

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

Recombinação homóloga como a principal resposta ao dano induzido por doxorrubicina em
Drosophila melanogaster

Gustavo Siconello dos Santos

Ituiutaba - MG
Julho de 2018

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

Recombinação homóloga como a principal resposta ao dano induzido por doxorrubicina em
Drosophila melanogaster

Gustavo Siconello dos Santos

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
Julho de 2018

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Edna Siconello dos Santos e Belmiro José dos Santos, por, desde sempre, me incentivarem e apoiarem, pelos ensinamentos e pelas inesquecíveis demonstrações de amor, por tantos e tantos momentos que seguem incentivando minha caminhada. Quem imaginaria que alguns dinossauros me trariam até aqui? Devo-lhes minha vida. Ao meu irmão, Henrique Siconello dos Santos, eterno companheiro das discussões intermináveis, pelo constante incentivo, pelas inúmeras viagens a mundos distantes, aprendizado compartilhado e por demonstrar-me as vantagens de se começar pelo modo “Hard”. E a todos os familiares pelo apoio.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Alexandre Azenha Alves de Rezende, pelos ensinamentos, pelos momentos alegres e descontraídos em meio ao frenesi acadêmico e, principalmente, pela paciência. Imensa gratidão por ter acreditado em mim e por ter me acolhido enquanto discípulo científico.

Aos demais professores do curso de Ciências Biológicas, pela contribuição na construção profissional e pessoal da minha pessoa enquanto futuro biólogo. O aprendizado por vocês transmitido possui grandioso valor e irá reverberar enquanto eu viver.

Aos meus amigos de ermos distantes, Julia e Talis, pelo carinho, compreensão e pacatez. Nenhum período de ausência jamais será capaz de erodir meu carinho por vocês. Nossa “party” sempre estará pronta para a próxima aventura.

À minha irmã “mais nova”, Larissa Fernandes, por ter sido uma grande companheira (“Greg” da dupla dinâmica) em meio a todos os desesperos, felicidades, angústias e alegrias da vida acadêmica e pessoal. Pelas trocas de experiências e conhecimentos enriquecedores e pelos puxões de orelha. Aos meus amigos, Lucas Felipe (Frodo), Felipe Naves (Dilon) e Nathalia Sousa, pelo grande carinho, companheirismo, extensos debates e trocas de ideias. Foram inúmeros momentos que me marcaram e certamente os relembrei com imensa ternura. E aos demais amigos que o período de graduação me proporcionou e que me auxiliaram direta ou indiretamente na minha formação.

À minha namorada, Natália Oliveira do Nascimento, pelo afeto, compreensão, amizade, companheirismo e pelos momentos de intenso convívio e alegria.

À Universidade Federal de Uberlândia pela oportunidade e suporte estrutural que tornaram possíveis inúmeros momentos de aprendizado e crescimento pessoal e profissional.

À banca de avaliadores, Maria Paula Carvalho Naves e ao Cássio Resende de Moraes pela disposição, atenção e valiosa ajuda em minha caminhada enquanto profissional Biólogo. Essa certamente é uma etapa de várias outras que estão por vir.

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pela bolsa concedida.

RESUMO

O cloridrato de doxorubicina (DXR), denominado comercialmente como adriamicina, é um agente quimioterápico, utilizado no tratamento de alguns tipos de tumores sólidos. Quando ministrado, permanece ativo durante todo o processo de divisão mitótica e sua ação citotóxica advém da conversão do anel de quinona em semiquinona, interagindo e danificando enzimas, tal como as topoisomerases, principalmente a do tipo II. Esta, quando inibida, impede a religação da dupla fita de DNA, provocando lesões que podem levar a apoptose, processo carcinogênico ou ser passíveis de reparo. Assim, foi analisado o potencial tóxico e recombinogênico relacionados a diferentes concentrações do DXR (0,1; 0,2; 0,4; 0,8 e 1,0 mM), em larvas de 72 ± 4 h de *D. melanogaster* obtidas através dos dois cruzamentos realizados para o SMART (*Somatic Mutation And Recombination Test*). Cruzamento padrão (ST) - com níveis basais de metabolização – e o de alta bioativação (HB), com elevados níveis de citocromo P450 (CYP450). O teste de sobrevivência demonstrou que, as concentrações de 0,8 e 1,0 mM foram tóxicas tanto no ST quanto no HB, quando comparadas ao controle negativo, além disso, no cruzamento HB, a concentração de 0,4 mM também foi tóxica. Com base nos resultados obtidos é possível inferir que a maior taxa de mortalidade dos indivíduos do cruzamento HB, pode estar relacionada ao fato de possuírem maiores níveis de expressão de CYP450, pois a interação do DXR com esse complexo enzimático está relacionada ao aumento da geração de radicais livres, promovendo maior toxicidade e consequente mortalidade. A avaliação recombinogênica revelou que, para os indivíduos advindos do cruzamento ST, a concentração de 0,1 mM resultou em 75,3% de manchas induzidas por recombinação, a concentração de 0,2 mM foi de 82,8% e a de 0,4 mM foi de 84,9%. Para a concentração de 0,1 mM do cruzamento HB a taxa foi de 88,23% e para as concentrações 0,2 e 0,4 mM foi, respectivamente, de 86,60%, 96,24%. Diante do acima exposto, pode-se inferir que o dano celular induzido por DXR é reparado preferencialmente por recombinação homóloga (RH), já que este mecanismo pode levar à perda da heterozigose, aumentando a frequência de manchas mutantes nas asas de *D. melanogaster* e que, por outro lado, o aumento de RH está relacionado o aumento da taxa de sobrevivência em ambos os cruzamentos.

Palavras chave: Reparo do DNA; dano do DNA; doxorubicina; SMART;

ABSTRACT

Doxorubicin hydrochloride (DXR), commercially known as adriamycin, is a chemotherapeutic agent used in the treatment of some types of solid tumors. When administered, it remains active throughout mitotic division and its cytotoxic action comes from the conversion of quinone ring into semiquinone, interacting and damaging enzymes, especially topoisomerase II. This, when inhibited, prevents the re-ligation of the double strands of DNA, provoking lesions that may lead to an apoptosis, carcinogenic process or may be amenable to repair. Thus, the toxic and recombinogenic potential of different concentrations of DXR (0.1, 0.2, 0.4, 0.8 and 1.0 mM) in 72 ± 4 h larvae of *D. melanogaster*, obtained through the crosses used at SMART (Somatic Mutation and Recombination Test), originated from Standard Cross (ST) - with basal levels of metabolism - and High Bioactivation (HB), with high cytochrome P450 (CYP450) levels. Survival tests demonstrated that, concentrations of 0.8 and 1.0 mM were toxic in ST and HB crosses, when compared to the negative control, however, in the HB cross, the concentration of 0.4 mM was also toxic. Based on the results obtained it is possible to infer that the greater mortality of individuals in the HB cross, may be related to the fact that they have a higher expression of CYP450 levels, due to the interaction between DXR with this enzyme complex, is associated with the increased production of free radicals, promoting greater toxicity and consequent mortality. The recombinogenic evaluation revealed that, in individuals from ST cross, the concentration of 0.1 mM results in 75.3% recombination-induced spots. At the concentration of 0.2 mM, it was 82.8% and at a concentration of 0.4 mM it was 84.9%. The concentration of 0.1 mM was 88.23% and for the 0.2 and 0.4 mM concentrations, were, respectively, 86.60%, 96.24%. In view of the foregoing, it can be inferred that the response to DXR-induced cell damage is preferentially repaired by homologous recombination (HR), since that mechanism may lead to loss of heterozygosity, increasing the frequency of mutant spots in the wings of *D. melanogaster* and, on the other hand, the increase in HR is related to survival rate increase in both crosses.

Keywords: DNA repair; DNA damage; doxorubicin; SMART

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	8
2. MATERIAL E MÉTODOS	10
2.1 Compostos Químicos e Meio de Cultura	10
2.2 Teste de Mutação e Recombinação Somática (SMART) em <i>Drosophila melanogaster</i> ...	11
2.2.1 Linhagens de <i>Drosophila</i>	11
2.2.2 Cruzamentos e Tratamentos	11
2.2.3 Preparação e Análise das Lâminas	11
2.2.4 Análise Estatística	12
3. RESULTADOS	13
4. DISCUSSÃO	22
5. CONCLUSÃO	24
6. REFERÊNCIAS	25
ANEXO 1	30

1. INTRODUÇÃO

Considerado a segunda maior causa de mortalidade no mundo, o câncer, tem sido alvo de intensos estudos e pesquisas com a finalidade de encontrar melhores meios de prevenção e tratamento (Lowy, Collins, 2016; Fitzmaurice et al., 2017). Pesquisas indicam aumento significativo em sua incidência, cerca de 33% entre os períodos de 2005 e 2015, sendo estimados aproximadamente 17,5 milhões de casos no ano de 2015 (Fitzmaurice et al., 2017). Uma série de quimioterápicos tem sido utilizada no combate ao câncer, sendo as antraciclina uma das classes destes medicamentos.

As antraciclina, antibióticos naturais inicialmente isolados da bactéria *Streptomyces peucetius* na década de 60, configuram uma classe de medicamentos que contam atualmente com mais de 2000 derivados. Dentre os quimioterápicos desta classe destaca-se o cloridrato de doxorubicina (DXR) (Corte's-Funes, Coronado, 2007; Carvalho et al., 2009). O DXR, também conhecido como adriamicina (Rocha et al., 2001), é amplamente utilizado em tratamentos oncológicos devido ao seu amplo espectro de ação antitumoral, possuindo ações citotóxicas contra inúmeras variedades de cânceres, tais como os de pulmão, mama, ovário e gástrico (Corte's-Funes, Coronado, 2007; Borilev et al., 2018).

Assim como os demais compostos da classe das antraciclina, o DXR contém uma estrutura aromática plana tetracíclica (aglicona) ligada a um amino-açúcar (daunosamina) por ligação glicosídica (Carvalho et al., 2009; Borilev et al., 2018). Possui diversos meios de ação citotóxica e um deles em virtude da atuação do radical semiquinona, derivado da redução química do anel de quinona por uma série de oxidoreduases celular, podendo provocar reações de oxido-redução (Hardman et al., 2002). O DXR liga-se, então, covalentemente a enzimas responsáveis pela replicação do DNA, além de intercalar-se no mesmo (Carvalho et al., 2009). Sua aplicação afeta, principalmente, tecidos de rápida proliferação, tais como os folículos pilosos, tumorais e da medula óssea, e permanece ativo durante todo o período de divisão mitótica, provocando lesões no DNA e levando à apoptose (Hardman et al., 2002).

IMAGEM DXR

Além disso, interfere na cadeia transportadora de elétrons mitocondrial, reagindo com oxigênio molecular e induzindo aumento nas taxas de liberação de radicais livres, levando a lesões em diversas biomoléculas celulares (Zhou et al., 2001). A elevada concentração de radicais livres relaciona-se diretamente com o desenvolvimento de cardiomiopatias, uma vez que o DXR induz, por diferentes vias, a cardiotoxicidade dependendo da dose ministrada, tempo de tratamento, bem

como variáveis envolvendo saúde e hábitos de vida do paciente, limitando seu uso clínico (Tan et al., 2010; Carvalho et al., 2013).

