

Genotoxicidade do anastrozol avaliado por meio do Teste para Detecção de Mutação e Recombinação Somática (SMART) em *Drosophila melanogaster*

Dagmar Leles Cunha

Graduanda em Enfermagem pelo Centro Universitário de Patos de Minas.
e-mail: dagleles@hotmail.com

Júlio César Nepomuceno

Professor Associado do Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia.
Professor Titular do Centro Universitário de Patos de Minas. e-mail: nepomuceno@ufu.br

Resumo: Anastrozol é utilizado como hormonioterapia na adjuvância do tratamento contra o câncer de mama que, até recentemente, era baseada, principalmente, no uso do tamoxifeno. O anastrozol inibe a enzima aromatase e leva a uma redução da ação do estrógeno, reduzindo o estímulo causado pelo estriol na célula neoplásica. Em razão da imaturidade do fármaco no mercado, com ampla aceitação e indicação, surge concomitantemente a necessidade da avaliação do seu potencial genotóxico, sendo este o objetivo principal do presente trabalho. Tal avaliação foi realizada por meio do teste para detecção de mutação e recombinação somática (SMART) em *Drosophila melanogaster*. Para tanto, foram utilizadas larvas de 72 horas provenientes dos cruzamentos padrão (ST) e alta capacidade de bioativação (HB). As larvas, provenientes de ambos os cruzamentos, foram tratadas com diferentes concentrações de anastrozol (0,08; 0,16; 0,24 mg/mL). Foram utilizados água (osmose reversa) como controle negativo e Doxorubicina (DXR) (0,125 mg/mL) como controle positivo. A análise demonstrou que não houve aumento nas frequências de manchas mutantes, nos descendentes MH do cruzamento ST, quando tratados com as diferentes concentrações de anastrozol. Por outro lado, quando indivíduos descendentes do cruzamento de alta bioativação (HB) foram tratados com as mesmas concentrações de anastrozol, foi verificado um aumento no número de manchas mutantes, nas maiores concentrações (0,16 e 0,24 mg/mL). Nos indivíduos tratados com as associações anastrozol e o quimioterápico DXR foi verificada uma redução no número de manchas mutantes, induzidas por este quimioterápico, em todas as concentrações testadas e em ambos os cruzamentos (ST e HB). Podemos concluir que, nestas condições experimentais, o anastrozol apresentou atividade genotóxica indireta, ou seja, necessitou da ação das enzimas citocromo P450 (CYP-450) para se tornar genotóxico. Na associação anastrozol mais DXR ocorreu um efeito modulador entre os dois compostos, que reduziu a genotoxicidade da DXR.

Palavras-chave: Anastrozol. SMART. Doxorubicina. Efeito modulador

Abstract: Anastrozole is used as hormone-therapy in the adjuvant treatment against breast cancer, which until recently was based especially on the use of tamoxifen. Anastrozole inhibits the aromatase enzyme, and it leads to a reduction of the action of estrogen, reducing the stimulus caused by estriol in the neoplastic cell. Because of the immaturity of the medicine, with ample acceptance and indication, there is simultaneously a need of evaluation of its genotoxic potential, and this is the main objective of the present work. Such evaluation was made through

the Somatic Mutation and Recombination Test (SMART) in *Drosophila melanogaster*. This way, we used larvae of 72 hours proceeding from standard (ST) cross and high capacity of bioactivation. The larvae, proceeding from both crosses, were treated with different concentrations of anastrozole (0.08; 0.16; 0.24 mg/mL). We used water (reverse osmosis) as negative control and Doxorubicin (DXR) (0.125 mg/mL) as positive control. The analysis showed that there was no increase in the frequencies of mutant spots, in MH descendants of ST cross, when treated with different concentrations of anastrozole. On the other side, when individuals descending from the high bioactivation (HB) cross were treated with the same concentrations of anastrozole, we could observe an increase in the number of mutant spots, in the highest concentrations (0.16 e 0.24 mg/mL). In the individuals treated with the association anastrozole and the chemotherapeutic DXR, we could observe a decrease in the number of mutant spots, induced by this chemotherapeutic, in all tested concentrations and in both crossed (ST and HB). We can conclude that, in these experimental conditions, anastrozole presented an indirect genotoxic activity, that is, it needs the action of the enzyme cytochrome P450 (CYP-450) so as to become genotoxic. In the association anastrozole and DXR, there was a modulator effect between the two compounds, which reduced the genotoxicity of DXR.

Keywords: Anastrozole. SMART. Doxorubicin. Modulator effect.

1. Introdução

1.1. Correlação entre mutação e câncer

O termo “mutação” refere-se a qualquer alteração sobre o DNA, sendo um processo fundamental para a evolução das espécies, fornecendo nova variabilidade genética, permitindo assim a adaptação dos organismos às mudanças do meio ambiente. Porém, após passar por sucessivas mutações, poderá determinar a perda do controle da divisão celular e o aparecimento de tumores e aberrações (RIBEIRO, MARQUES, 2003; SNUSTAD, SIMMONS, 2001).

As chamadas mutações espontâneas, derivadas de erros na replicação do DNA, podem acontecer naturalmente, por lesões e por inserção de elementos de transposição. As mutações induzidas surgem após tratamento proposital ou exposição a agentes exógenos, denominados mutagênicos; esses agentes podem acelerar ou aumentar o aparecimento de mutações (BROWN, 1999; BURNS; BOTTINO, 1991; LOURO, 2002; RIBEIRO, MARQUES, 2003; SNUSTAD; SIMMONS, 2001).

Os mutágenos induzem transformações por três vias: eles podem substituir as bases do DNA, alterá-las formando um mau pareamento ou danificá-las de modo que não mais se pareiem. As células têm um sistema de reparo, utilizando um filamento do DNA como molde para correção dos danos; porém, se este por sua vez se apresentar com a dupla-hélice danificada, as mutações gerarão uma gama de anomalias cromossômicas, resultando na morte celular ou aparecimento de câncer (SUZUKI; GRIFFITHS; LEWONTIN 2006).

Deste modo, torna-se clara a interligação entre mutagênese e carcinogênese. A mutação é o estágio inicial pelo qual grande parte dos carcinógenos inicia o tumor.

1.2. Câncer de mama

O câncer (CA) é um distúrbio genético, uma vez que é desencadeado por alterações no DNA, havendo perda do controle do crescimento celular. Origina-se de uma única célula normal que acumula mutações após sucessivas divisões. Após serem expostas a agentes onco-promotores, as células iniciam um processo de multiplicação descontrolada e irreversível, diminuem a suscetibilidade à apoptose e aumentam a taxa de mutação. Sem regulação as células multiplicam-se e acumulam-se umas sobre as outras formando tumores (STRANCHAN; READ, 2002; UCHIMURA *et al.*, 2006).

Atualmente reconhece-se que certas substâncias e produtos químicos apresentam risco potencial de promover modificações no DNA que, por sua vez, quando não reconhecidas e reparadas passam a desencadear alterações no genoma, por meio de pontos de mutação, deleção, amplificação genética ou rearranjos (ZORDAN *et al.*, 1994).

