

## **Avaliação do efeito carcinogênico e anticarcinogênico do levonorgestrel através do teste de detecção de clones de tumores epiteliais em células de *Drosophila melanogaster***

**Evaluation of the carcinogenic and anticarcinogenic effect of Levonorgestrel on a test for the detection of clones of epithelial tumors in *Drosophila melanogaster***

**Mariana Rodrigues da Silva**

Graduanda do curso de Fisioterapia (UNIPAM). e-mail: marianarodrigues1406@gmail.com

**Rosiane Gomes Silva Oliveira**

Professora orientadora (UNIPAM). e-mail: rosianegso@unipam.edu.br

---

**Resumo:** O levonorgestrel (LNG) é um tipo de progesterona sintética utilizado para anticoncepção de emergência, em sistema intrauterino e em anticoncepcionais. Dentre os diversos efeitos do levonorgestrel, estudos afirmam que este possui um grande impacto no câncer, sendo capaz de inibir a carcinogênese. O objetivo deste estudo é avaliar o efeito carcinogênico e anticarcinogênico do LNG, por meio do teste de detecção de clones de tumores epiteliais em células de *Drosophila melanogaster*. Comparando os resultados dos indivíduos tratados com concentrações isoladas de LNG (12, 25, 37,5 µg/mL), com o controle negativo, estes mostram ausência de efeito carcinogênico, pois não houve aumento significativo na frequência de tumores. Nas concentrações de LNG associadas à DXR, os resultados indicam efeito modulador, pois houve um aumento significativo na frequência de tumores, quando comparado ao controle positivo ( $p < 0,05$ ). Frente ao exposto, conclui-se que o LNG não apresentou potencial carcinogênico nas concentrações testadas, porém, apresentou efeito modulador capaz de potencializar danos induzidos pela DXR.

**Palavras-chave:** *Drosophila melanogaster*. Levonorgestrel. Warts.

**Abstract:** Levonorgestrel (LNG) is a type of synthetic progesterone used for emergency contraception, in intrauterine device and in contraceptives. Among the several effects of levonorgestrel, studies claim that it has a major impact on cancer, capable of inhibit carcinogenesis. The objective of this study is to assess the carcinogenic and anticarcinogenic effect of LNG by way of the detection test of clones of epithelial tumors in *Drosophila melanogaster* cells. Comparing the results of the individuals treated with isolated concentrations of LNG with the negative control, these show absence carcinogenic effect, for there was no significant increase in the frequency of tumors. At the concentrations of LNG associated with DXR, the results indicated a modulating effect, as there was a significant increase in tumor frequency when compared to the positive control. Considering the information above, can conclude that LNG did not present carcinogenic potential in the tested concentrations, however, it presented a modulating effect capable of potentiating induced damage by the DXR.

**Keywords:** *Drosophila melanogaster*. Levonorgestrel. Warts

## 1. Introdução

Desde a década de 50, os médicos buscavam conhecimento sobre contracepção, pois neste período não havia ensinamentos sobre tal assunto nas faculdades de medicina brasileiras. Em 1962 já eram feitas pesquisas isoladas sobre anticoncepcionais para mulheres de camadas populares em várias cidades do Brasil. Estas aderiram a estes contraceptivos de forma tão acelerada que em 1970, 6,8 milhões de cartelas de pílulas anticoncepcionais foram vendidas e, em 1980, este número subiu para 40,9 milhões, causando um significativo declínio da fecundidade (PEDRO, 2003).

Neste mesmo período, entre 1960 e 1970, o médico canadense Albert Yuzpe iniciou estudos sobre o método de contracepção pós-coito, atualmente conhecido como anticoncepção de emergência (AE), como resposta para as consequências de uma violência sexual. Somente em 1995 que a AE foi reconhecida como medicamento essencial pela Organização Mundial de Saúde (OMS) (MARTIN, 2004).

A AE é um método hormonal oral capaz de inibir o processo de gravidez quando houver uma relação sexual desprotegida, a utilização não adequada de anticoncepcionais ou, ainda, em casos de violência sexual. Esta anticoncepção por emergência pode atuar inibindo ou retardando a ovulação, alterando o transporte do óvulo e dos espermatozoides, interferindo na capacitação espermática, entre outros mecanismos. Porém, para sua eficácia, é necessário ser administrada antes da fecundação. Caso já tenha ocorrido a implantação, não é possível interromper gravidez em curso por meio da AE (COSTA *et al.*, 2008).

Um dos fármacos mais utilizados como AE é o levonorgestrel, cujo mecanismo de ação envolve a inibição da ovulação, por meio das alterações na fase lútea, interferência com a penetração do espermatozoide no ovócito e maturação deste e, também, na modificação do muco cervical (FERREIRA *et al.*, 2010). Este medicamento é um tipo de progesterona sintética e pode ser utilizado, em baixas concentrações, em sistema intrauterino liberador de levonorgestrel (SIU-LNG), onde o dispositivo é implantado no útero com liberação gradual de levonorgestrel (BRASIL, 2013) e em pílulas diárias de anticoncepcionais (WANNMACHER, 2003).

Com relação ao câncer, Carballo e Roca (2006) afirmam que contraceptivos orais como levonorgestrel apresentam efeito protetor contra o carcinoma do endométrio e do ovário. Contudo, Linhares *et al.* (2005) relatam que receptores da progesterona (RP) são importantes, pois regulam o crescimento do aparelho reprodutor feminino e da glândula mamária, logo encontram-se envolvidos na gênese de tumores malignos.

No Brasil, o câncer, principalmente o câncer de mama, tem apresentado grande incidência e mortalidade no sexo feminino, com curva ascendente a partir dos 25 anos até 45 e 50 anos de idade (LINHARES *et al.*, 2005). No ano de 2016 estão previstos 57.960 novos casos de câncer de mama no Brasil, com risco estimado de 56,20 casos a cada 100 mil mulheres (INCA, 2015).

Diante da grande incidência de câncer de mama no país, e por existirem algumas hipóteses sobre sua correlação com os hormônios sintéticos, este estudo faz-se necessário para uma melhor compreensão do papel do levonorgestrel na gênese do câncer. Dessa

forma, o presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de avaliar o efeito carcinogênico e anticarcinogênico do levonorgestrel em *D. melanogaster*, por meio do teste para detecção de clones de tumores epiteliais.

## 2. Revisão da literatura

### 2.1. Câncer

O câncer tem sido um grande problema de saúde pública, sendo responsável por mais de seis milhões de óbitos por ano, representando aproximadamente 12% de todas as causas de morte no mundo. Os países desenvolvidos têm apresentando maior incidência de câncer; porém, dos dez milhões de casos novos anuais de câncer, cinco milhões e meio são diagnosticados nos países em desenvolvimento (GUERRA; GALLO; MENDONÇA, 2005).