Ainda, o DXR pode interferir no ciclo catalítico da enzima topoisomerase II (topo II) e na estabilização do complexo topo II – DNA após a clivagem da dupla fita, acarretando em lesões ao longo do material genético (Osheroff et al., 1991; Borilev et al., 2018). Essa enzima é essencial na regulação topológica do DNA, pois atua na manutenção estrutural dos cromossomos, na replicação, transcrição e demais vias metabólicas da célula. Além disso, desempenha importante papel durante a replicação do DNA aliviando a tensão acumulada devido à hiperespiralização à frente da forquilha de replicação. Desse modo, a topo II secciona a dupla fita, religando-a em sequência (Osheroff et al., 1991; Baguley, Ferguson, 1998).

Mutações gênicas, eventos recombinogênicos e aberrações cromossômicas induzidas por agentes químicos, se sucedem pelas mais diversas interações. Mecanismos evolutivos selecionaram, ao longo do tempo, sistemas de reparo do DNA que atendem, de modo geral, às lesões no material genético induzidas ou não (Costa & Menk, 2000; Friedberg, 2003). Um desses mecanismos responsáveis pelo reparo de quebras bifilamentares é a recombinação homóloga (RH), de elevada importância na instalação de eventos mutagênicos e recombinogênicos. A atividade enzimática do processo de RH baseia-se na cópia da sequência de nucleotídeos do cromossomo homólogo não lesionado, utilizando-a para reparar o cromossomo lesionado. Porém, desse modo, há probabilidade de marcadores genéticos entrarem em homozigose, passando a expressar fenótipos ou condições exclusivas de marcadores recessivos (Graf et al., 1984; Friedberg, 2003).

Desenvolvido em 1984, o SMART (Somatic Mutation And Recombination Test) é amplamente utilizado para avaliar o potencial genotóxico de compostos mutagênicos de ação direta ou indireta, cuja ação mutagênica pode ser ativada ou intensificada pelo metabolismo da *D. melanogaster*, dependendo do período de meia vida dos mesmos. (Graf et al, 1984). Assim, a utilização de modelos animais, de modo a simular o desenvolvimento e progressão de condições humanas, é extensamente explorada. Devido às inúmeras similaridades do arcabouço genético da *Drosophila melanogaster* em comparação com os seres humanos, a torna alvo de variados estudos (Kim et al., 2011; Naves et al., 2018; Morais et al., 2018). Seu curto ciclo de vida, fácil manipulação em laboratório, características genéticas bem conhecidas e um metabolismo passível de ativar diferentes xenobióticos, demonstram a sensibilidade da *D. melanogaster* em análises toxicológicas, tal como no SMART (Graf et al., 1984; Wilson-Sanders, 2014).

Embora a RH seja indutora de recombinação mitótica, mutação, recombinação não-homóloga e deleções, também podem levar à perda de heterozigose. Nesse sentido, o DXR, enquanto eficiente agente mutagênico e recombinogênico, se torna excelente objeto de estudo em virtude de sua elevada utilização clínica como antineoplásico e de suas diversas vias de atuação no

organismo, induzindo, principalmente, citotoxicidade cardíaca como efeito colateral (Graf et al., 1984; Carvalho et al., 2009). Incrementar, melhorar ou alterar seu uso para se alcançar melhores resultados no tratamento é de grande relevância e importância médica e, para tanto, é imprescindível compreender suas características.

Este estudo teve o propósito de analisar e demonstrar os efeitos genotóxicos do DXR, bem como quantificar a contribuição da recombinação homóloga para cada concentração testada e relacioná-las com as taxas de sobrevivência, por meio do SMART de asa em *D. melanogaster*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Compostos Químicos e Meio de Cultura

O Cloridrato de Doxorrubicina (DXR) foi adquirido da Pfizer do Brasil Lote: 5PL5111, CAS: 31677-93-7. Uretano 10 mM (Etil-carbamato – CAS: 51-79-6, Buchs, Suíça), foi utilizado como controle positivo e água ultra pura (18.2 MΩ), obtida do sistema MilliQ (Millipore, Vimodrone, Milan, Itália) foi usada como controle negativo. O Purê de batata em flocos, utilizado como meio de cultura alternativo, foi obtido da Yoki Alimentos S.A. – São Bernardo do Campo, SP, Brasil. Todas as soluções foram preparadas no momento de uso.

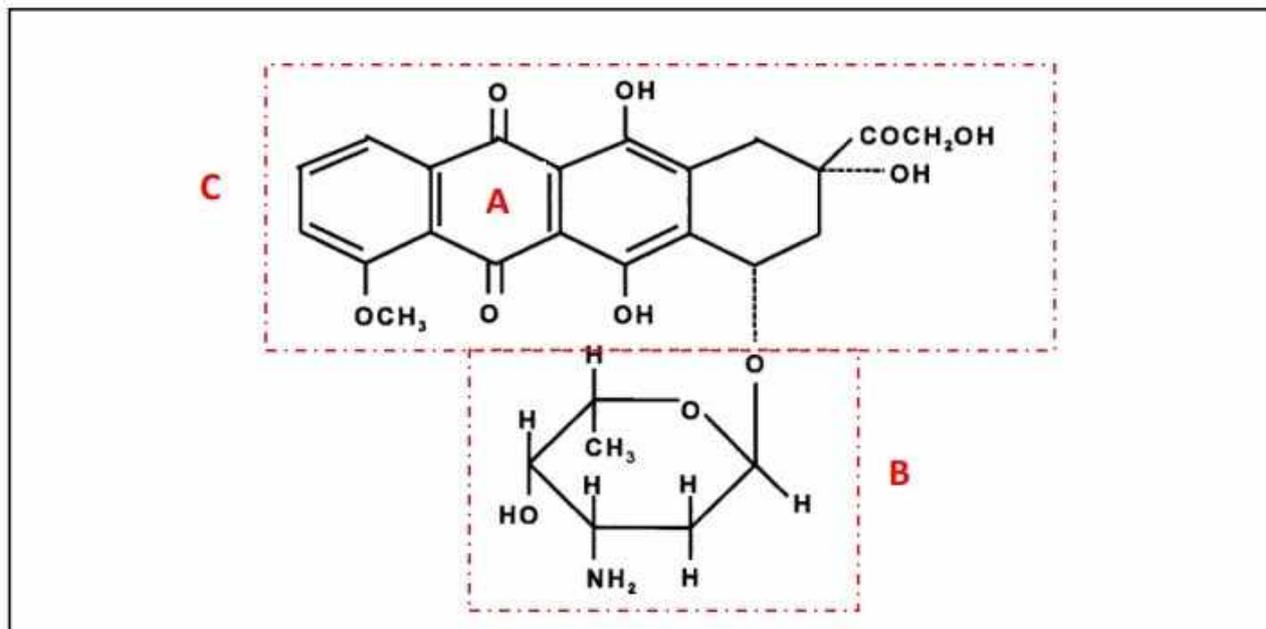


Figura 1. Estrutura química da Doxorrubicina. A: Anel quinona; B: Amino-açúcar e C: Porção quinona. (Fonte: Singal, P. K. et al., 2000, com modificações)

2.2 Teste de Mutação e Recombinação Somática (SMART) em *Drosophila melanogaster*

2.2.1 Linhagens de *Drosophila*

Três linhagens diferentes de moscas foram utilizadas: (i) machos *mwh* (*mwh/mwh*); (ii) fêmeas *flr³* (*flr³/In(3LR)TM3, ri pp sep I(3)89Aa bx^{34e} e Bd^S*); e (iii) fêmeas *ORR;flr³* (*ORR;flr³/In(3LR)TM3, ri pp sep I(3)89Aa bx^{34e} e Bd^S*). Essas linhagens mutantes foram cedidas pelo Prof. Dr. Ulrich Graf, do Instituto de Toxicologia, ETH, da Universidade de Zürich (Schwerzenbach, Suíça). As linhagens mutantes foram mantidas em estufa B.O.D (*Biologic Oxigen Demand*) (Tecnal – Equipamentos para Laboratórios Ltda., Piracicaba, SP), com fotoperíodo de 12 horas claro/escuro e temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$.

2.2.2 Cruzamentos e Tratamentos

Foram realizados dois cruzamentos: 1] padrão (*Standard cross* – ST), que utiliza machos *mwh* e fêmeas virgens *flr³* (Graf et al., 1989); e 2] alta bioativação metabólica (*High Bioactivation cross* – HB), que utiliza machos *mwh* e fêmeas *ORR; flr³* (Graf, Van Schaik, 1992), caracterizado por elevados níveis de expressão de enzimas do complexo enzimático citocromo P450. Ambos os cruzamentos (ST e HB) produzem dois tipos de descendentes: moscas trans-heterozigotas marcadas (MH – *mwh+/+flr³*) e moscas heterozigotas balanceadas (BH – *mwh+/+TM3,Bd^S*).

Larvas de terceiro estágio ($72 \pm 4\text{h}$), provenientes dos dois cruzamentos, foram submetidas a tratamento crônico (aproximadamente 48h) com diferentes concentrações de DXR (0,1; 0,2; 0,4; 0,8 ou 1,0 mM). As concentrações escolhidas após ensaio de sobrevivência foram aquelas que não alteraram significativamente as taxas de sobrevivência quando comparadas ao controle negativo, para o DXR foi: 0,1; 0,2; 0,4 mM.

Os tratamentos (sobrevivência e SMART) foram realizados em frascos contendo 1,5 g de meio de cultura alternativo (purê de batata instantâneo, Yoki Hikari[®]), hidratados com 5 mL de cada concentração testada. Água ultra pura foi utilizada como controle negativo e como controle positivo utilizou-se Uretano 10 mM. Todos os tratamentos foram realizados em duplicata.

2.2.3 Preparação e Análise das Lâminas

Os adultos emergentes após o tratamento foram coletados e armazenados em frascos contendo etanol 70%. As asas foram retiradas com auxílio de pinças entomológicas e de um estereomicroscópio, e alinhadas sobre uma lâmina de vidro, sendo 5 pares de asas de fêmeas na parte superior e 5 pares de asas de machos na porção inferior. Para adesão da lamínula à lâmina,

foram utilizados solução de Faure (30 g de goma arábica, 20 mL de glicerol, 50 g de hidrato cloral e 50 mL de água) e pesos de metal. As lâminas foram analisadas em microscópio óptico de luz com aumento de 400X.

2.2.4 Análise Estatística

Para avaliação do potencial mutagênico e carcinogênico das diferentes concentrações de DXR, a frequência de manchas obtidas em cada série de tratamento foi comparada com o controle negativo. Para tanto, foi utilizado o teste binomial condicional de Kastebaum e Bowman (1970), seguindo o procedimento de decisões múltiplas de acordo com Frei e Würigler (1988) que é aplicado sobre duas hipóteses e permite a obtenção de quatro diagnósticos estatísticos.

Na hipótese nula (H_0), é determinado que não há diferença na frequência de manchas induzidas nos dois grupos e na hipótese alternativa (H_A) é colocado um fator multiplicador (m), em que se afirma que um dos grupos apresenta uma frequência de manchas m vezes maior ou menor do que o outro. Como as manchas simples pequenas podem apresentar alta frequência espontânea, o valor multiplicador m é fixado em 2. Para as manchas simples grandes e gêmeas, na qual apresentam uma frequência espontânea baixa, o m é estabelecido em 5 (Andrade et al., 2004).

