

O teste do micronúcleo: seu uso no Homem

Jeanete Maristela S. Agostini

Laboratório de Citogenética, Depto. de Biologia, Universidade Federal de Santa Catarina. Campus Universitário 88040-900 Florianópolis, Santa Catarina, Brasil.

Resumo

Os micronúcleos são formados de fragmentos cromossômicos ou cromatídicos acêntricos e de cromossomos inteiros que não são incorporados no núcleo da célula filha durante a divisão celular. Eles são corpúsculos contendo DNA sem qualquer conexão estrutural com o núcleo principal.

Pelo fato de a presença de micronúcleos poder ser considerada um indicativo prévio da existência de alterações cromossômicas, a análise de sua frequência pode ser proposta como uma alternativa para métodos citogenéticos clássicos em monitoramento de danos cromossômicos, podendo ser usado para detectar efeitos citogenéticos em indivíduos cronicamente expostos a agentes mutagênicos e/ou carcinogênicos

UNITERMOS: micronúcleo, clastogênese, aneugênese.

Summary

Micronuclei are formed of acentric chromosome or chromatid fragments and of whole chromosomes not incorporated into the daughter nuclei during cell division. These corpuscles have no connexion at all with the main nucleus.

Because the presence of micronuclei may be considered a previous indicator of chromosomes alterations, the analysis of its frequency can represent an alternative to the classic cytogenetic methods used for monitoring chromosome damage.

It can be employed to detect cytogenetic effects of chronic human exposure to mutagenic and/or carcinogenic agents.

KEY WORDS: micronuclei, clastogens, aneugens.

Considerações gerais

O estudo de micronúcleos se constitui em um dos métodos para medida de danos cromossômicos espontâneos ou induzidos, ou ainda de erros de segregação, uma vez que o micronúcleo resulta da produção de fragmentos acêntricos ou de cromossomos que se atrasam em relação aos demais em sua migração para os pólos da célula em anáfase. Quando a célula entra em telófase, estes fragmentos acêntricos, produzidos por quebras cromossômicas ou cromatídicas, ou os cromossomos inteiros, perdidos por problemas no fuso mitótico, são incluídos nas células filhas, podendo se fundir com o núcleo principal, ou formar um ou mais núcleos secundários: os micronúcleos.

O teste do micronúcleo tem sido amplamente usado, nos últimos anos, tanto *in vitro* como *in vivo*, como um teste primário em genética toxicológica (Hedle et al., 1983; Mac Gregor, 1991), pela sua capacidade de avaliar genotoxicidade. Este teste oferece a vantagem de ser simples e rápido na detecção de danos cromossômicos induzidos e permite o estabelecimento de correlações entre diferentes sistemas de avaliação biológica em um determinado sistema de células.

Para Hedle et al. (1991), apesar da formação de micronúcleos de fragmentos cromossômicos acêntricos ser de fácil e amplo entendimento, algumas dúvidas ainda permanecem com relação à origem do micronúcleo. Existem, de fato, quatro mecanismos reconhecidos, segundo os autores, que podem dar origem ao micronúcleo e a estruturas semelhantes ao mesmo:

- a) perda mitótica de fragmentos acêntricos;
- b) uma variedade de conseqüências mecânicas de quebras e trocas cromossômicas;
- c) perda mitótica de cromossomos inteiros, e
- d) apoptose, que é uma forma de destruição nuclear em que o núcleo se desintegra e fragmentos nucleares são formados. Este fenômeno

ocorre naturalmente, ou em resposta a danos celulares quimicamente induzidos, danos estes que não necessitam ser de natureza genética (inibição de síntese de proteína, é um exemplo).

Para o teste do micronúcleo, os autores consideram que somente os três primeiros mecanismos são importantes, assumindo com isto que a indução de micronúcleos indica risco genético.

Mc Gregor et al. (1987), entre outros, acreditam que a formação de fragmentos acêntricos desempenha o papel principal no mecanismo de formação de micronúcleos.

Micronúcleos podem também surgir na meiose como consequência mecânica de alterações cromossômicas.

Os micronúcleos são facilmente detectados em células interfásicas como corpúsculos intracitoplasmáticos livres (Högstedt, 1984). Estes corpúsculos são pequenos, arredondados a ovais, encontrados no citoplasma, normalmente ao lado do núcleo principal. A sua semelhança com o núcleo principal em forma, textura, coloração e conteúdo de DNA é que facilita sua detecção.

Os micronúcleos variam em número e tamanho, dependendo do grau e do tipo de alteração cromossômica que os originaram.

O tamanho dos micronúcleos varia conforme o agente indutor, sendo que micronúcleos derivados de cromossomos inteiros, são normalmente maiores do que aqueles derivados de fragmentos cromossômicos.

A frequência de células com micronúcleo reflete o nível de dano induzido por agentes que originam quebras e/ou problemas no fuso mitótico, detectando tanto clastogênese como aneugênese. O aumento desta frequência revela uma ação genotóxica que pode ou não estar associada à transformação neoplásica.

