

Teste de linfócitos humanos no reconhecimento do efeito clastogênico e citotóxico da 5-fluorouracil

Lília Maria de Azevedo Moreira*

Lis Matilde Paes Araújo**

Ana Patrícia Barros Cordeiro***

Fábio Alexandre Ferreira Gusnão**

Resumo

A 5-fluorouracil (5-Fu) tem sido utilizada nos protocolos quimioterápicos como parte da terapêutica de alguns tipos de câncer, como o de mama. Dentre seus efeitos, esta substância inibe a enzima timidilato sintetase, prejudicando a síntese de DNA, e incorpora-se ao RNA, interferindo, assim, no processamento da síntese protéica. Em células normais a 5-fluorouracil pode induzir mutações e apresentar efeitos genotóxicos, levando ao aparecimento de danos secundários no metabolismo humano. O presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito clastogênico e citotóxico desta substância em diferentes concentrações, a fim de verificar aquela que causaria menor dano à célula. Como sistema teste foi tomada a cultura de linfócitos de sangue periférico de 72 horas, em seis pacientes com câncer de mama e quatro controles normais do mesmo sexo, idade e hábitos de vida. A 5-fluorouracil foi aplicada em G2, cinco horas antes do término da cultura nas concentrações de 1,0; 2,5; 5,0; 7,5; 10 µg/ml. As lâminas obtidas foram coradas com Giemsa e analisadas ao microscópio. A ação citotóxica e clastogênica da 5-fluorouracil foi estudada através do cálculo do Índice Mitótico e análise das aberrações cromossômicas com observação de 50 células em cada tratamento de acordo com os protocolos convencionais. Os resultados obtidos mostram danos cromossômicos em todas as concentrações, com diferenças mais significativas na concentração 2,5 µg/ml. Isto sugere que, em determinada concentração, a 5-fluorouracil satura os receptores de membrana levando a célula a não mais responder ao aumento de concentração.

Palavras-chave 5-fluorouracil. Aberrações cromossômicas. Câncer de mama.

INTRODUÇÃO

O câncer é um processo complexo e multifásico, em que a transformação de uma célula normal em uma célula cancerígena envolve tanto fatores genéticos como epigenéticos (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 1992). O distúrbio é caracterizado por um acúmulo de eventos que afetam genes envolvidos na regulação celular, tendo como resultado uma proliferação celular descontrolada.

O câncer de mama, com alta taxa de incidência, é um tipo de neoplasia em que ocorre a formação de células malignas no tecido da mama. Mulheres com uma história familiar de câncer de mama podem ter maior risco de apresentar a doença. Estima-se que, aproximadamente, 5% a 10% das mulheres com câncer de mama podem apresentar mutações nos genes BRCA1 e BRCA2, sendo que o risco de desenvolvimento do câncer em mama de mulheres com muta-

* Professora Titular de Genética

Laboratório de Genética Humana e Citogenética. Instituto de Biologia. UFBA.

Campus de Ondina

Tel.: (71)247-3744

E-mail: lazevedo@ufba.br

** Bolsista PIBIC-CADCT. Instituto de Biologia. UFBA.

*** Estagiária do Laboratório de Citogenética Humana. UFBA.

ções nos genes relacionados é de 40% a 85%, respectivamente (OFFIT, 1996). Outros fatores têm sido associados ao aumento do risco de câncer de mama, entre eles menarca precoce, idade avançada e história familiar de câncer de mama (ROSE, 1993).

Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA) - Ministério da Saúde, a estimativa para os casos de câncer de mama no Estado da Bahia, em 2002, é de 1.280, representando 18,93% da população. Na capital, foram registrados 670 casos, com taxa bruta de 51,01%, fato que justifica o interesse no estudo desta patologia. Considerando-se sua frequência e importância, torna-se imprescindível a procura de terapias adequadas e efetivas para o tratamento da doença.

