

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E NATURAIS DO PONTAL
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CARCINOGENICO DA ASSOCIAÇÃO DOS
HORMÔNIOS ETINILESTRADIOL E LEVONORGESTREL POR MEIO DO TESTE
PARA DETECÇÃO DE TUMOR EPITELIAL EM *Drosophila melanogaster*.

Caroline Cristina D'Amato

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Coordenação do Curso de Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Uberlândia, para
obtenção do grau de Bacharel em Ciências
Biológicas.

Ituiutaba - MG

Dezembro – 2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E NATURAIS DO PONTAL
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CARCINOGENICO DA ASSOCIAÇÃO DOS
HORMÔNIOS ETINILESTRADIOL E LEVONORGESTREL POR MEIO DO TESTE
PARA DETECÇÃO DE TUMOR EPITELIAL EM *Drosophila melanogaster*.

Caroline Cristina D'Amato

Prof. Dr. Alexandre Azenha Alves de Rezende

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Coordenação do Curso de Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Uberlândia, para
obtenção do grau de Bacharel em Ciências
Biológicas.

Ituiutaba - MG

Dezembro – 2018

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho aos meus pais que fizeram o possível e o impossível para que eu chegasse até aqui. Obrigada por tudo que fizeram e continuam fazendo por mim.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente, à Deus, por fazer com que eu chegasse até aqui com saúde, sempre me dando forças suficientes para não desistir.

Ao meu orientador, professor Dr. Alexandre Azenha Alves de Rezende por aceitar o desafio de me orientar e pela dedicação e paciência que sempre ofereceu.

À Profa. Dra. Luciana Karen Calábria e ao Prof. Me. Cássio Resende de Moraes, por aceitarem o convite para participar da banca examinadora, pela leitura do texto e valiosas sugestões.

A todo corpo docente e técnico-administrativo da Universidade Federal de Uberlândia, pelos ensinamentos e apoio à minha formação acadêmica ao longo de todos esses anos.

Ao grupo PET Mais Saúde pelo crescimento pessoal e profissional que me proporcionaram e, agradeço em particular à Tutora Dra. Juliana Aparecida Povh por todo apoio e ensinamento.

Aos meus pais, Antônio D'Amato e Sandra Aparecida Zoccolaro, à minha irmã Carla C. D'Amato e, minhas sobrinhas, Bianca e Luana, por sempre estarem na retaguarda, dando todo apoio e ajudando a concretizar todos os meus sonhos. Espero um dia retribuir tudo a vocês.

Ao meu companheiro, Delsom, que esteve presente ao meu lado, tendo paciência e sempre me fortalecendo em todos os obstáculos enfrentados.

A todos os meus amigos e amigas que fizeram parte dessa caminhada, compartilhando momentos de alegria e de crescimento. Independente de distância, vocês se fizeram presentes em todos os momentos.

APRESENTAÇÃO

O formato deste Trabalho de Conclusão de Curso cumpre as normas aprovadas pelo Curso de Ciências Biológicas do Instituto de Ciências Exatas e Naturais do Pontal da Universidade Federal de Uberlândia, mas foi redigido no formato de artigo científico, em português, respeitando as normas da Revista Scientia Plena, as quais podem ser acessadas: <https://www.scientiaplenu.org.br/sp/about/submissions#authorGuidelines>.

Este manuscrito representa o estudo na íntegra e será submetido para publicação somente após as considerações dos membros da banca de avaliação.

RESUMO

A contracepção hormonal combinada contém, na maioria das vezes, a associação de dois hormônios, o estrogênio e a progesterona. O etinilestradiol é o estrogênio mais utilizado e, no caso da progesterona pode ser utilizado o levonorgestrel. O uso prolongado de contraceptivos orais tem sido relacionado à indução de tumores no fígado, colo do útero e mama. O objetivo do presente estudo foi avaliar o potencial tóxico e carcinogênico da associação de etinilestradiol e levonorgestrel, por meio do Teste de Detecção de Tumor Epitelial (ETC) em *Drosophila melanogaster*. Para tanto, larvas de terceiro estágio, oriundas do cruzamento entre machos *mwh/mwh* e fêmeas virgens da linhagem *wts/TM3,Sb'*, foram tratadas com diferentes concentrações da associação, respectivamente, entre etinilestradiol e levonorgestrel (C1 - 0,000328125 / 0,001640625 mg/mL, C2 - 0,00065625 / 0,00328125 mg/mL, C3 - 0,0013125 / 0,0065625 mg/mL, C4 - 0,002625 / 0,013125 mg/mL, C5 - 0,00525 / 0,02625 mg/mL, C6 - 0,0105 / 0,0525 mg/mL, C7 - 0,021 / 0,105 mg/mL e C8 - 0,042 / 0,21 mg/mL). De acordo com as condições experimentais utilizadas, pode-se concluir que as maiores concentrações são tóxicas e, ainda, as concentrações analisadas (C1, C3 e C5) aumentaram significativamente o número de tumores epiteliais. Mais estudos sobre a correlação entre a exposição aos hormônios supracitados e a indução de câncer se fazem necessários para garantir a segurança do uso destes hormônios pela população.

Palavras-chave: WTS, contraceptivos, hormônios esteroides.

ABSTRACT

Combined hormonal contraception, most often, contains the combination of two hormones, estrogen and progesterone. Ethinylestradiol is the most widely used estrogen and levonorgestrel can be used in the case of progesterone. Prolonged use of oral contraceptives has been linked to tumor induction in the liver, cervix and breast. The objective of the present study was to evaluate the toxic and carcinogenic potential of the association of ethinylestradiol and levonorgestrel through the Epithelial Tumor Detection Test (ETC) in *Drosophila melanogaster*. Therefore, third - instar larvae from the cross between *mwh / mwh* and virgin females of the *wts / TM3 strain, Sb1*, were treated with different concentrations of the association, respectively, between ethinylestradiol and levonorgestrel (C1 - 0.000328125 / 0.001640625 mg/mL, C2 - 0.00065625 / 0.00328125 mg/mL, C3 - 0.0013125 / 0.0065625 mg/mL, C4 - 0.002625 / 0.013125 mg / mL, C5-0.00525 / 0.02625 mg/mL, C6 - 0.055 / 0.0525 mg/mL, C7 - 0.01 / 0.105 mg/mL and C8 - 0.02 / 0.21 mg/mL). According to the experimental conditions used, it can be concluded that the highest concentrations are toxic and the concentrations analyzed (C1, C3 and C5) have significantly increased the number of epithelial tumors. Further studies on the correlation between exposure to the above hormones and the induction of cancer are necessary to ensure the safety of use of these hormones by the population.