O teste do micronúcleo pode também ser usado, para avaliação de instabilidade cromossômica e sensibilidade a mutagênicos e/ou clastogênicos em síndromes geneticamente determinadas. Um aumento espontâneo nas frequências de micronúcleos tem sido encontrado também no processo natural de envelhecimento e em pais de indivíduos com trissomias autossômicas (Rudd et al., 1988).

Pelas suas características, o método que avalia a frequência de micronúcleos pode ser usado com sucesso para detectar efeitos citogenéticos em humanos expostos cronicamente a agentes mutagênicos e/ou carcinogênicos.

O principal valor do teste do micronúcleo consiste no fato de que é um método rápido, que pode ser aplicado *in vivo*, com capacidade de detectar efeitos a nível cromossômico que não são detectados por outros testes, como por exemplo, com bactérias. Acredita-se, ainda, que pela correlação encontrada entre substâncias químicas com atividades mutagênicas e as substâncias que causam tumores malignizantes em animais experimentais, este teste além de ser aplicado para mutagenicidade também pode ser usado para avaliar potencial carcinogênico.

Outras vantagens, sem esquecer a simplicidade e a rapidez do método, são segundo Hedle et al. (1983), determinadas pelo fato dos micronúcleos: a) poderem ser observados durante toda a interfase; b) serem de fácil reconhecimento; c) não dependerem de metáfases adequadas para análise; d) sendo formados durante a divisão celular persistirem pelo menos através das próximas interfases, de forma que o tempo de coleta da amostra é menos crítico; e) apresentarem frequência espontânea baixa; f) terem significado claro, em comparação com a interpretação de outros parâmetros citogenéticos, tais como falhas cromossômicas ou trocas entre cromátides-irmãs, e por fim, g) poderem os defeitos do fuso que levam a exclusão de alguns cromossomos, também ser detectados.

No entanto, o teste também apresenta desvantagens que devemos levar em consideração: a) a formação do micronúcleo requer, pelo menos, uma divisão celular; b) agentes que não causam atrasos cromossômicos na anáfase nem quebras cromossômicas não são detectados. Logo, o teste não detecta não-disjunção mitótica, quando não há perda de cromossomo na anáfase, nem alterações que envolvem rearranjos cromossômicos sem a ocorrência de fragmento acêntrico, tais como translocações ou inversões; c) nem todos os fragmentos acêntricos formam micronúcleo na primeira divisão celular, porém alguns deles podem sobreviver, replicar e se tornar micronúcleo na segunda ou na divisão subsequente.

A eficiência da perda de fragmentos e a formação de micronúcleos provavelmente varia de um tipo de célula para outro, dependendo de propriedades mecânicas da célula, tais como seu tamanho e forma, bem

como o tamanho e a morfologia do cromossomo (Hedle et al., 1991). O micronúcleo pode ser constituído de mais que um cromossomo perdido na anáfase, ou de mais que um fragmento cromossômico, quando múltiplas alterações deste tipo são formadas na célula. Também é possível que alguns fragmentos sejam incluídos no núcleo principal e assim não sejam detectáveis como micronúcleos. Por estas razões, as informações obtidas através do teste do micronúcleo são mais limitadas do que as obtidas através da análise de metáfases.

Substâncias químicas que induzem alterações cromossômicas devem, em teoria, determinar um aumento na incidência de micronúcleos. Porém, sabe-se que existem discordâncias entre resultados obtidos em estudos de alterações cromossômicas e os de micronúcleo (Wakata e Sasaki, 1987; Hedle et al., 1991).

Não podemos deixar de levar em consideração que a cinética dose-resposta é aparentemente diferente entre a manifestação de alterações cromossômicas e micronúcleos. Quando existem resultados discordantes ao se avaliar o efeito genotóxico de uma substância química através do estudo de alterações cromossômicas e micronúcleos, é importante que se levem em consideração, também, alguns detalhes como concentração, tipos de solventes, rotas de administração e tempo de coleta, antes de se concluir que o químico em questão induz um efeito mas não outro (Hedle et al., 1991).

Uma outra preocupação é identificar substâncias que não causariam nenhum efeito em células somáticas, evidenciadas pelo teste do micronúcleo, mas que poderiam, contudo, causar alterações cromossômicas ou defeitos de fuso em células germinativas, ou vice-versa. Uma vez que substâncias químicas são raramente distribuídas uniformemente entre todos os órgãos, é de se esperar que a produção dos efeitos em células somáticas e germinativas devam diferir quantitativamente (IPCEM, 1983).

Na utilização da análise de micronúcleos como uma medida de danos, não há condições de identificar qual o mecanismo preferencial, dentre os possíveis, que originou o micronúcleo, uma vez que a observação de um aumento na sua frequência não fornece informações sobre o mecanismo responsável por sua origem.

Vários esforços têm sido realizados com o objetivo de se identificar a origem do micronúcleo. Segundo Yamamoto e Kikuchi (1980) e Wakata e Sasaki (1987), um critério para se distinguir a origem do micronúcleo seria o tamanho do mesmo, que varia de acordo com o agente indutor: os originados de fragmentos de cromossomos devem ser menores do que os resultantes de cromossomos inteiros.