O câncer de mama é comumente tratado por várias combinações terapêuticas: radiação, quimioterapia e terapia hormonal. A aplicação e seleção da terapia pode ser influenciada pela idade, menopausa da paciente, estágio da doença, grau histológico e nuclear do tumor primário, estágio do receptor-estrógeno (ER), estágio do receptor- progesterona (PR), medida da capacidade proliferativa e amplificação do gene HER//neu.

A quimioterapia é realizada através do uso de drogas para eliminar as células cancerosas. Assim como a radioterapia, a quimioterapia atinge as células com câncer e também as células normais. As conseqüências citotóxicas deste tratamento dependem principalmente da droga e da dose ministradas. Para o câncer de mama, é usualmente utilizada uma combinação de drogas que podem ser ministradas oralmente ou aplicadas por via intravenosa. Dentre estas, são muito utilizados os agentes alquilantes, como a ciclofosfamida, e as fluorpirimidinas, como a 5-fluorouracil.

Inicialmente sintetizada por Heidelberger e colaboradores (1957), a 5-fluorouracil ganhou importância clínica no tratamento de carcinomas de mama, ovário, gastrointestinais e de pele (CHABNER et al., 1975) pela sua potente ação inibidora sobre a timidilato sintetase.

De acordo com Chabner e colaboradores (1975), existem dois caminhos metabólicos

principais para que a atuação dessa substância lesione as células: (i) degradação hepática com produção de a fluoro b alanina, uréia, amônia e CO₂ ou (ii) transformação nos nucleosídeos 5-fluorouridina (FUR) e 5-fluorodesoxiuridina (FUDR). Estes últimos são fosforilados, em diversos tecidos, para formar os produtos ativos ácido 5-fluorouridílico (ribonucleotídeo) e ácido 5-fluorodesoxiuridílico (desoxirribonucleotídeo). O ácido 5-fluorouridílico, que se incorpora ao RNA, acarreta alterações na síntese e na função do RNA e perturba a estabilidade ribossômica. Não obstante, estes efeitos são de importância secundária comparados com a inibição da timidilato sintetase pelo ácido 5-fluorodesoxiuridílico.

Na presença de um determinado co-fator (ácido N⁵ N¹⁰ - metileno tetrahidrofólico), o ácido 5-fluorodesoxiuridílico liga-se covalentemente ao centro ativo da enzima, formando um complexo estável (CHABNER et al., 1975). Como conseqüência, instala-se o bloqueio da conversão do ácido desoxiuridílico e ácido timidílico. Como, na maioria das células, esta é a única via para síntese de ácido timidílico e o reservatório celular deste ácido é habitualmente muito pequeno, a replicação do DNA é rapidamente inibida (TAYLOR; HAUT; TUNG, 1962). Embora seja um inibidor da biosíntese de DNA, o ácido 5-fluorodesoxiuridílico não é incorporado ao DNA. Segundo Gebhart (1984), a 5-fluorouracil é uma substância que induz aberrações cromossômicas e trocas de cromátides irmãs, além de ser caracterizada como mutagênica no sistema de cultura de linfócitos e em outros sistemas.

A maioria das substâncias utilizadas no tratamento do câncer são potentes genotoxinas capazes de lesar o DNA, provocando a morte das células cancerígenas. Além de atingirem as células-alvo, elas também podem ser absorvidas por células normais, podendo provocar a ocorrência de mutações e de outros efeitos genotóxicos, levando ao aparecimento de tumores secundários. Assim, ao avaliar eventuais potenciais clastogênicos das substâncias químicas utilizadas na quimioterapia, procura-se aplicar protocolos de tratamento que possam minimizar os efeitos dos agentes utilizados.

Desse modo, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a ação clastogênica/mutagênica e citotóxica da ciclofosfamida e 5-fluorouracil em diferentes concentrações e analisar a resposta individual dos pacientes à 5-fluorouracil utilizada com frequência no tratamento do câncer de mama.

