluído em DMSO e apresentou como concentração final na cultura de linfócitos 0,5% v/v e 0,05% v/v, respectivamente. Foram obtidas também culturas controle com DMSO puro nas concentrações supra-citadas e sem nenhuma droga. Utilizaram-se frascos em duplicata para cada situação experimental, um crescido na presença de BrdU e outro sem esta droga.

Nas culturas crescidas em presença de BrdU foram realizadas contagens de trocas entre cromátides irmãs e frequência de metáfases em diferentes gerações celulares e nas mantidas na ausência de BrdU frequência de aberrações numéricas e/ou estruturais, índice mitótico e frequência relativa de fenótipos nucleares.

A instabilidade cromossômica foi pesquisada através das frequências de trocas entre cromátides irmãs e de aberrações numéricas e/ou estruturais e a cinética celular, através dos valores de índice mitótico, frequência relativa de células nas diferentes gerações e frequência relativa dos fenótipos nucleares.

A análise estatística dos dados permitiu concluir que o ácido retinóico promoveu um pequeno mas significativo aumento na fre-

quência de trocas entre cromátides irmãs em linfócitos em cultura, independente da concentração da droga utilizada. Este aumento ocorreu de forma global na cultura, sem preferência por nenhuma região, par ou grupo cromossômico. Por outro lado, ele não foi capaz de provocar aberrações cromossômicas numéricas e/ou estruturais estatisticamente significativas.

Em relação à cinética celular e dadas as condições utilizadas neste trabalho, não foram constatadas alterações significativas promovidas pelo ácido retinóico.

VIII. SUMMARY

The possibility of using retinoic acid (derived from Vitamin A) to provoke instability and alterations in the cellular kinetics of human chromosomes, was studied in cultures of lymphocytes from 10 women, considered to be a control group, all between 20 and 30 years of age.

Cultures were incubated for the last 5 hours in media containing retinoic acid at concentrations of 20 $\mu\text{g/ml}$ and 2 $\mu\text{g/ml}$. The retinoic acid was diluted in DMSO and presented concentrations of 0.5% v/v and 0.05% v/v respectively in the cultures of lymphocytes. Control cultures were also prepared containing pure DMSO in the same concentrations but containing no drug. Duplicate flasks were used in each experimental situation, one grown in the presence of BrdU and the other in its absence.

Counts of crossing over between sister chromatids and the frequency of metaphases in different cellular generations were determined in the cultures grown in the presence of BrdU. In those grown without BrdU, the frequency of numerical and/or structural aberrations was determined, and also the mitotic index and the relative frequency of nuclear phenotypes.

Chromosomal instability was investigated using the frequency of crossing over between sister chromatids and numerical and/or structural aberrations. Cellular kinetics were investigated through the values for mitotic index, relative frequency of the different generations of cells and the relative frequency of nuclear phenotypes.

A statistical analysis of the data allows one to conclude that retinoic acid provoked a small, but significant increase in the frequency of crossing over between sister chromatids in cultured lymphocytes, independent of the concentration of drug used. This increase occurred throughout the culture, with no preference for region or chromosomic pair or group. On the other hand, it was not capable of causing significant numerical and/or structural chromosomic aberrations.