As células humanas são constituídas por membrana celular, citoplasma e núcleo. No núcleo estão presentes os genes, que constituem os cromossomos, formando o DNA (ácido desoxirribonucleico). Estes são responsáveis por guardar e fornecer instruções para formas, estruturas e atividade celular (INCA, 1996).

Estas células do organismo humano passam por divisão celular consecutivamente. Normalmente essa divisão é responsável pela formação, crescimento e regeneração de tecidos, de forma ordenada (PONTES, 2013). Quando ocorrem mutações no material genético (DNA) destas células, elas recebem instruções erradas para as suas atividades, dando origem a uma doença genômica conhecida como câncer (DANTAS *et al.*, 2009).

As alterações celulares são decorrentes de danos em genes específicos. Estas ocorrem no genoma celular por meio de metabólitos reativos endógenos, mutágenos ambientais e drogas terapêuticas que podem alterar sua integridade (RESENDE, 2007). Dessa forma, estas podem ser espontâneas ou induzidas por agentes mutagênicos, como radiações, metais, inflamações crônicas, radicais livres do oxigênio, dieta inadequada e xenobióticos como cigarro, pesticidas, entre outros. Com o ciclo celular alterado, há o aumento das taxas de proliferação e deficiência nas taxas de morte celular, resultando na aglomeração de clones de células neoplásicas, dando origem aos tumores (FERRARI; TORRES, 2002)

Os tumores formados a partir das alterações celulares são classificados em dois tipos: malignos e benignos. Os tumores benignos são aqueles em que as células permanecem no mesmo local onde originou o tumor, não se transmitindo para outros tecidos. Já nos tumores malignos, as células vão sofrendo divisões e invadindo outros tecidos do corpo, em um processo chamado de metástase (LOPES; OLIVEIRA; PRADO, 2002).

O processo de formação do câncer é chamado de carcinogênese, em que células normais são convertidas em células malignas através de agentes indutores chamados de carcinógenos. A carcinogênese envolve múltiplas etapas, como a de iniciação, promoção e progressão, que incluem mudanças tanto genéticas quanto epigenéticas, ativando os proto-oncogenes e/ou inativando os genes supressores de tumor (SOUTO; FALHARI; CRUZ, 2005).

No estágio de iniciação, as células sofrem a ação dos oncoiniciadores, também conhecidos como agentes cancerígenos. Estes modificam alguns genes, e as células se tornam geneticamente alteradas, porém não é possível detectar um tumor. Quando essas células alteradas sofrem o efeito dos agentes oncopromotores, inicia-se o estágio de promoção, em que as células são transformadas em malignas de forma lenta e gradual. A exposição excessiva a hormônios é exemplo de fator que causa a transformação de células iniciadas em malignas. Já no último estágio, conhecido como estágio de progressão, os agentes oncoaceleradores fazem a multiplicação excessiva e irreversível das células alteradas. Neste momento, o câncer já está instalado e evoluindo até que os primeiros sinais clínicos apareçam (INCA,1996).

## 2.2. Levonorgestrel

O levonorgestrel é um progestágeno que apresenta atividade antiestrogênica. Este é utilizado na área de ginecologia por meio de diferentes formas, como componente em contraceptivos orais, na terapia de reposição hormonal ou na contracepção por emergência. Este também pode ser utilizado como endoceptivo intrauterino (DIU) com liberação diretamente no órgão-alvo em doses menores (BRASIL, 2013).

A anticoncepção por emergência através da progesterona sintética levonorgestrel pode ser administrada, no máximo, 72 horas após a relação sexual desprotegida (NOGUEIRA; REIS; POLI NETO, 2000). Além disso, pode ser usada em uma dose total contendo 1,5mg, dividida em 2 comprimidos de 0,75mg em uma dose única ou a cada 12 horas (BRASIL, 2005).

Existe outro método de AE, chamado de Regime de Yuzpe, que consiste na administração de um estrogênio associado a um progestágeno sintético, administrados até cinco dias após a relação sexual. Comparado ao levonorgestrel, o Regime de Yuzpe apresenta maior taxa de falha e é escolhido apenas se o levonorgestrel não estiver disponível. A frequência e a intensidade dos efeitos colaterais também são maiores neste regime (BRASIL, 2010). Para os AE, estima-se que o índice de falha seja de aproximadamente 2% e o índice de efetividade, em média, de 75%. Isto nos mostra que após uma relação sexual desprotegida, este é capaz de evitar três em cada quatro gestações. Nos três primeiros dias, a taxa de falha é de 3,2% para o método de Yuzpe e de 1,1% para o levonorgestrel (BRASIL, 2005).

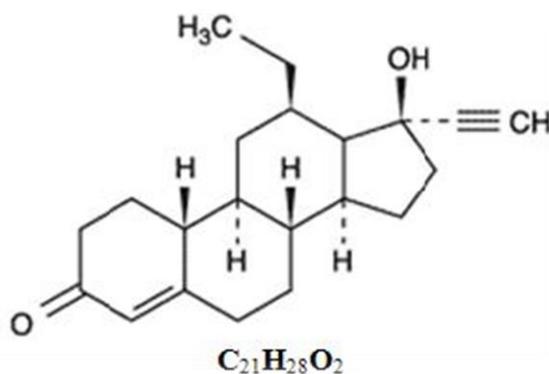
O mecanismo de ação do levonorgestrel depende da fase do ciclo menstrual em que ele é usado. Dessa forma, ele pode causar atraso na ovulação, alterar a resposta endometrial e também pode alterar a motilidade tubária e a função do corpo lúteo, alterando a fecundação. Contudo, se já houver iniciado o processo de nidação, este contraceptivo perde sua eficácia. Em casos de fecundação, não há evidências que este medicamento cause efeitos nocivos para o embrião, nem que este piore o prognóstico da gestação (NOGUEIRA; REIS; POLI NETO, 2000).

Os progestogênios puros podem causar efeitos colaterais, como náuseas e vômitos, sendo que a incidência aproximada é de 16% de náuseas e 3% de vômitos. Se após as duas horas de ingestão houver vômitos, a dose deve ser repetida. Existem ainda os efeitos secundários com duração de menos de 24 horas, como cansaço, aumento da sensibilidade das mamas e cefaleia. Além disso, a utilização destes faz com que a pacientes

sangre 14 a 21 dias após o tratamento (NOGUEIRA; REIS; POLI NETO, 2000).