MATERIAL E MÉTODOS

A metodologia aplicada foi o estudo caso controle com a análise cromossômica em células obtidas de cultura de linfócitos de indivíduos com câncer de mama com protocolo quimioterápico incluindo 5-fluorouracil e ciclofosfamida. A amostra foi constituída por seis pacientes com câncer de mama atendidos em clínica especializada de Salvador-Bahia. O grupo controle foi formado por indivíduos do mesmo sexo, da mesma faixa etária da paciente com câncer de mama e com os mesmos hábitos de vida. Previamente ao estudo citogenético, foi obtido o termo de consentimento informado de pacientes de acordo com a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde. Foi também aplicado um questionário com vistas a apurar dados sobre hábitos de vida e sobre a história familiar com relação ao câncer.

Foram coletados cerca de 10ml de sangue periférico heparinizado, utilizando-se seringas e agulhas estéreis e descartáveis. Em câmara asséptica, foram transferidos 0,5ml de sangue para cada 4,5ml de meio de cultura, cada um dos quais contendo 3,8ml de meio RPMI 1640 suplementado com 0,6ml de soro bovino fetal e 0,1ml de fitohemaglutinina e antibióticos (estroptomomicina e penicilina). Os frascos foram encubados em estufa a 37° C, por 72 horas, de onde só foram retirados para a adição dos respectivos tratamentos.

O tratamento com a 5-fluorouracil foi realizado nas concentrações de 1,0; 2,5; 5,0; 7,5; 10,0µg/ml e a ciclofosfamida foi aplicada na concentração final de 6µg/ml. As drogas foram adicionadas às culturas 68 horas após o início do procedimento, o que correspondia à fase G2. A ciclofosfamida, considerada como agente radiomimético, foi tomada como controle posi-

tivo. Como controle negativo, foi feita cultura sem adição de agentes. Após 70 horas do cultivo, foram adicionadas 4 gotas de colchicina (0,016µg/ml) em cada frasco, com seringa de agulha calibre 25x7.

Decorridas 72 horas do momento da semeadura, deu-se início à colheita com tratamentos de solução hipotônica (KCL 0,075M aquecido a 37° C) por dez minutos e fixador preparado com metanol e ácido acético na proporção de 3:1, de acordo com a técnica de Moorhead e colaboradores (1960), adaptada ao emprego de rotina no Laboratório de Genética Humana e Citogenética do Instituto de Biologia - UFBA. Após três fixações, o sedimento era ressuspensão em aproximadamente 0,3ml de fixador e as lâminas preparadas instilando-se uma gota do material em lâmina previamente lavada e mantida em álcool a 4° C. Todas as centrifugações foram feitas em centrífuga, a 1.000 rpm (rotações/minuto), por cinco minutos.

A coloração das lâminas foi feita com solução de Giemsa diluído em tampão fosfato (pH 6,8), na proporção de 1:30, por seis minutos, e a análise realizada em microscópio óptico comum em objetiva de imersão (100X). Foram analisadas 50 metáfases de cada indivíduo para cada um dos tratamentos e concentrações estudadas. Avaliou-se o Índice Mitótico (IM), o número de células anômalas, bem com a frequência de aberrações por célula. A análise das aberrações cromossômicas (AC) seguiu o critério de Preston e colaboradores (1981), e todos os resultados foram ordenados em fichas de análise.

Foram consideradas quebras cromossômicas todas as descontinuidades na estrutura que estivessem desalinhadas com o fragmento cromatídico complementar. Consideram-se *gaps* (falhas) aquelas descontinuidades na estrutura da cromátide que são menores do que o diâmetro da mesma. Tanto os *gaps* quanto as quebras foram classificados em cromatídicos e isocromatídicos, com lesão em apenas uma ou em ambas as cromátides, respectivamente. Células que apresentavam mais de dez alterações estruturais foram classificadas como

multifragmentadas. Para classificação das alterações foi também utilizada a nomenclatura preconizada no ISCN. (MITELMAN, 1995)