With respect to the cellular kinetics and given the conditions used in this research, no significant alterations provoked by the retinoic acid were detected.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- ABB, J. and DUNHARDT, F. - Effects of Retinoic Acid on the Human Lymphocyte response to mitogens. *Exptl. Cell Biol.*, 48:169-79 (1980).
- ABRAHM, J., BESA, E.C.; HYZINSKI, M.; FINAN, J. and NOWELL, P. - Disappearance of cytogenetic abnormalities and clinical remission during therapy with 13-cis-retinoic acid in a patient with myelodysplastic syndrome inhibition of growth of the patient's malignant monocytoid clone. *Blood*, 67(5):1323-27, 1986.
- ADVERSE EFFECTS WITH ISOTRETINOIN. *FDA DRUG BULLETIN*, 13(3):21-3, 1983.
- AGNISH, N.D.; DINARDO, B.; RUSIN, G. and HOAR, R.M. - The effect of a teratogenic dose of isotretinoin on the subsequent pregnancy in the rat. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 11(4-Part 1):655-66, 1984.
- AMATRUDA, T.T.; SIDELL, N.; RANYARD, J. and KOEFFER, H.P. - Retinoic acid treatment of human neuroblastoma cells is associated with decreased N-myc expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 126(3):1189-95, 1985.
- ALHADEFF, B. and COHEN, M.M. - Frequency and distribution of sister chromatid exchanges in human peripheral lymphocytes. *Isr. J. Med. Sci.*, 12:1440-7, 1976.
- AL-HAMDAMI, M.M.; ATKINSON, M.E. and MAYHEW, T.M. - Ultra-structural morphometry of blastogenesis I: transformation of small lymphocytes stimulated *in vivo* with dinitrochlorobenzene. *Cell Tissue Res.*, 200:495-509, 1979.

- ANSON, J.F.; HINSON, W.C.; PIPKIN, J.L.; KWARTA, R.F.; HANSEN, D.R.; YOUNG, J.F.; BURNS, E.R. and CASCIANO, D.A. - Retinoic acid induction of stress proteins in fetal mouse limb buds. *Dev. Biol.*, *121*:542-7, 1987.
- AUBIN, G.; TREMBLAY, M. and VOYER, P. - Malformations congénitales dues a l'Accutane. *Can. Med. Assoc. J.*, *133*:208, 1985.
- AUERBACH, A.D.; SAGI, M. and CARTER, D.M. - Enhancement of - carcinogen-induced chromosome breakage and sister chromatid exchange by 13-cis retinoic acid. *Basic Life Science*, *29*(pt A):333-42, 1984.
- BASERCA, R. *The Biology of Cell Reproduction*. Harvard University Press, London, England, Cap B, 91-102 p, 1979.
- BASHOR, M.M.; TOFT, D.O. and CHYTIL, F. - *In vitro* binding of retinol to rat tissue components. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, *70*:3483-7, 1973.
- BEEK, B. and ODE, G. - Sister chromatid exchanges in human leukocyte chromosomes: spontaneous and induced frequencies in early and late proliferating cells *in vitro*. *Human Genetics*, *49*:51-61, 1979.
- BEIGUELMAN, B. *Citogenética Humana*. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, RJ, 328 p, 1982.
- BEIGUELMAN, B. *Curso Prático de Bioestatística*, 1a. ed., Editora da Revista Brasileira de Genética, Ribeirão Preto, SP, 224 p, 1988.
- BENKE, R.J. - The Isotretinoin Teratogen Syndrome. *JAMA*, *251*(24):3267-9, 1984.
- BIRTH DEFECTS CAUSED BY ISOTRETINOIN - NEW JERSEY. *MMMR*, *37*(11):171-2, 1988.
- BRAUN, J.T.; FRANCIOSI, R.A.; MASTRI, A.R.; DRAKE, R.M. and O'NEIL, B.L. - Isotretinoin Dysmorphic Syndrome. *Lancet*, *i*(8375):506-7, 1984.