Key-words: WTS, contraceptives, steroid hormones.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	I
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	III
2.1. Compostos químicos e meio de cultura.....	III
2.2. Linhagens de <i>D. melanogaster</i> e tratamentos.....	III
2.3. Fixação de moscas e análise de tumor epitelial.....	IV
2.4. Análise estatística.....	IV
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	IV
4. CONCLUSÃO.....	VIII
5. AGRADECIMENTOS.....	VIII
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	IX
7. NORMAS DA REVISTA	XI

1. INTRODUÇÃO

No século XX o conceito de *hormônios* foi utilizado pela primeira vez, para se referir aos mensageiros químicos que regulavam os processos orgânicos. Após serem estudados e manipulados, os hormônios poderiam ser aplicados a diversos tratamentos, como por exemplo, a perda da libido, problemas relacionados ao fluxo menstrual, infertilidade e reposição hormonal, sendo a última relacionada com a melhora das condições de saúde e qualidade de vida da mulher após a menopausa [1 apud 2].

Em 1960 foi lançada no mercado dos Estados Unidos a primeira pílula anticoncepcional, *Enovid*, devidamente autorizada a ser comercializada pelo *Food and Drug Administration* (FDA). Em seguida, as pílulas se disseminaram pelo mundo, acarretando em várias discussões. De um lado, as feministas questionavam os critérios de segurança e, já no campo da saúde, existia o receio em relação ao câncer e trombose [3,4].

Por trás da descoberta da pílula tinha um grupo de pessoas importantes e, Margaret Sanger era uma delas, uma feminista que tinha o desejo de dar a todas as mulheres o direito de controlar a própria fertilidade. A pílula teve papel fundamental na revolução sexual e na emancipação feminina [5]. Mesmo com todo o “preconceito” e preocupação em relação ao uso do anticoncepcional via oral, ano após ano as vendas só aumentaram. Seis anos após a primeira comercialização, uma reportagem da revista *Realidade* trazia na capa “Brasil: 60 milhões de pílulas por ano” [4].

O anticoncepcional é composto pelos hormônios progesterona e estrogênio, que são conhecidos como esteroides, hormônios lipossolúveis que passam através da membrana da célula e ligam-se a sua proteína receptora específica no núcleo. A progesterona tem função no preparo da mucosa uterina para receber o óvulo e, ainda, estimula as mamas para a produção do leite. Já o estrogênio é importante para as características sexuais secundárias da mulher e, no desenvolvimento e manutenção do sistema reprodutor feminino [6].

A glândula hipófise que se localiza no cérebro, produz os hormônios folículo estimulante (FSH) e o hormônio luteinizante (LH). Os quais aumentam e diminuem seus níveis no decorrer do mês, e quando atingem o nível máximo no organismo, estimulam a produção da progesterona e do estrogênio no ovário, ocorrendo assim, a ovulação. Contudo, quando se ingere a pílula anticoncepcional, doses de hormônios sintéticos são introduzidas no organismo, fazendo com que a hipófise deixe de produzir FSH e LH, pois o cérebro entende que sua presença não é necessária [7].

Segundo Rang et al., (2007) [8] existem dois tipos principais de contraceptivos orais: a pílula combinada que contém estrogênio e progesterona e, a pílula que possui apenas a progesterona. Na pílula combinada, o etinilestradiol (Figura 1A) é o estrogênio mais utilizado e, o progestogênio ou também conhecido por progestina, que são hormônios sexuais femininos, os quais podem estar presentes na forma de: norestisterona, levonorgestrel (Figura 1B), etinodiol, entre outros [9]. O levonorgestrel foi uma das primeiras progesteronas a ser utilizada na composição das pílulas [10] e, é utilizado como uma pílula anticoncepcional de emergência, que deve ser administrada oralmente, dentro de uma janela de 72 horas após a relação sexual [11]. Após o seu uso, a pílula, conhecida como, “pílula do dia seguinte”, agirá bloqueando a fecundação [10].

Nas pílulas são utilizados dois tipos de estrogênio, o etinilestradiol (Figura 1A) que é um estrogênio sintético, utilizado também na suplementação de estrogênio, e o valerato de estradiol que é natural. Quanto à dosagem, as pílulas de etinilestradiol podem ser de ultrabaixa dosagem (15 µg), baixa dosagem (20 e 30 µg) ou média dosagem (35 µg), sendo que superior a esse valor é considerada alta dosagem [10]. As altas dosagens desse estrogênio sintético anteriormente causavam efeitos colaterais, como aumento do peso e enjoos.

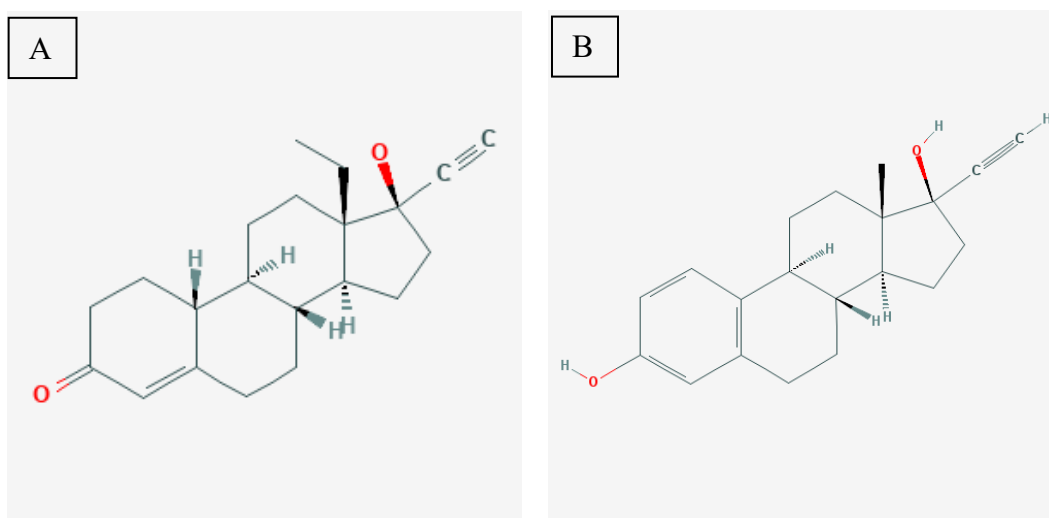


Figura 1. Estrutura química do etinilestradiol (A) E do levonorgestrel (B)