Em relação às alterações numéricas, foram identificadas metáfases contendo 45 e 47 cromossomos bem como células poliplóides. Além do número total de alterações estruturais encontradas por célula, foi computado o total de células aberrantes por indivíduo. O Índice Mitótico (nº de células em divisão/1.000 células) foi indicativo do efeito citotóxico das substâncias aplicadas na cultura.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da análise de alterações cromossômicas dos pacientes com câncer de mama e dos indivíduos controles encontram-se sumarizados na Tabela 1. A Figura 1 apresenta alterações cromossômicas verificadas nos sujeitos da pesquisa. Dados sobre a genotoxicidade da

5-fluorouracil são evidenciados no gráfico comparativo entre as pacientes e o grupo controle (FIGURA 2). O teste InStat 3.0 comparou a frequência de diversos tipos de alterações cromossômicas nas diferentes concentrações da 5-fluorouracil, sendo utilizado como positivo células tratadas com a ciclofosfamida. Os tratamentos com 5-fluorouracil nas concentrações de 1,0µg/ml, 2,5µg/ml, 5,0µg/ml, 7,5µg/ml e 10,0µg/ml induziram aumentos significativos na frequência de alterações cromossômicas, tanto em pacientes quanto no grupo controle. Os **gaps** cromatídicos foram as alterações mais frequentes. Verificou-se, entretanto, diferenças individuais quanto à sensibilidade à 5-fluorouracil nas concentrações testadas.

Nas pacientes, o teste apresentou diferença estatisticamente significativa quanto a ocorrências de **gap** cromatídico (p=0,0246), deleção isocromatídica (p = 0,0324), células hiperdiploides (p=0,0461) e Índice Mitótico (p=0,0253). O achado de células hipodiploides

Tabela 1 - Resultados da análise de alterações cromossômicas

	AC	N	CROMOSSÔMICA				CROMATIDÍCAS			T AC EST	HIPO	HIPER	T AC NUM	T CL AN	IM
			DIC	AN	DELEÇÃO		GAP	DEL ISO	TROC						
					INT	TER									
TRAT															
P A C I E N T E S	CONT	300	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	29,9	
	CP 6,0 g	250	8	4	8	14	26	4	0	64	26	21	47	108	17,8
	5-F 1,0 g	250	4	2	0	0	9	2	0	17	25	15	40	57	10,7
	5-F 2,5 g	225	3	0	0	7	17	9	0	35	19	13	33	67	12,7
	5-F 5,0 g	300	7	2	1	4	10	1	0	25	32	21	54	78	15,2
	5-F 7,5 g	275	8	0	2	5	10	1	0	26	37	18	54	79	13,8
	5-F 10 g	250	9	1	3	3	6	1	0	23	26	13	40	63	13,4
TOTAL	1850	39	9	14	33	78	18	0	190	165	101	268	452	113,5	
C O N T R O L E S	CONT	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	21,1	
	CP 6,0 g	200	1	0	5	6	10	4	0	26	10	14	24	50	13,5
	5-F 1,0 g	200	1	0	1	1	8	1	0	12	12	5	22	34	6,9
	5-F 2,5 g	175	7	0	0	1	11	4	0	23	23	7	19	42	7,7
	5-F 5,0 g	175	4	0	0	1	4	1	0	10	10	3	15	25	6,3
	5-F 7,5 g	150	3	1	1	5	8	0	0	18	18	10	26	42	7,8
	5-F 10 g	175	0	0	0	0	17	7	0	24	24	12	18	42	9,0
TOTAL	1275	55	10	7	14	58	17	0	113	97	51	124	235	72,3	

Nota : TRAT - Tratamento

AC - Aberrações cromossômicas

CONT - Controle

N - Número de células analisadas

DIC - Dicêntrico

AN - Anel

INT - Intersticial

TER - Terminal

DEL ISO - Deleção isocromatídica

TROC - Trocas

T AC ESTR - Total de aberrações estruturais.