A fórmula química do levonorgestrel é  $C_{21}H_{28}O_2$  (Figura 1) e ele apresenta diversos metabólitos, como 3- $\alpha$ -, 5- $\beta$ - e 3- $\alpha$ ,5- $\alpha$ -tetraidrolevonorgestrel, com 16-beta hidroxilevonorgestrel também identificado. Há também os metabólitos urinários hidroxilados nas posições 2- $\alpha$  e 16- $\beta$ , e em baixas quantidades, há metabólitos presentes no plasma nas formas conjugadas de sulfatos e glicuronídeos. Contudo, a atividade biológica de seus metabólitos ainda não está estabelecida (SILVA *et al.*, 2011).

**Figura 1.** Fórmula química do levonorgestrel.



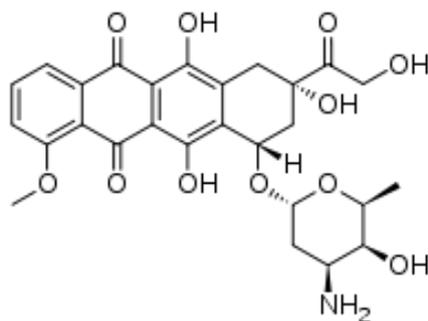
Fonte: <http://www.drugs.com/pro/next-choice.html>

### 2.3. Doxorrubicina (DXR)

A doxorrubicina (DXR) é um antineoplásico muito utilizado na terapêutica, principalmente no tratamento de leucemias e tumores sólidos (CANDIDO, 2013). Esta foi descoberta em 1960, isolada a partir de culturas fúngicas de *Streptomyces peucetius var. caesius*. É mais utilizada na oncologia humana e, em menor extensão, na oncologia veterinária (SILVA; CAMACHO, 2005).

Na estrutura da DXR há um anel de antraciclina (Figura 2) que se intercala entre os pares de nucleotídeos do DNA, nas fases de transcrição e replicação. Porém, esta é capaz de produzir radicais livres reativos, que lesam a membrana celular e o DNA; por isso, deve-se limitar as doses a serem administradas (MINOTTI *et al.*, 2004 *apud* CANDIDO, 2013).

**Figura 2.** Estrutura química da doxorubicina (DXR)



**Fonte:** [https://www.researchgate.net/figure/299447373\\_fig8\\_Figura-16-Estrutura-quimica-da-Doxorubicina](https://www.researchgate.net/figure/299447373_fig8_Figura-16-Estrutura-quimica-da-Doxorubicina). Acesso em 22 de fevereiro de 2016.

A DXR apresenta diversos mecanismos de ação, incluindo a intercalação do DNA, inibindo a síntese de proteínas e a formação de radicais livres, e inibição de enzimas topoisomerasas. Principais toxicidades associadas à doxorubicina são a supressão da medula óssea, náuseas, vômitos e alterações gastrointestinais como diarreia. Além disso, há toxicidade do miocárdio (LORI; STEIN; THAMM, 2010). As patologias que resultam do efeito cardiotoxíco da doxorubicina são caracterizadas, clinicamente, por insuficiência cardíaca congestiva (ICC), hipotensão, anormalidades eletrocardiográficas, arritmias e morte súbita (SILVA; CAMACHO, 2005).

Este fármaco é pouco absorvido pela via oral, sendo utilizado restritamente por via intravenosa. O seu metabolismo é lento, reduzido e hepático, e sua excreção é feita principalmente pela bile, mas também pelas fezes e pela urina (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMAN, 2012) Segundo Silva e Camacho (2005), a DXR tem capacidade significativa sobre tumores, incluindo alguns que são geralmente refratários a outros fármacos.

Em *Drosophila melanogaster*, a doxorubicina é empregada como controle positivo no teste de detecção de clones de tumores epiteliais (*wts*), induzindo a formação de tumores epiteliais por várias partes de seu corpo (COSTA; OLIVEIRA; NEPOMUCENO, 2011).

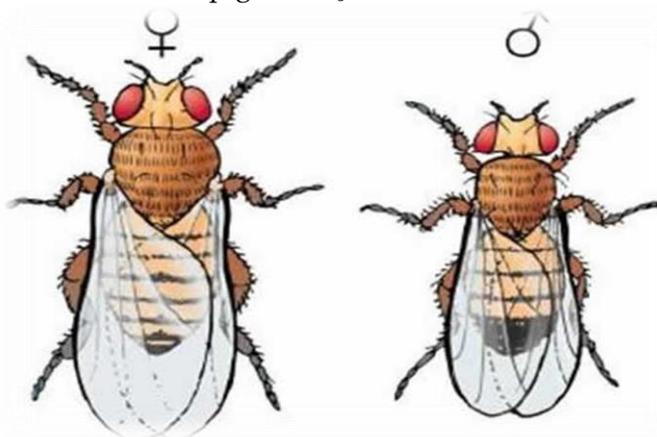
#### **2.4. *Drosophila melanogaster***

O desenvolvimento da genética no Brasil obteve impulso a partir de 1930, e em 1943 os autores brasileiros iniciaram as publicações sobre genética de populações utilizando a *Drosophila melanogaster*. O geneticista Theodosius Dobzhansky, juntamente com geneticistas do grupo de Dreyfus, produziram uma série de publicações individuais e conjuntas sobre estes animais, durante quatro visitas marcantes ao Brasil (ROCHA *et al.*, 2013).

A *Drosophila melanogaster* (Figura 3) é conhecida popularmente como a “mosca da fruta”, normalmente apresenta cor marrom e amarelo e tem cerca de 3 mm de comprimento e 2 mm de largura. Além disso, ela tem a cabeça arredondada, os olhos grandes e vermelhos, e as antenas curtas. O macho é pouco menor que a fêmea e há maior quan-

tidade de pigmentação negra na extremidade posterior do abdome (MILLER, 2000). Pertencente à ordem Díptera, é eucarionte e possui 8 pares de cromossomos, sendo um par sexual (GOMES, 2001).

**Figura 3.** *Drosophila melanogaster*: o macho (direita) é menor e apresenta pigmentação negra na extremidade posterior do abdome e a fêmea (esquerda) é maior, com menos pigmentação.