Cada hipótese é testada para um nível de significância de 5%, sendo quatro as decisões possíveis: 1) inconclusivo (i): são aceitas ambas as hipóteses e como elas não podem ser simultaneamente verdadeiras, nenhuma conclusão pode ser tomada; 2) negativo (-): aceita H_0 e rejeita H_A ; 3) positivo (+): rejeita H_0 e aceita H_A e 4) fraco-positivo (f+): são rejeitadas ambas as hipóteses.

Com o objetivo de confirmar os resultados positivos e excluir os outliers foi efetuado o teste U de Wilcoxon, Mann e Whitney (Frei e Würigler, 1995).

Com base nas frequências de indução de clone por 10^5 células, a atividade recombinogênica é calculada como: frequência de mutação (FM) = frequência de clones em moscas BH / frequência de clones em moscas MH; frequência de recombinação (FR) = 1 - FM. Frequência do total de manchas (FT) = total de manchas observadas em moscas MH / número de moscas (Sinigaglia et al., 2006). Comparações estatísticas de taxas de sobrevivência foram realizadas por meio do teste do X^2 para proporções, para amostras independentes. No teste de sobrevivência 20 indivíduos foram analisados para as concentrações de 0,1; 0,2 e 0,4 mM e 40 indivíduos foram analisados para o controle negativo e positivo.

3. RESULTADOS

Neste estudo foram analisados o potencial mutagênico e recombinogênico do Cloridrato de Doxorrubicina (DXR) por meio do *Somatic Mutation and Recombination Test (SMART)* em células somáticas da asa de *Drosophila melanogaster*. Foram avaliadas as seguintes concentrações: 0,1; 0,2; 0,4; 0,8 ou 1,0 mM, tanto no Cruzamento Padrão (ST) como no Cruzamento de Alta-Bioativação (HB). De acordo com os procedimentos experimentais utilizados, os testes de sobrevivência demonstraram que, as concentrações de 0,8 e 1,0 mM foram tóxicas (**Figura 2 A**), diminuindo significativamente ($p < 0,05$) a taxa de sobrevivência dos indivíduos do Cruzamento ST. Este resultado pode ser observado tanto para o cruzamento ST (**Figura 2 A**), quanto para o HB (**Figura 2 B**), porém, neste último, a concentração de 0,4 mM também diminuiu significativamente a taxa de sobrevivência. Portanto, foram escolhidas apenas as concentrações subtóxicas para análise por meio do *SMART*.

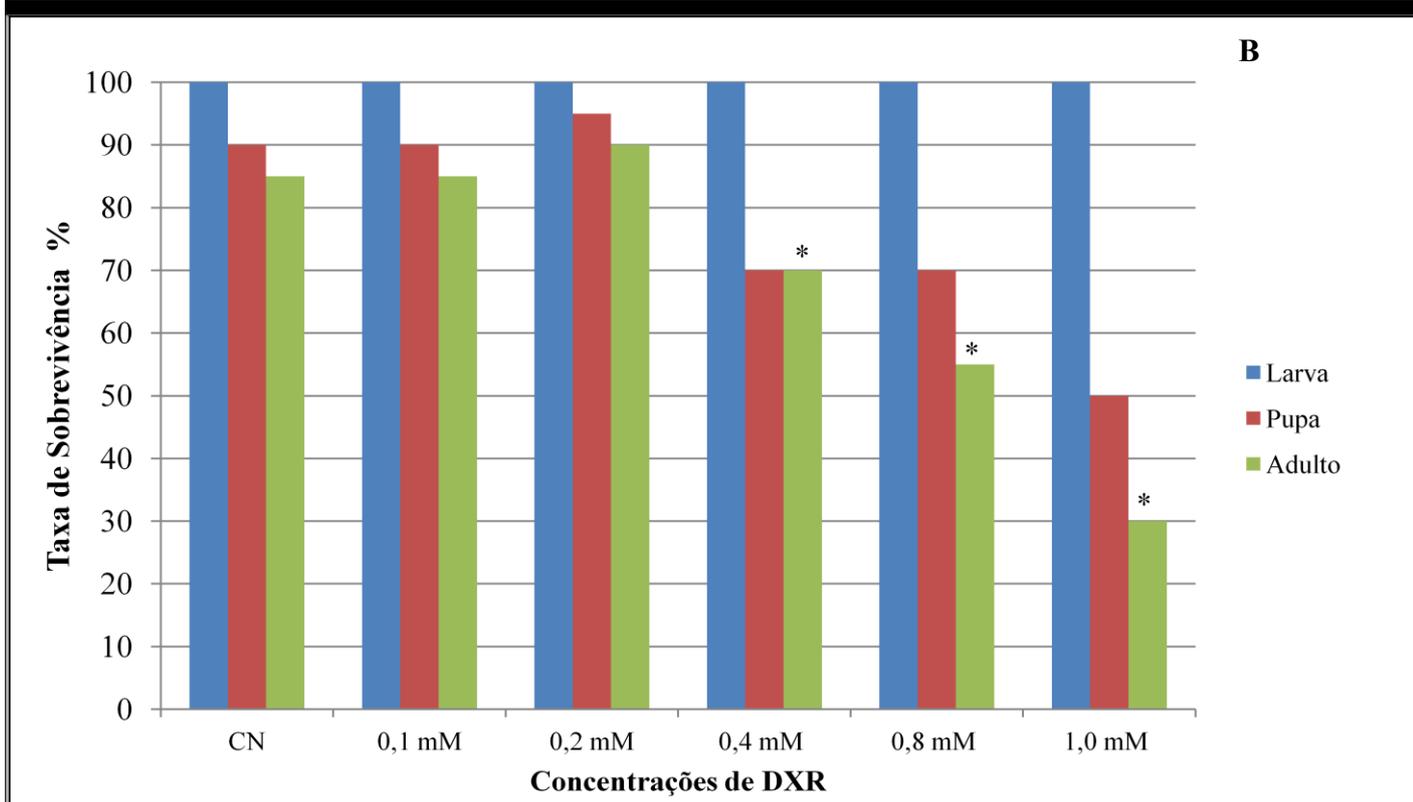
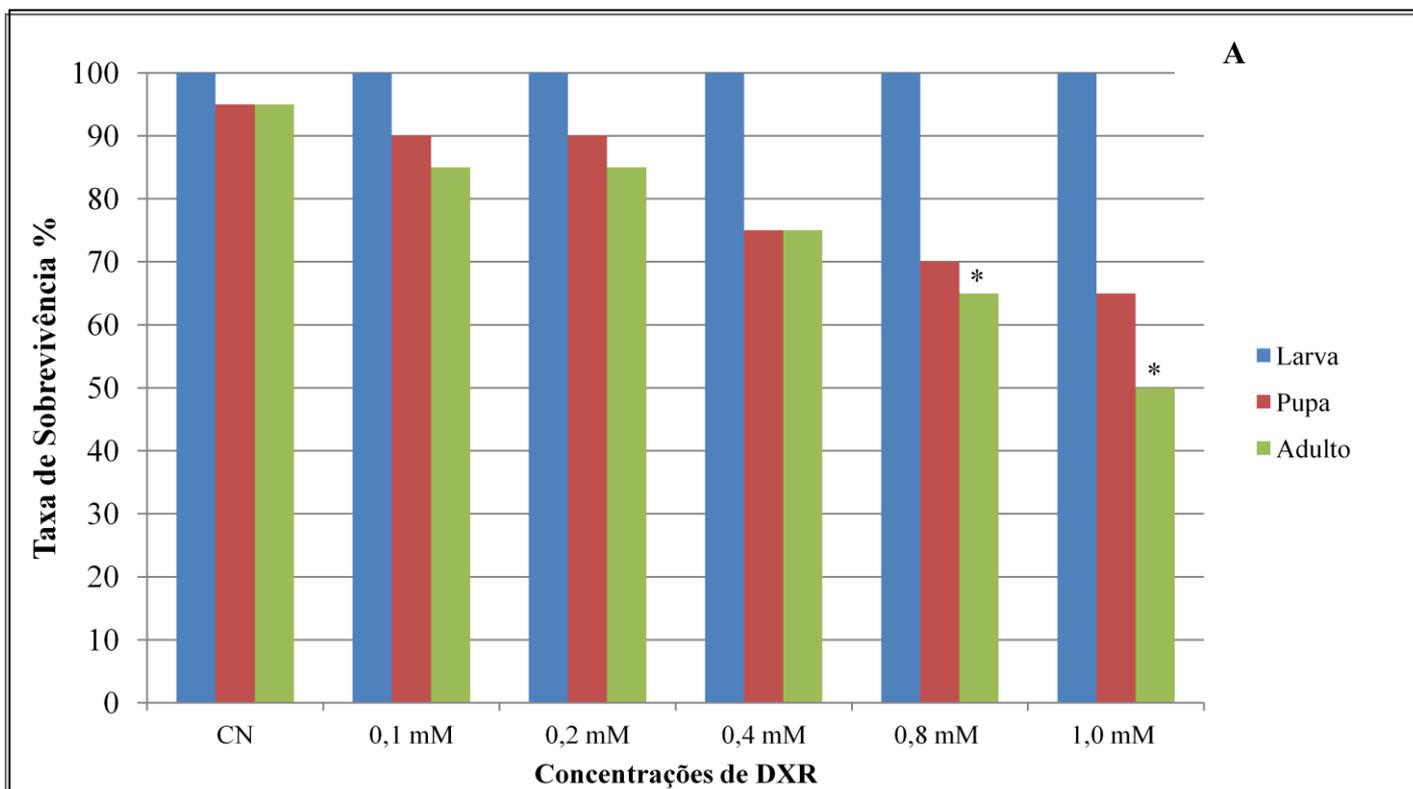


Figura 2 – Taxa de Sobrevivência (%) dos indivíduos dos cruzamentos ST (A) e HB (B) tratados com diferentes concentrações de DXR. * Concentrações com diminuição significativa na taxa de sobreviventes ($p < 0,05$).

Os resultados obtidos na análise dos descendentes MH oriundos do cruzamento ST, tratados com DXR (0,1; 0,2 ou 0,4 mM), com água ultrapura (controle negativo) e Uretano (10 mM) como controle positivo, estão apresentados na **Tabela 1**. Os números de manchas mutantes simples pequenas (MSP), simples grandes (MSG), gêmeas (MG) e o total de manchas (TM) observadas nos indivíduos tratados com DXR, independentemente da concentração, diferiram significativamente ($p<0,05$) quando comparados com os números de manchas mutantes encontrados no controle negativo.

As frequências de mutações observadas no controle negativo e no controle positivo, para ambos os cruzamentos, estão de acordo com aquelas obtidas por outros autores com o SMART de asa em *D. melanogaster* (Naves et al., 2018; Morais et al., 2018). O Uretano, composto reconhecidamente genotóxico, demonstrou-se majoritariamente mutagênico para *D. melanogaster* em ambos os cruzamentos, ST e HB (**Tabela 1 e 2**). Em virtude da metabolização pela via citocromo P450, o uretano (Etil Carbamato) pode ser convertido em vinil carbamato, composto com maior genotoxicidade, resultando em um número elevado de manchas mutantes induzidas nos indivíduos do cruzamento HB (**Tabela 2**). Maior ação genotóxica do Uretano, portanto, segundo estudos prévios, é dependente de sua ativação metabólica em *D. melanogaster*, diferindo do DXR, que é predominantemente recombinogênico (Frei et al., 1990; Lehmann et al., 2003).