Vanderkerken et al. (1989) mostram que quando existe um aumento no número de micronúcleos com centrômero, há também um aumento no número de micronúcleos de tamanho grande. Vanparys et al. (1990) usam medidas de área do micronúcleo para avaliar atividades aneugênicas e concluem que aneugênicos podem ser distintos de clastogênicos por este método. Contudo, o método, segundo os autores, também apresenta limitações. Primeiramente, não é possível distinguir micronúcleo sem centrômero, formado por dano cromossômico, daquele com centrômero, formado por defeito no fuso mitótico e ter, assim, uma verdadeira indicação de aneuploidia. Também não é possível determinar se o micronúcleo se constitui de um ou mais cromossomos. Medidas do tamanho do micronúcleo servem como um mecanismo de informação somente quando um grande número de micronúcleos é examinado.

Observações de heterocromatina centromérica por bandas-C fornecem evidências da presença de cromossomos inteiros no micronúcleo (Banduhn and Obe, 1985).

Vanderkerken et al. (1989), através do emprego de banda-C, análise do conteúdo de DNA e medida da área do micronúcleo, concluíram que estes métodos podem distinguir claramente as atividades aneugênicas das clastogênicas, mas consideraram o método de banda-C o melhor deles para provar a presença de um cromossomo inteiro no micronúcleo.

Medidas de conteúdo de DNA também foram utilizadas para distinguir micronúcleos contendo cromossomos inteiros daqueles que contêm só fragmentos cromossômicos (Vanderkerken et al., 1989). Contudo, elas não fornecem mais informações do que as obtidas por medidas de área do micronúcleo.

Henning et al. (1988) acreditam que não se pode determinar sem uma investigação do conteúdo do micronúcleo se o mesmo se originou de erro de segregação ou se é resultado de quebra. Baseado no conheci-

mento de que alguns micronúcleos contêm cromossomos inteiros ou fragmentos cromossômicos cêntricos, o teste do micronúcleo pode ser uma técnica útil para o estudo de aneuploidia, nos casos em que a presença do centrômero no micronúcleo pode ser detectada. Isto se tornou possível após a descoberta de anticorpos anticinetócoros, isolados no soro de pacientes com a variante CREST da Síndrome de Escleroderma (Moroi et al., 1980). Estes anticorpos são de baixo custo, comercialmente disponíveis e seu uso permite determinar o mecanismo de origem do micronúcleo (Henning et al., 1988; Eastmond e Tucker, 1989).

Coloração imunofluorescente, associada com anticorpos anti-cinetócoros foi usada por Degrassi e Tanzarella (1988) para desenvolver um teste *in vitro* para agentes indutores de aneuploidias.

Eastmond e Tucker (1989) combinaram o uso destes anticorpos com o método de inibição de citocinese em linfócitos, pelo emprego de citocalasina, desenvolvido por Fenech e Morley (1985), com a finalidade de desenvolver um método relativamente rápido para avaliar aneuploidias induzidas, em células humanas, por agentes químicos ou radiações. A maior limitação para o teste é que somente aneugênicos que produzem perda de cromossomos e, portanto, produzem micronúcleo, podem ser identificados. Logo, presume-se que certas classes de aneuploidigênicos, como os que causam não-disjunção, não devem ser detectados por este método.

Outro método molecular que vem sendo recentemente usado para avaliar o conteúdo dos micronúcleos, é o que emprega sondas de DNA centrômero - específicas. O uso destas sondas em hibridização *in situ*, para classificação de micronúcleos, tem sido apresentado em trabalhos como os de Salassidis et al. (1992), e sua utilização possibilita obter informações relativas ao cromossomo ou região cromossômica presente no micronúcleo.

As desvantagens apresentadas por Hedle et al. (1991) para a utilização do método de hibridização por sondas de DNA são: a) o método ser trabalhoso; b) haver variabilidade individual quanto à quantidade de heterocromatina centromérica; c) quebras cromossômicas, que podem ocorrer dentro da heterocromatina, poderem conter DNA marcado suficiente

para dar a impressão de que o micronúcleo contém um cromossomo inteiro.

Apesar disto os métodos moleculares, ao contrário dos outros, fornecem dados mais específicos e menos subjetivos sobre o micronúcleo. O uso de anticorpos anti-cinetocoros e de sondas de DNA é de grande importância na identificação do conteúdo do micronúcleo. Apesar de sua importância, as sondas de DNA ainda não vêm sendo usadas em análise de rotina de micronúcleos.

O uso de microscopia ultravioleta supravital, que permite observar os movimentos dos cromossomos/cromátides durante a mitose, complementado com análise imunocitoquímica e de ultraestrutura do micronúcleo formado, foi empregado por Schiffmann e De Boni (1991), para registrar a formação de micronúcleos originados de elementos de cromatina, deslocados durante a mitose. Esta técnica mostra que os micronúcleos foram formados durante a mitose, e não por segmentação acidental do núcleo, em outros estágios do ciclo celular.