- BRUNO, N.P.; BEACHAM, B.E. and BURNETT, J. - Adverse Effects of Isotretinoin Therapy. *Cutis*, 33:484-6, 489, 1984.
- CAMPOS, H. de - *Estatística Experimental não Paramétrica*. 3a. edição. Impresso no Departamento de Matemática e Estatística da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" da Universidade de São Paulo. Piracicaba, SP. Cap. 4, 113-131 pg.
- CARVALHO, H.F.; MELLO, M.L.S.; HACKEL, C. e CORDEIRO, J.A. - Fenótipos nucleares de linfócitos humanos em cultura e suas respostas ao tratamento pela amicacina. *Ciência e Cultura*, 40 (7/Supl.):752, 1988.
- CHAMBON, P. - Nuclear receptors and development. *Cell. Biol. Intern. Rep.* (Suppl.), 14:1, 1990.
- CHRISTOPHERS, E. and LANGNER, A. - *In vitro* effects of vitamin A acid on cultured fibroblasts, lymphocytes and epidermal cells: a comparative study. *Arch. Derm. Forsch.*, 251:147-53, 1974.
- CHYTIL, F. - Retinoic Acid: Biochemistry, Pharmacology, Toxicology and therapeutic use. *Pharmacol. Rev.*, 36(2):935-1005, 1984.
- CHYTIL, F. - Retinoic Acid: Biochemistry and Metabolism. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 15(4 - Part 2):741-7, 1986.
- CONNER, C.S. - Isotretinoin: a reappraisal. *Drug Intell. Clin. Pharm.*, 18:308-9, 1984.
- COX, N.H. - Amenorrhoea during treatment with isotretinoin. *Br. J. Dermatol.*, 119(6):857-8, 1988.
- DAI, W.S.; HSU, M.A. and ITRI, L.M. - Safety of pregnancy after discontinuation of isotretinoin. *Arch. Dermatol.*, 125:362-5, 1989.
- DEAN, M.; LEVINE, R.A. and CAMPESI, J. - c-myc Regulation during retinoic acid induced differentiation of F9 cells is postranscriptional and associated with growth arrest. *Mol. Cell Biol.*, 6(2):518-24, 1986.

- De ROBERTIS, E.D.P.; De ROBERTIS JR., E.M.F. - *As Bases da Biologia Celular e Molecular*. 2a. Edição. Editora Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro, RJ, 332 p, 1985.
- EDWARDS, M.K.S. and McBURNEY, M.W. - The concentration of retinoic acid determines the differentiated cell types formed by a teratocarcinoma cell line. *Dev. Biol.*, 99:187-91, 1983.
- GEBHART, E. - Sister chromatid exchange (SCE) and structural chromosome aberration in mutagenicity testing. *Human Genet.*, 59:235-54, 1981.
- GENSLER, H.L.; MATRISIAN, L.M. and BOWDEN, G.T. - Effect of retinoic acid on the late stage promotion of transformation in JB6 mouse epidermal cells in culture. *Cancer Res.*, 45:1922-5, 1985.
- GENSLER, H.L.; SIM, D.A. and BOWDEN, G.T. - Influence of the duration of topical 13-*cis*-retinoic acid treatment on inhibition of mouse skin tumor promotion. *Cancer Res.*, 46:2767-70, 1986.
- GOODMAN, D.W.S.; BLOMSTRAND, R.; WERNER, B.; HUANG, H.S.; and SHIRATORI, T. - The intestinal absorption and metabolism of vitamin A and β -carotene in man. *J. Clin. Invest.*, 45:1615-23, 1966.
- HACKEL, C.; COSTA, A.C.; CIOLFI, H.N.; SARTORATO, E.L.; NASCIMENTO, J.A. e ALVES, G.L. - *Técnicas de análise dos cromossomos humanos*. Laboratório de Citogenética Humana. Departamento de Genética Médica/FCM/UNICAMP. Apostila.
- HERSH, J.H.; DANHAUER, D.E.; HAND, M.E. and WEISSKOPF, B. - Retinoic acid embryopathy: Timing of exposure and effect on fetal developmental. *JAMA*, 254(7):909-10, 1985.
- HILL, R.M. - Isotretinoin teratogenicity. *Lancet*, i(8392):1465, 1984.