Os resultados obtidos na análise dos descendentes BH do cruzamento ST, estão apresentados na **Tabela 1**. As frequências de manchas mutantes registradas nos descendentes BH, tratados com as diferentes concentrações de DXR, diferiram estatisticamente do controle negativo, com exceção de manchas simples grandes tratadas com 0,1 mM de DXR. Os descendentes BH possuem múltiplas inversões no cromossomo balanceador TM3, inviabilizando eventos decorrentes de recombinação. Assim, comparando-se as frequências de manchas observadas nos descendentes MH (devidas à mutação, aberração e recombinação), com as frequências de manchas observadas nos descendentes BH (devidas somente à mutação e aberração), é possível estimar a contribuição de recombinação no total de manchas mutantes induzidas.

A contribuição da taxa de recombinação para a frequência total de manchas induzidas e taxa de sobrevivência nos indivíduos do cruzamento ST está representada na **Tabela 1** e na **Figura 4 A** respectivamente. Comparando-se as frequências de manchas observadas nos descendentes MH e BH do cruzamento ST, tratados com DXR, verifica-se para a concentração de 0,1 mM que aproximadamente 75,3% das manchas foram induzidas por recombinação. Já para a concentração de 0,2 mM foi de 82,8% e para a concentração de 0,4 mM foi de 84,9%.

Os resultados obtidos da análise dos indivíduos MH provenientes do cruzamento HB, tratados com diferentes concentrações de DXR (0,1; 0,2 ou 0,4 mM), Água Milli-Q (controle negativo) e Uretano (10 mM) como controle positivo, estão apresentados na **Tabela 2**. Os números de MSP, MSG, MG e TM observados nos indivíduos tratados com DXR, independentemente da concentração, diferiram significativamente ($p < 0,05$) quando comparados aos resultados encontrados no controle negativo.

Tabela 1. Resultados obtidos com o Teste de Mutação e Recombinação Somática (SMART) em células da asa de *Drosophila melanogaster*, com os descendentes trans-heterozigotos marcados (MH) e heterozigotos balanceados (BH) do cruzamento padrão (ST), tratados com Água ultra pura e Uretano (controles negativo e positivo, respectivamente) e diferentes concentrações de DXR.

Genótipos e Concentração (mM)	Nº de Indiv. (N)	Manchas por Indivíduo (no. de manchas) diag. estatístico ^a				Total manchas <i>mwh</i> ^c (n)	Frequência de formação de clones/10 ⁵ células ^d		Recombinação (%)
		MSP (1-2 cells) ^b m = 2	MSG (>2 cells) ^b m = 5	MG m = 5	TM m = 2		Observado	Controle Corrigido	
<i>mwh/flr³</i>									
Contr. Neg.	40	0,45 (18)	0,05 (02)	0,00 (00)	0,50 (20)	18	00,922		
URE 10	40	2,13 (85) +	0,23 (09) +	0,10 (04) i	2,45 (98) +	92	04,713	03,791	06,752
DXR 0,1	20	1,60 (32) +	3,15 (63) +	4,05 (81) +	8,80 (176) +	171	17,520	16,598	75,304
DXR 0,2	20	1,95 (39) +	4,30 (86) +	4,05 (81) +	10,30 (206) +	201	20,520	19,598	82,748
DXR 0,4	20	1,25 (25) +	4,85 (97) +	6,50 (130) +	12,60 (252) +	240	24,590	23,668	84,848
<i>mwh/TM3, Bd^s</i>									
Contr. Neg.	40	0,30 (12)	0,05 (02)	^e	0,35 (14)	14	0,717		
URE 10	40	2,03 (81) +	0,05 (02) i		2,08 (83) +	83	4,252	3,535	
DXR 0,1	20	2,35 (47) +	0,00 (00) i		2,35 (47) +	47	4,816	4,099	
DXR 0,2	20	1,40 (28) +	0,25 (05) +		1,65 (33) +	33	3,381	2,664	
DXR 0,4	20	1,25 (25) +	0,85 (17) +		2,10 (42) +	42	4,303	3,586	

Moscas trans-heterozigotas marcadas (*mwh/flr³*) e heterozigotas balanceadas (*mwh/TM3*) foram avaliadas.

^a Diagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würigler (1988; 1995), para comparação com o controle negativo: -, negativo; i, inconclusivo; +, positivo (P<0.05).

^b Incluindo raras manchas simples *flr³*.

^c Considerando clones *mwh* de manchas simples *mwh* e gêmeas.

^d Frequência de formação de clones: clones/moscas/48.800 células (sem correção de tamanho).

^e Apenas manchas simples *mwh* podem ser observadas nos indivíduos heterozigotos *mwh/TM3*, já que o cromossomo balanceador TM3 não contém o gene *flr³*.

MSP: Manchas simples pequenas; MSG: Manchas simples grandes; MG: Manchas gêmeas; TM: Total de manchas.

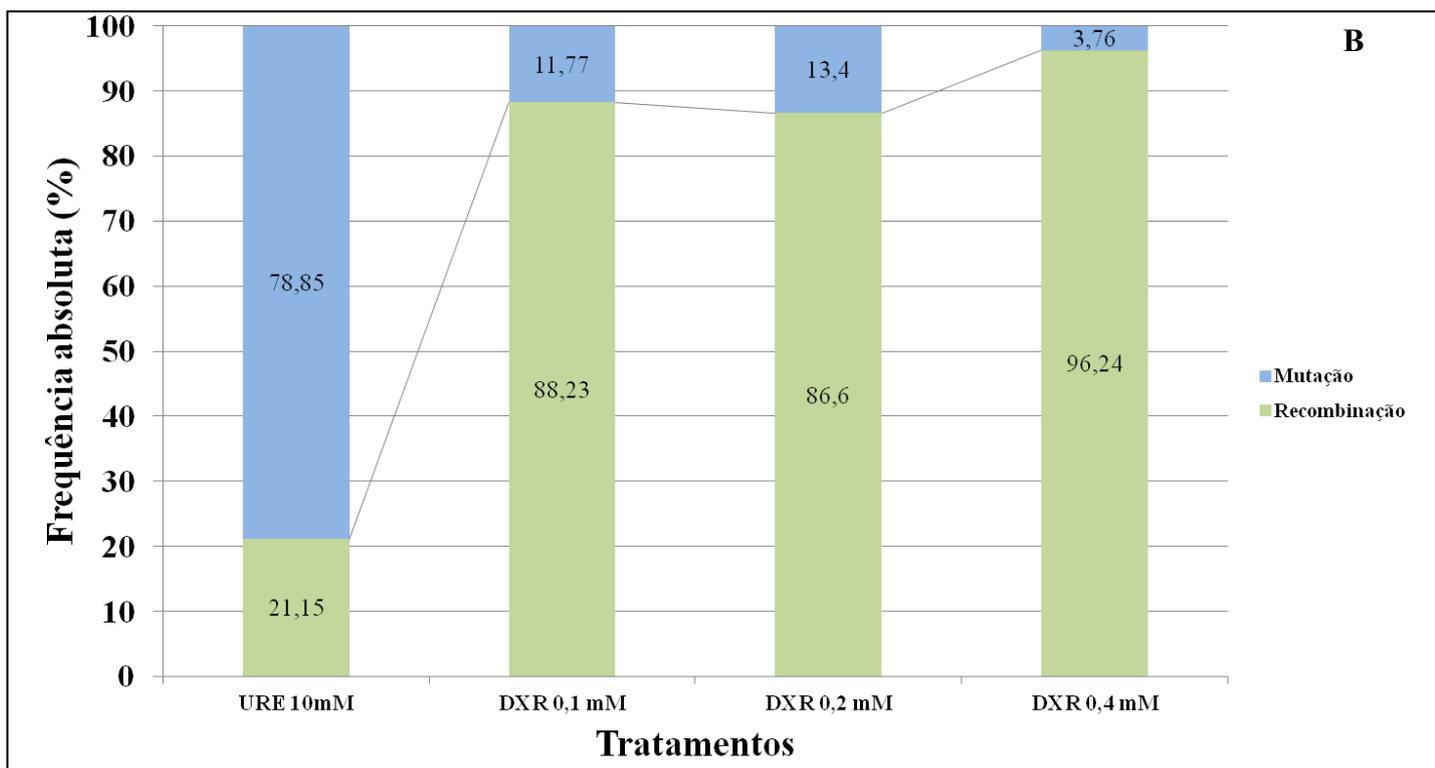
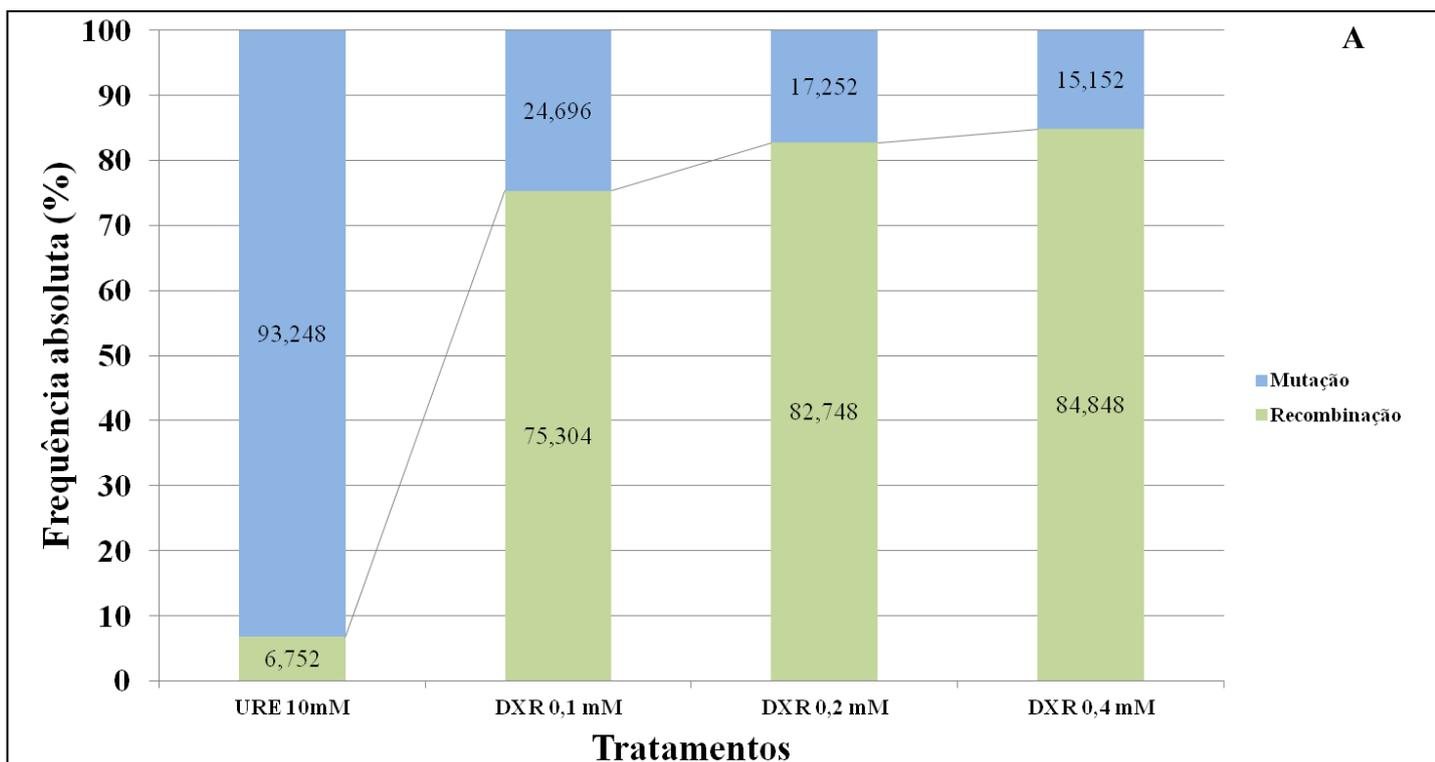


Figura 3. Contribuição de mutação e recombinação (%) para a frequência total de manchas observadas nos indivíduos MH do (A) cruzamento ST e (B) cruzamento HB, tratados com Uretano (10 mM) e DXR (0,1; 0,2 ou 0,4 mM).