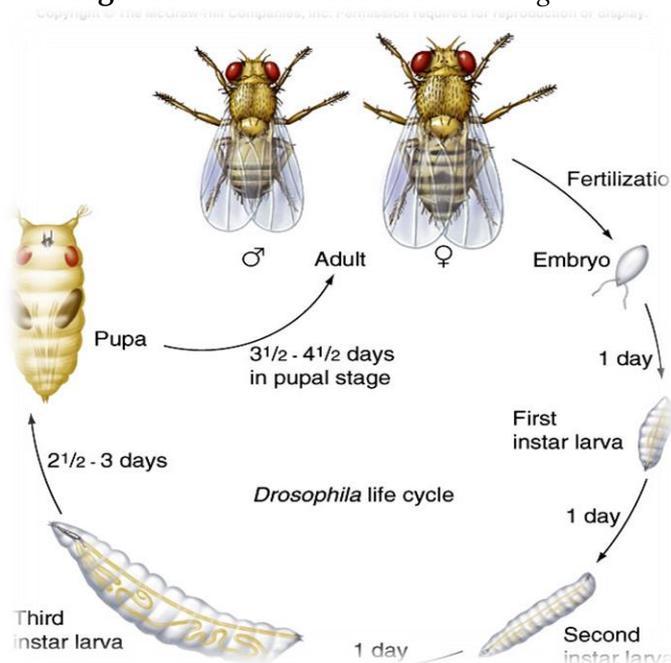
**Fonte:** [http://www.sc.didaxis.pt/hereditariedade/CIENCIA\\_VIVA\\_DSC/IMAGENS/morfologia](http://www.sc.didaxis.pt/hereditariedade/CIENCIA_VIVA_DSC/IMAGENS/morfologia)  
Acesso em 22 de fevereiro de 2016.

Essa mosca tem sido utilizada como material biológico pelos pesquisadores, por ser de fácil manutenção em laboratório, em uma temperatura de 18 a 25°C. Além disso, as *Drosophilas* apresentam poucas exigências quanto ao seu espaço cultural e nutricional e sua morfologia é facilmente analisada através de uma lupa que amplie 20 a 40 vezes (GOMES, 2001). A *D. melanogaster* fornece grande número de indivíduos por progênie e seu rápido ciclo de vida também é uma vantagem para utilização desta espécie (GRAF; SINGER, 1992).

O ciclo de vida (Figura 4) destas é dividido em quatro estágios: ovo, larva, pupa e adulto e leva 12 dias para seu desenvolvimento de ovo até adulto. Os ovos são depositados pelas fêmeas no meio de cultura e o desenvolvimento embrionário leva aproximadamente 24 horas. As larvas de primeiro instar iniciam sua alimentação imediatamente na superfície do meio, enquanto as de segundo e terceiro instar necessitam escavar o meio. A larva de terceiro instar já está madura e deixa o meio para formar a pupa e, em torno de três dias, o adulto emergirá (AMORETTY, 2013).

Em 2000, o genoma da *D. melanogaster* foi sequenciado, e estima-se que este tenha 14.000 genes e 165 milhões de bases. Já o genoma humano possui aproximadamente 22.500 genes e 3.400 milhões de bases. Apesar dessa diferença numérica, ao comparar esses dois genomas, percebe-se que há semelhança devido aos genes homólogos (MANNING, 2008). Além disso, as doenças humanas, como câncer, têm cerca de 70% dos genes correspondentes em *D. melanogaster*, o que possibilita vários estudos utilizando-a como organismo modelo (SEPEL; LORETO, 2010).

**Figura 4.** Ciclo de vida da *D. melanogaster*.



**Fonte:** [http://skenderianscience.weebly.com/uploads/2/6/1/4/26143564/7822724\\_orig.jpg](http://skenderianscience.weebly.com/uploads/2/6/1/4/26143564/7822724_orig.jpg). Acesso em 22 de fevereiro de 2016.

Todas essas características descritas tornam a *D. melanogaster* adequada à análise genética, favorecendo o estudo de patologias humanas, além de ser consideradas exemplos de métodos alternativos ao uso de mamíferos em pesquisas científicas (MORALES, 2008).

## 2.5. **WARTS (WTS):** Teste para detecção de tumores epiteliais em *Drosophila melanogaster*

O teste para detecção de tumores epiteliais, conhecido como *warts* ou *wts*, é utilizado por pesquisadores para testar o efeito carcinogênico e anticarcinogênico de várias substâncias, como extratos de plantas, medicamentos, entre outros.

Este teste utiliza o *wts* como marcador genético (SIDOROV *et al.*, 2001), que é uma mutação recessiva letal em homozigose nas *D. melanogaster* (COSTA; OLIVEIRA; NEPOMUCENO, 2011). Devido a letalidade do *wts*, este é mantido em estoque com a presença de um balanceador cromossômico (*TM3*) (ANDRADE, LEHMANN, 2003). Dessa forma, são obtidas larvas heterozigotas (*wts+/<sup>+</sup>mwh*), por meio do cruzamento entre linhagens *wts/TM3* e *multiple wing hairs (mwh/mwh)* (SIDOROV *et al.*, 2001).

No disco imaginal da mosca heterozigota, existem clones de células homozigotas que durante a metamorfose, se desenvolvem em estruturas do corpo da mosca adulta (como a epiderme), expressando os tumores que se assemelham a verrugas. (EEKEN *et al.*, 2002). Estas células apresentam um ciclo celular equivalente às células somáticas dos mamíferos (COSTA; OLIVEIRA; NEPOMUCENO, 2011). Assim, quando há fatores indutores

de tumores nestas células, pode-se relacionar com o risco de estes induzirem câncer em seres humanos (EKEN *et al.*, 2002).

Há uma diversa classe de genes, conhecidos como genes supressores de tumor, que são responsáveis pela regulação da proliferação celular. Mutações que levam à perda da função destes genes fazem com que haja proliferação descontrolada de células e consequentemente a formação de tumores (WATSON, 1995). Na *D. melanogaster*, o gene *wts* (*warts*) está localizado no cromossomo 3R100A5 e é responsável pela a regulação do ciclo celular, atuando como um supressor de tumor. Este gene possui um homólogo em mamíferos, o LATS1, que está localizado no cromossomo 6q24-25 (EKEN *et al.*, 2002; XIA *et al.*, 2002).

Em casos de deleção deste gene nas *D. melanogaster*, por meio de uma recombinação mitótica nas células somáticas, por exemplo, ocorrerá a formação de clones de células que são fragmentados e arredondados. Isso resultará na hipertrofia apical dos discos imaginários de células epiteliais e induzirá o aparecimento de tumores característicos, similares à verrugas (JUSTICE *et al.*, 1995)

### 3. Metodologia

#### 3.1. Agentes químicos

##### 3.1.1. Levonorgestrel

O levonorgestrel é um fármaco progestogênio totalmente sintético, comercializado na forma de comprimidos. Neste experimento, utilizou-se o medicamento conhecido comercialmente como DIAD®, sendo este adquirido na Farmácia Universitária do Centro Universitário de Patos de Minas (UNIPAM). Os comprimidos adquiridos continham 0,75mg do princípio ativo, e foram diluídos em etanol 5% para preparar as seguintes concentrações: 12 µg/mL, 25 µg/mL, 37,5 µg/mL, com base no estudo de Ferreira *et al.* (2010).