HIPO - Células hipoplóides

HIPER - Células hiperplóides

T AC NUM - Total de aberrações cromossômicas numéricas

T CÉL AN - Total de células anormais (com aberrações)

IM - Índice Mitótico

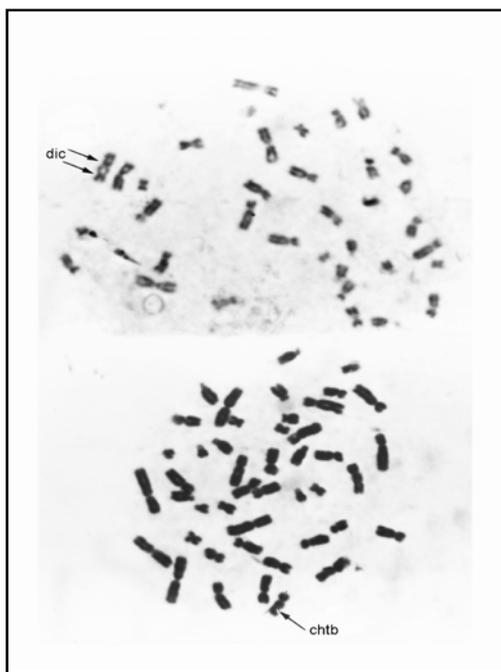


Figura 1 - Metáfases de pacientes obtidas com a aplicação *in vitro* de 5-fluorouracil na concentração de 2,5 µg/ml, com setas indicando quebra cromossômica (chrb) e cromossomo dicêntrico (dic)

apresentou diferença muito significativa ($p=0,0021$), número total de aberrações numéricas ($p=0,0040$) e o número total de aberrações estruturais ($p<0,0001$), este último considerado extremamente significativo. O teste não mostrou diferenças significativas nas aberrações cromossômicas dicêntricas ($p=0,1546$), anéis ($p=0,7774$), deleção intersticial ($p=0,1387$) e deleção terminal ($p=0,1925$).

A aplicação do teste InStat 3.0 ao grupo controle indicou significância estatística no número de células hipodiplóides ($p=0,0369$) e de aberrações estruturais ($p=0,0457$). O teste mostrou também um valor p próximo do nível de significância nas comparações feitas entre os *gaps* cromatídicos ($p=0,0944$). A análise foi não significativa para deleção intersticial ($p=0,6325$), deleção isocromatídica ($p=0,5054$), deleção terminal ($p=0,4782$), células hiperdiplóides ($p=0,1118$) e ao Índice Mitótico ($p=0,1636$).

A comparação dos dois grupos com o teste InStat 3.0 revelou diferenças significativas quanto a *gaps* cromatídicos ($p=0,0234$); muito

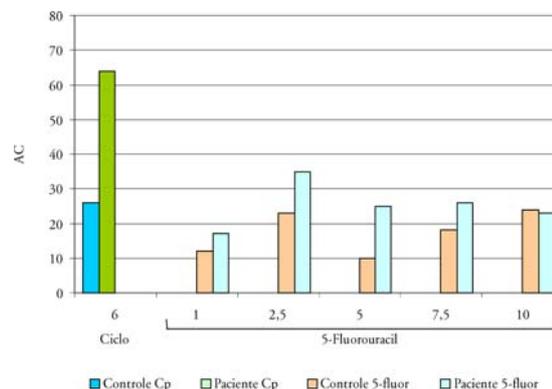


Figura 2 - Frequências das aberrações cromossômicas estruturais entre pacientes e controles submetidas ao tratamento *in vitro* em diferentes concentrações

significativa para a análise de células hipodiplóides ($p=0,0012$), para células hiperdiplóides ($p=0,0041$) e para o Índice Mitótico ($p=0,0021$); extremamente significativo quanto ao número total de aberrações estruturais ($p=0,0002$) e ao número total de aberrações numéricas ($p=0,0007$); mostrou um valor de p próximo ao nível de significância para a deleção terminal ($p=0,0679$) e não significativo para a análise dos anéis ($p=0,5478$), deleção intersticial ($p=0,2998$), deleção isocromatídica ($p=0,1573$) e análise de aberrações cromossômicas dicêntricas ($p=0,3765$).