Tabela 2. Resultados obtidos com o Teste de Mutação e Recombinação Somática (SMART) em células da asa de *Drosophila melanogaster*, com os descendentes trans-heterozigotos marcados (MH) e heterozigotos balanceados (BH) do cruzamento de alta bioativação (HB), tratados com Água ultra pura e Uretano (controles negativo e positivo, respectivamente) e diferentes concentrações de DXR.

Genótipos e Concentração (mM)	Nº de Indiv. (N)	Manchas por Indivíduo (no. de manchas) diag. estatístico ^a				Total manchas <i>mwh</i> ^c (n)	Frequência de formação de clones/10 ⁵ células ^d		Recombinação (%)
		MSP (1-2 cells) ^b <i>m</i> = 2	MSG (>2 cells) ^b <i>m</i> = 5	MG <i>m</i> = 5	TM <i>m</i> = 2		Observado	Controle Corrigido	
<i>mwh/flr³</i>									
Contr. Neg.	40	0,58 (23)	0,03 (01)	0,03 (01)	0,63 (25)	24	1,229		
URE 10	40	9,33 (373) +	0,75 (30) +	1,20 (48) +	11,28 (451) +	437	24,231	23,002	21,15
DXR 0,1	20	2,65 (53) +	2,40 (48) +	3,60 (72) +	8,65 (173) +	165	16,906	15,677	88,23
DXR 0,2	20	2,75 (55) +	4,15 (83) +	4,85 (97) +	11,75 (235) +	221	22,643	21,414	86,60
DXR 0,4	20	5,00 (100) +	9,55 (191) +	16,05 (321) +	30,60 (612) +	584	59,836	58,607	96,24
<i>mwh/TM3, Bd⁸</i>									
Contr. Neg.	40	0,75 (30)	0,00 (00)	^e	0,75 (30)	30	1,536		
URE 10	40	9,43 (377) +	0,18 (07) i		9,60 (384) +	384	19,672	18,136	
DXR 0,1	20	1,55 (31) +	0,10 (02) i		1,65 (33) +	33	3,381	1,845	
DXR 0,2	20	1,90 (38) +	0,25 (05) +		2,15 (43) +	43	4,405	2,869	
DXR 0,4	20	1,25 (25) +	0,85 (17) +		2,10 (42) +	42	2,1	0,564	

Moscas trans-heterozigotas marcadas (*mwh/flr³*) e heterozigotas balanceadas (*mwh/TM3*) foram avaliadas.

^a Diagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würzler (1988; 1995), para comparação com o controle negativo: -, negativo; i, inconclusivo; +, positivo (P<0.05).

^b Incluindo raras manchas simples *flr³*.

^c Considerando clones *mwh* de manchas simples *mwh* e gêmeas.

^d Frequência de formação de clones: clones/moscas/48.800 células (sem correção de tamanho).

^e Apenas manchas simples *mwh* podem ser observadas nos indivíduos heterozigotos *mwh/TM3*, já que o cromossomo balanceador TM3 não contém o gene *flr³*.

MSP: Manchas simples pequenas; MSG: Manchas simples grandes; MG: Manchas gêmeas; TM: Total de manchas.

Os resultados obtidos na análise dos descendentes BH do cruzamento HB, estão apresentados na **Tabela 2**. As frequências de manchas mutantes registradas nos descendentes BH, tratados com diferentes concentrações de DXR, diferiram estatisticamente ($p < 0,05$) do controle negativo. Diante do observado, houve aumento na frequência de recombinação de acordo com o aumento das concentrações testadas para os indivíduos tratados com DXR de ambos os cruzamentos, ST e HB. A taxa de recombinação no cruzamento HB foi de aproximadamente 88,23%, 86,60%, 96,24%, para as concentrações 0,1; 0,2 e 0,4 mM, respectivamente. A contribuição da taxa de recombinação para a frequência total de manchas induzidas e taxa de sobrevivência nos indivíduos do cruzamento HB está representada na **Tabela 2** e na **Figura 4 B** respectivamente.

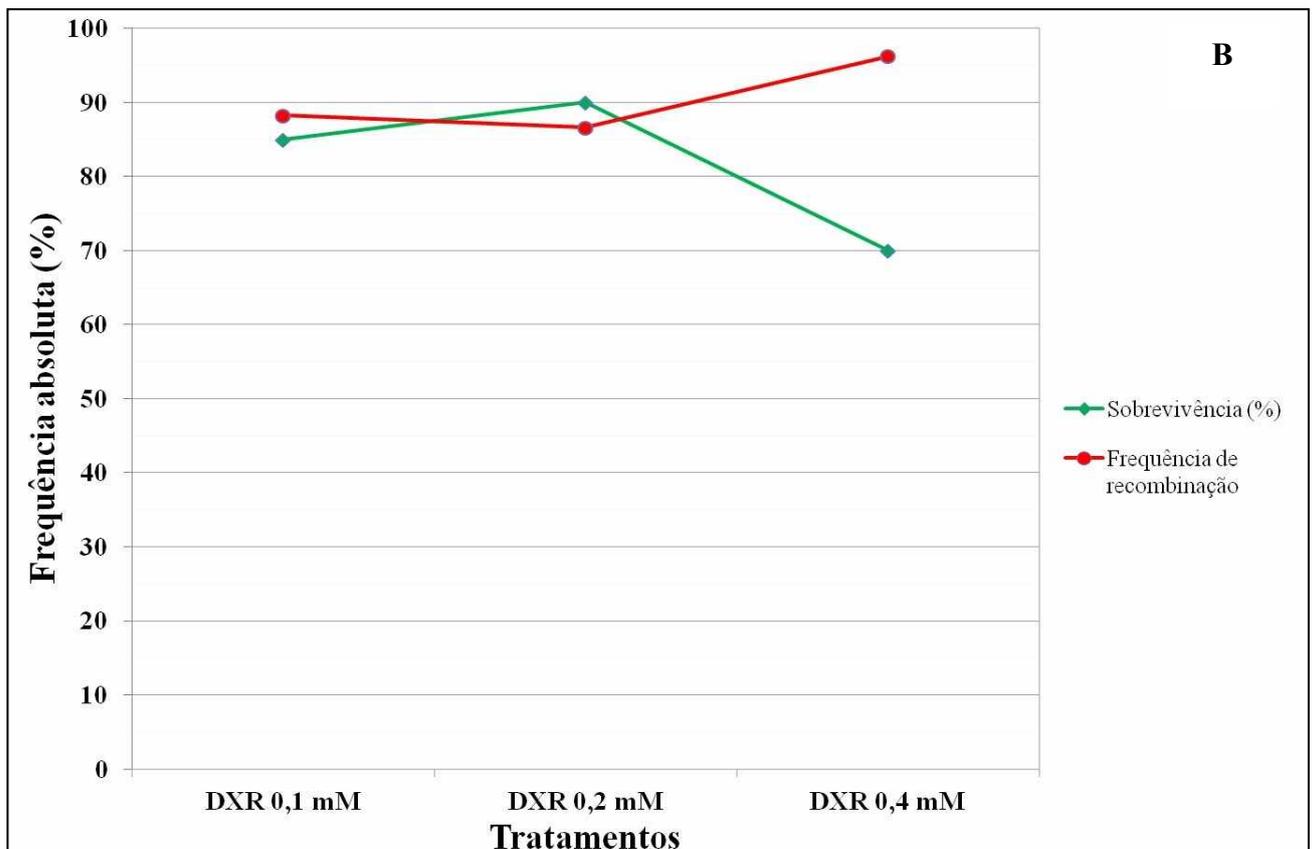
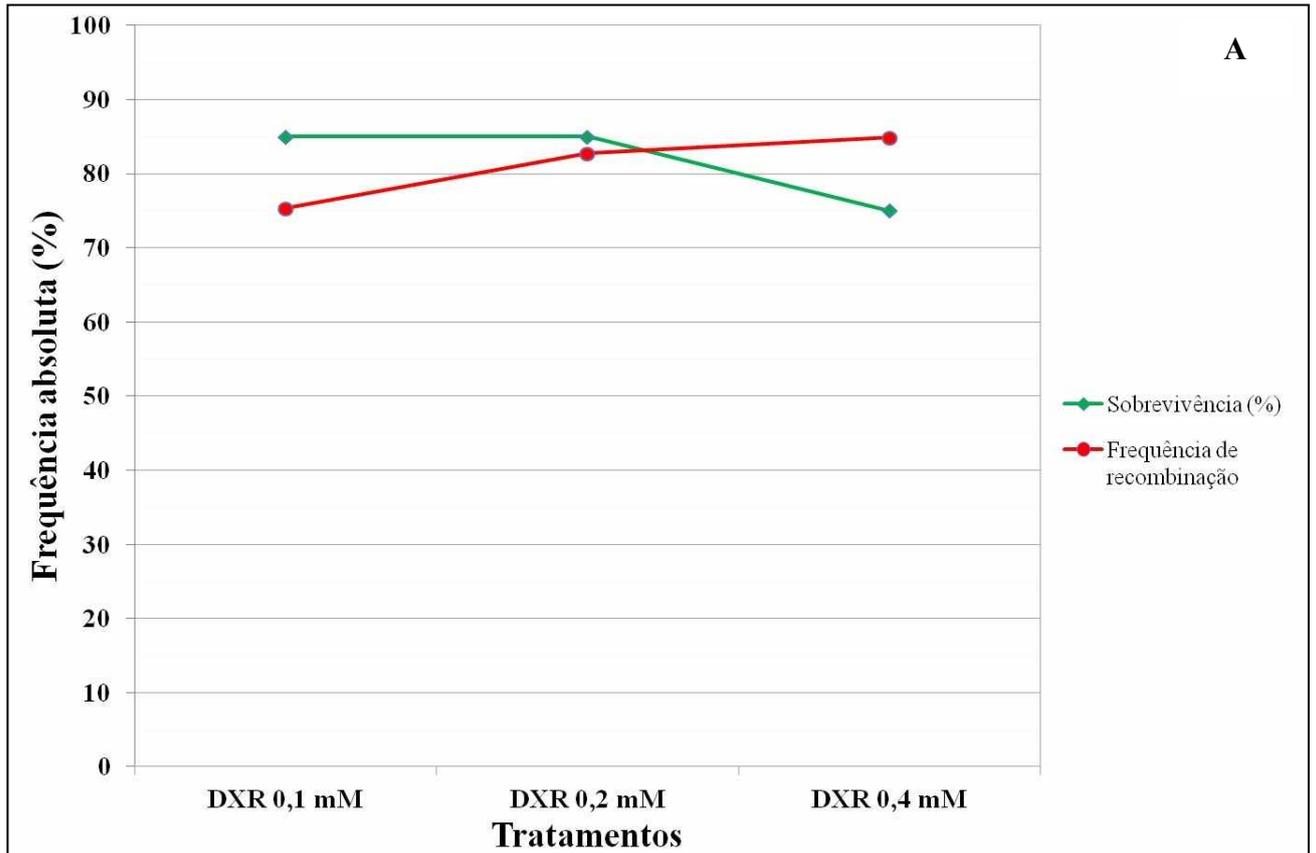


Figura 4. Relação entre frequência de recombinação (%) e taxa de sobrevivência observada nos indivíduos MH do (A) cruzamento ST e (B) cruzamento HB, tratados com Uretano (10 mM) e DXR (0,1; 0,2 ou 0,4 mM).