O aumento de pessoas com câncer deriva da associação dos seguintes fatores: aumento da expectativa de vida; maior número de exposição a mutagênicos; ampla escala de substâncias carcinogênicas; alimentação inadequada e, ainda, associada à inúmera quantidade de agrotóxicos utilizados; sedentarismo; etilismo; tabagismo e história familiar. Segundo dados do INCA (Instituto Nacional do Câncer), as neoplasias mais estimadas no Brasil para 2010 são os carcinomas mamários e prostáticos (INCA, 2010).

O câncer de mama no Brasil é o mais prevalente entre o sexo feminino entre 40-69 anos, sendo a maior causa de morte nesta classe (TRUFELLI *et al.*, 2008).

Com o aumento da população feminina e significativamente da terceira idade, e por ser o CA de mama, segundo dados do INCA (2010), o maior causador de mortes em mulheres entre 40-69 anos (TRUFELLI *et al.*, 2008), a ciência prevê a necessidade de práticas direcionadas à etiologia, tratamento e desencadeadores mutagênicos e carcinogênicos, visando ao controle de tal patologia.

Os hormônios estrógeno e progesterona têm atividade proliferativa no tecido mamário normal e, por tal fator, acredita-se que estejam envolvidos no aumento do número de células susceptíveis ao crescimento seletivo das células malignas na carcinogênese.

Existem inúmeros tipos de câncer de mama, como por exemplo: Carcinoma ductal; C. lobular infiltrante; C. inflamatório; Doença de Paget; Sarcomas; Fibroadenomas, sendo o último, por sua vez, o mais comum entre mulheres jovens entre 20 e 25 anos, frequentes no quadrante superior externo da mama esquerda (ESTEVÃO; NAZARIO; BARACAT, 2007).

Encontram-se geneticamente alterados e aberrantemente expressados nos tumores mamários os proto-oncogenes: *C-MYC* fator essencial no controle da proliferação celular; *c-erbB-2* associado ao comportamento agressivo do tumor e pior prognóstico e o *INT-2* envolvido na transformação da de célula mamária. Entre 1990-1994 identificou-se que portadores de mutações nos genes *BRCA1* E *BRCA2* (genes responsáveis pela proteção e reparo do DNA), têm 85% de probabilidade de desenvolvimento de CA de mama (CHAVES *et al.*, 1999).

Quantificações de alterações genéticas ao nível celular são de grande interesse, uma vez que podem ajudar a elucidar a iniciação, desenvolvimento e progressão tumoral (CHAVES *et al.*, 1999).

A sintomatologia do CA é variável, tendo em vista que as mutações malignas podem ocorrer em todas as células do organismo e será definida de acordo com o local onde se instalar. Para diagnóstico, salvo raríssimas exceções, necessita-se da realização de biópsia para análise anatomopatológica (VARELLA; JARDIM, 2009).

Existe atualmente ampla gama de tratamentos contra o CA. A escolha basear-se-á no estadiamento, que é o processo de avaliação da extensão da doença, e apresenta-se também como importante indicador de prognóstico. O estadiamento é dividido em clínico, cirúrgico e anatomopatológico. O estadiamento clínico é definido como: estágio 1) fase inicial; estágio 2) fase intermediária; estágio 3) fase avançada e estágio 4) metástase (VARELLA, JARDIM, 2009).

Inúmeras são as possibilidades de escolha do tratamento para o CA, tais como: cirúrgica; radioterápica definitiva, adjuvante, neoadjuvante, paliativa e combinada, sendo por braquiterapia, intraoperatória, radiocirúrgica estereotática, irradiação de todo o corpo ou radionuclídeos; terapia alvo; transplantes; imunoterapia; terapia gênica; quimioterapia e hormonioterapia (VARELLA; JARDIM, 2009).

1.3. Quimioterapia

O tratamento quimioterápico pode ser curativo, neoadjuvante (prévio), paliativo (controle e alívio dos tumores), ou adjuvante (após o tratamento principal com o objetivo de reduzir risco de metástase) (UCHIMURA *et al.*, 2006).

Segundo Varella e Jardim (2009), o termo *quimioterapia* refere-se ao tratamento de doenças por meio de substâncias químicas que afetam o funcionamento celular; porém, é mais conhecido como definição para tratamento antineoplásico. Durante a Segunda Guerra Mundial, em uma pesquisa com mostarda nitrogenada, gás venenoso, os médicos do exército norte-americano descobriram que os técnicos que manipulavam o produto apresentavam considerável baixa no número de leucócitos, células estas que por sua vez estão em maior número em pacientes com leucemia. Esta foi a primeira demonstração da possibilidade de tratar leucemias com drogas químicas, como é o caso dos citostáticos, que por sua vez são medicamentos que apresentam mecanismos de ação diversos, mas com a mesma característica comum de interromper o ciclo celular em alguma das fases. Trata-se de fármacos muito ativos e com elevada toxicidade potencial que, em exposição contínua ou prolongada, têm aspectos mutagênicos, embriotóxicos, teratogênicos e carcinogênicos (UCHIMURA *et al.*, 2006).

A quimioterapia visa diminuir ou cessar a atividade do tumor. É um tratamento complexo que interfere na produção de proteínas e bloqueia processos metabólicos comuns do tumor aos tecidos saudáveis, que acabam sendo afetados de forma indesejada pela medicação.

Os fármacos são classificados em: ciclo inespecíficos, ciclo específicos (atuam na divisão celular) e fase específicos (somente em uma determinada fase do ciclo). Quan-

do se utiliza somente um agente quimioterápico é denominada monoquimioterapia; dois ou mais, poliquimioterapia, que por sua vez tem grande risco de sinergismo, e expõe maior número de células (UCHIMURA *et al.*, 2006).

Dentre os diversos mecanismos pelos quais os quimioterápicos interferem na divisão celular, os mais comuns são: destruição da molécula de DNA, após sua divisão; decomposição de enzimas e proteínas necessárias para a síntese de DNA, ou bloqueiam as enzimas de reparo. Por ter interferência inespecífica no ciclo celular, qualquer célula em processo de divisão será afetada, sendo ela neoplásica ou normal. Tecidos que apresentem rápida mitose celular (como por exemplo, pele, cabelo, mucosa) são os mais afetados (VARELLA; JARDIM, 2009).

Teoricamente a quimioterapia isoladamente é incapaz de eliminar a última célula tumoral, pois os quimioterápicos agem somente em determinadas fases do ciclo celular, destruindo, assim, somente as células que se encontrem nessa fase (VARELLA; JARDIM, 2009). Deste modo, as associações de drogas que atuam em diferentes fases do ciclo aumentam o espectro de ação do tratamento, por meio do chamado sinergismo por potencialização que, por sua vez, deve conter drogas que não apresentem toxicidade pelos mesmos tecidos.

Sendo a indicação de tratamento adjuvante cada vez mais ampla no tratamento de câncer de mama, na tentativa de controle da patologia, há um crescente uso precoce de quimioterapia, antes mesmo da abordagem cirúrgica. Porém, essa ampla abordagem de tratamento antes de um exame histopatológico do tumor (baseado apenas na citologia), afeta o futuro planejamento terapêutico, que é embasado no tipo histológico, receptor estrogênico e número de linfonodos axilares acometidos. Portanto, só deve ser administrado em comprovação da relação custo-benefício favorável (CHAVES *et al.*, 1999).