- HYODOH, F. - Effects of retinoic acid on the differentiation of THP-1 cell lines containing aneuploid or diploid chromosomes. *Cell Struct. Funct.*, 12:225-42, 1987.
- ISOTRETINOIN AND HUMAN TERATOGENICITY - *Nutr. Rev.*, 44(9):297-9, 1986.
- JETTEN, A.M.; BARRETT, J.C. and GILMER, T.M. - Differential response to retinoic acid of syrian hamster embryo fibroblasts expressing v-src or v-Ha-ras oncogenes. *Mol. Cell Biol.*, 6(10):3341-8, 1986.
- JUHL, H.J.; SCHURER, C.C.; BARTRAM, C.R.; KOHL, F.V.; MELDERIS, H.; WICHERT, P.v. and RUDIGER, H.W. - Retinoids induced sister chromatid exchanges in human diploid fibroblasts. *Mutat. Res.*, 59:317-20, 1978.
- KAMM, J.J. - Toxicology, carcinogenicity and teratogenicity of some orally administered retinoids. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 6(4 Part 2):652-59, 1982.
- KENNETH, L.J. - *Smith's Recognizable Patterns of Human Malformations*. 4a. edição. Saunders Company Harcourt Brace Jovanovich, Inc., New York, NY, 778 p., 1988.
- KLANN, R.C. and MARCHOK, A. C. - Effects of retinoic acid on cell proliferation and cell differentiation in a rat tracheal epithelial cell line. *Cell Tissue Kinet.*, 15:473-82, 1982.
- KONOHAMA, I.; HASHIMOTO, T.; DYKES, P.J. and MARKS, R. - Effects of all-trans retinoic acid on the morphology of human epidermal cells *in vitro*. *Arch Dermatol. Res.*, 279:459-64, 1987.
- KOOPMAN, P. and COTTON, R.C.H. - The response of embryonal carcinoma cells to retinoic acid depends on colony size. *Differentiation*, 31:55-60, 1986.

- KORENBERG, J.R. and FREEDLENDER, E.F. - Giemsa technique for the detection of sister chromatid exchanges. *Chromosoma*, 48:355-60, 1974.
- La CRUZ, E.; SUN, S.; VANGVANICHYAKORN, K. and DESPOSITO, F. - Multiple congenital malformations associated with maternal isotretinoin therapy. *Pediatrics*, 74(3):428-30, 1984.
- LAMMER, E.J.; CHEN, D.T. and HOAR, R.M. - Retinoic acid embryopathy. *N. Engl. J. Med.*, 313:837-41, 1985.
- LANCASTER, P.A.L. and ROGERS, J.G. - Isotretinoin use in pregnancy. *Med. J. Aust.*, 148:654-5, 1988.
- LATT, S.A. - Localization of sister chromatid exchanges in human chromosomes. *Science*, 185:74-6, 1974.
- LOTAN, R.; STOLARSKY, T. and LOTAN, D. - Isolation and analysis of melanoma cells mutants resistant to the antiproliferative action of retinoic acid. *Cancer Res.*, 43:2868-75, 1983.
- MANDEL, H.G. and COHN, V.H. - Vitaminas lipossolúveis. In: GILMAN, A.C.; GOODMAN, L.S. e GILMAN, A. - *As bases farmacológicas da terapêutica*. 6a. ed., vol. 2, Editora Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro, RJ, Cap. 67, 1385-1401, 1983.
- McBRIDE, W.G. - Limb reduction deformities in child exposed to isotretinoin in utero on gestation days 26-40 only. *The Lancet*, 8446:1276, 1985.
- Mc CORMICK, D.L.; BAGG, B.J. and HULTIN, T.A. - Comparative activity of dietary or topical exposure to three retinoids in the promotion of skin tumor induction in mice. *Cancer Res.*, 47:5989-93, 1987.
- MELARACNO, M.I. de S.A. - *Aspectos citogenéticos do processo de envelhecimento celular*. (Tese de Doutorado, Instituto de Biociências; Universidade de São Paulo) São Paulo, 1988.