Os agentes exógenos que induzem a efeitos nível celular são agrupados em duas categorias principais: genotóxicos e citotóxicos. Agentes genotóxicos alteram a estrutura normal do material genético e podem causar mutações cromossômicas e gênicas. As substâncias citotóxicas causam modificações do aparelho mitótico ou deprimem a síntese de macromoléculas essenciais à vida celular e, como consequência, causam diminuição ou atraso da divisão celular. Substâncias alquilantes e as fluorpirimidinas, como a ciclofosfamida e 5-fluorouracil, respectivamente, são mutagênicas e clastogênicas nos sistemas de cultura de linfócitos e de células da medula óssea. Desse modo, a presença desses agentes citotóxicos é suficiente para induzir danos cromossômicos nos pacientes tratados com os mesmos, como constatado no presente trabalho.

A ciclofosfamida é uma droga largamente usada no tratamento do câncer de mama, com efeito citotóxico comprovado, exercendo um efeito clastogênico sobre as células do tecido somático (KRISHNA et al., 1993). Esta substância é bastante utilizada como controle positivo em diversos estudos, devido ao seu comprovado efeito clastogênico e mutagênico sobre as células da medula óssea e sobre linfócitos de sangue periférico, tanto em sistemas *in vivo* como *in vitro*. Os resultados presentemente obtidos corroboram estes estudos comprovando o efeito citotóxico da substância.

O sistema utilizado neste trabalho para avaliar a atividade citotóxica e clastogênica da 5-fluorouracil em diferentes concentrações foi a cultura de linfócitos de sangue periférico, sistema amplamente utilizado na análise de aberrações cromossômicas e na troca de cromátides irmãs, induzidas tanto *in vitro* como *in vivo*. Este método citogenético não é restrito para obter apenas evidências da mutagenicidade e carcinogênese; é também apropriado para detectar indivíduos com uma sensibilidade ou resistência específicas às terapias, permitindo, assim, selecionar uma terapia apropriada em casos individuais. (GEBHART, 1984)

Um fator muito importante neste tipo de estudo é o tempo de cultura. A maioria dos pesquisadores recomenda a utilização de culturas de 48 horas ao invés de culturas de 72 horas, uma vez que, nesta última, algumas células encontram-se na segunda divisão, o que pode provocar a eliminação de algumas aberrações (RABELLO-GAY et al., 1992). Richard e colaboradores (1993) sugerem que o aumento de aneuploidias pode depender do tempo de cultura, com maior frequência em culturas de células de 72 horas do que em culturas de 48 horas. Não se pode descartar a possibilidade de que, nas concentrações usadas, as substâncias tenham a capacidade de interagir com fuso mitótico ou com região do centrômero, interferindo no processo de divisão celular e, conseqüentemente, levar ao aparecimento de aneuploidias.

O presente estudo seguiu a metodologia de culturas de 72 horas, que proporciona maior

rendimento, considerando-se o tratamento destas com um agente clastogênico (GEBHART, 1984). A toxicidade da 5-fluorouracil, levando à desregulação do ciclo celular dos indivíduos estudados, típico de pacientes com câncer, foi verificada em estudo piloto. Além disso, a aplicação dos agentes nas últimas 5 horas de cultura permitiu avaliar eventuais danos em apenas um ciclo.

É importante referir o fato de que tanto a ciclofosfamida quanto a 5-fluorouracil foram acrescentadas diretamente à cultura, evitando a possibilidade de seus constituintes serem reprocessados, ocultando, assim, a ação dos seus metabólitos.

A 5-fluorouracil, em todas as concentrações utilizadas, induziu alterações estruturais extremamente significativas nas culturas de linfócitos e um aumento na frequência de células anormais, quando comparadas as pacientes com o grupo controle. O *gap* cromatídico foi a alteração mais freqüente, indicando o efeito do agente após a replicação do DNA sem reparo do dano estrutural.