Tipos de células que são empregadas para o estudo do micronúcleo

Idealmente, a frequência de micronúcleos deve ser calculada com base em células que se dividiram pelo menos uma vez; logo, podem ocorrer em qualquer tipo de célula, em diferentes organismos, desde que esta sofra divisão.

Em animais, principalmente mamíferos tais como ratos e camundongos, freqüentemente são usadas células de medula óssea, podendo também ser usadas células de sangue circulante. Porém, outros órgãos e tecidos têm se mostrado apropriados para o teste, como por exemplo, fígado de embriões, embriões pré-implantados e células de tumores de ovário.

Na espécie humana, a análise pode ser feita em linfócitos de sangue periférico, fibroblastos e células epiteliais esfoliadas.

a) Micronúcleos em células de medula óssea

O teste do micronúcleo é amplamente usado em medula óssea de animais, uma vez que ela garante um fácil acesso a uma população de células que se dividem rapidamente.

O micronúcleo em medula óssea pode ser observado em micloblastos, mielócitos e eritoblastos. São contados, porém, normalmente, só os eritrócitos jovens, para padronizar e facilitar a análise.

Os micronúcleos podem ser facilmente reconhecidos no citoplasma de eritrócitos jovens porque os eritoblastos de mamíferos expulsam seu núcleo principal, através de mecanismo descrito por Tavassoli (1978), no estágio terminal de maturação. É, portanto, após a expulsão do núcleo principal, que sofre fagocitose por macrófagos (Skutelsky e Danan, 1969), em eritrócitos policromáticos que o efeito do micronúcleo é mais facilmente avaliado (Schmid, 1975).

Freqüentemente, os micronúcleos não são expulsos dos eritoblastos junto com o núcleo principal, por isso eles podem ser facilmente detectados nos eritrócitos policromáticos anucleados, embora hoje se saiba que os micronúcleos podem ser excluídos das células de medula óssea por mecanismos similares aos da expulsão nuclear (Parton et al., 1991).

Micronúcleos em células eritropoéticas de medula óssea também são bons indicadores de danos citogenéticos no Homem (Högsted et al., 1983). Enquanto em ratos e camundongos somente os eritrócitos policromáticos são adequados para uso, uma vez que nestes animais os eritoblastos têm pouco ou nenhum citoplasma, no Homem estas células têm citoplasma suficiente para abrigar o micronúcleo, podendo, assim, ser usadas. Apesar disto, o teste do micronúcleo em medula óssea de humanos tem sido usado somente em pequena escala, pois a dificuldade para obtenção de amostra inviabiliza a utilização do método em grande escala. Como em pacientes com leucemia faz-se normalmente esta coleta para fins de diagnóstico, o teste pode ser usado mais facilmente nestes casos. Usam-se normalmente eritoblastos, uma vez que pacientes leucêmicos não apresentam eritrócitos em quantidade suficiente para a análise (Erdtmann e Onsten, 1991).

A rápida diferenciação das células eritropoiéticas *in vivo* pode ser considerada uma vantagem para o seu uso em humanos, se levarmos em conta a demorada e variada diferenciação dos linfócitos de sangue periférico. Além de a avaliação de micronúcleos, nestas células evidenciar mais adequadamente um dano citogenético recente, esta avaliação ainda reflete uma situação *in vivo* e exclui condições de cultura celular que podem introduzir erros inerentes ao ensaio.

Uma das maiores desvantagens associadas ao teste do micronúcleo *in vivo* em medula óssea é que agentes testados ou seus metabólitos nem sempre alcançam a medula. Este tipo de problema não ocorre em células em cultura, apesar de nelas, não ocorrer metabolização *in vivo* (Hedle et al., 1983). Alguns compostos, tais como agentes mutagênicos instáveis ou aqueles que originam metabólitos de vida curta, não são detectados por este teste, porque os metabólitos produzidos no fígado não atingem a medula óssea (Cllet et al., 1989).

Sabe-se, também, que pode ocorrer um baixo nível de ativação metabólica de alguns carcinógenos bem conhecidos, pela medula óssea, podendo então o teste apresentar deficiência para detectar os efeitos destas substâncias sobre os cromossomos dos indivíduos expostos. A maioria destas substâncias têm capacidade de induzir micronúcleos, quando aplicadas em doses muito próximas da dose máxima que pode ser testada, isto é, perto da dose considerada letal. Nestes casos, pelo fato de o teste em medula óssea não ser suficientemente sensível, é possível que muitos mutagênicos não sejam detectados.

b) Micronúcleo em culturas temporárias de linfócitos do sangue periférico

A análise de micronúcleos em culturas de linfócitos é um sistema que, por ser simples e rápido na detecção de alterações e perdas cromossômicas, pode ser usado para monitoramento populacional.

Uma das vantagens do emprego desta técnica é o fato de os linfócitos do sangue periférico serem de fácil obtenção e a maioria deles se encontram na fase G₀ do ciclo celular. Estas células deixam o sangue, passam através do baço, dos nódulos linfáticos e outros tecidos, e voltam à circulação sanguínea através dos ductos linfáticos. O tempo total de recircula-

ção é de aproximadamente 12 horas. Isto significa que os linfócitos com mutações induzidas em qualquer parte do corpo estarão em algum momento, no sangue periférico. Este sistema permite, portanto, a detecção de mutações induzidas tanto em linfócitos do sangue periférico como naqueles distribuídos em diferentes órgãos (Ferrari, 1991).