- MELARACNO, M.I. de S.A. - *Trocas entre cromátides irmãs induzidas e não induzidas pelo END 26644 (ácido mercapto oxazolil carboxílico)*. (Tese de Mestrado, Instituto de Biociências; Universidade de São Paulo) São Paulo, 1982.
- MELARAGNO, M.I. and SMITH, M. de A.C. - Sister chromatid exchange in human lymphocytes. *Rev. Bras. Genet.*, 7:299-311, 1984.
- MELARAGNO, M.I. and SMITH, M. de A.C. - Sister chromatid exchange in mutagenicity testing: a study of mercapto oxazolyl-carboxylic acid. *Rev. Brasil. Genet.*, 9:321-30, 1986.
- MEYSKENS JR., F.L.; ALBERTS, D.S. and SALMON, S.E. - Effect of 13-cis retinoic acid and 4-hydroxyphenil-all-trans retinamide on human tumor colony formation in soft agar. *Int. J. Cancer* 32:295-9, 1983.
- MOORHEAD, P.S.; NOWELL, P.C.; MELLMANN, W.J.; DATTIPS, D.M. and HUNGEFORD, D.A. - Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. *Exp. Cell Res.*, 20: 613-6, 1960 apud Melaragno, 1988, *op. cit.*
- MORGAN, W.F. and CROSSEN, P.E. - The incidence of sister chromatid exchanges in cultured human lymphocytes. *Mutat. Res.*, 42:305-12, 1977.

- MUMMERY, C.L.; VAN DEN BRINK, C.E.; VAN DEN SAAT, P.T. and LAAT, S.W. de - The cell cycle, cell death and cell morphology during retinoic acid induced differentiation of embryonal carcinoma cells. *Dev. Biol.*, 104:297-307, 1984.
- MUMMERY, C.L.; VAN ROOYEN, M.A.; M.A.; VAN DEN BRINK, S.E. and LAAT, S.W. de - Cell cycle analysis during retinoic acid induced differentiation of a human embryonal carcinoma derived cell line. *Cell Differ.*, 20:153-60, 1987.
- MURTAUGH, M.P.; DENNISON, O.; STEIN, J. and DAVIES, P.J.A. - Retinoic acid induced gene expression in normal and leukemic myeloid cells. *J. Exp. Med.*, 163:1325-30, 1986.
- NILSSON, M.H.L.; SPURR, N.K.; SAKSENA, P.; BUSCH, C.; NORDELINDER, H.; PETERSON, P.A.; RASK, L. and SUNDELIN, J. - Isolation and characterization of a c-DNA clone corresponding to bovine cellular retinoic acid binding protein and chromosomae localization of the corresponding human gene. *Eur. J. Biochem.*, 173:45-51, 1988.
- NORDLIND, K. and THYBERG, J. - *In vitro* effects of 13-cis retinoic acid (RO 4-3780) and Etretinate (RO 10-9359) on DNA synthesis and fine structure of guinea pig and human lymphoid cells. *Int. Archs. Allergy Appl. Immun.*, 71:363-7, 1983.
- ONC, D.E. and CHYTIL, F. - Retinoic acid binding protein in rat tissue. Partial purification and comparasion to rat tissue retinol binding protein. *J. Biol. Chem.*, 250:6113-7, 1975.
- PERRY, P. and WOLFF, S. - New Giemsa method for the differential staining of sister chromatids. *Nature*, 251:156-8, 1974.
- PINA-NETO, J.M. and FERRARI, I. - Frequency and distribution of sister chromatid exchanges in normal individuals. *Rev. Bras. Genet.*, 4(1):65-73, 1981.