. Segundo Watson (2007) [12] estudos mostraram que os efeitos mais prolongados dos hormônios resultam na ativação de genes específicos. Quando um hormônio esteroide penetra na célula, ele se liga a um receptor que se encontra no citoplasma da célula, esse receptor torna-se ativo e penetra no núcleo, promovendo a transcrição gênica..

Segundo Fernandes e Mello (2008) [13] mutações sucessivas no DNA, resultam em mudanças expressivas no padrão de comportamento celular resultando no processo de carcinogênese. Nesse caso, as células perdem a capacidade de limitar e controlar o seu próprio crescimento e passam a se multiplicar rapidamente e sem controle [14, 15, 16]. Nesse contexto, encontra-se a terapia de reposição hormonal (TRH), como por exemplo, aumento de fatores de risco relacionados à hiperplasia endometrial e progressão para o câncer, estão relacionados à hiperestimulação do endométrio pela exposição crônica aos altos níveis circulantes de estrógenos, sem oposição de efeitos antiproliferativos da progesterona. Contudo, não há consenso no âmbito científico para definir, com exatidão, doses seguras para a TRH [17].

Muito se discute que, como na maioria das medicações, as pílulas têm seus benefícios e seus malefícios, podendo acarretar em efeitos colaterais, como alterações imunológicas, metabólicas, vasculares e, renais/urinárias, e distúrbios dos sistemas nervoso central e reprodutor [18]. E principalmente, as mulheres que tem predisposição às doenças cardiovasculares e utilizam a pílula, apresentam risco elevado para trombose arterial, estando relacionado com o estrogênio que está presente na composição destes medicamentos [19].

A indústria farmacêutica vem diminuindo a dosagem de hormônios utilizada nas pílulas para deixá-las mais seguras. Com o objetivo de diminuir efeitos colaterais e manter a eficácia do mesmo, as taxas de hormônios foram reduzidas, para menos de 50 µg de estrogênio e 1,5 mg de progestogênio [20]. Contudo, atualmente, há ainda no mercado alguns anticoncepcionais com alta dosagem de etinilestradiol acima de 35 µg, justificando a realização, de estudos em modelos animais para mensurar o potencial nocivo associado ao uso dessas substâncias.

Atualmente, existe a discussão da utilização de animais em pesquisas científicas. Ativistas são contra essa prática e argumentam que há métodos alternativos, apesar de existirem pouquíssimos casos nos quais simulações computacionais, experimentos *in vitro* e outros métodos sejam capazes de substituir completamente o uso de animais [21]. Ainda é possível evidenciar um esforço mundial para reduzir a utilização de animais superiores nas pesquisas toxicológicas/genéticas, principalmente no que diz respeito ao desenvolvimento de modelos alternativos *in vivo* [22].

Drosophila melanogaster é um inseto utilizado como modelo experimental na genética e na biologia do desenvolvimento há cerca de um século [23]. Destaca-se no meio científico para avaliação da toxicidade, mutagenicidade e carcinogenicidade de diferentes xenobióticos [24, 25, 26, 27].

O termo Drosophotoxicologia engloba as abordagens metodológicas relacionadas ao uso da *D. melanogaster* como organismo de escolha em estudos de toxicologia. Este modelo experimental oferece várias vantagens importantes, tais como estrutura genômica relativamente simples, vida útil curta, baixo custo de manutenção, simplicidade de manipulação experimental, homologia de genes relevantes com organismos superiores e facilidade de obtenção de fenótipos mutantes [28].

A conservação evolutiva de genes supressores de tumor entre *D. melanogaster* e mamíferos têm estimulado os estudos relacionados à indução e o desenvolvimento de tumores nesse inseto, podendo contribuir diretamente para o entendimento da gênese de processos carcinogênicos em humanos [29]. As proteínas quinases, incluindo as dependentes de ciclinas (CDK), formam um complexo responsável pelo controle da regulação do ciclo celular em *D. melanogaster*. Diversos oncogenes e genes supressores de tumor participam desse controle, sendo um deles o gene recessivo *wts* (*warts* - verruga), que tem homologia ao gene supressor de tumor, *Large tumor suppressor kinase 1* (LATS1) em mamíferos [30].

Mutação e recombinação são processos que acontecem a todo instante durante o desenvolvimento celular. A mutação, em especial, é fonte da mudança evolutiva, produzindo novos alelos espontaneamente por exposição aos agentes físicos, químicos ou biológicos. Já a recombinação, promove o rearranjo de alelos, agrupando-os em novas combinações. Esses processos garantem a variação genética, mas por outro lado também são responsáveis pelo envelhecimento e por patologias relacionadas, tais como o câncer e doenças neurodegenerativas [31]. Para manter os processos evolutivos, os organismos biológicos dispõem de uma grande variedade de mecanismos de reparo do DNA, que promovem a replicação exata do DNA durante a divisão celular e a remoção de possíveis danos [32]. Entretanto, uma falha nos mecanismos de reparo possibilita a fixação da mutação.

O Teste para Detecção de Tumores Epiteliais (ETC) em *D. melanogaster* faz uso de uma linhagem que possui o gene marcador *wts* (*warts*), que está localizado no cromossomo 3 da mosca e, quando em homozigose, é letal para o zigoto. Por isso, o gene *warts* é mantido na linhagem estoque com a presença de um balanceador cromossômico, o *Third multiple 3* (TM3). Caso ocorra a perda da heterozigose nas células do disco imaginal, haverá formação de clones homozigotos, que são viáveis em conjuntos de células isoladas da larva e se manifestam como tumores (verrugas) na mosca adulta [33]. Assim, o ETC foi utilizado com o objetivo de avaliar o potencial carcinogênico da associação de etinilestradiol e levonorgestrel, formulação disponibilizada em pílulas anticoncepcionais presentes no mercado, em diferentes concentrações.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Compostos químicos e meio de cultura

A associação dos hormônios foi obtida por meio do anticoncepcional Evonor® (Pfizer Ireland Pharmaceuticals, Lote S89206).