Högsted et al. (1983) e Högsted (1984) usaram o método para estudo in vivo, mostrando um aumento na frequência de micronúcleos em indivíduos fumantes e em trabalhadores expostos a estireno. Nestes estudos, os micronúcleos vinham sendo contados em linfócitos após a destruição do citoplasma por tratamento hipotônico.

Como é necessário que a célula passe pelo menos por uma mitose para que os micronúcleos possam se expressar, o número de micronúcleos contados depende: a) da proporção de células que responderam ao mitógeno; b) da proporção de células estimuladas que se dividiram; e c) do destino dos micronúcleos nas células que se dividiram mais uma vez (Fenech e Morley, 1985).

Linfócitos de diferentes indivíduos respondem de forma completamente diferente ao mitogênico, logo, a proporção de células que se divide em culturas difere de indivíduo para indivíduo. Da mesma forma, em culturas de um mesmo indivíduo, a proporção de linfócitos que passam por somente uma divisão, são dependentes das condições e do tempo de cultura (Pincu et al., 1984).

O método realizado de forma convencional em linfócitos humanos é bastante impreciso, uma vez que a análise dos micronúcleos é dificultada pela incerteza acerca da fração de células que se dividiram uma vez após a exposição. Vários esforços foram efetuados para aperfeiçoar o método, no sentido de se identificar linfócitos que se dividiram pelo menos uma vez sob a influência do agente mutagênico (Pincu et al., 1984; Fenech e Morley, 1985), bem como de se manter os linfócitos com os citoplasmas preservados (Högstedt, 1984). Isto passou a ser conseguido através do emprego de: a) incorporação de bromodeoxiuridina (BrdU) (Pincu et al., 1984); b) autoradiografia, com incorporação pelos linfócitos de timidina tritiada; e c) inibição da citocinese pelo emprego da citocalasina B (Fenech e Morley, 1985).

Os métodos que envolvem o uso de BrDU e timidina tritiada trazem problemas para o cálculo de estimativas de micronúcleos, pois estas substâncias têm capacidade por si só de produzir quebras cromossômicas.

Por este motivo, o método que envolve a análise de micronúcleos em linfócitos cultivados com citoplasma preservado, e que identifica núcleos que se dividiram por bloqueio da citocinese usando citocalasina B, desenvolvido por Fenech e Morley (1985), tem sido o mais recomendado. As células com citoplasma são facilmente reconhecidas pela sua aparência binucleada, uma vez que realizam divisão nuclear sem, no entanto, terem realizado divisão citoplasmática. Isto ocorre uma vez que esta droga bloqueia a citocinese após a telófase e, como consequência, determina um acúmulo de células binucleadas na fase G1. Problemas com a eficácia do método de bloqueio de citocinese também podem ser originados por erros inerentes ao procedimento de cultura e de análise.

O método para avaliação de micronúcleos em linfócitos com bloqueio de citocinese tem sido usado, nos últimos anos, para a análise de micronúcleos em avaliação de linfócitos de pessoas expostas, e de substâncias testadas *in vitro* (Sarto et al., 1990a; Meng e Zhang, 1990; Högstedt et al., 1991; Migliore et al., 1991).

c) Micronúcleos em células esfoliadas

Micronúcleos detectados em células epiteliais esfoliadas refletem alterações cromossômicas e/ou cromatídicas, ou irregularidades mitóticas que ocorrem nas células da camada basal em proliferação. Os micronúcleos detectados nestas células de superfície epitelial se originaram em células da camada basal em divisão que, quando atingem a camada superficial, são esfoliadas.

A análise dos micronúcleos pode ser feita em células obtidas a partir da mucosa bucal, bexiga e ureter, cervix, brônquios e mucosa nasal. A análise em células de mucosa bucal (por raspagem de mucosa oral) é mais comumente realizada, principalmente em indivíduos com alto risco de câncer oral, tais como fumantes, consumidores de álcool e indivíduos que praticam estes dois hábitos (Stich et al., 1982, 1983; Livingston et al., 1990), e em indivíduos expostos a agentes genotóxicos por razões profissionais ou por tratamento antineoplásico (Sarto et al., 1990a e b;

Agostini, 1993). Uma vez que as células de mucosa bucal permitem a coleta de um grande número de células esfoliadas viáveis para a análise e como a raspagem da mucosa, para a obtenção das mesmas, é um processo simples e bem tolerado pelos indivíduos, esta análise é usada em grande escala, principalmente em monitoramento biológico de grupos de pessoas expostas a genotóxicos.