- PINTO JR., W. - Comunicação pessoal, 1988.
- PISCIOTTA, A.V.; WESTRING, D.W.; DEPNEY, C. and WALSH, B. - Mitogenic effect of phytohaemagglutinin at different ages. *Nature*, 215:193-4, 1967.
- PUENGTONWATANAKUL, S.; VERASERTNIYOM, O.; ONGSAKUL, M.; LAMB, A.J. and SIRISINHA, S. - Effect of Retinoic Acid (RA) and Retinyl palmitate (RP) repletion on Lymphocytes of Vitamin A deficient rats. *Asian Pacific J. Allergy Immun.*, 3:67-72, 1985.
- ROBERT, E. - Isotretinoin dose and teratogenicity. *Lancet*, 1(8579):236, 1988.
- ROBERTSON, M. - Towards a biochemistry of morphogenesis. *Nature*, 330:420-1, 1987.
- ROBERTSON, R. and MacLEOD, P.M. - Accutane-induced teratogenesis. *Can. Med. Assoc. J.*, 133(11):1147-8, 1985.
- ROSA, F. - Isotretinoin dose and teratogenicity. *Lancet*, 2(8568):1154, 1987.
- ROSA, F.W. - Retinoic Acid Embryopathy. *N. Engl. J. Med.*, 315(4):262-3, 1986.
- SANI, D.P. and HILL, D.L. - A retinoic-binding protein from chick embryo skin. *Cancer Res.*, 36:409-13, 1976.
- SANKOWSKI, A.; JANIK, P. and BOGACKA-ZATORSKA, E. - Treatment of basal cell carcinoma with 13-cis-retinoic acid. *Neoplasma*, 31(5):615-8, 1984.
- SCOTT, B. - Drug information. Isotretinoin (Accutane). *J. Kans. Med. Soc.*, 84(1):30-6, 1983.
- SETTERFIELD, G.; HALL, R.; BLADON, T.; LITTLE, T. and KAPLAN, J.G. - Changes in structure and composition of lymphocyte nucleic during mitogenic stimulation. *J. Ultrastruct. Res.*, 82:264-82, 1983.

- SIDELL, N.; ALTMAN, A.; HAUSSLER, M.R. and SIEGER, R.C. - Effects of Retinoic Acid (RA) on the growth and phenotypic expression of several human neuroblastoma cell lines. *Exp. Cell Res.*, 148:21-30, 1983.
- SINHA, A.K.; LINSCOMBI, V.A.; GOLLAPUDI, B.B.; JERSEY, G.C. and FLAKE, R.E. - Cytogenetic variability of lymphocytes from phenotypically normal men: influence of age, smoking, season and sample storage. *J. Toxicol. Environ. Health*, 17:327-45, 1986.
- SMITH, D.M.; ROGER, A.E.; HERNDON, B.J. and NEWBERNE, P.M. - Vitamin A (retinyl acetate) and benzo (a) pyrene-induced respiratory tract carcinogenesis in hamsters fed a commercial diet. *Cancer Res.*, 35:11-16, 1975.
- SOKAL, R.R. and ROHLF, F.J. - *Biometry: The Principles and Practice of Statistics in Biological Research*. 2a. ed., W.H. Freeman and Company, New York, 1981.
- STERN, R.S. - When a uniquely effective drug is teratogenic. *N. Engl. J. Med.*, 320(15):1007-9, 1989.
- STRICKLAND, S. and MAHDAVI, V. - The induction of differentiation in teratocarcinoma stem cells by retinoic acid. *Cell*, 15:393-403, 1978.
- STRICKLAND, S.; SMITH, K.K. and MAROLTI, K.R. - Hormonal induction of differentiation in teratocarcinoma stem cells: Generation of parietal endoderm by retinoic acid and dibutyryl camp. *Cell*, 21:347-55, 1980.
- SUN, M. - Anti-Acne drug poses Dilemma for FDA. *Science*, 240:714-5, 1988.

- SUNDAR, S.K.; LEVINE, P.H.; ABLASHI, D.V. and MENEZES, I. - Retinoic acid and steroids inhibit epstein-barr virus-induced nuclear antigen DNA syntesis and lymphocyte transformation. *Anticancer Res.*, 4:415-8, 1984.
- TAKASE, S.; ONG, D.E. and CHYTIL, F. - Transfer of Retinoic Acid from its complex with cellular Retinoic Acid - Binding Protein to the Nucleus. *Arch. Biochem. Biophys.*, 247(2):328-34, 1986.
- TAMMI, R.; JANSÉN, C.T. and TAMMI, M. - Effects of Retinoic Acid on adult human epidermis in whole skin organ culture. *Arch. Dermatol. Res.*, 277:276-83, 1985.
- TAMMI, R. and TAMMI, M. - Influence of Retinoic Acid on the ultrastructure and hyaluronic acid synthesis of adult human epidermis in whole skin organ culture. *J. Cell Physiol.*, 126:389-98, 1986.
- TAYLOR, J.H. - Sister chromatid exchanges in tritium labeled chromosomes. *Genetics*, 43: 515-29, 1958 apud Deiguelman, 1982 *op. cit.*
- TAYLOR, J.H.; WOODS, P.S. and HUGHES, W.C. - The organization and duplication of chromosomes as revealed by autoradiografic studies using tritium labeled thymidine. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 43:122-7, 1957, apud Melaragno, 1982, *op. cit.*
- TETZNER, C.; JUHL, H.J. and RUDIGER, H.W. - Sister chromatid exchange induction by metabolically activated retinoids in human diploid fibroblastsss cultures. *Mutat. Res.*; 79:163-67, 1980.
- THEIN, R. and LOTAN, R. - Sensitivity of cultured human osteosarcoma and chondrosarcoma cells to retinoic acid. *Cancer Res.*, 42:4771-5, 1982.