Como controle positivo utilizou-se o Cloridrato de Doxorrubicina (DXR) adquirido da Pfizer do Brasil (Lote: 5PL5111, CAS: 31677-93-7.), e como, controle negativo água ultra pura (18.2 MΩ), obtida do sistema MilliQ (Millipore, Vimodrone, Milan, Itália). O Purê de batata em flocos, utilizado como meio de cultura alternativo, foi obtido da Yoki Alimentos S.A. Todas as soluções foram preparadas no momento de uso.

2.2. Linhagens de *D. melanogaster* e tratamentos

Duas linhagens mutantes foram utilizadas no presente trabalho: (1) Linhagem *multiple wing hairs* (*mwh*, 3-0,3); e (2) Linhagem *warts* (*wts*, 3-100) - *wts*, [1] in [1] *kni* [ri-1] *p* [p] *wts* [3-17]/TM3, SB [1]. A linhagem *mwh* objetiva exclusivamente permitir o estado de heterozigose para o

marcador *wts* por meio do cruzamento. A linhagem *warts* possui um marcador *wts* no cromossomo 3, que é mantido em hemizigose na presença do balanceador cromossômico TM3, *Sb*¹. O marcador *wts*, quando expresso na condição selvagem, atua como um gene supressor de tumor. A deleção desse gene, e a expressão do alelo recessivo, leva à formação de clones de células que são consideradas altamente invasivas, acarretando na manifestação de tumor epitelial no corpo e apêndices da mosca.

Foi realizado o cruzamento entre machos *mwh/mwh* e fêmeas virgens da linhagem *wts/TM3,Sb*¹. Duas progênies são geradas nesse cruzamento: trans-heterozigoto marcado (*mwh+/+wts*) (MH), e heterozigoto balanceado (*mwh+/+TM3, Sb*¹) (BH). No ensaio de detecção de clones de tumor, apenas a progênie MH é analisada. A identificação da progênie é feita mediante a expressão do balanceador cromossômico TM3, *Sb*¹, que apresenta, como fenótipo, pelos curtos e espessos no corpo da mosca, o que difere da progênie MH, que apresenta pelos selvagens do tipo longos e finos no corpo da mosca.

As moscas da linhagem *wts* foram mantidas em estoque, em estufa B.O.D com ciclo de 12h de claro/escuro com umidade relativa de 60% e temperatura média de $25 \pm 1^\circ\text{C}$. A coleta de ovos dos descendentes do cruzamento ocorreu por um período de 8 horas, em frascos contendo meio de cultura à base de ágar (4%) e fermento biológico suplementado com sacarose comercial. Após 72 ± 4 horas, larvas de 3º estágio foram lavadas em água ultrapura MiliQ (Millipore) e coletadas com auxílio de uma peneira de malha fina. Para escolha das concentrações, as larvas foram submetidas ao tratamento crônico (aproximadamente 48 horas) com diferentes concentrações da associação dos hormônios etinilestradiol e levonogestrel, respectivamente, C1 - 0,000328125 / 0,001640625 mg/mL, C2 - 0,00065625 / 0,00328125 mg/mL, C3 - 0,0013125 / 0,0065625 mg/mL, C4 - 0,002625 / 0,013125 mg/mL, C5 - 0,00525 / 0,02625 mg/mL, C6 - 0,0105 / 0,0525 mg/mL, C7 - 0,021 / 0,105 mg/mL e C8 - 0,042 / 0,21 mg/mL. A taxa de sobrevivência foi calculada logo após a metamorfose, por meio da contagem de imagos, e usada neste trabalho para a escolha das concentrações a serem avaliadas no ETC.

DXR foi usado como controle positivo na concentração de 0,4 mM, tendo como base, estudos de recombinação homóloga em *D. melanogaster* e ensaios de carcinogênese [34, 35, 25]. Larvas de 3º estágio foram expostas a purê de batata hidratado com 0,4 mM DXR e após 6 horas, as larvas foram transferidas para *vials* contendo 1,5 g de purê de batata hidratada em 5 mL de água ultra pura.

2.3. Fixação de moscas e análise de tumor epitelial

Para análise de tumor epitelial, 180 adultos eclodidos do cruzamento *mwh+/+mwh X wts+/TM3, Sb*¹, de cada concentração, foram fixados em etanol 70% (v/v) e analisados sob estereomicroscópio e placa de Petri embebida com glicerina comercial. A análise foi baseada na contagem de tumores, de acordo com a descrição de Justice (1995) [29]. Os resultados foram registrados em um diagrama padrão, expressando os números observados em cada seguimento das moscas: olhos, cabeça, corpo, asas, pernas e halteres.

2.4. Análise estatística

As frequências de tumores epiteliais observados nos indivíduos tratados com diferentes concentrações da associação de etinilestradiol e levonogestrel foram comparadas estatisticamente com as frequências de tumores epiteliais observadas nas moscas tratadas com água ultrapura (controle negativo) usando o teste *U*, não paramétrico, de Mann-Whitney, com nível de significância $p \leq 0,005$. Para estabelecer a curva de sobrevivência, a taxa de sobrevivência das moscas tratadas com a combinação dos hormônios foram comparadas com o controle negativo, utilizando o Teste do Chi-quadrado para razões de amostras independentes.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente estudo foram avaliados os efeitos tóxico e carcinogênico de diferentes associações dos hormônios etinilestradiol e levonogestrel em *D. melanogaster*. Conforme apresentado na Figura 2, indivíduos tratados com as maiores concentrações (C6, C7 e C8) apresentaram menor taxa de

sobrevivência ($P \leq 0,05$) quando comparados ao controle negativo. Para a realização da indução de tumores epiteliais, as concentrações C1, C3 e C5 foram escolhidas. A escolha dessas concentrações foi baseada na ausência de toxicidade e, ainda, para uma análise ampliada dos efeitos das associações dos hormônios esteroidais avaliados.