A maioria dos citostáticos, embora tenha a finalidade de curar, melhorar a sobrevivência e/ou promover efeito paliativo, são de natureza tóxica, e sua administração exige grande cuidado e habilidade. Erro durante manuseio ou administração pode levar a efeitos tóxicos graves ao cliente e ao profissional que prepara a medicação.

O tratamento é administrado em ciclos, para que as células normais se recuperem dos danos sofridos, após sucessivas doses quimioterápicas.

Descoberta por Waksman em 1940, por meio de uma cultura em caldo de *Streptomyces*, as actinomicinas deram origem a uma série de antineoplásicos, dentre eles, a Doxorrubicina, que por sua vez é utilizada no tratamento de diversas neoplasias, inclusive as mamas (GILMAN *et al.*, 2006).

A Doxorrubicina, embora muito utilizada, é classificada como vesicante, ou seja, de alta capacidade de agressão tissular, frequentemente associada à necrose, irritação intracelular e ulceração (UCHIMURA *et al.*, 2006). Apresenta propriedades citotóxicas em células cancerígenas e também sobre vários órgãos. Suas manifestações tóxicas mais importantes são: mielossupressão, tromboplastina, anemia, estomatite, perturbações gastrintestinais, manifestações dermatológicas, toxicidade cardíaca e derrame pericárdico (CHABNER *et al.*, 1996; GILMAN *et al.*, 2006; SILVA, 2006).

Dentre as atividades terapêuticas e tóxicas deste antibiótico destaca-se, como principal efeito bioquímico, sua intercalação com o DNA, que culmina na destruição da

célula pelo fármaco, por meio de quebras de mono e bifilamentos, troca de cromátides irmãs e interferência na síntese de RNA. Liga-se covalentemente ao DNA de fita dupla, através de sua intercalação com os pares de base guanina-citosina, inibindo assim sua replicação. Por apresentar capacidade de ligação com a membrana celular, uma gama de funções celulares é afetada, alterando morfologia celular e induzindo apoptose (ANVISA, 2010; GILMAN *et al.*, 2006; KATZUNG, 2006). Sua ação citotóxica tem íntima relação, também, com a inibição da replicação nucleotídica, por meio de sua intercalação com a topoisomerase II, enzima responsável pelo reparo da molécula de DNA. Série de oxidases, redutases e desidrogenases promovem redução enzimática, promovendo liberação de radicais livres altamente reativos da hidroxila.

1.4. Hormonioterapia

Outro tratamento que vem se destacando, tanto em prescrições médicas, quanto no número de pró-fármacos em pesquisa para o mercado farmacêutico da oncologia, é a chamada hormonioterapia, que por sua vez é dividida em ablativa, aditiva, competitiva ou inibitiva.

Sabe-se que diversos tipos de CA apresentam crescimento e disseminação hormoniodependentes. Os hormônios agem como fator de crescimento ao se ligarem aos receptores das células tumorais, sinalizando a ativação gênica responsável pela multiplicação celular. Esse tipo de interferência ocorre em tumores instalados nas mamas, endométrios, ovários, próstata, tireoide e outros (VARELLA; JARDIM, 2009).

A hormonioterapia anticâncer reduz a ação do estrógeno nas células, reduzindo o estímulo causado pelo estriol na célula neoplásica, reduzindo velocidade de multiplicação e induzindo apoptose (CHAVES *et al.*, 1999). A hormonioterapia apresenta dois mecanismos básicos: supressão da produção de hormônios, deste modo privando as células do estímulo desencadeador da divisão, e bloqueio da ligação dos hormônios com seus receptores (VARELLA; JARDIM, 2009).

De acordo com Varella e Jardim (2009), por meio de manipulações hormonais, as principais estratégias de interferências no crescimento tumoral são:

- ✓ Retirada cirúrgica de glândulas endócrinas (ovário/ testículo): privando o organismo da ação hormonal, induz remissão de 40% dos casos de CA de mama disseminado em mulheres pré-menopausa e 80% dos portadores de CA protático disseminado.
- ✓ Doses suprafsiológicas de hormônios: no caso do CA de mama, administração de baixas doses de estrógeno ou progesterona estimula o crescimento tumoral, porém, pode entrar em remissão quando exposto à alta dosagem destes hormônios.
- ✓ Antagonistas hormonais: competem por mesmo sítio de ligação, podendo ser citado o Tamoxifeno, que bloqueia os receptores de estrógeno.
- ✓ Combinação hormonal: sinergismo, que por sua vez não apresenta efeito tão favorável quanto às associações quimioterápicas.

- ✓ Inibidores das enzimas produtoras de hormônios: ao serem inibidas, bloqueia-se a síntese hormonal, privando as células hormoniodependentes do seu fator de crescimento.

A hormonioterapia na adjuvância no tratamento de câncer de mama, até recentemente, era baseada principalmente no uso do Tamoxifeno por um período de cinco anos, ficando os demais fármacos restritos ao caso de contraindicações deste. Recentemente, entretanto, os inibidores da aromatase (IA) de terceira geração, como o anastrozol, têm colocado a supremacia deste em cheque. O anastrozol tem sido descrito há mais de uma década como referência de baixa toxicidade, por apresentar boa resposta e posologia cômoda de um comprimido ao dia (CHAVES *et al.*, 1999).

A enzima aromatase é fundamental na formação de estrógenos na menopausa, é dependente do citocromo P450 e promove conversão de andrógenos a estrógenos e é codificada por gene no cromossomo 15, sendo expressa em diversos tecidos. Na mama ocorre produção local dessa enzima, tornando a concentração de estrógeno mais elevada do que os níveis séricos. Os IA há mais de duas décadas são uma opção terapêutica em câncer de mama; entretanto, os de terceira geração se tornaram um marco por serem extremamente eficientes, bloqueando mais de 98% da aromatização e por apresentarem baixas reações adversas medicamentosas (RAMs) (DAMIANI; DAMIANI, 2007).

1.5. Anastrozol

O anastrozol é um inibidor competitivo de terceira geração da síntese de esteróides (bloqueador específico e altamente potente). Ele se liga seletivamente e inibe reversivelmente a aromatase, que por sua vez faz parte do complexo enzimático do citocromo P-450, encontrada em muitos tecidos, incluindo os dos ovários, antes da menopausa, fígado e mama. No CA de mama estrógeno-dependente, é utilizado no tratamento em mulheres em período pós-menopausa; inibe a conversão periférica de androstenediona e testosterona para estradiol e estrona, bloqueando por completo o estrogênio. Ao contrário do Tamoxifeno, não tem atividade agonista, inibindo assim o crescimento tumoral. Devido ao bloqueio específico não necessita de utilização conjunta de corticosteroides. É metabolizado no fígado, com meia vida de eliminação 50 horas. Em sete dias as concentrações plasmáticas atingem níveis de equilíbrio. Em estudos recentes de comparação do tamoxifeno X anastrozol, os benefícios clínico foram maiores para o inibidor da aromatase, que apresentou perfil de toxicidade muito favorável (DAMIANI; DAMIANI, 2007).