Comparando-se ambos os valores verificou-se decréscimo da taxa de sobrevivência com o aumento da concentração do DXR, evidenciando proporcionalidade inversa. Ou seja, aumento na concentração de DXR é diretamente relacionada com aumento da taxa de recombinação, principalmente devido ao aumento da homozigose de alelos recessivos, e perda da dominância dos alelos selvagens, fixados no DNA em virtude do processo de RH, desencadeado pela resposta celular ao dano.

4. DISCUSSÃO

Para a avaliação dos efeitos mutagênicos e/ou carcinogênicos de substâncias químicas, físicas ou biológicas, diferentes organismos e sistemas-teste podem ser empregados (Fonseca, Pereira, 2004). *D. melanogaster*, conhecida popularmente como “mosca da fruta”, é um organismo teste muito versátil e é amplamente utilizado em pesquisas científicas nos mais diferentes campos da ciência (Kim et al., 2011).

A Drosophotoxicologia engloba uma série de metodologias relacionadas ao uso da *D. melanogaster* como organismo de escolha em estudos toxicológicos, por oferecer importantes vantagens (Lombardot et al., 2015; Chifiriuc et al., 2016). Além disso, a *Drosophila* é um organismo genético bem estudado para o entendimento dos mecanismos moleculares de doenças humanas. Aproximadamente 75% de genes causadores de doenças em humanos possuem homólogos funcionais na *Drosophila* (Pandey, Nichols, 2011).

O processo de replicação do material genético ocorre com elevada velocidade e acurácia, mantendo a integridade do DNA. Porém, é reconhecida a importância da existência de uma taxa de tolerância e manutenção de eventos mutagênicos, inclusive como matéria prima para a evolução biológica dos seres vivos (Haldane 1933; Branzei, Szakal, 2016). Tais eventos mutagênicos podem originar-se de diversas vias, podendo resultar em aneuploidias, aberrações cromossômicas e morte celular, e o *Somatic Mutation And Recombination Test* (SMART) apresenta versatilidade e sensibilidade enquanto método de análise. Nesse sentido, o uso da *D. melanogaster* garante vantagem na avaliação de processos genotóxicos e sua correlação com compostos mutagênicos e recombinogênicos, bem como a ativação de xenobióticos pelo metabolismo do organismo modelo, devido à possibilidade de preservação do tecido a ser analisado (Graf et al, 1984; Frei, Würigler, 1992).

De acordo com os testes de sobrevivência realizados, as concentrações de 1,0 e 0,8 mM foram tóxicas para os indivíduos dos cruzamentos ST e HB (**Figura 2 A** e **Figura 2 B**). Acredita-se que, em virtude da elevada expressividade da via citocromo P450 dos indivíduos do cruzamento

HB, haja maior biotransformação do DXR via oxido-redução, mesmo por que o DXR é metabolizado, principalmente, no fígado em humanos (Fu, 2003). A conversão do anel de quinona em semiquinona, e sua reoxidação, além de sua interação com a cadeia transportadora de elétrons da mitocôndria, aumenta a concentração de radicais livres, responsáveis pela citotoxicidade (Carvalho et al, 2009).

As taxas de sobrevivência apresentaram uma relação inversamente proporcional com o aumento da concentração de DXR. Por outro lado, o número de manchas mutantes está diretamente relacionada com o aumento das concentrações de DXR, em ambos os cruzamentos (**Tabelas 1 e 2**). Todas as classes de manchas, nos indivíduos MH dos cruzamentos ST e HB, diferiram estatisticamente ($p < 0,05$) do controle negativo. Resultados semelhantes foram verificados por Lehmann e colaboradores (2003). As taxas de sobrevivência dos controles (**Figuras 1A e 1B**), negativo (Água MilliQ) e positivo (Uretano 10 mM) condizem com estudos prévios (Naves et al., 2018; Morais et al., 2018).

O Cloridrato de Doxorrubicina surgiu como um quimioterápico promissor em 1960 (Singal, Iliskovic, 1998) e ainda é utilizado no tratamento de diversos tumores (Smith et al., 2010). Devido à sua estrutura singular, o DXR é altamente lipofílico e sua meia-vida é relativamente longa no organismo (Singal, Iliskovic, 1998).

Existem dois mecanismos fundamentais de ação do DXR: indução de danos ao DNA e produção de radicais livres (Granados-Principal et al., 2010). Um dos mecanismos propostos é a interação do DXR com a enzima Topoisomerase II a qual controla a topologia das regiões super espiralizadas do DNA (Islaih et al., 2005). Sendo assim, organismos tratados com DXR tem o procedimento de re-ligação das duplas fitas seccionadas pela Topoisomerase II impedida pelo quimioterápico, causando lesões permanentes à molécula do DNA (Minotti et al., 2004; Filyak et al., 2007).

Em *D. melanogaster* o DXR é notoriamente reconhecido como composto genotóxico e os danos são reparados, preferencialmente por recombinação homóloga (Lehmann et al., 2003; Valadares et al., 2008; Rezende et al., 2009; 2011).

O teste SMART fundamenta se na premissa que, durante a diferenciação das células dos discos imaginais nas larvas, a perda da heterozigose de um dos marcadores (*mwh* ou *flr³*) leva a instalação da mutação que resulta no fenótipo dos pelos mutantes (*multiple wing hairs* ou *flare*) (Graf et al., 1984).

Os resultados apresentados nas **Figuras 1A e 1B**, **Tabelas 1 e 2** sugerem que, após metabolizado via citocromo P450, os metabólitos do DXR passam a causar mais danos. Visando quantificar a contribuição de eventos recombinogênicos e mutagênicos na frequência total de manchas mutantes observadas em indivíduos de ambos os cruzamentos, os indivíduos heterozigoto

balanceados (BH) foram analisados e a frequência de manchas mutantes com pelos *mwh* foram comparadas com a frequência de manchas mutantes com pelos *mwh* dos indivíduos MH (Frei, Würigler, 1995).

Quando calculada as taxas de recombinação, pôde-se perceber que o dano induzido pelo DXR é majoritariamente de origem recombinogênica (**Figuras 2A e 2B**). A elevada taxa de recombinação mitótica se dá em virtude da interação do DXR com a enzima Topoisomerase II, pois ao impedir a enzima de realizar sua função de regular a topologia do DNA em processos de transcrição e replicação, pode induzir à quebra bifilamentar do material genético (Osheroff et al., 1991).

Em resposta ao dano celular, a recombinação homóloga (RH), um dos diversos mecanismos de reparo do material genético, utiliza a informação do cromossomo homólogo não lesionado para sintetizar uma nova fita e reparar a quebra bifilamentar do cromossomo lesionado. Este mecanismo, por sua vez, pode levar à perda de heterozigose, fato evidenciado pela observação das manchas mutantes nas asas de *D. melanogaster*, e, embora sua função seja reparar o DNA, seu mecanismo de recombinação pode induzir processos carcinogênicos (Friedberg, 2003; Branzei, Szakal, 2016).

O mecanismo de reparo por RH pode ser encontrado em diferentes organismos. Esse mecanismo possui papel primordial na manutenção da estabilidade genômica e está intimamente relacionado às quebras cromossômicas (Heyer, 2007; 2010). Assim, o aumento do processo recombinogênico parece estar diretamente relacionado com a diminuição da taxa de sobrevivência dos indivíduos (**Figuras 3A e 3B**) como possível resposta aos danos causados pelo DXR.

5. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos por meio do SMART, nas condições experimentais testadas, permitem concluir que a toxicidade e os danos ao DNA induzidos pelo DXR estão diretamente relacionados às concentrações do DXR. Sendo assim, fica evidente, como previamente descrito na literatura, a ação recombinogênica do DXR em *D. melanogaster*. Mais estudos são necessários para elucidar o mecanismo de ação do DXR em diferentes concentrações e para reforçar o papel da RH como sistema de reparo primordial para manutenção da estabilidade genômica e consequente sobrevivência dos indivíduos tratados com diferentes agentes genotóxicos.

6. REFERÊNCIAS

ANDRADE R.; REGULY L.; LEHMANN M. Wing Somatic Mutation and Recombination Test (SMART). In: Henderson, DS (Ed), **Humana Press Inc**. Totowa 2004; 389-412 p.

BAGULEY, B. C; FERGUSON, L. R. Mutagenic properties of topoisomerase-targeted drugs. **Biochimica Et Biophysica Acta (bba) - Gene Structure And Expression**, v. 1400, n. 1-3, out. 1998. Disponível em: <<https://europepmc.org/abstract/med/9748584>>. Acesso em: 18 jun. 2018.

BORIŁEV, I. et al. Nanoformulations of doxorubicin: how far have we come and where do we go from here?. **Nanotechnology**, v. 29, n. 33, 11 jun. 2018. Disponível em:<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29798934>>. Acesso em: 22 maio 2018.

BRANZEI, D.; SZAKAL, B. DNA damage tolerance by recombination: Molecular pathways and DNA structures. **Dna Repair**, v. 44, ago. 2016. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1568786416300878?via=ihub>>. Acesso em: 22 jun. 2018.

CARVALHO, C. et al. Doxorubicin: The Good, the Bad and the Ugly Effect. **Current Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 25, jun. 2009. Disponível em:<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19548866>>. Acesso em: 19 maio 2018.

CARVALHO, F. S. et al. Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity: From Bioenergetic Failure and Cell Death to Cardiomyopathy. **Medicinal Research Reviews**, v. 34, n. 1, 11 mar. 2013. Disponível em:<<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/med.21280>>. Acesso em: 29 maio 2018.

CHIFIRIUC, M. et al. Drosophotoxicology: An Emerging Research Area for Assessing Nanoparticles Interaction with Living Organisms. **International Journal Of Molecular Sciences**, v. 17, n. 2, 14 fev. 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4783871/>>. Acesso em: 16 jun. 2018.

CORTÉS-FUNES, H.; CORONADO, C. Role of anthracyclines in the era of targeted therapy. **Cardiovascular Toxicology**, v. 7, n. 2, 25 abr. 2007. Disponível em:<<https://link.springer.com/article/10.1007/s12012-007-0015-3>>. Acesso em: 29 maio 2018.