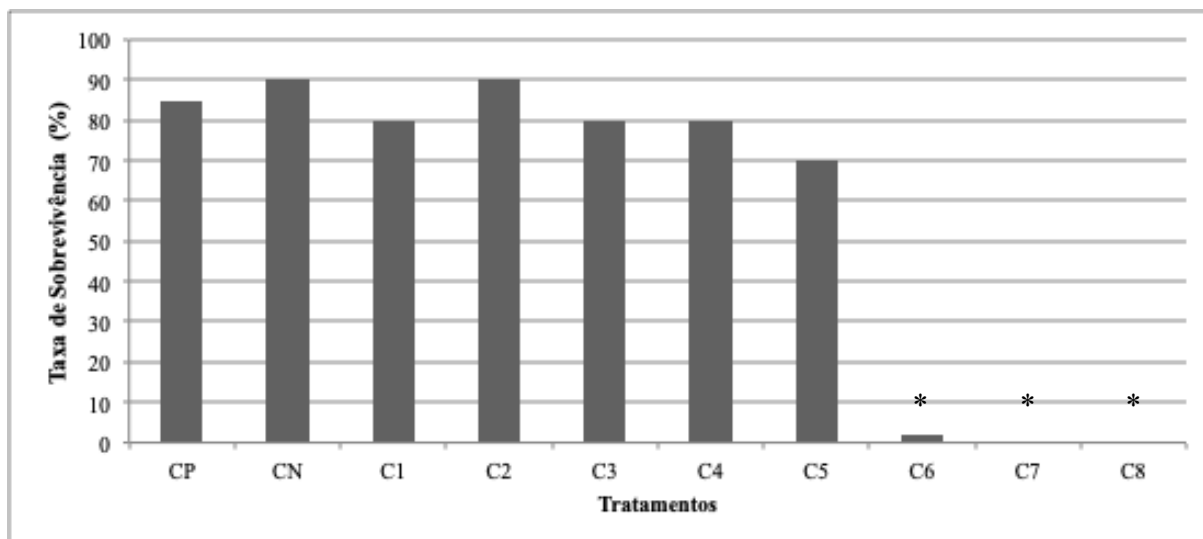


Figura 2. Taxa de sobrevivência (%) dos indivíduos tratados com diferentes concentrações dos hormônios etinilestradiol e levonogestrel, respectivamente, sendo (C1 - 0,000328125 / 0,001640625 mg/mL, C2 - 0,00065625 / 0,00328125 mg/mL, C3 - 0,0013125 / 0,0065625 mg/mL, C4 - 0,002625 / 0,013125 mg/mL, C5 - 0,00525 / 0,02625 mg/mL, C6 - 0,0105 / 0,0525 mg/mL, C7 - 0,021 / 0,105 mg/mL e C8 - 0,042 / 0,21 mg/mL); CP-Cloridrato de Doxorubicina; e CN- Água MilliQ. *Diferença significativa ($p < 0,05$) de acordo com o teste do Chi- quadrado para razões de amostras independentes.

A frequência de indução de tumores epiteliais em moscas trans-heterozigotas *mwh+/+wts* está apresentada na Figura 1. Os dados apresentados, da taxa espontânea de tumores, corroboram com dados anteriores de Maciel et al., (2017) [36] e Orsolin (2011) [37].

Todas as concentrações avaliadas (C1, C3 e C5) aumentaram significativamente a frequência de tumores ($p \leq 0,05$). A maioria das pesquisas realizadas sobre a utilização de anticoncepcionais orais e sua associação com a carcinogênese, demonstra que, o uso crônico (mais que 5 anos) eleva em até 1,5 vezes o risco de se desenvolver a doença [38].

De acordo com Maier e Herman (2001) [39], etinilestradiol ou noretindrona aumentam a incidência de alguns tipos específicos de tumores em cães e roedores em altas doses, contudo, a exposição a longo prazo representa baixo risco para a saúde humana. Por outro lado, corpos d'água contaminados por esse hormônio contradizem a segurança de uso anteriormente afirmada. Mesmo em baixas concentrações, o hormônio etinilestradiol foi capaz de alterar o sucesso reprodutivo de peixes [40] e também causar instabilidade genômica, induzindo danos em cromossomos de células de mamíferos em cultura [41].

Levonorgestrel é apontado como um dos responsáveis por indução de câncer. Em estudo realizado utilizando o referido hormônio, foi detectado correlação positiva entre o uso e a indução de câncer de mama em mulheres com 30 a 49 anos na Finlândia [42], além de aumentar a proliferação celular de *Michigan Cancer Foundation-7* (MCF-7) [43]. Já segundo Silva e Oliveira (2007) [44], quando trabalharam com o hormônio levonorgestrel, o mesmo não apresentou potencial carcinogênico nas concentrações testadas (12, 25 e 37,5 $\mu\text{g/mL}$), porém, quando associado à DXR, houve aumento significativo nas frequências de tumores em todas as concentrações. Portanto, ficou evidente que o composto testado apresentou efeito modulador capaz de potencializar a ação tumoral da DXR.

Hormônios esteroides têm uso generalizado na medicina e seus efeitos colaterais são continuamente debatidos. A possível atividade genotóxica e carcinogênica destes hormônios tem sido objeto de muitas investigações e dados epidemiológicos sobre o câncer parecem correlacionar a exposição a esses hormônios com a indução de neoplasias [45].

O uso de anticoncepcionais é um dos métodos contraceptivos mais utilizados pelas mulheres, contudo, por mais que algumas informações vêm apresentadas na bula, elas não estão cientes dos efeitos toxicológicos que os hormônios podem acarretar. Por exemplo, o fato do levonorgestrel dificultar as vias bioquímicas, tais como proteínas, carboidratos e lipídeos [46]. Enquanto, o etinilestradiol ter sido relacionado como, carcinogênicos em humanos, aumentando o número de casos de câncer de útero e sob certas condições de exposição, câncer de mama, sendo relacionado aos processos terapêuticos de reposição hormonal pós-menopausa [47,48,49,50,51].

Ainda, os contraceptivos orais contendo etinilestradiol têm sido implicados no aumento de tumores, como, por exemplo, de fígado, de colo de útero e de mama [49, 52, 50], contudo, é preciso de mais estudos na área para elucidar o papel do etinilestradiol e do levonorgestrel na carcinogênese.