Como a hormonioterapia não induz resposta em todos os pacientes, é de suma importância identificar a probabilidade de resposta em cada caso. No CA de mama, a presença de receptores de estrógenos é detectada por meio da análise anatomopatológica, que por sua vez também indica o prognóstico. O tratamento hormonal provoca remissões em 60 a 75% dos tumores com receptores positivos em menos de 10% no caso de ausência desses receptores (VARELLA; JARDIM, 2009).

O CA é uma das principais causas de óbito em nações desenvolvidas. Estima-se que uma a cada três pessoas terá o diagnóstico de CA (RANG *et al.*, 2007). Como os a-

gentes mutagênicos alteram, aumentam e aceleram o aparecimento de mutações associadas ao desenvolvimento de neoplasias, por conseguinte, a genética toxicológica, cada vez mais, através de bioensaios, concentra suas investigações na detecção de mutações e possíveis agentes genotóxicos e desencadeadores de neoplasias (RIBEIRO; MARQUES, 2003).

Compostos com atividades biológicas continuam sendo desvendados, principalmente quando se refere às suas propriedades tóxicas, carcinogênicas e mutagênicas. A cada droga produzida, antes de seu lançamento no mercado farmacêutico existe a necessidade da realização de testes de genotoxicidade, para estudos detalhados sobre a composição química e toxicidade, pois tais fatores interferem no processo de multiplicação celular, e determinadas substâncias modificam genes específicos ou contribuem para o desenvolvimento de mutações, o que torna os testes genéticos úteis no rastreamento de agentes com potencial genotóxico.

Sendo assim, o objetivo principal deste trabalho foi avaliar a genotoxicidade do anastrozol por meio do teste para detecção de mutação e recombinação somática (Somatic Mutation and Recombination Test - SMART) em *Drosophila melanogaster*.

1.6. Teste para detecção de mutação e recombinação somática (SMART) em *Drosophila melanogaster*

O teste SMART, que detecta mutações e recombinações somáticas, foi desenvolvido por Graf *et al.* em 1984 e é utilizado para detecção de agentes genotóxicos, antígenotóxicos e eventos mutacionais de ponto, deleções, translocações, recombinação mitótica (GRAF *et al.*, 1984; VOGEL; ZILASTRA, 1987).

A *Drosophila melanogaster* ou vulgarmente conhecida como mosca-da-banana foi um dos primeiros organismos a ser usado em genética e, ainda hoje, é utilizado por apresentar curto ciclo de vida, simples cruzamento e cultivo, machos e fêmeas facilmente distinguíveis, grande número de mutantes, linhagens bem caracterizadas, confiabilidade e de baixo custo. Os fenótipos mutantes surgem regularmente em populações de laboratório, e por meio de tratamento com substâncias químicas e/ou radiação, pode-se aumentar a frequência (SUZUKI; GRIFFITHS; LEWONTIN 2006). Este inseto de fácil manipulação e manutenção em laboratório fornece um grande número de indivíduos por progênie, além de apresentar considerável fração de genes homólogos aos do homem.

Estudos de indução e desenvolvimento de tumores em *Drosophila* podem contribuir diretamente para o entendimento de cânceres em seres humanos. Grande número de proto-oncogenes e supressores de tumores de mamíferos são conhecidos em *Drosophila* (EEKEN *et al.*, 2002).

O SMART tem como foco os discos imaginais que, por sua vez, são grupos de células que separadamente se proliferam, diferenciam e desenvolvem estruturas corpóreas da mosca adulta (FREI; WÜRGLER, 1995).

Para realização do teste SMART são utilizadas larvas de três linhagens mutantes de *Drosophila*, portadoras dos marcadores genéticos *multiple wing hairs* (*mwh*, 3-0,3)

e *flare-3* (*flr3*, 3-38,8):

- *mwh/mwh* (*multiple wing hair*): tem um alelo mutante no cromossomo 3, capaz de alterar o fenótipo dos pelos das asas, que são caracterizadas por apresentarem somente um pelo e passam a expressar três ou mais. Apresenta alelo em homozigose.
- *flr³/In(3LR) TM3* (*flr³, flare3*): alelo mutante do cromossomo 3 próximo ao centrômero; altera o fenótipo do pelo das asas, deformando-o ao aspecto de "chama". Não apresenta alelos em homozigose, pois seria letal. No outro cromossomo, um balanceador que tem múltiplas inversões recebe o nome de *TM3 Bds*, faz o balanceamento do alelo mutante. Portanto, a mutação *flr³* será viável, apenas quando algumas células do disco imaginal carregarem a mutação.
- *ORR; flr³/In(3LR) TM3*(*flr³, flare*): construída para aumentar a capacidade metabólica na ativação de promutágenos, por ser caracterizada por um alto nível de citocromo P450 constitutivo.

São realizados cruzamento padrão (*ST- Standard Cross*) e cruzamento de alta bioativação (*HB- High Bioactivation Cross*) (GRAF; VAN SCHAIK, 1992), de onde originam-se pelos mutantes, denominados manchas mutantes. A frequência e o tamanho dessas manchas permitem a determinação quantitativa dos efeitos mutagênicos e recombinogênicos.

2. Material e métodos

2.1. Agentes químicos

Doxorrubicina (DXR) cloridrato de (8*S*-cis)-10- [3-amino-2,3,6,-trideoxi-alfa-1lixohexapiranosil)oxi]-7,8,9,10-tetrahidro-6,8,11-trihidroxi-8-(hidroxiacetil)-étoxi-5,12-naftacenodiano (CAS 23214-92-8), Eurofarma Laboratório Ltda, São Paulo-SP, Brasil, foi utilizado como controle positivo. Cada frasco contém 50mg de DXR liofilizado. Possui peso molecular 580,0 e fórmula molecular C₂₇H₂₉NO₁₁.HCl (Figura 1), lote nº 04020136.

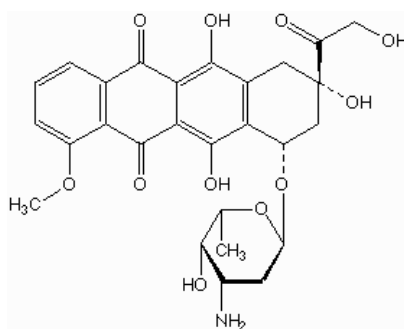


Figura 1 - Fórmula estrutural da doxorubicina.

Arimidex contém 1mg de anastrozol (Figura 2) – lactose mono-hidratada – carboximetilamido sódico – povidona (K31) (E1201) – estearato de magnésio (E5720 com revestimento Macrogol 400 – hipromelose (E464) – Dióxido de titânio (E171), Laboratório AstraZeneca Ltda EUA/ Cotia-SP, Brasil. Cada caixa contém 28 mg de anastrozol, denominado quimicamente como 1,3-benzenodiacetonitrila,a,a',a'-tetrametil-5(1-H-1,2,4-triazol-1-ilmetil); com fórmula empírica C₁₇H₁₉N₅ e peso molecular de 293,4. O anastrozol é um pó cristalino quase branco com solubilidade moderada em meio aquoso (0,5 mg/mL a 25°C), a solubilidade é independente do pH na faixa fisiológica (ANASTROLIBBS, 1997).