No presente estudo, foram encontradas diferenças estatisticamente significativas nas pacientes, em relação a células hipodiplóides ou hiperdiplóides, quando comparadas com o grupo controle. A diminuição do Índice Mitótico, tanto no grupo controle quanto nas pacientes, forneceu a indicação de uma eventual citotoxicidade na cultura, o que pode acontecer com o uso de agentes clastogênicos. Os resultados obtidos comprovaram a citotoxicidade destas substâncias nas concentrações e doses utilizadas neste estudo. A ciclofosfamida e, principalmente, a 5-fluorouracil interferiram no crescimento celular, de tal modo que em alguns casos foi possível analisar apenas 25 metáfases.

Ao comparar a frequência dos vários tipos de alterações estudadas nas diversas concentrações de 5-fluorouracil, o teste InStat 3.0 mostrou diferenças estatisticamente significativas para alguns destes tipos. As alterações que ocorreram, em número muito reduzido, não permitiram estabelecer comparações estatisticamente significativas.

Analisando as diferentes concentrações de 5-fluorouracil, constatou-se que esta substância induziu aberrações cromossômicas em todas as concentrações testadas, porém as células tiveram maior dano cromossômico na concentração 2,5µg/ml. É interessante ressaltar que, nas concentrações seguintes (5,0µg/ml, 7,5µg/ml e 10µg/ml), não houve aumento significativo de danos cromossômicos, sugerindo que, a partir de uma determinada concentração, a 5-fluorouracil pode saturar os receptores de membrana, levando a célula a não mais responder ao aumento desta droga.

CONCLUSÕES

A 5-fluorouracil foi considerada, nas condições *in vitro* estudadas, uma substância citotóxica em todas as concentrações, levando à menor frequência de divisões celulares. Foi con-

siderada também clastogênica, uma vez que induziu a quebras cromossômicas nas culturas submetidas ao tratamento *in vitro*. A ciclofosfamida, utilizada como controle positivo, demonstrou ser eficiente como indicador de danos cromossômicos e ter efeito citotóxico.

Portadoras de câncer de mama mostraram maior sensibilidade aos danos cromossômicos provocados pela 5-fluorouracil e ciclofosfamida.

Os maiores danos cromossômicos foram encontrados na concentração de 2,5µg/ml, sugerindo, assim, que as células, devido à saturação dos receptores de membrana, não responderam em ordem crescente ao aumento das concentrações de 5-fluorouracil.

Os resultados obtidos neste estudo sugerem possíveis danos genéticos secundários, advindos da ação de mutágenos químicos que fazem parte do protocolo de quimioterapia.

Human lymphocyte assay on the recognition of the cytotoxic effect and the clastogenicity of the 5-fluorouracil

Abstract

5-fluorouracil is being use in chemotherapeutic protocols as part of the therapeutic of some kinds of cancer; like breast cancer. Among other effects, this substance inhibits the timidalato sintetasis, undermining DNA synthesis, and incorporates itself in the RNA, thus interfering in the protein synthesis processing. In normal cells, 5-fluorouracil can induce mutations and present genotoxic effects, leading to the appearance of secondary damages to the human metabolism. This investigation aimed to evaluate the clastogenic and cytotoxic effect of 5-fluoroacyl in different concentrations, to verify which would cause the lesser damage to the organism. As a test-system we took a culture of 72-hours peripheric blood lymphocytes, in six patients with breast cancer and four normal controls with the same sex, age and life habits. 5-fluorouracil was applied in G2, four hours before beginning of culture in concentrations of 1,0; 2,5; 5,0; 7,5; 10 µg/ml. The obtained slides were stained with Giensa and analyzed under microscope. Cytotoxic and clastogenic actions of 5-fluorouracil were studied through calculation of the Mitotic Index and Chromosome Aberration analysis, with analysis of 50 cell for each treatment, according to conventional protocol. The obtained results show chromosomal damage in all concentrations, with more significant difference in 2,5 µg/ml concentration, which suggests that in a certain concentration, 5-fluorouracil saturates membrane receptors, making the cell stop responding to increase in concentration.

Keywords: 5-Fluorouracil. Chromosomal aberrations. Breast cancer.

REFERÊNCIAS

- ANDERSON, D. et al. Cyclophosphamide: review of its mutagenicity for an assessment of potential germ cell risks. *Mutat. Res.*, Amsterdam, n.1/2, p.115-181, 1995.