- TOKUYASU, K.; MADDEN, S.C. and ZELDIS, L.J. - Fine structural alterations of interphase nuclei of lymphocytes stimulated to growth activity *in vitro*. *J. Cell. Biol.*, 37:630-60, 1968.
- TONG, P.; MAYES, D. and WHEELER, L. - Extracellular calcium alters the effects of retinoic acid on DNA synthesis in cultured murine keratinocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 138:483-8, 1986.
- UPDATE ON BIRTH DEFECTS WITH ISOTRETINOIN. *FDA DRUG BULLETIN*, 14(2):15-6, 1984.
- VALONE, F.H. and PAYAN, D.G. - Potentiation of mitogen induced human T-lymphocyte activation by retinoic acid. *Cancer Res.*, 45:4128-31, 1985.
- VERMA, A.K. - Inhibition of tumor promoter 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate induced synthesis of epidermal ornithine decarboxylase messenger RNA and Diacylglycerol-promoted mouse skin tumor formation by Retinoic Acid. *Cancer Res.*, 48:2168-73, 1988.
- YEN, A.; BROWN, D. and FISHBAUGH, J. - Precommitment states induced during HL-60 myeloid differentiation: possible similarities of Retinoic Acid and DMSO induced early events. *Exp. Cell Res.*, 173:80-4, 1987.
- YEN, A.; REECE, S.L. and ALBRIGHT, K.L. - Dependence of HL-60 myeloid cell differentiation on continuous and split retinoic acid exposures: precommitment memory associated with altered nuclear structure. *J. Cell Physiol.*, 118:277-86, 1984.
- WILLHITE, C.C.; HILL, R.M. and IRVING, D.W. - Isotretinoin induced craniofacial malformations in humans and hamsters. *J. Craniofac. Genet. Dev. Biol.*, 2(Suppl.):193-209, 1986.
- WOLFF, S. Sister chromatid exchange. *Ann. Rev. Genet.* 11: 183-201, 1977.
- ZAROWNY, D.P. - Accutane roche: risk of teratogenic effects. *Can. Med. Assoc. J.*, 131:273, 1984.

APÊNDICE I.

IDENTIFICAÇÃO DA CASUÍSTICA

Nº AMOSTRA | IDENTIFICAÇÃO | IDADE (anos)

01	MLFP	24
02	NLV	24
03	JMC	24
04	R	22
05	I	25
06	MZ	28
07	JB	24
08	ELS	28
09	M	21
10	CRF	28

APÊNDICE 11

Dados referentes às falhas cromatídicas por grupos cromossômicos em culturas de linfócitos humanos: valores absolutos.