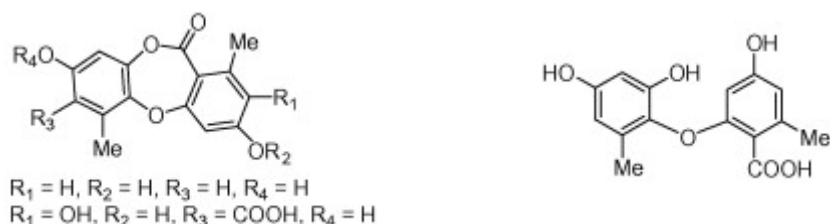


Figura 2. Fórmula estrutural do anastrozol

2.2. Cruzamentos entre as linhagens

No cruzamento Padrão (“ST- Standard Cross”) efetuou-se o cruzamento utilizando fêmeas virgens *flr³/In(3 LR)TM3, ri pp sep I(3)89Aa bx^{34e} e Bd^s*, cruzadas com machos *mwh/mwh* (Graf *et al.*; 1989); e Cruzamento de Alta Capacidade de Bioativação (“HB- High Bioactivation Cross”) cruzando fêmeas virgens *ORR / ORR; flr³/In(3 LR)TM3, ri pp sep I(3)89Aa bx^{34e} e Bd^s* com machos *mwh/mwh* (GRAF; VAN SCHAICK, 1992).

Após 48 horas de início dos cruzamentos foi realizada a ovoposição, por um período de 8 horas, em frascos contendo uma base sólida de ágar (4% de ágar em água) e uma camada de fermento biológico (*Sacharomyces cerevisiae*) suplementado com açúcar. Após 72 +/- 4 horas, as larvas do 3º estágio foram lavadas com água corrente e coletadas com auxílio de uma peneira de malha fina.

Grupos com cerca de 100 larvas foram transferidos para frascos de vidro de 25 mL, contendo 1,5 g de meio alternativo de purê de batatas (marca Yoki® Alimentos S.A, lote nº. B2LC7F1) e anastrozol (0,08, 0,16 e 0,24 mg/mL) associados ou não com DXR (0,125mg/mL). Esta concentração de DXR é conhecida como sendo genotóxica para a *Drosophila* no teste SMART (FRAGIORGE; SPANÓ; ANTUNES, 2007; COSTA; NEPOMUCENO, 2006). Larvas foram tratadas, também, com 0,125 mg/mL de DXR, como um controle positivo, e água osmose reversa (estéril) como controle negativo. Pelo fato dos possíveis compostos serem fotossensíveis todos os frascos do tratamento foram envolvidos com papel alumínio.

Destes cruzamentos nascem dois tipos de descendentes: trans-heterozigotos marcados (MH) e heterozigotos balanceados (BH). Esses descendentes são distintos fenotipicamente, baseados no marcador *TM3, Bd^s*. Os MH (*mwh +/ + flr³*), expressam-se pelos mutantes nas asas, originados de mutação e recombinação e apresentam os cromossomos estruturalmente normais, e seu fenótipo desenvolve asas normais de borda lisa. Os descendentes BH (*mwh +/ + TM3, Bd^s*) inibem recombinação ocorrendo somente mutação; por terem um cromossomo balanceador *TM3/ Bd^s*, seu fenótipo desenvolve asas mal formadas com aparência serrilhada, denominadas “serrate” (GUZMÁN-RINCON; GRAF, 1995).

2.3. Preparação e análise microscópica das asas

Após se alimentarem do meio teste e completar as etapas de desenvolvimento (metamorfose), as moscas adultas foram coletadas e conservadas em etanol 70%. As moscas preservadas tiveram suas asas destacadas com o auxílio de pinças entomológicas, e estas foram estendidas aos pares sobre lâminas. Para fixação das asas foi utilizada solução de Faure (30g de goma arábica, 20 mL de glicerol, 50g de hidrato de cloral e 50 mL de água destilada). A análise das asas foi realizada em microscópio óptico de luz com aumento de 400X, em que se observaram todas as células das 7 regiões nas quais a asa é dividida, sendo os setores: A, B, C', C, D, D' e E, que determina a posição da mancha, que por sua vez é classificada em manchas simples, quando expressam apenas um dos marcadores (*mwh* ou *flr³*), ou manchas gêmeas, quando expressam os dois marcadores (*mwh* e *flr³*) na mesma mancha (GRAF *et al.*, 1984). Foram registrados o número e os tipos de manchas encontradas (simples ou gêmeas), assim como o tamanho das mesmas, e a posição em que se encontram na asa, que por sua vez é indicada.

2.4. Análise estatística

Com o intuito de verificar uma possível ação genotóxica do anastrozol foi realizada a análise estatística dos experimentos, por meio do teste Binomial Condicional de Kastenbaum e Bowman descrito por Frei e Würgler (1995). Para a análise estatística de antigenotoxicidade, as frequências de cada tipo de mancha por mosca foram comparadas aos pares (controle negativo versus anastrozol; DXR isoladamente versus anastrozol + DXR), usando-se o teste *U* de Mann, Whitney e Wilcoxon (FREI & WURGLER, 1995).

3. Resultados e discussão

Foram analisadas aproximadamente 24.400 células em cada asa de *D. melanogaster*, e a análise estatística forneceu as Tabelas 1, 2, 3 e 4, que demonstram as frequências de manchas mutantes: simples pequenas (MSP), simples grandes (MSG), manchas gêmeas (MG) e o total de manchas (TM) em asas de *D. melanogaster*.

Os dados da Tabela 1, observados nos descendentes MH, do cruzamento padrão, demonstram que o quimioterápico doxorrubicina (DXR) está exercendo seu efeito genotóxico, aumentando o número de manchas mutantes, quando comparado ao controle negativo. Esse aumento é estatisticamente significativo ($P < 0,05$) em todas as classes de manchas. A grande quantidade de manchas, nos descendentes do cruzamento padrão, demonstra que nestes indivíduos, com níveis basais de citocromo P-450 (CYP450), existem enzimas suficientes para metabolização da DXR. DXR é considerado como mutagênico de ação direta; no entanto, exige redução metabólica de seu anel quinona a um radical semiquinona para produzir toxicidade (RAMJI *et al.*, 2003). O aparecimento de manchas gêmeas indica uma atividade recombinogênica da DXR. Resultados da ação recombinogênica da DXR em células somáticas de *D. melanogaster* foram encontrados em Lehmann *et al.* (2003), Rodriguez-Arnaiz; Sortibrán; Tellez, (2004) e Costa; Nepomuceno (2006).

A Tabela 1 apresenta, também, os resultados das frequências de manchas mutantes observadas nos descendentes MH descendentes dos cruzamentos padrão (ST), tratados com anastrozol, em três diferentes concentrações (0,08; 0,16 e 0,24 mg/mL). Nesta tabela são encontrados os controles positivo (DXR 0,125 mg/mL) e negativo (água osmose reversa). Os dados desta Tabela mostram que não houve aumento estatisticamente significativo ($P > 0,05$) nas frequências de manchas induzidas pelo anastrozol, quando comparadas com o controle negativo.