COSTA, R. M. A.; MENK, C. F. M. Biomonitoramento de mutagênese ambiental. **Projeto Genoma do Câncer**, 2000. p.24.

FILYAK, Y.; FILYAK, O.; STOIKA, R. Transforming growth factor beta-1 enhances cytotoxic effect of doxorubicin in human lung adenocarcinoma cells of A549 line. **Cell Biology International**, v. 31, n. 8, ago. 2007. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1016/j.cellbi.2007.02.008>>. Acesso em: 30 maio 2018.

FITZMAURICE, C. et al. Global, Regional, and National Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and Disability-Adjusted Life-years for 32 Cancer Groups, 1990 to 2015. **Jama Oncology**, v. 3, n. 4, 1 abr. 2017. Disponível em: <https://jamanetwork.com/journals/jamaoncology/fullarticle/2588797?utm_campaign=articlePDF&utm_medium=articlePDFlink&utm_source=articlePDF&utm_content=jamaoncol.2016.5688>.

Acesso em: 20 maio 2018.

FONSECA, C. A.; PEREIRA, D. G. Aplicação da genética toxicológica em planta com atividade medicinal. **Infarma**, v. 16, n. 7-8, out. 2004. Disponível em: <<http://www.cff.org.br/sistemas/geral/revista/pdf/79/16-aplicacao.pdf>>. Acesso em: 3 jul. 2018.

FREI, H. et al. The genotoxicity of the anti-cancer drug mitoxantrone in somatic and germ cells of *Drosophila melanogaster*. **Mutation Research/genetic Toxicology**, v. 279, n. 1, maio 1992. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/016512189290262X>>. Acesso em: 01 jul. 2018.

FREI, H.; WÜRGLER, F. E. Induction of somatic mutation and recombination by four inhibitors of eukaryotic topoisomerases assayed in the wing spot test of *Drosophila melanogaster*. **Mutagenesis**, v. 11, n. 4, 1996. Disponível em: <<https://academic.oup.com/mutage/article/11/4/315/995055>>. Acesso em: 08 jun. 2018.

FREI, H.; WÜRGLER, F. E. Optimal experimental design and sample size for the statistical evaluation of data from somatic mutation and recombination tests (SMART) in *Drosophila*. **Mutation Research/environmental Mutagenesis And Related Subjects**, v. 334, n. 2, abr. 1995. Disponível em: <<http://europepmc.org/abstract/med/7885379>>. Acesso em: 28 maio 2018.

FREI, H.; WÜRGLER, F. E. Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative, or inconclusive result. **Mutation Research/environmental Mutagenesis And Related Subjects**, v. 203, n. 4, ago. 1988. Disponível em: <<http://europepmc.org/abstract/med/3136327>>. Acesso em: 21 jun. 2018.

FRIEDBERG, E. C. DNA damage and repair. **Nature**, v. 421, n. 6921, 23 jan. 2003. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nature01408>>. Acesso em: 2 junho 2018.

FRÖLICH, A.; WÜRGLER, F. E. Genotoxicity of ethyl carbamate in the *Drosophila* wing spot test: dependence on genotype-controlled metabolic capacity. **Mutation Research**, v. 244, n. 3, 17 jan.

1990. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0165799290901298>>. Acesso em: 04 jul. 2018.

FU, Q. Mitomycin C, doxorubicin and 5-fluorouracil may not improve survival over 5-fluorouracil alone in people with curatively resected gastric cancer. **Cancer Treatment Reviews**, v.29, n.2, Apr, 2003.

GRAF, U. et al. Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. **Environmental Mutagenesis**, v. 6, n. 2, 1984. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/em.2860060206>>. Acesso em: 03 jun. 2018.

GRAF, U.; VAN SCHAIK, N. Improved high bioactivation cross for the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. **Mutation Research/environmental Mutagenesis And Related Subjects**, v. 271, n. 1, fev. 1992. Disponível em: <<http://europepmc.org/abstract/MED/1371830>>. Acesso em: 24 jun. 2018.

GRANADOS-PRINCIPAL, S. et al. New advances in molecular mechanisms and the prevention of adriamycin toxicity by antioxidant nutrients. **Food And Chemical Toxicology**, v. 48, n. 6, jun. 2010. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278691510002218>>. Acesso em: 27 maio 2018.

HALDANE, J. B. S. The Part Played by Recurrent Mutation in Evolution. **The American Naturalist**, v. 67, n. 708, jan. 1933. Disponível em: <https://www.jstor.org/stable/2457127?seq=1#page_scan_tab_contents>. Acesso em: 24 jun. 2018.

HARDMAN, J. G. et al. The Pharmacological Basis of Therapeutics. **Journal Of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 6, mar. 2002. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jm020026w>>. Acesso em: 12 jun. 2018.

HEYER, W. Biochemistry of eukaryotic homologous recombination. **Molecular Genetics Of Recombination**, 2007. Disponível em: <https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-540-71021-9_4>. Acesso em: 14 jun. 2018.

HEYER, W.; EHMSSEN, K. T.; LIU, J. Regulation of Homologous Recombination in Eukaryotes. **Annual Review Of Genetics**, v. 44, n. 1, dez. 2010. Disponível em: <<https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-genet-051710-150955>>. Acesso em: 27 jun. 2018.

HEYER, W.D. Molecular Genetics of Recombination. **Topics In Current Genetics**, 01 mar. 2007. Disponível em: <<https://europepmc.org/abstract/med/21552479>>. Acesso em: 28 jun. 2018.

ISLAIH, M. et al. Relationships between genomic, cell cycle, and mutagenic responses of TK6 cells exposed to DNA damaging chemicals. **Mutation Research/fundamental And Molecular Mechanisms Of Mutagenesis**, v. 578, n. 1-2, 15 out. 2005. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0027510705002241>>. Acesso em: 25 jun. 2018.

KASTENBAUM, M. A.; BOWMAN, K. O. Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies. **Mutation Research**, v. 9, 1970. Disponível em: <<https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19711602040>>. Acesso em: 01 jul. 2018.

KIM, S. et al. Drosophila as a model system for studying lifespan and neuroprotective activities of plant-derived compounds. **Journal Of Asia-pacific Entomology**, v. 14, n. 4 dez. 2011. Disponível em: < <https://arizona.pure.elsevier.com/en/publications/drosophila-as-a-model-system-for-studying-lifespan-and-neuroprote>>. Acesso em: 2 junho 2018.

LEHMANN, M. et al. Doxorubicin and two of its analogues are preferential inducers of homologous recombination compared with mutational events in somatic cells of Drosophila melanogaster. **Mutation Research/genetic Toxicology And Environmental Mutagenesis**, v. 539, n. 1-2, ago. 2003. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1383571803001621>>. Acesso em: 20 jun. 2018.

LOMBARDOT, B. et al. High-Throughput In Vivo Genotoxicity Testing: An Automated Readout System for the Somatic Mutation and Recombination Test (SMART). **Plos One**, v. 10, n. 4, 1 abr. 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25830368>>. Acesso em: 20 jun. 2018.

LOWY, D. R.; COLLINS, F. S. Aiming High — Changing the Trajectory for Cancer. **New England Journal Of Medicine**, v. 374, n. 20, 19 maio 2016. Disponível em: <<https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMp1600894>>. Acesso em: 08 maio 2018.

MINOTTI, G. Anthracyclines: Molecular Advances and Pharmacologic Developments in Antitumor Activity and Cardiotoxicity. **Pharmacological Reviews**, v. 56, n. 2, 1 jun. 2004. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15169927>>. Acesso em: 18 jun. 2018.

MORAIS, C. R. de et al. Evaluation of toxicity, mutagenicity and carcinogenicity of samples from domestic and industrial sewage. **Chemosphere**, v. 201, jun. 2018. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653518304211?via=ihub>>. Acesso em: 25 jun. 2018.

NAVES, M. P. C. et al. Assessment of mutagenic, recombinogenic and carcinogenic potential of titanium dioxide nanocrystals in somatic cells of Drosophila melanogaster. **Food And Chemical Toxicology**, v. 112, fev. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2017.12.040>. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278691517307822>>. Acesso em: 18 jun. 2018.

OSHEROFF, N.; ZECHIEDRICH, E. L.; GALE, K. C. Catalytic function of DNA topoisomerase II. **Bioessays**, v. 13, n. 6, jun. 1991. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/bies.950130603>>. Acesso em: 21 jun. 2018.

PANDEY, U. B.; NICHOLS, C. D. Human Disease Models in Drosophila melanogaster and the Role of the Fly in Therapeutic Drug Discovery. **Pharmacological Reviews**, v. 63, n. 2, 17 mar. 2011. Disponível em: <<http://pharmrev.aspetjournals.org/content/63/2/411/tab-article-info>>. Acesso em: 27 maio 2018.

REZENDE, A. A. A. de et al. Protective effects of proanthocyanidins of grape (*Vitis vinifera* L.) seeds on DNA damage induced by Doxorubicin in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Food And Chemical Toxicology**, v. 47, n. 7, jul. 2009. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19341778>>. Acesso em: 29 maio 2018.

REZENDE, A. A. A. de et al. The effect of the dibenzylbutyrolactolic lignan (-)-cubebin on doxorubicin mutagenicity and recombinogenicity in wing somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Food And Chemical Toxicology**, v. 49, n. 6, jun. 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21385598>>. Acesso em: 26 jun. 2018.

ROCHA, A. da. Natural products in anticancer therapy. **Current Opinion In Pharmacology**, v. 1, n. 4, 1 ago. 2001. Disponível em: <<https://europepmc.org/abstract/med/11710734>>. Acesso em: 27 jun. 2018.

SINGAL, P. K.; ILISKOVIC, N. Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy. **New England Journal Of Medicine**, v. 339, n. 13, 24 set. 1998. Disponível em: <<https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/nejm199809243391307>>. Acesso em: 07 jun. 2018.

SINGAL, P. K. et al. Adriamycin-induced heart failure: mechanism and modulation. **Molecular And Cellular Biochemistry**, v. 207, n. 1-2, abr. 2000. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1023/A:1007094214460>>. Acesso em: 03 jul. 2018.

SMITH, L. A. et al. Cardiotoxicity of anthracycline agents for the treatment of cancer: Systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. **Bmc Cancer**, v. 10, n. 1, 29 jun. 2010. Disponível em: <<https://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2407-10-337>>. Acesso em: 7 jun. 2018.

TAN, X. et al. Doxorubicin Induces Apoptosis in H9c2 Cardiomyocytes: Role of Overexpressed Eukaryotic Translation Initiation Factor 5A. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 33, n. 10, 2010. Disponível em: <https://www.jstage.jst.go.jp/article/bpb/33/10/33_10_1666/_article>. Acesso em: 5 junho 2018.

VALADARES, B.L.B.; GRAF, U.; SPANÓ, M.A.. Inhibitory effects of water extract of propolis on doxorubicin-induced somatic mutation and recombination in *Drosophila melanogaster*. **Food And Chemical Toxicology**, v. 46, n. 3, mar. 2008. Disponível em: <<http://europepmc.org/abstract/med/18160198>>. Acesso em: 29 maio 2018.