##### 3.1.2. Doxorrubicina (DXR)

O cloridrato de Doxorrubicina (DXR) é um medicamento conhecido comercialmente como Adriblastina® RD. Este possui propriedades antineoplásicas e foi utilizado como controle positivo neste experimento, onde foram diluídos 0,03538g de Adriblastina (DXR) em 25 mL de água osmose reversa, para obtenção de uma concentração de 0,4 mM.

Este medicamento é um pó liofilizado e cada fraco contém 10mg. Ele é composto por doxorrubicina, lactose e metilparabeno, além da doxorrubicina. Sua utilização é restrita para hospitais e laboratórios, sendo empregado especificamente em neoplasias malignas. A forma molecular da DXR é C<sub>27</sub>H<sub>29</sub>NO<sub>11</sub> e apresenta peso molecular de 580,0 g/mol.

### 3.2. Teste para detecção de clones de tumores epiteliais em *Drosophila melanogaster*

As seguintes linhagens mutantes foram utilizadas no teste para detecção de tumores epiteliais (*wts*): *wts* e *mwh*. A linhagem *wts* apresenta um alelo letal em homozigose, *warts (wts) no cromossomo 3 (wts, 3-100)*, sendo necessário a presença de um cromossomo balanceador *TM3* e, fenotipicamente, é caracterizada pela presença de pelos mais grossos e curtos por todo corpo da mosca. Já a linhagem *multiple wing hairs (mwh/mwh)* é mantida em homozigose por ser uma mutação viável e possui o gene marcador no cromossomo 3 (3-0,3) caracterizado por expressar três ou mais pelos em cada célula.

A linhagem *wts* foi cedida pelo Bloomington *Drosophila* Stock Center, da Universidade de Indiana, Estados Unidos, com o número de registro: Bloomington/7052, enquanto a linhagem *mwh/mwh* foi fornecida pelo Dr. Ulrich Graf (Physiology and Animal Husbandry, Institute of Animal Science, ETH Zurich, Schwerzenbach, Switzerland).

No laboratório de Citogenética e Mutagênese do UNIPAM, os estoques dessas linhagens são mantidos e cultivados. Cada uma delas é posta em frascos de ¼ de litro contendo meio de cultura de *D. melanogaster*. Esse meio é composto por 820 mL de água; 25g de fermento (*Saccharomyces cerevisiae*); 11 g de ágar; 156 g de banana e 1g de nipagin. Estas são conservadas em uma incubadora B.O.D. 411 D, com temperatura de aproximadamente 25° C e umidade a 60%, com fotoperíodo de 12 horas.

#### 3.2.1. Cruzamento

O cruzamento foi realizado entre fêmeas virgens *wts/TM3,Sb1* com machos *mwh/mwh*. Estes foram colocados juntos em frascos contendo meio de cultura próprio para postura, e foi o local onde as moscas fêmeas depositaram seus ovos. Deste cruzamento, foram obtidas larvas heterozigotas *wts +/- mwh*, após 72 horas. Após esse procedimento, as larvas foram tratadas com os agentes químicos testados e posteriormente analisadas. Contudo, as análises foram realizadas apenas em moscas adultas que apresentaram pelos longos e finos fenotipicamente. As demais moscas, que tinham pelos curtos e grossos, não foram analisadas por não apresentarem o gene em estudo e, por isso, foram descartadas.

#### 3.3. Procedimento experimental

Após o cruzamento entre fêmeas virgens *wts/TM3,Sb1* com machos *mwh/mwh*, foi realizado a coleta dos ovos por um período de 8h. Para isso, as moscas foram transferidas para frascos contendo meio de cultura para postura. Este meio próprio para postura é composto por uma base sólida de ágar contendo 4% de ágar em água e uma camada de fermento (*S. cerevisiae*) suplementado com açúcar. Após esse período as moscas foram retiradas para o desenvolvimento dos ovos.

Aproximadamente 72 horas após a coleta, as larvas foram lavadas em água corrente com o auxílio de uma peneira de malha fina e transferidas para recipientes contendo 1,5 g de meio de purê de batatas (meio alternativo para *Drosophila*).

No cotratamento, as larvas foram colocadas em frascos de 2,5 cm de diâmetro, 8,0 cm de altura, contendo meio de cultura instantâneo para *Drosophila sp.* e 5mL da associação entre DXR e as diferentes concentrações de levonorgestrel. Outro grupo de larvas foi tratado apenas com as concentrações isoladas de levonorgestrel.

Além destas concentrações, foram inclusos grupos controles. O grupo controle positivo utilizou a DXR a 0,4mM e o controle negativo utilizou o etanol 5%. Nesta etapa do tratamento as larvas ficam expostas aos agentes químicos testados por um período de aproximadamente 48 horas, até ocorrer a empupação.

### 3.4. Análises das moscas

Após se alimentarem dos meios e finalizarem a metamorfose, as moscas já se encontram na sua forma adulta. Estas foram coletadas, transferidas e armazenadas em frascos contendo etanol ( $C_2H_6O$ ) a 70%. Foram obtidas moscas descendentes com pelo curto e com pelo longo. No entanto, foram analisadas apenas as de pelos longos, pois seu fenótipo é selvagem (*wts+/+ mwh*) quanto à presença de tumor.

A análise das moscas com fenótipo de pelo longo e fino foi realizada através da lupa estereoscópica e é baseada na contagem de tumores de acordo com a descrição de Justice *et al.* (1995). Para isso, utilizou-se uma placa escavada contendo glicerina (Glicerol  $C_3H_8O_3$ ), onde as moscas foram colocadas e analisadas individualmente, com o auxílio de um pincel para manuseio. Para registrar a frequência de tumores, foi utilizado um diagrama padrão expressando, quantitativamente, os tumores observados em vários segmentos das moscas, tanto nos olhos, como na cabeça, corpo, asas, pernas e halteres, em cada concentração testada.

### 3.5. Análise estatística

As diferenças estatísticas entre as frequências de tumores das concentrações testadas e os controles (positivo e negativo) foram calculadas usando-se o teste U, não paramétrico, de Mann Whitney, com nível de significância  $p < 0,05$ .

## 4. Resultados e discussão

O teste para detecção de clones de tumores epiteliais em *Drosophila melanogaster* foi utilizado neste trabalho para avaliar a carcinogenicidade do levonorgestrel. Para tanto, foram utilizadas diferentes concentrações do composto (12  $\mu\text{g/mL}$ ; 25  $\mu\text{g/mL}$ ; 37,5  $\mu\text{g/mL}$ ), um controle positivo (DXR a 0,4mM) e um controle negativo (etanol 5%). Foram analisadas 150 moscas de cada concentração e os resultados desta análise estão expressos na Tabela 1.