Tratamentos e grupos cromossômicos	INDIVÍDUOS										
	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	
PRESENÇA DE FALHAS CROMATÍDICAS POR GRUPOS CROMOSSÔMICOS											
I	A	2	3	2	2	1	1	3	3	1	2
	B	2	2		1			2	4	1	
	C + X	5	4	5	4	2	3	4	8	5	5
	D	2	4	1	2		1	4	1		1
	E	2	1		2		1	1	2		
	F	1			2						
II	C	1			1						
	A	1	4	2	2	2	1	1	1		2
	B	2				1	1		3	2	
	C + X	3	5	3	3	2	3	6	7	5	5
	D	3	2	1	1		2	1	1		
	E	1	2	1	1		1				1
III	F	1	1			1		1			
	C									1	
	A	1	2	1	1	1	2	1	3		1
	B	1	1	2			1	1	5	3	2
	C + X	5	3	4	1	3	3	5	5	2	5
	D	1	3	2	4		1	2		1	2
IV	E	1	1		1	1	1	3		1	
	F				1					2	
	C										
	A	1	3	2		1		1	3		
	B	1		1	2		1	2	1	1	
	C + X	4	1	5	2		3	3	3	2	5
V	D	1	3	2	1		2	2	3	1	
	E	1		1				1	2	2	1
	F	1		1							
	C	1	1	1							
	A		2	1		2		1	2		1
	B		2	2			2		2		
V	C + X	3	3	4	3	2		4	4	4	6
	D	2	2	2	2	1	2		2	1	
	E	2	2	2	2			2	2	1	1
	F					1					
	C										

OBS.: Os espaços em branco significam que não foram observadas falhas cromatídicas.

APÊNDICE III

Dados referentes às falhas isocromatídicas por grupos cromossômicos em culturas de linfócitos humanos: valores absolutos.

Tratamentos e grupos cromossômicos	INDIVÍDUOS									
	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10
	PRESENÇA DE FALHAS ISOCROMATÍDICAS POR GRUPOS CROMOSSÔMICOS									
I	A	1	1	1		1	1			
	B		1							
	C + X	2	1			1			1	
	D									
	E									
	F									
II	C									
	A	1	1	1	1					1
	B	1	2		2	1				
	C + X	1	1	1	1					
	D	1	1	1			1			
	E		1		1					
III	F									
	C		1							
	A				1					
	B			1						1
	C + X							1		
	D									
IV	E									
	F									
	C									
	A									
	B									
	C + X				1	1				
V	D									
	E									
	F									
	C									
	A									
	B									
C + X				1	1					
D										
E										
F										
C										

OBS.: Os espaços em branco significam que não foram observadas falhas isocromatídicas.

APÊNDICE IV

Dados referentes às quebras cromatídicas por grupos cromossômicos em culturas de linfócitos humanos: dados absolutos

Tratamentos e grupos cromossômicos	INDIVÍDUOS										
	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	
PRESENÇA DE QUEBRAS CROMATÍDICAS POR GRUPOS CROMOSSÔMICOS											
I	A				1	1					
	B				1	1					
	C + X	1		1	1	1		2	1	1	
	D										
	E						1				
	F										
II	C										
	A										
	B			1						1	
	C + X			1			1				
	D					1					
	E									1	
III	C										
	A							1			
	B						1				
	C + X	1				1					
	D							1			
	E	1									
IV	C										
	A		1								
	B							1			
	C + X	1	1		1		1	1		1	
	D								1		
	E	1									
V	C										
	A					1		1			
	B						1	1			
	C + X				1		1		1		
	D										
	E										

OBS.: Os espaços em branco significam que não foram observadas quebras cromossômicas.

APÊNDICE V

Dados referentes às quebras isocromatídicas por grupos cromossômicos em culturas de linfócitos humanos: dados absolutos.

Tratamentos e grupos cromossômicos	INDIVÍDUOS										
	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	
PRESENÇA DE QUEBRAS ISOCROMATÍDICAS POR GRUPOS CROMOSSÔMICOS											
I	A	1			1						1
	B										
	C + X						1				
	D										
	E										
	F										
II	A					1		1			
	B			1			1				
	C + X			1			1	1			
	D					1					
	E										
	F										
III	A					1					
	B										
	C + X										
	D										
	E										
	F				1						
IV	A								1		
	B										
	C + X			1	3	1			1		
	D					1					
	E										
	F										
V	A				1			1			
	B										
	C + X				1						
	D										
	E										
	F										

OBS.: Os espaços em branco significam que não foram observadas quebras isocromatídicas