A Tabela 2 mostra a frequência de manchas mutantes, observadas nos descendentes MH, provenientes do cruzamento ST, tratados com anastrozol nas três diferentes concentrações associadas à DXR (0,125 mg/mL). Os resultados apontam uma redução, estatisticamente significativa ($P < 0,05$), em todas as categorias de manchas (simples pequenas, simples grandes, manchas gêmeas e total de manchas), quando estas frequências de manchas foram comparadas com o controle DXR.

A Tabela 3 mostra a frequência de manchas mutantes observadas nos descendentes MH, provenientes do cruzamento HB, tratados com as diferentes concentrações de anastrozol. Os resultados apresentados nesta tabela mostram que as frequências de manchas mutantes, encontradas nos indivíduos tratados com DXR (0,125 mg/mL), foram superiores àqueles encontrados nos indivíduos descendentes do cruzamento ST. Estes resultados mostram, de maneira inequívoca, a necessidade de redução metabólica da DXR, de seu anel quinona a um radical semiquinona, para produzir toxicidade. Os dados desta tabela mostram que houve resultado inconclusivo nos indivíduos tratados com a concentração de 0,08 mg/ml de anastrozol e aumento, estatisticamente significativo ($P < 0,05$), nas frequências de manchas mutantes, nos indivíduos MH tratados com as maiores concentrações de (0,16 e 0,24 mg/mL).

Este aumento, nas frequências de manchas mutantes, observado nos indivíduos provenientes do cruzamento HB, demonstra uma possível ação de metabolização do anastrozol, pelas CYP450, em metabólitos tóxicos, tendo em vista que esta genotoxicidade ocorreu apenas nestes descendentes. Os descendentes do cruzamento HB no teste de SMART, apresentam alta expressividade de CYP450, que por sua vez ativam e metabolizam pró-mutágenos e pró-carcinógenos (FRÖLICH, WÜRGLER, 1989), o que explica a maioria das substâncias citotóxicas apresentarem metabolismo citocro-

mo-dependente. Essa classe enzimática apresenta cerca de 500 isoenzimas, que participam tanto da biossíntese quanto da degradação de vitaminas, esteroides, ácidos graxos e uma diversidade de drogas (LOURO *et al.*, 2002).

Na Tabela 4 estão apresentados os dados da associação anastrozol, nas suas diferentes concentrações testadas, com a DXR (0,125 mg/mL). Nesta associação foi verificada uma redução significativa ($P < 0,05$), nas frequências de manchas mutantes, em todas as concentrações do anastrozol (0,08; 0,16 e 0,24 mg/mL), quando comparadas com as frequências do controle positivo DXR e ainda um resultado fraco positivo nas concentrações 0,08 e 0,16 mg/ml, ou seja, excluindo as duas hipóteses citadas na tabela 1.

Os mecanismos pelos quais o anastrozol reduziu as frequências de manchas mutantes induzidas pela DXR não foram avaliados neste estudo. Contudo, devido à ação inibidora de CYP450 promovido pelo anastrozol, é possível propor um possível mecanismo na redução de manchas. Alguns substratos farmacológicos transformam-se por meio da ação do CYP450 em metabólitos reativos, desencadeando indução enzimática, exacerbando a toxicidade tecidual (KATZUNG, 2006). De acordo com Buzdar *et al.* (2002), o anastrozol é um inibidor de diversas isoformas de CYP450. De acordo com Ramji *et al.* (2003), a doxorubicina, para exercer os seus múltiplos mecanismos de citotoxicidade, precisa sofrer a bioativação redutora, processo este, catalisado pelo NADPH-citocromo P450 redutase (CYPRED).

Portanto, é possível que a redução de manchas, verificada nos descendentes tratados com a associação de anastrozol (0,08; 0,16 e 0,24 mg/mL) e DXR (0,125 mg/mL), ocorreu devido à inibição não seletiva de enzimas CYP 450, encontradas neste organismo-teste, necessárias para a metabolização deste quimioterápico. Como nos descendentes do cruzamento padrão (ST) essa família de enzimas hepáticas é pequena, ao ser ainda inibida pelo anastrozol, desencadearia a drástica redução no número manchas, como foi observado na Tabela 2, fortalecendo ainda mais a hipótese de inibição de CYP450.

Nos indivíduos descendentes do cruzamento de alta bioativação (HB) os níveis de CYP450 estão presentes em excesso. Neste caso, o anastrozol não bloquearia 100% dessas enzimas, deixando parte delas livres para interagirem com a DXR, que por sua vez, como já dito anteriormente, mesmo em pequenas concentrações exerce efeito genotóxico. É importante verificar que as frequências de manchas encontradas nos indivíduos descendentes do cruzamento HB, tratados com a associação anastrozol mais DXR (Tabela 4), foram comparáveis com as frequências de manchas mutantes do controle positivo (DXR), dos indivíduos descendentes do cruzamento ST (Tabela 1), para obtenção de um resultado fidedigno, identificando, dessa forma, a frequência significativa de mutações ocorridas nas diversas concentrações de anastrozol, tendo como base o controle positivo que no presente estudo resulta na quantidade máxima de manchas mutantes induzidas pela exposição ao agente externo de escolha, no caso a DXR e o controle negativo, que indica a frequência de mutações espontâneas, que por sua vez ocorrem naturalmente e não sofrem interferência do meio.

Tabela 1. Frequência de manchas mutantes observadas nos descendentes trans-heterozigotos de *Drosophila melanogaster*, do cruzamento padrão, tratados com diferentes concentrações de anastrozol.

Tratamentos	N. de Indiv. (N)	Manchas por indivíduo (no. de manchas) diag. estatístico ^a								Total manchas mwh ^c (n)
		MSP		MSG		MG		TM		
		(1-2 céls) ^b <i>m</i> = 2		(>2 céls) ^b <i>m</i> = 5		<i>m</i> = 5		<i>m</i> = 2		
<i>mwh/flr³</i>										
Controle água	20	0,20	(04)	0,10	(02)	0,00	(00)	0,30	(06)	6
DXR (0,125 mg/mL)	20	1,70	(34) +	3,65	(73) +	0,95	(19) +	6,30	(126) +	118
Anastrozol 0,08 mg/mL	20	0,30	(06) i	0,20	(04) i	0,05	(01) i	0,55	(11) i	11
Anastrozol 0,16 mg/mL	20	0,55	(11) i	0,15	(03) i	0,00	(00) i	0,70	(14) i	13
Anastrozol 0,24 mg/mL	20	0,25	(05) i	0,00	(00) i	0,05	(01) i	0,30	(06) i	6

^aDiagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würigler (1988): +, positivo; -, negativo; i, inconclusivo. *m*, fator de multiplicação para a avaliação de resultados significativamente negativos. Níveis de significância $\leq 0,05$.

^bIncluindo manchas simples *flr³* raras.

^cConsiderando os clones mwh para as manchas simples mwh e para as manchas gêmeas.

Tabela 2. Frequência de manchas mutantes observadas nos descendentes trans-heterozigotos de *Drosophila melanogaster*, do cruzamento padrão, tratados com diferentes concentrações de anastrozol associadas com DXR (0,125 mg/mL).