**Tabela 1.** Frequência de clones de tumores observados em *Drosophila melanogaster*, heterozigotas para o gene supressor de tumor *wts*, tratadas com diferentes concentrações de levonorgestrel isoladas ou associadas à doxorrubicina

Tratamentos		Número de moscas analisadas	Número de tumores analisados							Total	Frequência (Nº de tumores/mosca)
Levonorgestrel (concentração µg/mL)	DXR (mM)		Olho	Ca-beça	Asa	Corpo	Perna	Halter			
0	0	150	0	5	6	11	5	1	28	0,18	
0	0,4	150	6	119	381	258	375	44	1183	7,88*	
12,5	0	150	0	9	5	16	14	1	45	0,30	
25	0	150	2	15	3	18	7	1	46	0,30	
37,5	0	150	2	9	6	22	4	0	43	0,28	
12,5	0,4	150	70	367	839	782	890	154	3102	20,68**	
25	0,4	150	120	486	938	878	1174	174	3770	25,13**	
37,5	0,4	150	115	389	876	723	1085	133	3321	22,14**	

Diagnóstico estatístico de acordo com o teste de Mann-Whitney. Nível de significância  $p \leq 0,05$ .

\* Valor considerado diferente do controle negativo ( $p < 0,05$ ).

\*\* Valor considerado diferente do controle positivo (DXR 0,4mM) ( $p < 0,05$ ).

DXR, doxorrubicina.

Ao analisar os resultados da frequência de tumores dos indivíduos tratados apenas com etanol 5% (Tabela 1), é possível observar uma frequência de tumores de 0,18, devido à predisposição genética da *Drosophila melanogaster*. Já nos indivíduos tratados apenas com o controle positivo é possível notar uma frequência de 7,88 tumores por mosca, demonstrando que a DXR responde de forma significativa a indução tumoral nas linhagens utilizadas no teste. Este efeito também foi comprovado nos estudos de Cardoso e Nepomuceno (2015) e Bontempo e Orsolin (2016) que utilizaram a DXR como controle positivo no teste *wts* e obtiveram como resultados aumentos significativos nas frequências de tumores em todos os segmentos corporais da *D. melanogaster* adulta.

Ao comparar os resultados dos indivíduos tratados, com as concentrações isoladas do levonorgestrel (12, 25 e 37,5 µg/mL) em relação ao controle negativo, verifica-se que não houve aumento significativo na frequência de tumores ( $p > 0,05$ ) (Tabela 1). Portanto, o levonorgestrel não apresentou potencial carcinogênico nas concentrações testadas.

Este resultado corrobora com os resultados encontrados por Ferreira *et al.* (2010), que verificaram a ausência do efeito genotóxico do levonorgestrel nas células somáticas de *D. melanogaster* utilizando este mesmo composto no teste SMART em asa.

A Tabela 1 também mostra os resultados dos indivíduos que foram tratados com levonorgestrel associado à DXR. Nesse caso, é possível observar um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) nas frequências de tumores em todas as concentrações, quando comparadas

ao controle positivo, ficando evidente que o composto testado apresentou efeito modulador capaz de potencializar a ação tumoral da DXR.

Estes resultados comprovam os de Trinh *et al.* (2008), que afirmaram que as mulheres que foram diagnosticadas com câncer de mama invasivo sem metástase durante o uso do sistema intrauterino liberador de levonorgestrel, apresentaram pior prognóstico, quando comparadas com as que tiveram inserção após o tratamento de câncer e com as que não tinham utilizado o sistema.

O levonogestrel é um esteroide sintético que apresenta afinidade com receptores de progesterona (LAU; AFFANDI; ROGERS; 1999). Assim como a progesterona, o levonogestrel ao se ligar com os receptores de progesterona podem exercer regulação da expressão genética, além de afetar a proliferação e diferenciação celular nos tecidos alvos (DRUGBANK, 2017). Com relação ao efeito proliferativo, de acordo com Maruo *et al.* (2007), em estudo *in vitro* com células de leiomioma uterinas cultivadas, revelou-se que os receptores de progesterona (P(4)) são capazes de estimular atividades proliferativas ao aumentar a expressão de fator de crescimento epidermal (EFC). Mirkin, Wong e Archer (2005) complementam que progestágenos como o levonogestrel podem, ainda, aumentar o RNAm do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) em células de câncer de mama T47-D, relacionado com o crescimento do câncer de mama. Logo, os possíveis efeitos proliferativos e angiogênicos apresentados para levonogestrel podem estar relacionados com o aumento de tumores na presente pesquisa. Além disso, este esteroide é capaz de alterar a permeabilidade da membrana, permitindo a entrada de DXR para as células (DRUGBANK, 2017).

Todavia, os mecanismos diretamente envolvidos com o aumento na frequência de tumores quando o levonogestrel foi associado à DXR não foram diretamente avaliados nesse estudo; portanto, novos estudos devem ser conduzidos com esse propósito. Dessa forma, o tratamento de pacientes com o quimioterápico DXR em uso de levonogestrel deve ser considerado, diante dos resultados encontrados neste estudo.

Os resultados obtidos no presente trabalho diferem da maior parte dos estudos existentes até o momento, pois a maioria deles sugere efeito anticarcinogênico do levonogestrel. Arnes, Hvinge e Orbo (2014) observaram que a ocorrência de pequenos pólipos hiperplásicos endometriais foi reduzida pelo uso do sistema intrauterino liberando 20µg de levonogestrel por 24 h na mucosa uterina, reduzindo a necessidade de histerectomia nestas pacientes. Backman *et al.* (2005) também afirmam em estudo caso-controle que as usuárias do sistema intrauterino liberador de levonogestrel não apresentaram aumento na incidência de câncer de mama, quando comparadas a população feminina finlandesa média.

Contudo, há uma carência de estudos clínicos randomizados a longo prazo em pacientes com câncer, principalmente de mama, utilizando levonogestrel para avaliar recorrência da doença e seu mecanismo de ação associado ao quimioterápico.

## 5. Considerações finais

A partir dos resultados encontrados nas presentes condições experimentais, pode-se concluir que levonorgestrel não apresentou potencial carcinogênico nas concentrações testadas. Contudo, apresentou efeito modulador, sendo capaz de potencializar os danos induzidos pela DXR em *D. melanogaster*. Assim, partindo dessas ações do levonorgestrel, é possível sugerir que sua utilização como coadjuvante no tratamento do câncer não é viável. Dessa forma, fica expressa a necessidade de novas investigações com ênfase em humanos.