Como os resultados evidenciam efeito carcinogênico devido à perda da heterozigose do marcador wts, pode ser devido os hormônios induzirem danos genéticos ou mesmo citotoxicidade. Há alguns trabalhos, como por exemplo, o do Wan e O'Brien (2014) [53], que mostram que o etinilestradiol, está relacionado com o aumento do estresse oxidativo, devido ao aumento de espécies reativas de oxigênio (ROS).

Tabela 1. Frequência de tumor epitelial observado em descendentes heterozigotos para o gene supressor de tumor *wts* de *D. melanogaster* expostos a diferentes concentrações da associação dos hormônios etinilestradiol e levornogestrel

Tratamentos	Número de indivíduos	Frequência de tumores analisados (%)						
		olhos	cabeça	asas	corpo	pernas	halteres	Total
Controle negativo	180	0,016 (03)	0,000 (00)	0,027 (05)	0,077 (14)	0,016 (03)	0,005 (01)	0,144 (26)
Controle positivo	180	0,677 (122)*	0,561 (101)*	2,400 (432)*	1,461 (263)*	1,227 (221)*	0,266 (48)*	6,594 (1187)*
C-1	180	0,000 (00)	0,077 (14)*	0,033 (06)	0,238 (43)*	0,011 (02)	0,000 (00)	0,361 (65)*
C-3	180	0,011 (02)	0,111 (20)*	0,077 (14)*	0,294 (53)*	0,005 (01)	0,000 (00)	0,500 (90)*
C-5	180	0,005 (01)	0,088 (16)*	0,066 (12)*	0,322 (58)*	0,000 (00)	0,000 (00)	0,483 (87)*

*Valores considerados diferentes do controle negativo ($p \leq 0,05$). Controle Negativo: Água ultrapura; Controle positivo: Doxorubicina (0,4 mM); Concentrações dos tratamentos com hormônios etinilestradiol e levornogestrel, respectivamente:- C1 - 0,000328125 / 0,001640625 mg/mL, C3 - 0,0013125 / 0,0065625 mg/mL, C5 - 0,00525 / 0,02625 mg/mL.

4. CONCLUSÃO

De acordo com as condições experimentais utilizadas, a associação dos hormônios etinilestradiol e levonorgestrel, induziu de forma significativa o aparecimento de tumores em *D. melanogaster* nas concentrações analisadas, e nas maiores concentrações, apresentou efeito tóxico.

5. AGRADECIMENTOS

A Universidade Federal de Uberlândia pela estrutura fornecida e ao PET Mais Saúde pelo apoio financeiro.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Speroff L, Glass RH, Kase NG. Menopause and postmenopausal hormone therapy. 5 ed Baltimore: Williams & Wilkins; 1994. Clinical Gynecologic endocrinology and Infertility. p. 583-649.
2. Zahar SEV et al. Qualidade de vida em usuárias e não usuárias de terapia de reposição hormonal. Revista da Associação Médica Brasileira. 2005 Abr; 51(3):133-8.
3. Brasil JAN. “Métodos anticoncepcionais para ginecologistas e obstetras”.CIDADE: Faculdade de Ciências e Letras, Laboratório Editorial; 2000. Scavone L, Batista LE. Pesquisas de gênero: entre o público e o privado, p. 108-9.
4. Bonan C, Teixeira LA, Nakano AR. Absorção e metabolização dos hormônios sexuais e sua transformação em tecnologias contraceptivas: percursos do pensamento médico no Brasil. Ciência e Saúde Coletiva. 2017 Out; 22 (1):107-16, doi: 10.1590/1413-81232017221.26532016.
5. Baker JH. Margaret Sanger: a life of passion. 1st ed, New York: Hill and Wang. 2011. 328 p. doi:10.1590/1413-81232017221.26532016.
6. Ranieri CM, Silva RF. Atenção farmacêutica no uso de métodos contraceptivos. Disponível em: <<http://web.unifil.br/pergamum/vinculos/000003/000003F7.pdf>>. Acesso em: 30 jun. 2017.
7. Mukai J. et al. Pílulas anticoncepcionais. PIBID-IQ-UNICAMP, 2012.
8. Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Flower RJ. Farmacologia. 6ª. ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2007. 829 p.
9. Rang HP, Dale MM, Ritter JM. Farmacologia. 4a. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2001. p.595-604.
10. Lopes MB. Cinquenta anos da pílula anticoncepcional. Niterói: [s. n.], 2014.
11. Glasier AF, Cameron ST, Fine PM, Logan SJS, Casale W, Van Horn J et al. Ulipristal acetate versus levonorgestrel for emergency contraception: a randomised non-inferiority trial and meta-analysis. Lancet. 2010; 375(9714):555–62, doi: 10.1016/S0140-6736(10)60101-8.
12. Watson CS, Jeng YJ, Kochukov MY. Nongenomic signaling pathways of estrogen toxicity. Toxicological Sciences. 2009 Nov; 115(1):1-11, doi: :10.1093/toxsci/kfp288.
13. Fernandes IC, Mello AA. Entendendo e Combatendo o câncer. Campina Grande. 2008, 7(10/11):2-11.
14. Cotran, Ramzi S, Kumar V, Robbins SL. Patologia estrutural e funcional. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S/A; 2005.
15. Junqueira LC, Carneiro J. Biologia celular e molecular. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S/A; 2000.
16. Silva, Penildon. Farmacologia. 7a. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S/A; 2006.
17. Araújo Júnior NLC, Athanazio DA. Terapia de reposição hormonal do endométrio. Caderno - Saúde Pública, 2007 Nov; 23(11):2613-22, doi: 10.1590/S0102-311X2007001100009.
18. Mitre EI. et al. Avaliações audiométrica e vestibular em mulheres que utilizam o método contraceptivo hormonal oral. Revista Brasileira de Otorrinolaringologia. 2006 Mai/Jun;72(3):350-4, doi:10.1590/S0034-72992006000300009.
19. Brito MB, Nobre F, Vieira CS. Contraceção hormonal e sistema cardiovascular. Arquivos brasileiros de Cardiologia. 2011 Abr;96(4):81-9, doi: 10.1590/S0066-782X2011005000022.
20. Pereira SM, Taquette SR. Desvendando mitos sobre anticoncepção hormonal oral na adolescência. Adolescência & Saúde. 2008 Mar;5(1): 45-9.
21. Morales MM. Métodos alternativos à utilização de animais em pesquisa científica: mito ou realidade? Ciência e Cultura. 2008; 60(2):33-6.
22. Siddique HR et al. Validation of *Drosophila melanogaster* as an in vivo model for genotoxicity assessment using modified alkaline Comet assay. Mutagenesis. 2005 Jul;20(4): 285-90, doi: 10.1093/mutage/gei032.
23. Roberts DB. *Drosophila melanogaster*: the model organismo. Entomologia Experimentalis et Applicata. 2006 Out;121:93-103,doi:10.1111/j.1570-8703.2006.00474.x.
24. Demir E, Turna F, Vales G, Kaya B, Creus A, Marcos R. In vivo genotoxicity assessment of titanium, zirconium and aluminium nanoparticles, and their microparticulated forms, in *Drosophila*. Chemosphere. 2013 Nov;93(10):2304-10, doi: 10.1016/j.chemosphere.2013.08.022.
25. Morais CR, Bonetti AN, Carvalho SM, Rezende AAA, Araujo GR, Spanó MA. Assessment of mutagenic, recombinogenic and carcinogenic potential of Fipronil insecticide in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. Chemosphere. 2016 Dez;165:342-51, doi:10.1016/j.chemosphere.2016.09.023.
26. Oliveira VC, Constante SAR, Orsolin PC, Nepomuceno JC, de Rezende AAA, Spanó MA. Modulatory effects of metformin on mutagenicity and epithelial tumor incidence in doxorubicin-treated *Drosophila melanogaster*. Food Chem Toxicol. 2017 Ago;106:283-291, doi: 10.1016/j.fct.2017.05.052.