O fato de mutagênicos e/ou carcinogênicos poderem estar presentes em grande quantidade na urina de indivíduos expostos, faz com que células uroteliais estejam sendo, principalmente a partir dos últimos anos, usadas para detectar os efeitos genotóxicos da exposição a estes agentes (Ribeiro et al., 1989; Cid et al., 1991). Porém, o maior problema no uso destas células é a obtenção de um número adequado de células informativas, mesmo em indivíduos do sexo feminino que apresentam um número maior de células esfoliadas de bexiga que os masculinos, mas nas quais é impossível distinguir as células que se originaram da parte inferior do trato urinário das produzidas pela mucosa vaginal. Por este motivo, a avaliação de células micronucleadas da bexiga urinária aplica-se apenas a indivíduos do sexo masculino. Outro problema é a presença de um grande número de estruturas que podem estar presentes no material analisado, as quais se confundem com o micronúcleo, estruturas estas que são leucócitos, particularmente granulócitos, com núcleos desintegrados e que tem seu número aumentado em pessoas com infecção ou inflamação urinária, mesmo que assintomáticas.

Células esfoliadas de colo uterino também podem ser usadas para teste do micronúcleo, por exemplo, em mulheres clinicamente assintomáticas que se submetem a exames de rotina na prevenção do câncer (Gattas et al., 1991).

Sarto et al. (1990b) e Ballarim et al. (1992) sugerem o uso de células de mucosa nasal no teste do micronúcleo, principalmente na avaliação de contaminantes ambientais voláteis, por ser a cavidade nasal, a via de entrada normal do sistema respiratório e, portanto, o primeiro alvo destes contaminantes. No caso das células de mucosa nasal, a raspagem das mesmas é incômoda e dolorida e, por isso, não é facilmente tolerada pelos indivíduos.

O uso de células esfoliadas de tecido epitelial, proposto por Stich et al. (1982, 1983), para avaliar os efeitos genotóxicos produzidos por bai-

As doses de substâncias carcinogênicas, deve ser estimulado uma vez que permite um acesso não invasivo a tecidos humanos que são alvos diretos de carcinogênicos órgãos-específicos, nos quais os carcinomas verdadeiramente se desenvolvem. É um método simples, rápido e econômico, com possibilidade, por isso, de ser aplicado a um grande grupo de pessoas, além de estar livre de interferências inerentes à cultura celular.

A aplicação do teste, em tecidos alvos de certos carcinógenos, constitui um avanço na detecção de um fenômeno mutagênico que, muitas vezes, precede à instalação de um processo cancerígeno. Porque células esfoliadas podem ser coletadas de áreas específicas, torna-se possível estimar a frequência de células micronucleadas em várias regiões de um órgão, indicando, assim, áreas com elevado risco de transformação neoplásica.

A introdução do teste do micronúcleo *in vivo* em células esfoliadas, no Homem, foi de grande importância, uma vez que os resultados das avaliações de genotoxicidade *in vitro* não podem ser extrapolados para tecidos humanos com seus sistemas específicos de ativação e inativação metabólica para substâncias pré e carcinogênicas. Vale lembrar, também, que existe um número enorme de possíveis interações entre o grande número de compostos sinérgicos ou antagônicos que não podem ser simulados em sistemas de testes *in vitro*.

A aplicação do teste do micronúcleo em células esfoliadas de vários tecidos humanos pode fornecer evidências tanto da exposição a agentes carcinogênicos e clastogênicos, além de uma estimativa dos efeitos aditivos ou potenciadores, quando vários carcinogênicos ou agentes genotóxicos agem juntos.

Embora o teste ainda não seja usado para diagnóstico na rotina citopatológica em grande escala, também pode ser empregado, com pequenas modificações, em biópsias de tecidos humanos, abrindo as portas para o reconhecimento de diferentes estágios de carcinogênese.

d) Micronúcleos em outros tecidos

O teste do micronúcleo vem sendo aplicado, também, em outros órgãos e tecidos.

Determinação direta de micronúcleos em vião coriônico de humanos foi proposta por Cui et al. (1989) para estudar o efeito mutagênico de fatores maternos, tais como idade, contracepção, consumo de fumo e álcool.

Métodos para a detecção de micronúcleos de origem meiótica foram desenvolvidos em células germinativas de mamíferos, inclusive no Homem, para avaliar danos causados neste tipo de célula (Russo e Levis, 1992).

A análise de micronúcleos em fibroblastos tem se mostrado útil, no Homem, principalmente como medida de instabilidade cromossômica espontânea, susceptibilidade à não-disjunção e hipersensibilidade de separar a influência ambiental dos fatores genéticos dos indivíduos dos quais os tecidos derivaram (Henning et al., 1988; Rudd et al., 1988).