Tratamentos	N. de Indiv. (N)	Manchas por indivíduo (no. de manchas) diag. estatístico ^a				Total manchas mwh ^c (n)
		MSP	MSG	MG	TM	
		(1-2 céls) ^b <i>m</i> = 2	(>2 céls) ^b <i>m</i> = 5	<i>m</i> = 5	<i>m</i> = 2	
<i>mwh/flr</i> ³						
Controle água	20	0,20 (04)	0,10 (02)	0,00 (00)	0,30 (06)	
DXR (0,125 mg/mL)	20	1,70 (34) +	3,65 (73) +	0,95 (19) +	6,30 (126) +	118
Anastrozol 0,08 mg/mL + DXR	20	0,65 (13) +	0,85 (17) +	0,30 (06) +	1,80 (36) +	31
Anastrozol 0,16 mg/mL + DXR	20	0,45 (09) +	1,00 (20) +	0,10 (02) +	1,55 (31) +	27
Anastrozol 0,24 mg/mL + DXR	20	0,40 (08) +	0,75 (15) +	0,20 (04) +	1,35 (27) +	24

^aDiagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würzler (1988): +, positivo; -, negativo; i, inconclusivo. *m*, fator de multiplicação para a avaliação de resultados significativamente negativos. Níveis de significância 0,05.

^bIncluindo manchas simples *flr*³ raras.

^cConsiderando os clones mwh para as manchas simples mwh e para as manchas gêmeas.

Tabela 3. Frequência de manchas mutantes observadas nos descendentes trans-heterozigotos de *Drosophila melanogaster*, do cruzamento de alta bioativação, tratados com diferentes concentrações de anastrozol.

Tratamentos	N. de Indiv. (N)	Manchas por indivíduo (no. de manchas) diag. estatístico ^a								Total manchas mwh ^c (n)
		MSP		MSG		MG		TM		
		(1-2 céls) ^b <i>m</i> = 2		(>2 céls) ^b <i>m</i> = 5		<i>m</i> = 5		<i>m</i> = 2		
<i>mwh/flr</i> ³										
Controle água	20	0,45 (09)		0,20 (04)		0,00 (00)		0,65 (13)		13
DXR 0,125 mg/mL	20	1,40 (28) +		4,80 (96) +		2,05 (41) +		8,25 (165) +		149
Anastrozol 0,08 mg/mL	20	1,05 (21) +		0,05 (01) -		0,00 (00) i		1,10 (22) i		22
Anastrozol 0,16 mg/mL	20	1,35 (27) +		0,15 (03) i		0,05 (01) i		1,55 (31) +		29
Anastrozol 0,24 mg/mL	20	0,90 (18) i		1,15 (23) +		0,30 (06) +		2,35 (47) +		42

^aDiagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würzler (1988): +, positivo; -, negativo; i, inconclusivo. *m*, fator de multiplicação para a avaliação de resultados significativamente negativos. Níveis de significância $\leq 0,05$.

^bIncluindo manchas simples *flr*³ raras.

^cConsiderando os clones *mwh* para as manchas simples *mwh* e para as manchas gêmeas.

Tabela 4. Frequência de manchas mutantes observadas nos descendentes trans-heterozigotos de *Drosophila melanogaster*, do cruzamento de alta bioativação, tratados com diferentes concentrações de anastrozol associadas com DXR (0,125 mg/mL).

Tratamentos	N. de Indiv. (N)	Manchas por indivíduo (n.º de manchas) diag. estatístico ^a				Total manchas mwh ^c (n)
		MSP	MSG	MG	TM	
		(1-2 céls) ^b <i>m</i> = 2	(>2 céls) ^b <i>m</i> = 5	<i>m</i> = 5	<i>m</i> = 2	
<i>mwh/flr³</i>						
Controle água	20	0,45 (09)	0,20 (04)	0,00 (00)	0,65 (13)	
DXR (0,125 mg/mL)	20	1,40 (28) +	4,80 (96) +	2,05 (41) +	8,25 (165) +	149
Anastrozol 0,08 mg/mL + DXR	20	2,25 (45) +	2,60 (52) +	0,75 (15) +	5,60 (112) f+	106
Anastrozol 0,16 mg/mL + DXR	20	2,05 (41) i	2,60 (52) +	0,90 (18) +	5,55 (111) f+	105
Anastrozol 0,24 mg/mL + DXR	20	1,90 (38) i	1,80 (36) +	0,80 (16) +	4,50 (90) +	81

^aDiagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würigler (1988): +, positivo; -, negativo; i, inconclusivo. *m*, fator de multiplicação para a avaliação de resultados significativamente negativos. Níveis de significância $\leq 0,05$.

^bIncluindo manchas simples *flr³* raras.

^cConsiderando os clones mwh para as manchas simples mwh e para as manchas gêmeas.

4. Conclusões

Em baixos níveis de CYP450 o anastrozol não apresentou genotoxicidade, mantendo as frequências de manchas mutantes com valores não diferentes do controle negativo. Por outro lado, nos descendentes com altos níveis constitutivos de CYP450, foram verificados aumentos nas frequências de manchas mutantes, com valores superiores ao controle negativo. Portanto, o anastrozol é um fármaco de genotoxicidade indireta, necessitando de sua ativação metabólica para se tornar genotóxico.

Na associação anastrozol mais quimioterápico DXR ocorreu uma redução de manchas induzidas por este quimioterápico. Esta redução de manchas ocorreu, provavelmente, pela inibição de CYP450, enzima responsável pela metabolização da DXR.

A genotoxicidade do anastrozol, e sua interação com a DXR, ressaltam a importância da realização de estudos específicos e maior número de pesquisas e testes genético-farmacológicos em pró-fármacos antes de sua liberação no mercado. Estudos fármaco-terapêuticos são importantes por promover maior segurança profissional durante a prescrição de um tratamento, e o conhecimento das interações, sinergismos e toxicidade indicarão uma atuação imediata e segura por parte dos médicos e enfermeiros no período pós-administração, frente ao desencadeamento de possíveis reações adversas, possibilitando intervenções específicas pré-definidas e esperadas, obtendo, assim, garantia e sucesso no tratamento do paciente, proporcionando ao mesmo segurança e confiabilidade na formulação de um prognóstico segundo o efeito terapêutico.

Referências

- ANASTROLIBBS. Libbs Farmacêutica Ltda. São Paulo-SP. Disponível em: <<http://www.libbs.com.br/Arquivos/Produto/ANASTROLIBBS.pdf>>. Acessado em 12 de novembro de 2010.
- ANVISA. *Bulário eletrônico*. Disponível em: <<http://www.bulario.bvs.br/index>>. Acesso em fev 2010.
- BROWN, T. A.. Alteração do Material Genético, in: *Genética: um enfoque molecular*. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap. 12, p. 135-151, 1999.
- BURNS, G.W.; BOTTINO, P.J. *Genética*. 6 ed. São Paulo: Guanabara Koogan, 1991.
- BUZDAR, A; ROBERTSON, J.F; EIERMANN, W; NABHOLTZ, J.M. An Overview of the Pharmacology and Pharmacokinetics of the Newer Generation Aromatase Inhibitors Anastrozole, Letrozole, and Exemestane, *American Cancer Society*, v. 95, nov. 2002.
- CHABNER, B. A. *et al.* Agentes Antineoplásicos, in: LIMBIRD, Lee E.; HARDMAN, Joel G. *Goodman e Gilman: as bases farmacológicas da terapêutica*. 9. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil, cap. 51, pp. 932-933, 1996.