## Referências

- AMORETTY, P.R.; PADILHA, K.P.; FREITAS, R.T.; BRUNO, R.V. Uso de *Drosophila melanogaster* como modelo para o estudo do relógio circadiano em insetos vetores. *AS&T*. v.1, n. 1, 2013.
- ANDRADE, H.H.R.; LEHMANN, M. Teste para detecção de mutação e recombinação somática (SMART) em *Drosophila melanogaster*. Ribeiro LR, Salvadori DMF, Marques EK. *Mutagenese ambiental*, Canoas: Editora ULBRA, p. 281-307, 2003.
- ARNES, M.; HVINGEL, B.; ORBO, A. Levonorgestrel-impregnated Intrauterine Device Reduces Occurrence of Hyperplastic Polyps: A Population-based Follow-up Cohort Study. *Anticancer Research*, v. 34, n. 5, p. 2319-2324, 2014.
- BACKMAN, T.; RAURAMO, I.; JAAKKOLA, K.; INKI, P.; VAAHTERA, K.; LAUNONEN, A.; KOSKENVUO, M. Use of the levonorgestrel-releasing intrauterine system and breast cancer. *Obstet Gynecol*, v. 106, n. 4, p. 813-7, 2005.
- BONTEMPO, N. J. S.; ORSOLIN, P. C. Avaliação do efeito anticarcinogênico do extrato de folhas de manga (*Mangifera indica* L.) por meio do teste para detecção de clones de tumores epiteliais em *Drosophila melanogaster*. *Perquirere*, v. 13, n. 1, p. 238-254, jul. 2016.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE. Departamento de Ações Programáticas Estratégicas. Área Técnica de Saúde da Mulher. *Anticoncepção de emergência, perguntas e respostas para profissionais de saúde*. Brasília, 2005. Disponível em: [http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/anticoncepcao\\_emergencia\\_perguntas\\_respostas\\_2ed.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/anticoncepcao_emergencia_perguntas_respostas_2ed.pdf). Acesso em: 18 de fevereiro de 2016.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE. Departamento de Ações Programáticas Estratégicas. *Prevenção e tratamento dos agravos resultantes da violência sexual contra mulheres e adolescentes*. Brasília, 2010. Disponível em: [http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/prevencao\\_agravo\\_violencia\\_sexual\\_mulheres\\_3ed.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/prevencao_agravo_violencia_sexual_mulheres_3ed.pdf). Acesso em: 18 de fevereiro de 2016.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE. Departamento de Ações Programáticas Estratégicas. Área Técnica de Saúde da Mulher. *Sistema intrauterino liberador de Levonorgestrel para o tratamento da Menorragia Idiopática*. Brasília, 2013. Disponível em: <http://conitec.gov.br/images/Incorporados/Levonorgestrel-final.pdf>. Acesso em: 18 de fevereiro de 2016.

BRUNTON, L.L.; CHABNER, B.A.; KNOLLMAN, B.C. *Goodman & Gilman: as bases farmacológicas da terapêutica*. 12 ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, p. 1713-1715, 2012.

CARBALLO, M.G.; ROCA, R.A. Anticonceptivos: avances en los últimos cinco años. *Revista Terapêutica*, n. 1589, p. 53-56, Madri, 2006.

CARDOSO, A. C. M.; NEPOMUCENO, J. C. Avaliação do efeito modulador do óleo de alho (*Alium Sativum* L.) sobre a carcinogenicidade da doxorubicina em células somáticas de *Drosophila melanogaster*. *Perquirere*, v. 12, n. 1, p. 160-175, jul. 2015.

CANDIDO, C. D. *Avaliação de Distribuição de doxorubicina incorporada em microemulsão lipídica em tecido tumoral e cardíaco em Camundongos*. Dissertação (Pós Graduação) - Curso de Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Araraquara, 2013.

COSTA, N.F.P.; FERRAZ, E.A.; SOUZA, C.T.; SILVA, C.F.R.; ALMEIDA, M.G. Acesso à anticoncepção de emergência: velhas barreiras e novas questões. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*, v. 30, n. 2, Rio de Janeiro, 2008

COSTA, W.F.; OLIVEIRA, A.B.; NEPOMUCENO, J.C. Lapachol as an epithelial tumor inhibitor agent in *Drosophila melanogaster* heterozygote for tumor suppressor gene wts. *Genetics and Molecular Research*, Ribeirão Preto, v. 10, n. 4, p.3236-3245, 2011.

DANTAS, E.L.R.; SÁ, F.H.L.; CARVALHO, S.M.F.; ARRUDA, A.P.; RIBEIRO, E. M.; RIBEIRO, E. M. Genética do Câncer Hereditário. *Revista Brasileira de Cancerologia*, Rio de Janeiro, v. 55, n. 3, p. 263-269, 2009.

DRUGBANK. *Levonorgestrel*. 2017. Disponível em: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00367>. Acesso em: 16 junh. 2017

EKEN, J. C. J.; KLINK, I; VEEN, B. L. V; PASTINK, A; FERRO, W. Induction of epithelial tumors in *Drosophila melanogaster* heterozygous for the tumor suppressor gene wts. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, v. 40, n. 4, p.277-282, 2002.

FERRARI, C. K.B; TORRES, E. A. F.S. Novos compostos dietéticos com propriedades anticarcinogênicas. *Revista Brasileira de Cancerologia*, Rio de Janeiro, v. 48, n. 3, p.375-382, 2002.

FERREIRA, A.K.S; SILVA, E.M; VIEIRA, I.L.B.F.; FELÍCIO, L.P ; VALE, C.R ; REZENDE, R.D.F ; SILVA, N.F ; CARVALHO, S. Ausência de citotoxicidade do Prevyol (Levonorgestrel) em células

somáticas de *Drosophila melanogaster*. *Congresso Brasileiro de Genética*, São Paulo. Resumos, p. 53, 2010.

GOMES, R. A. P. L. *Protocolo: utilização de Drosophila em Genética: 1ª Parte*. Departamento de Biologia Vegetal, Biologias, 2001. Disponível em: <<http://www.ordembilogos.pt/Publicacoes/Biologias/Droshort%20--%2001Jan01.pdf>>. Acesso em: 22 fev. 2016

GRAF, U.; SINGER, D. Genotoxicity testing of promutagens in the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. v. 8, p. 15-27, 1992.

GUERRA, M.R.; GALLO, C.V.M.; MENDONÇA, G.A.S. Risco de Câncer no Brasil: Tendências e Estudos Epidemiológicos Mais Recentes. *Revista Brasileira de Cancerologia*, p.227-234, 2005.

INCA- INSTITUTO NACIONAL DE CANCER. *Câncer: o que é*. Rio de Janeiro, 1996. Disponível em: [http://www1.inca.gov.br/conteudo\\_view.asp?id=322](http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=322). Acesso em: 20 fev. 2016.