Referências bibliográficas

- Agostini, J.M. (1993). *Análise Citogenética em Trabalhadores de Minas de Carvão Mineral de Criciúma-SC*. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil, 158pp.
- Ballarin, C., Sarto, F., Giacomelli, L., Bartolucci, G.C. and Clonfero, E. (1992). Micronucleated cells in nasal mucosa of formaldehyde - exposed workers. *Mutation Res.*, 280: 1-7.
- Banduhn, N. and Obe, G. (1985). Mutagenicity of methyl 2-benzimidazo-lecarbamate, diethyl-stibestrol and estradiol: structural chromosomal aberrations, sister-chromatid exchanges, C-mitoses, polyploidies and micronuclei. *Mutation Res.*, 156: 199-218.
- Cid, González M., Loria, D., Vilesnsby, M., Miotti, J.L. and Matos, E. (1991). Leather tanning workers: chromosomal aberrations in peripheral lymphocytes and micronuclei in exfoliated cells in urine. *Mutation Res.*, 259: 197-201.
- Cliet, I., Fournier, E., Melcion e C., Cordier, A. (1989). In vivo micronucleus test using mouse hepatocytes. *Mutation Res.*, 216: 321-326, 1989.

- Cui, Y.Q., Dong, Z.W., Liu, S.B., Chang, S.C., Wang, Y. and Ji, X.Y. (1989). Assessment of the mutagenic effect of maternal factors on human chorionic villi by micronucleus test. *Environ. Mol. Mutagen.*, 14(Suppl. 15): 42.
- Degrassi, F., and Tanzarella, C. (1988). Immunofluorescent staining of kinetochores in micronuclei a new assay for the detection of aneuploidy. *Mutation Res.*, 203: 339-345.
- Eastmond, D.A. and Tucker, J.D. (1989). Identification of aneuploidy - inducing agents using cytokinesis - blocked human lymphocytes and antikinetochore antibody. *Environ. Mol. Mutagen.*, 13: 34-43.
- Erdtmann, B. and Onsten, T.G.H. (1991). Freqüência de micronúcleos e irregularidades nucleares em eritoblastos da medula óssea de pacientes com doenças hematológicas. *Simpósio Latino-Americano de Mutagênese Ambiental - Programa e Resumos*. Rio de Janeiro-RJ, Brasil, pp31.
- Fenech, M. and Morley, A.A. (1985). Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutation Res.*, 147: 29-36.
- Ferrari, I. (1991). Teste do micronúcleo em cultura temporária de linfócitos. In: Rabello-Gay, M.N., Rodrigues, M.A., La Regina, Montelleone-Neto, R. (Editores). *Mutagênese, Teratogênese e Carcinogênese - Métodos e Critérios de Avaliação*. Sociedade Brasileira de Genética/Revista Brasileira de Genética. Ribeirão Preto - SP, Brasil, pp. 107-112.
- Gattas, G.J.F., Longatto Filho, A., Maeda, M.Y.S., Santos, D.R. and DeAndrea, A. (1991). Micronúcleos em células de colo uterino: Papanicolau X Feulgen Fast-Green. *Rev. Bras. Genet.*, 14(Suppl. 3): 177.
- Heddle, J.A., Hite, M., Kirkhart, B., Mavournin, K., Mac Gregor, J.T. Newell, G.W. and Salamone, M.F. (1983). The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. A Report of U.S. Environmental Protection Agency Gerle-Tox Program. *Mutation Res.*, 123: 61-188.
- Heddle, J.A., Cimino, M.C., Hayashi, M., Romagna, F., Shelby, M.D., Tucker, J.D. and Mac Gregor (1991). Micronuclei as index of cytogenetic damage: past, present, and future. *Environ. Mol. Mutagen.*, 18: 277-291.

- Hennig, V.G.G, Reidd, N.L. and Hoar, D.I. (1988). Kinetochore immuno-fluorescence in micronuclei: A rapid method for the in situ detection of aneuploidy and chromosome breakage in human fibroblasts. *Mutation Res.*, 203: 045-414.
- Hogstedt, B. (1984). Micronuclei in lymphocytes with preserve cytoplasm. A method for assessment of cytogenetic damage in man. *Mutation Res.*, 130: 63-72.
- Hogstedt, B., Akesson, B., Axell, K., Gullberg, B., Mitelman, F., Pero, R.W., Skertfing, S. and Welinder, H. (1983). Increased frequency of lymphocyte micronuclei in workers producing reinforced polyester resin with low exposure to styrene. *Scand. J. Work. Environ. Health*, 9: 241-246.
- Hogstedt, B., Homen, A., Karlsson, A., Raihle, G., Nillius, K. and Vestlund, K. (1991). Gasoline pump mechanics had increased frequencies and sizes of micronuclei in lymphocytes stimulated by pokeweed mitogen. *Mutation Res.*, 263: 51-55.
- International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens. (1983). Screening strategy for chemicals that are potential germ-cell mutagens in mammals. Committee I- Final Report. *Mutation Res.*, 14: 117-177.
- Livingston, G.K., Reed, R.N., Olson, B.L. and Lockey, J.E. (1990). Induction of nuclear aberrations by smokeless tobacco in ephitelial cells of human oral mucosa. *Environ. Mol. Mutagen.*, 15: 136-144.
- Mac Gregor, J.T. (1991). Micronucleus assays protocols. *Mutation Res.*, 259: 123-125.
- Mac Gregor, J.T., Hedle, J.A., Hite, M., Margolin, B.H., Ramel, C., Salamone, M.F. Tice, R.R. and Wild, D. (1987). Guideline for the conduct of micronucleus assays in mammalian bone marrow erythrocytes. *Mutation Res.*, 189: 103-112.
- Meng, Z. and Zhang, L. (1990). Observation of frequencies of lymphocytes with micronuclei in human peripheral blood cultures from workers in a sulphuric acid factory. *Environ. Mol. Mutagen.*, 15: 218-220.