- BERRIGAN, M. J.; STRUCK R. F.; GURTOO, H. L. Lipid peroxidation induced by ciclophosphamide. **Cancer Biochem. Biophys.**, London, v.9, p.265-270, 1987.
- BORGES-OSÓRIO, M. R.; ROBINSON, W. M. **Genética humana**. 2.ed. Porto Alegre: Artemed, 2001. cap.12, p.279-299.
- CHABNER, B. A. et al. The clinical pharmacology of antineoplastic agents. **N. Eng. J. Med.**, Boston, v.292, p.1107-1113, 1975.
- DIRECTOR, A. E. et al. Chronic ingestion of clastogenics by mice and frequency of chromosome aberrations. **Environ. Mol. Mutagen.**, New York, v.32, p.139-147, 1998.
- GEBHART, E. Chromosomal aberrations in lymphocytes of patients under chemotherapy. In: OBE, J. (Ed). **Mutations in man**. Berlin: Springer-Verlag, 1984. p.198-222.
- HEIDELBERGER, C. et al. Fluorinated pyrimidines: a new class of tumour-inhibitory compounds. **Nature**, London, v.179, p.663-666, 1957.
- INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. Consensus report. In: VANIO, H. et al. (Ed.). Mechanisms of carcinogenesis in risk identification. Lyon: World Health Organization, 1992. p.9-54.**
- KRISHNA, G. et al. Use of cyclophosphamide as a positive control in dominant lethal and micronucleus assays. **Mutat. Res.**, Amsterdam, v.335, p.331-337, 1993.
- MITELMAN, Felix (Ed.). **ISCN 1995: International System for Human Cytogenetic Nomenclature**. Basel: Karger, 1995.
- MOORHEAD, P. et al. Chromosomes preparations of leucocytes cultured from human peripheral blood. **Exp. Cell Res.**, Orlando, v.20, p.613, 1960.
- MURALIKRISHNAN, G.; STANLEY, V.; PILLAI, K. S. Dual role of vitamin C on lipid profile and combined application of cyclophosphamide, methotrexate and 5-fluorouracil treatment in fibrosarcoma-bearing in rats. **Cancer Lett.**, Limerick, v.169, n.2, p.115-120, 2001.
- OFFIT K. et al. Germline BRCA1 185delAG mutations in Jewish women with breast cancer. **Lancet**, London, v.343, n.9016, p.1643-1645, 1996.
- PRESTON, R. J. et al. Mamalian *in vivo* and *in vitro* cytogenetics assays: a report of the U.S. EPA's Gene-tox Program. **Mutat. Res.**, Amsterdam, v.87, p.143-188, 1981.
- RABELLO-GAY, M. et al. **Mutagenese, carcinogenese e teratogenese**. teste com linfócitos do sangue periférico. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1992. p.97-105.
- RICHARD, F. et al. Aneuploidy in human lymphocytes: an extensive study of eight individuals of various ages. **Mutat. Res.**, Amsterdam, v.295, p.71-80, 1993.
- ROSE, P. P. et al. Factors influencing prognosis in node-negative breast carcinoma: analysis of 767 T1N0M0/T2N0M0 patients with long-term follow-up. **J. Clin. Oncol.**, Alexandria, v.11, n.11, p.2090-2100, 1993.
- TAYLOR, J. H.; HAUT, W. F.; TUNG, J. Effects of fluorodeoxyuridine on DNA replication, chromosome breakage and reunion. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, DC, v.48, p.190-198, 1962.

Agradecimentos

As pacientes que, acreditando no valor desta investigação, cederam amostras de sangue para o estudo. Às Dr^{as}. Gildete Lessa e Ivana Nascimento, e a toda a equipe médica e técnica do Núcleo de Oncologia da Bahia (NOB), pelo apoio ao projeto e pela doação das substâncias testadas nas culturas de linfócitos. Os autores também agradecem à Prof^a Lucy Magalhães Freitas pela cuidadosa revisão do manuscrito.