CHAVES I.G. *et al.* *Mastologia: aspectos multidisciplinares*. Rio de Janeiro: Medsi 1999.

COSTA, W.F.; NEPOMUCENO, J.C. Protective Effects of a Mixture of Antioxidant Vitamins and Mineral on the Genotoxicity of Doxorubicin in Somatic Cells of *Drosophila melanogaster*. *Environ. Mol. Mutagen.*, 47 (1): 18-24, 2006.

DAMIANI D; DAMIANI D. Manejo farmacológico da baixa estatura: o papel dos inibidores da aromatase. *J. Pediatr.* v. 83, pp. 172-177, 2007

EKEN, *et al.* Introduction of epithelial tumors in *Drosophila melanogaster* heterozygous for the tumor suppressor gene *wts*. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, v. 40 p. 277-282, 2002.

ESTEVÃO, R. A. F; NAZARIO, A. C. P; BARACAT, E. C. Effect of oral contraceptive with and without associated estradiol on ultrasound measurements of breast fibroadenoma: randomized clinical trial. *São Paulo Med. J.* São Paulo, v. 125, n. 5, 2007. Disponível em: <<http://www.scielo.br>>. Acesso em: 9 fev. 2010.

FRAGIORGE, E. J.; SPANÓ, M. A.; ANTUNES, L. M. G. Modulatory effects of the antioxidant ascorbic acid on the direct genotoxicity of doxorubicin in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Genet. Mol. Biol.*, v. 30, n. 2, 2007.

FREI, H.; WURGLER, F. E. Optimal experimental design and sample size for the statistical evaluation of data from Somatic Mutation and Recombination Test (SMART) in *Drosophila*. *Mutation Res.*, pp. 235-247, 1995.

FRÖLICH, A.; WURGLER, F. E. New tester strains with improved bioactivation capacity for the *Drosophila* wing spot test. *Mutation Res.* pp. 99-104, 1989.

GILMAN, A. G. *Goodman & Gilman: as bases farmacológicas da terapêutica*. 11. ed. Rio de Janeiro: Graw Hill, 2006, p. 1103, 1105, 1223.

GRAF, U; WURGLER, F.E; KATZ, A.J; FREI, H; JUON, H; HALL, C.B; KALE, P.G. Antigenotoxicity studies in *Drosophila melanogaster*. *Environmental mutagenesis*, 1989, p. 153-188.

GRAF, U.; VAN SCHAIK, N. Improved high bioactivation cross for the wing somatic and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Res*, 1992, pp. 59-67.

GRAF, U; WURGLER, F.E; KATZ, A.J; FREI, H; JUON, H; HALL, C.B; KALE, P.G. Somatic Mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environmental mutagenesis*, 1987, p. 153-188.

GRIFFITHS, A.J.F.; *et al.* *Introdução à genética*. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 2001.

GUZMÁN-RICON, J.; GRAF, U.. *Drosophila melanogaster* somatic mutation and recombination test as a biomonitor, in: *Biomonitoring and Biomarkers as Indicators of Environmental Change*. New York: Edit by F. M. Butterworth *et al.*, Plenum Press, p. 169-181. 1995.

INCA – Instituto Nacional do Câncer. Ministério da Saúde. *O que é o Câncer?* Disponível em: <http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?ID=322>. Acesso em 15 fev. de 2010.

KATZUNG, B. G. *Farmacologia: básica e clínica*. 9 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

LEHMANN, M.; FRANCO, A.; VILAR, K. S. P.; LUKZA REGULY, M.; ANDRADE, H. H. Doxorubicin and two of its analogues are preferential inducers of homologous recombination compared with mutational events in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Mutat Res* (539): 167-75, 2003.

LOURO, I. D; JUNIOR, J.C.L; VIEIRA, M.S. Proto-oncogenes e genes supressores de tumor, in: LOURO, Íuri D., *et al.* *Genética Molecular do Câncer*. 2. ed. São Paulo: MSG Produção Editorial, 2002, cap. 6, p.63-79.

RANG, H.P. *et al.* *Farmacologia*. 6 ed. Rio de Janeiro: Elsevier. 2007.

RAMJI, S; LEE, C; INABA, T; PATTERSON, A.V; RIDDICK, D.S. Human NADPH-Cytochrome P450 Reductase Overexpression Does Not Enhance the Aerobic Cytotoxicity of Doxorubicin in Human Breast Cancer Cell Lines. *Cancer Research*, v. 63, p. 6914-6919, 2003.

RIBEIRO, L. R.; MARQUES, E. K. A importância da mutagênese ambiental na carcinogênese humana, in: *Mutagênese Ambiental*. Canoas: ULBRA, 2003, cap. 1. p. 21-27.

RODRIGUEZ-ARNAIZ, R.; SORTIBRAN, A. C.; TELLEZ, G. O. Detection of mitotic recombination and sex chromosome loss induced by adriamycin, chlorambucil, demecolcine, paclitaxel and vinblastine in somatic cells of *Drosophila melanogaster* in vivo. *Mutagenesis*. 19: 121-127, 2004.

SILVA, P. *Farmacologia*. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

SNUSTAD, D. Peter; SIMMONS, M.J. Mutação, reparo do DNA e Recombinação, in: _____. *Fundamentos de Genética*. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap. 14, p. 312-314; 332, 2001.

STRANCHAN, T; READ, A.P. *Genética molecular humana*. 2. ed. Porto Alegre: ARTMED 2002.

SUZUKI, D. T, GRIFFITHS A. J. F, LEWONTIN R. C. Genética e o Organismo, in: _____. *Introdução a Genética*. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006, cap. 1, v. 2, p. 433-441.

TRUFELLI D. C *et al.* Análise do atraso no diagnóstico e tratamento do câncer de mama em um hospital público. *Rev. Assoc. Med. Bras.*, São Paulo, v. 54, n. 1, 2008. Disponível em: <<http://www.scielo.br>. Acesso em: 17 fev. 2010.

UCHIMURA, N. S; RIBALTA, J. C. L; FOCCHI, J; BARACAT, E. C; UCHIMURA, T. T. Influência do uso de anticoncepcionais hormonais orais sobre o número de células de Langerhans em mulheres com captura híbrida negativa para papilomavírus humano. *Rev. Bras. Ginecol. Obstet.*, v. 27, n. 12, pp. 726-730, dez. 2006.

VARELLA, D.; JARDIM, C. *Cânceres: Guia prático de saúde e bem estar*. Barueri-SP: Gold Editora Ltda, 2009.

VOGEL, E. W.; ZILASTRA, J. A. Somatic cell mutagenicity in *Drosophila melanogaster* in comparación with genetic damage in early germ-cell stages. *Mutation Res.*, v. 180, p. 189-200, 1987.

ZORDAN, M; OSTI M, PAVANELLO S, COSTA R, LEVIS AG. Relationship between benzo pyrene-DNA adducts and somatic mutation and recombination in *Drosophila melanogaster*, pp. 171-180, *Environ Mol Mutagen*, 1994.