- Migliore, L., Guidotti, P., Favre, C., Nardi, M., Sessa, M.R. and Brunori, E. (1991). Micronuclei in lymphocytes of young patients under antileukemic therapy. *Mutation Res.*, 263: 243-248.
- Moroi, Y., Peebles, C., Fritzler, M.J., Steigewald, J. and Tan, E.M. (1980). Auto-antibody to centromere (kinetochore) in scleroderma sera. *Proc. Nat. Acad. Sci., USA*, 77: 1627-1631.
- Parton, J.W., Garriott, M.L. and Beyers, J.E. (1991). Expulsion of demecolcine-induced micronuclei from mouse bone marrow polychromatic erythrocytes. *Environ. Mol. Mutagen.*, 17: 79-83.
- Pincu, M., Bass, D. and Norman, A. (1984). An improved micronuclear assay in lymphocytes. *Mutation Res.*, 139: 61-65.
- Ribeiro, L.R., Salvadori, D.M.F. and Cerqueira, E.M.N. (1989). Bio-monitoring of individuals occupationally exposed to aromatic amines. *Environ. Mol. Mutagen.*, 14(Suppl. 15): 163.
- Rudd, N.L., Hoar, D.I., Greentree, G.L., Dimnik, L.S. and Henning, U.G.G. (1988). The micronucleus assay in human fibroblast: a measure of spontaneous chromosomal instability and mutagen hypersensitivity. *Environ. Mol. Mutagen.*, 12: 3-13.
- Russo, A. and Levis, A.G. (1992). Further evidence for the aneuploidogenic properties of chelating agents, p. induction of micronuclei in mouse male germ cells by EDTA. *Environ. Mol. Mutagen.*, 19: 125-131.
- Salassidis, K., Huber, R., Zitselsberger, H. and Bauchinger, M. (1992). Centromere detection in vin blastine and radiation-induced micronuclei of cytokinesis-blocked mouse cells by using *in situ* hybridization with a mouse gamma (major) satellite DNA probe. *Environ. Mol. Mutagen.*, 19: 1-6.
- Sarto, F., Tomanin, R., Giacomelli, L., Canova, A., Raimondi, F., Ghiotto, C. and Fiorentino, M.F. (1990a). Evaluation of chromosomal aberration in lymphocytes and MN in lymphocytes, oral mucosa and hair root cells of patients under antitubercular therapy. *Mutation Res.*, 228: 157-169.
- Sarto, F., Tomanin, R., Giacomelli, L., Iannini, G. and Gupiraggi, A.R. (1990b). The micronucleus assay in human exfoliated cells of the nose

- and mouth: application to occupational exposures to chromic acid and ethylene oxide. *Mutation Res.*, 244: 345-351.
- Schiffmann, D. and De Boni, V. (1991). Dislocation of chromatin elements in prophase induced by diethylsbestrol: a novel mechanism by which micronuclei can arise. *Mutation Res.*, 246: 113-122.
- Schmid, W. (1975). The micronucleus test. *Mutation Res.*, 31: 9-15.
- Skutelsky, E. and Danan, D. (1969). Reduction in surface charge as an explanation of the recognition by macrophages of nuclei expelled from normoblasts. *J. Cell Biol.*, 43: 8-15.
- Stich, H.F., Curtis, J.R. and Parida, B.B. (1982). Application of the micronucleus test to exfoliated cells of high cancer risk groups: tobacco chewers. *Int. J. Cancer*, 30: 553-559.
- Stich, H.F., Curtis, J.R. and Parida, B.B. (1983). Quantitating the synergistic effect of smoking and alcohol consumption with the micronucleus test on human buccal mucosa cells. *Int. J. Cancer*, 31: 305-308.
- Tavassoli, M. (1978). Red cell delivery and function of the marrow-blood barrier. A review. *Exp. Hematol.*, 6: 257-269.
- Vanderkerken, K., Vanparys, P.H., Verschaeve, L. and Kirsh-Volders, M. (1989). The mouse bone marrow micronucleus assay can be used to distinguish aneugens from clastogens. *Mutagenesis*, 4: 6-11.
- Vanparys, P.H., Vermeiren, F., Sysmans, M. and Temmerman, R. (1990). The micronucleus assay as a test for the detection of aneugenic activity. *Mutation Res.*, 244: 95-103.
- Wakata, A. and Sasaki, M.S. (1987). Measurement of micronuclei by cytokinesis-block method in cultured chinese hamster cells, p. comparison with types and rates of chromosome aberrations. *Mutations Res.*, 190: 51-57.
- Yamamoto, K.I. and Kikuchi, Y. (1980). A comparison of diameters of micronuclei induced by clastogens and by spindle poisons. *Mutation Res.*, 716: 127-131.