INCA- INSTITUTO NACIONAL DE CANCER. *Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil*. Rio de Janeiro, 2015. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/estimativa-2016-v11.pdf>. Acesso em: 15 junh. 2017.

JUSTICE, R. W; ZILIAN, O; WOODS, D. F; NOLL, M; BRYANT, P. J. The *Drosophila* tumor suppressor gene *warts* encodes a homolog o-f human myotonic dystrophy kinase and is required for the control of cell shape and proliferation. *Genes & Development*, v. 9, p. 534-546, 1995.

LAU, T.M.; AFFANDI, B.; ROGERS, P.A. Os efeitos dos implantes de levonorgestrel na expressão do fator de crescimento endotelial vascular no endométrio. *Academic Oxford, Mol Hum Reprod*, v. 1, n. 5, p. 57-64, jan. 1999.

LINHARES, J.J., SILVA, I.D.C.G., SOUZA, N.C.N., NORONHA, E.C., FERRARO, O., BARACAT, F.F. Polimorfismo do gene do receptor de progesterona (PROGINS) em mulheres com câncer de mama. Estudo caso-controlado. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*, v. 27, n. 8, p. 473-8, 2005.

LORI, J. C.; STEIN, T. J.; THAMM, D. H. Doxorubicin and cyclophosphamide for the treatment of canine lymphoma: a randomized, placebo-controlled study\*. *Veterinary And Comparative Oncology*, [s.l.], v. 3, n. 8, p.188-195, maio 2010.

LOPES, AA; OLIVEIRA, A.M.; PRADO, C.B. Principais Genes que participam da formação de tumores. *Revista de Biologia e Ciências da Terra*, v. 2, n. 2, 2002.

MANNING, G. *A introdução rápida e simples de Drosophila melanogaster*. 2008. Disponível em: <<http://www.ceolas.org/fly/intro.html>>. Acesso em: 27 fev. 2015

MARTIN, A. La anticoncepción de emergencia em América Latina y el Caribe. *Revista Panamericana de Salud Pública/ Pan American Journal of Public Health*, v. 16, n. 6, p. 424-431, 2004.

MARUO, T.; OHARA, N.; MATSUO, H.; XU, Q.; CHEN, W.; WARE, R.S.; JONANSSON, E.D.B. Effects of levonorgestrel-releasing IUS and progesterone receptor modulator PRM CDB-2914 on uterine leiomyomas. *Elsevier - Contraception*, New York, n. 75, p. 99-103, jan. 2007.

MILLER, C. 2000. "*Drosophila melanogaster*". *Animal Diversity Web*. Disponível em: [http://animaldiversity.org/accounts/Drosophila\\_melanogaster/](http://animaldiversity.org/accounts/Drosophila_melanogaster/). Acesso em 18 de fevereiro de 2016.

MIRKIN, S.; WONG, B.C.; ARCHER, D.F. Effect of 17-estradiol, progesterone, synthetic progestins, tibolone, and tibolone metabolites on vascular endothelial growth factor mRNA in breast cancer cells. *Fertility and Sterility – Elsevier*, v. 84, n. 2, agost. 2005

MORALES, M. M. Métodos alternativos à utilização de animais em pesquisa científica: mito ou realidade? *Experimentação Animal/Artigos*, v.60, n.2, p.33-36, 2008.

NOGUEIRA, A.A; REIS, F.J.C, POLI NETO, O.B. *Anticoncepcionais de emergência – por que não usar?* Medicina, Ribeirão Preto, n. 33, p. 60-63, 2000.

PEDRO, J.M. A experiência com contraceptivos no Brasil: uma questão de geração. *Revista Brasileira de História*. v. 23 n. 45, São Paulo, 2003

PONTES, L.B. *Câncer benigno e maligno*. 2013. Albert Einstein Sociedade Beneficente Israelita Brasileira. Disponível em: <<http://www.einstein.br/einstein-saude/em-dia-com-a-saude/Paginas/cancer-benigno-e-maligno.aspx>>. Acesso em: 20 fev. 2016

RESENDE, P. A. *Avaliação citogenética da resposta ao tratamento quimioterápico em mulheres portadoras de câncer de mama*. 2007. 76 f. Tese (Mestrado em Patologia Clínica) - Programa de Pós-graduação em Patologia, Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, 2007.

ROCHA, L. D. L. S.; FARIA, J. C. N. M.; CRUZ, A. H. S.; REIS, A. A. S.; SANTOS, R. S. *Drosophila*: um importante modelo biológico para a pesquisa e o ensino de Genética. *Scire Salutis*, Aquidabã, v. 3, n. 1, p. 37-48, 2013

SEPEL, L. M N; LORETO, É. L S. UM SÉCULO DE DROSOPHILA NA GENÉTICA. *Genética na Escola*, Ribeirão Preto, v. 2, n. 5, p. 42-47, 2010.

SIDOROV, R. A.; UGNIVENKO, E.G.; KHOVANOVA, E.M.; BELITSKY, G.A.; Induction of tumor clones in *D. Melanogaster* wts/+ heterozygotes with chemical carcinogens. *Mutation Research*, v. 498, p. 181-191, 2001.

SILVA, C.; SOUZA, E.; GONÇALVES, K.; DAME, U. *Revisão da Literatura: contracepção de emergência – “Pílula do dia seguinte”*. Fernandópolis: FIFE/FEF, pp. 18-21, 2011.

SILVA, C.E.V.; CAMACHO, A.A. Alterações ecocardiográficas em cães sob tratamento prolongado com doxorubicina. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. vol. 57, n. 3. Belo Horizonte, junho 2005.

SOUTO, R.; FALHARI, J.P.B.; CRUZ, A.D. O Papilomavírus Humano: um fator relacionado com a formação de neoplasias. *Revista Brasileira de Cancerologia*, v. 51, p. 2, p. 155-160, 2005.

TRINH, X.B.; TJALMA, W.A.; MAKAR, A.P.; BUYTAERT, G.; WEYLER, J.; DAM, P.A. Use of the levonorgestrel-releasing intrauterine system in breast cancer patients. *Fertil Steril*, v. 90, n. 1, p. 17-22, 2008.

WANNMACHER, L. Anticoncepcionais Orais: o que há de novo. *Ministério da Saúde*, v. 1, n. 1, Brasília, 2003.

WATSON, K.L. *Drosophila* warts--tumor suppressor and member of the myotonic dystrophy protein kinase family. *Bioessays*, v. 17, n. 8, p. 673-6, 1995

XIA, H.; HUILIN, Q.; LI, Y.; PEI, J.; BARTON, J.; BLACKSTAD, M.; XU, T.; TAO, W. LATS1 tumor suppressor regulates G2/M transition and apoptosis. *Oncogene*. v. 21, n. 8, p. 1233-1241, 2002.