27. Vasconcelos MA, Orsolin PC, Silva-Oliveira RG, Nepomuceno JC, Spanó MA. Assessment of the carcinogenic potential of high intense-sweeteners through the test for detection of epithelial tumor clones (warts) in *Drosophila melanogaster*. Food Chem Toxicol. 2017 Mar;101:1-7, doi: 10.1016/j.fct.2016.12.028.
28. Chifriuc MC, Ratiu AC, Popa M, Al A. Ecovoioi. Drosophotoxicology: An emerging research area for assessing nanoparticles interaction with living organisms. Int. J. Mol. Sci. 2016 Fev; 17(2): 36, doi: 10.3390/ijms17020036.
29. Justice RW, Zilian O, Woods DF, Noll M, Bryant PJ. The *Drosophila* tumor suppressor gene warts encodes a homolog of human myotonic dystrophy kinase and is required for the control of cell shape and proliferation. Gene Dev. 1995 Mar;9(5):534-546.
30. Eeken JCJ, Clink I, Veen BLV, Ferro W. Induction of epithelial tumors in *Drosophila melanogaster* heterozygous for the tumor suppressor gene wts. Environmental and Molecular Mutagenesis. 2002, 40(4):277-282, doi: 10.1002/em.10119.
31. Kennedy SR. et al. Somatic mutations in aging, cancer and neurodegeneration. Mechanisms of Ageing and Development, 2012 Abr;133(4): 118-26, doi: 10.1016/j.mad.2011.10.009.
32. Friedberg et al. DNA repair: From molecular mechanism to human disease. DNA repair. 2006 Ago;5(8):986-96.
33. Sidorov RA, Ugnivenko EG, Khovanova EM, Belitsky GA. Induction of tumor clones in *Drosophila melanogaster* wts/wts/+ heterozygotes with chemical carcinogenes. Mutat. Res. 2001 Nov;498(1-2):181-91.
34. Orsolin PC, Nepomuceno JC. Potencial carcinogênico do açafrão (*Curcuma longa* L.) identificado por meio do teste para detecção de clones de tumor em *Drosophila melanogaster*. Revista do Núcleo Interdisciplinar de Pesquisa e Extensão do UNIPAM. 2009, 6:55-69.
35. Orsolin PC, Silva-Oliveira RG, Nepomuceno JC. Modulating effect of synthetic statins against damage induced by doxorubicin in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. Food Chem. Toxicol. 2015 Jul;81:111-119, doi: 10.1016/j.fct.2015.04.004.
36. Maciel AD, Magalhães MD, Orsolin PC. Efeito modulador do óleo de copaíba (*Copaifera officinalis* L.) sobre a carcinogenicidade da doxorubicina, avaliado por meio do teste para detecção de clones de tumores em *Drosophila melanogaster*. Revista de Ciências Médicas e Biológicas. 2017 Mai/Ago;16(2):157-161, doi: 10.9771/cmbio.v16i2.21963.
37. Orsolin, PC. Avaliação do potencial mutagênico, recombinogênico e carcinogênico do Orlistat em células somáticas de *Drosophila melanogaster*. 2011. 75 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2011.
38. Schunemman JE, Souza RT, Dória MT. Anticoncepção hormonal e câncer de mama. Feminina. 2011 Abr;39(4).
39. Maier WE, Herman JR. Pharmacology and toxicology of ethinyl estradiol and norethindrone acetate in experimental animals. Regulatory Toxicology and Pharmacology. 2001 Ago;34:53-61, doi: 10.1006/rtp.2001.1483.
40. Nash JP, Kime DE, Van der Ven LTM, Wester PW, Brion F, Maack G, Stahlschmidt-Allner P, Tyler CR. Long-term exposure to environmental concentrations of the pharmaceutical ethinylestradiol causes reproductive failure in fish. Environ. Health Perspect. 2004 Dez;112(17):1725-1733, doi: 10.1289/ehp.7209.
41. Siddique YH, Beg T, Afzal M. Genotoxic potential of ethinylestradiol in cultured mammalian cells. Chem. Biol. Interact. 2005 Jan;151(2): 133-141, doi: 10.1016/j.cbi.2004.10.008.
42. Soini T, Hurskainen R, Grénman S, Mäenpää J, Paavonen J, Pukkala E. Cancer risk in women using the levonorgestrel-releasing intrauterine system in Finland. Obstet Gynecol. 2014 Ago; 124(2 Pt 1):292-9, doi: 10.1097/AOG.0000000000000356.
43. Ruan X, Neubauer H, Yang Y, Schneck H, Schultz S, Fehm T, Cahill MA, Seeger H, Mueck AO. Progestogens and membrane-initiated effects on the proliferation of human breast cancer cells. Climacteric. 2012 Out;15(5):467-72, doi: 10.3109/13697137.2011.648232.
44. Silva MR, Oliveira RGS. Avaliação do efeito carcinogênico e anticarcinogênico do levonorgestrel através do teste de detecção de clones de tumores epiteliais em células somáticas de *Drosophila melanogaster*. Revista Perquirere. 2017 Jan/abr; 14(1): 200-17.
45. Joosten HF, van Acker FA, van den Dobbelen DJ, Horbach GJ, Krajnc EI. Genotoxicity of hormonal steroids. Toxicology Letters. 2004 Jun;151(1):113-34, doi: 10.1016/j.toxlet.2004.01.018.
46. Swaroop G, Geetha V, Reshma A, Geethanjali S, Poornima R. Drug toxicity of levonorgestrel (LNG) targeting biochemical pathways in *Drosophila melanogaster*. International Journal of Pharmacology and Toxicology. 2013 Nov;1(2):43-52, doi: 10.14419/ijpt.v1i2.1363.
47. International Agency for Research on Cancer (IARC). Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans. Sex Hormones (II). 1979, vol. 21.

48. International Agency for Research on Cancer (IARC). IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans. Overall Evaluations of Carcinogenicity: An Updating of IARC Monographs. 1987, v. 1-42.
49. International Agency for Research on Cancer (IARC). IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans. Post-Menopausal Oestrogen Therapy. IARC Lyon France. 1999, v.72.
50. National Toxicology Program (NTP). NTP 11th Report on Carcinogens. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Toxicology Program, Research Triangle Park, NC. 2004; 11:1-A32.
51. Reeves GK, Beral V, Green J, Gathani T, Bull D. Hormonal therapy for menopause and breast-cancer risk by histological type: a cohort study and meta-analysis. 2006 Nov; 7(11):910-8, doi: 10.1016/S1470-2045(06)70911-1.
52. Moreno V, Bosch FX, Munoz N, Meijer CJ, Shah KV, Walboomers JM, Herrero R, Franceschi S. Effect of oral contraceptives on risk of cervical cancer in women with human papillomavirus infection: The IARC multicentric case-control study. Lancet. 2002 Mar;359(9312):1085-92, doi: 10.1016/S0140-6736(02)08150-3.
53. Wan L, O'Brien P. Molecular mechanism of 17 α -ethinylestradiol cytotoxicity in isolated rat hepatocytes. Canadian Journal of Physiology Pharmacology. 2014. Oct; 92:21-6, doi: 10.1139/cjpp-2013-0267.

7. NORMAS DA REVISTA

Tabelas e figuras devem ser centralizadas, com legendas objetivas e autoexplicativas. Tabelas não devem apresentar linhas verticais secundárias. Devem-se evitar tabelas com legendas entre páginas. Indicações, que podem ser incluídas em itálico por toda a obra.

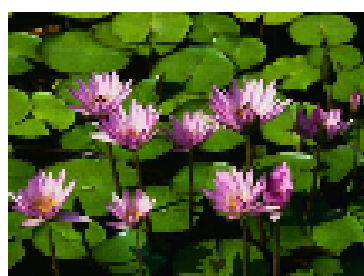


Figura 1: Legenda da figura

Tabela 1: Exemplo de modelo de tabela

	Título		
Título	Coluna 1	Coluna 2	Coluna 3
Linha 1	XXXX	XXXX	XXXX
Linha 2	XXXX	XXXX	XXXX
Linha 3	XXXX	XXXX	XXXX
Linha 4	XXXX	XXXX	XXXX

[SP10] Comentário: A legenda da figura deve ser objetiva e autoexplicativa, centralizada, em itálico e usando Times New Roman tamanho 10.

[SP11] Comentário: A legenda da tabela deve ser objetiva e autoexplicativa, centralizada, em itálico e usando Times New Roman tamanho 10.

4. CONCLUSÃO

Uma conclusão deve ser apresentada com as principais contribuições do estudo.

5. AGRADECIMENTOS

Apresentar os agradecimentos pertinentes, se houver.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Peiris DB, Crooks VC, Buckwalter JG, Chia V. Blood pressure levels before dementia. *Arch Neurol*. 2005 Jun;62(11):112-6. doi:10.1001/archneur.62.11.112.
2. Meneton F, Jeunissen X, de Wardener HE, MacGregor GA. Links between dietary salt intake, renal salt handling, blood pressure, and cardiovascular diseases. *Physiol Rev*. 2005 Apr;85(2):679-715. doi: 10.1152/physrev.00056.2003
3. Jenkins PS. Making sense of the chest x-ray: a hands-on guide. New York: Oxford University Press; 2003. 194 p.
4. Riffenburgh RH. Statistics in medicine. 2nd ed. Amsterdam (Netherlands): Elsevier Academic Press; 2006. Chapter 24, Regression and correlation methods; p. 467-86. doi: 10.1016/B978-0-12-384864-2.00025-1
5. Zhao C. Development of nano-electrospray and application to protein research and drug discovery [dissertation]. Buffalo (NY): State University of New York at Buffalo; 2005. 276 p.
6. Elze AG, Ferguson-Smith WE, Edinger D, Brooks JW. *Cardiac muscle and path. In: DeGroot LJ, Clem DR, Edinger W, editors. Proceedings of the 10th World Congress on Pathology Aug 17-22 San Diego, CA, Seattle (WA): IASP Press; 1992. p. 467-84.*

[SP12] Comentário: Uma lista Times New Roman tamanho 10, alinhamento justificado.

As referências apresentadas são exemplos de artigos [1,2], livro [3], capítulo de livro [4], dissertações e teses [5], artigos publicados em sites de revistas científicas [6]. Para mais informações, consultar <http://www.abn.br/abn/pt/colaboradores>.

TODAs referências que possuam DOI devem conter o respectivo número apresentado ao final de referência.