WILSON-SANDERS, S. E. Invertebrate Models for Biomedical Research, Testing, and Education. **Ilar Journal**, v. 52, n. 2, jan. 2011. Disponível em: <<https://academic.oup.com/ilarjournal/article/52/2/126/659946>>. Acesso em: 14 maio 2018.

ZHOU, S.; PALMEIRA, C.M.; WALLACE, K. B. Doxorubicin-induced persistent oxidative stress to cardiac myocytes. **Toxicology Letters**, v. 121, n. 3, maio 2001. Disponível em: <<http://europepmc.org/abstract/MED/11369469>>. Acesso em: 13 junho 2018.

ANEXO 1

Normas da revista – BIOSCIENCE JOURNAL

SUBMISSIONS

AUTHOR GUIDELINES

This journal is not accepting submissions at this time.

The essay must strive for clarity, brevity and conciseness. The text should be typed in Times New Roman, size 11, simple space and with a margin of at least 2 cm. All lines must be numbered. Papers should be submitted without the identification of the authors. The authors' names, title and address of work must be presented to metadata submission and in the cover letter. Figures and tables must be inserted in the text, as close as possible to where cited.

The article will be sent to three (03) reviewers in the area in question, in the shortest possible time, without identifying the authors and will be considered as approved upon 02 favorable opinions.

Only papers written in English will be accepted.

The journal reserves the right to make changes as to rules, spelling and grammar in the original, in order to maintain the standard patterns of the language, while respecting the style of the authors. The final proofs will be sent to the authors, together with the payment slip for publication.

Papers which are published become the property of the Bioscience Journal, having their reprint, in whole or in part, subject to the express permission of the journal Editor. The original source of publication must be assigned.

No reprints will be provided. The articles will be available for printing in PDF format on the journal website.

A publication fee will be charged to the amount of R\$ 40.00 (forty reais) per published page of the approved papers to national authors and \$ 40 (forty US dollars) for foreign authors. (Form of payment will be informed later).

Once the article has been reviewed and approved, the journal will categorize the contributions according to the following categories:

1. Original Articles - Articles that present a contribution which is entirely new to knowledge and allow other researchers, based on the written text, to judge the conclusions, check the accuracy of the analyzes and deductions of the author and repeat the investigation if they so wish. The articles must contain: Title, Summary (200 to 400 words), Keywords, Introduction, Material and Methods, Results, Discussion (or Results and Discussion) and Conclusion (optional), Acknowledgements (if applicable). They must also contain: Title, Abstract (200 to 400 words) and key words in Portuguese and References. The papers must not exceed 20 pages (including text, references, figures, and annexes).

2. Review Articles - Articles that present comprehensive and updated review of a subject of interest from the scientific community and which offer significant contribution to the area of knowledge under discussion. The articles must contain: Title, Summary (200 to 400 words), Keywords, Introduction, Development, Conclusion, Acknowledgements (if applicable). They must also contain: Title, Abstract (200 to 400 words) and keywords in Portuguese and References. The papers must not exceed 30 pages (including text, references, figures and any annexes). In this paper/work category only contributions made at the invitation of the editors (General or Associate) will be accepted for submission.

3. Case report (s) - Predominantly clinical articles, of high relevance and which are current, with original reports from clinical and basic areas. The articles must contain: Title, Summary (200 to 400 words), Keywords, Introduction, Case Report, Discussion, Conclusion (optional) and Acknowledgements (if necessary). They must also contain: Title, Abstract (200 to 400 words) and Keywords in Portuguese and References. The papers must not exceed 10 pages (including text, references, figures and any annexes).

4. Communication – Non original article, demonstrating the experience of a group or a service, preferably covering teaching, research, health policy and professional practice. Or an article to report the results (partial or not) of work that offers relevant information to scientific knowledge, but which does not allow for firm conclusions. It must contain: Title, Summary (200 to 400 words), Keywords, Introduction, Contents and Acknowledgements (if necessary). It must also contain: Title, Abstract (200 to 400 words) and Keywords in Portuguese and References. The papers must not exceed 10 pages, including attachments.

Presentation of Papers

Format: All papers/collaborations must be submitted through the Electronic System for Journal Publishing - SEER,
Address: <http://www.seer.ufu.br/index.php/biosciencejournal/about/submissions#onlineSubmissions>

The text must be saved in RTF (Rich Text Format) extension or Microsoft Word (2010) format. The metadata must be filled out with the Paper/Work title, name (s) of author (s), last academic degree, work institution, postal address, telephone, fax and email.

The text will be cordially written with intercalation of tables and figures, already inserted in the text, with the minimum amount required for its understanding.

As a measure of secrecy the body of the paper must not include the authors' names, which must be sent separately, with personal data (title, mailing address, email address and institution to which he/she is connected).

Paper title: The title must be brief and sufficiently specific and descriptive, containing the keywords that represent the contents of the text separated by colon, both accompanied by their translation into Portuguese.

Abstract: An informative summary must be prepared with about 200 to 400 words, including objective, method, results, conclusion, accompanied by its translation into Portuguese. Both must have 800 words at most.

Keywords: The keywords must not repeat words in the title, the scientific name of the species studied must be included. Words should be separated by a colon and begin with a capital letter. Authors must submit 3-6 terms, taking into consideration that a term may be composed of two or more words.

Acknowledgements: Acknowledgements as to help received in the preparation of the paper must be mentioned at the end of the article, before the references.

Notes: The notes contained in the article must be indicated with an asterisk immediately after the sentence to which they refer. The notes must be at the bottom of the corresponding page. Exceptionally, numbers may be adopted for the notes together with asterisks on the same page. In which case, the notes with asterisks precede the notes with numbers, regardless of the order of these notes in the text.

Appendices: Appendices can be used in the case of extensive lists, statistics and other supporting elements.

Figures and Tables: Clear photos (black and white or in color), graphs and tables in black and white (strictly essential for clarity of the text) will be accepted, and must be marked in the text by their order number, in the places where they must be inserted. If the illustrations submitted have already been published, mention the source. (See rules for preparation of figures, in the next section).

Manuscripts, even if they present scientific relevance and are methodologically correct, may be refused if they are not properly organization and if they are outside the norms of the Bioscience Journal.

GUIDELINES FOR THE PREPARATION OF FIGURES

1. Figures may be made in software depending on the authors' preference (Excel, Sigma Plot, etc.) They must be inserted and sent in TIFF or JPG format with a minimum resolution of 300 dpi.
2. The figures must have a maximum width of 8.0 cm or 16.0 cm.
3. The titles and the x and y axes scale must be in Times New Roman size 11. The axis lines and other lines (e.g., regression curves) must have a thickness of 0.3mm. All information contained inside the figure (e.g., equations, captions) must be in Times New Roman size 10 or at least 8. Right hand and top edges in graphs are not necessary.
4. All figures must be conveniently inserted into the text after being mentioned, consecutively and in Arabic numerals. The figures should be inserted in the text by means of the "Insert → Image/Figure → File" command.
5. Figures may be made up of multiple graphs, both horizontal and vertical, respecting the maximum width of 16.0cm and 8.0cm, respectively. When dealing with figures of multiple graphs, the same must be identified by letters (A, B, C, D) in capital letters in brackets, source Times New Roman size 11. Papers that have been consulted and cited in the text are the responsibility of the author.

Information coming from personal communication, papers in progress and unpublished papers must not be included in the reference list, but indicated in a footnote on the page in which they are cited.

References: NBR 6023/2002. The accuracy and appropriateness of the references to papers that have been consulted and cited in the text are the responsibility of the author. Information coming from personal communication, papers in progress and unpublished papers must not be included in the reference list, but indicated in a footnote on the page where they are cited.

The references included at the end of each article must be written on separate pages from the main text, in alphabetical order according to the ABNT NBR - 6023, August 2002 norms. All authors

must be mentioned in the list of references at the end of the article. The use of the expression et al is not allowed.

Observe the reference examples below:

The Book as a whole:

GRAZIANI, Mario. Cirurgia buco-maxilo-facial. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1976. 676 p.

Book chapter without proper authorship:

PERRINS, C. M. Social systems. In: _____. Avian ecology. Glasgow: Blackie, 1983. chapter. 2, p. 7-32.

Book chapter with proper authorship:

GETTY, R. The Gross and microscopic occurrence and distribution of spontaneous atherosclerosis in the arteries of swine. In: ROBERT JUNIOR.; A., ATRAUSS, R. (Ed.). Comparative atherosclerosis. New York: Harper & Row, 1965. p. 11-20.

Monographs, dissertations and theses:

CORRALES, Edith Alba Lua Segovia. Verificação dos efeitos genotóxicos dos agentes antineoplásicos citrato de tamoxifen e paclitaxel. 1997.84 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica) – Curso de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 1997.

Papers presented at events: Conferences, Seminars, Meetings ...

NOVIS, Jorge Augusto. Extensão das ações de saúde na área rural. In: CONFERÊNCIA NACIONAL DE SAÚDE, 7., 1980, Brasília. Anais... Brasília: Centro de Documentação do Ministério da Saúde, 1980. p. 37-43.

Journal articles:

COHEN, B. I.; CONDOS, S.; DEUTSCH, A. S.; MUSIKANT, B. L. La fuerza de fractura de tres tipos de materiales para el muñon en combinacion com tres espigas endodontiacales distintas. R. Cent. C. Biomed. Univ. Fed. Uberlândia, Uberlândia, v. 13, n. 1, p. 69-76, dez. 1997.

Observation: As for the title of the journals, a single standard must be adopted. In the list of references all titles of journals must be presented abbreviated or in full, and in bold.

Note: As for electronic documents, the normal reference must be made, with information as to the description on the medium or support being added at the end.

Example :

Chapter of book with proper authorship available on CD - ROM :

FAUSTO, A. I. da F.; CERVINI, R. (Org.). O trabalho e a rua. In: BIBLIOTECA nacional dos direitos da criança. Porto Alegre: Associação dos Juizes do Rio Grande do Sul, 1995. 1 CD-ROM.

Periodical article in electronic media:

ROCHA-BARREIRA, C. A. Caracterização da gônada e ciclo reprodutivo da *Collisella subrugosa* (Gastropoda: Acmaeidae) no Nordeste do Brasil. Brazilian Journal of Biology, São Carlos, v. 62, n. 4b, nov. 2002. Disponível em: Acesso em: 20 abr. 2003.

Recommendations: It is recommended that the ABNT rules concerning submission of articles in periodicals (NBR 6023/2002), presentation of citations in documents (NBR 10.520/2002), presentation of original papers (NBR 12256), norm for dating (NBR 5892), progressive numbering of the sections of a document (6024/2003) and abstracts (NBR 6028 /2003), as well as the norm for IBGE tabular presentation, be observed.

Transfer of Copyright:

All persons listed as authors must sign the Transfer of Copyright:

“I declare that, in the case of acceptance of the article, the Bioscience Journal shall be the owner of the copyrights relating to same, which will become the sole property of the Journal, prohibiting any reproduction, in whole or in part, in any other place or means of publication, printed or electronic, without the prior and required authorization being requested, and if obtained, will include an appropriate acknowledgment to the Journal”.

Signature (s) of author (s) Date ___ / ___ / ____

Opinions expressed by authors are their exclusive responsibility.

Statement of Responsibility:

All persons listed as authors must sign the responsibility statement in the following terms:

I certify that I participated in the conception of the paper to take public my responsibility for its content, not omitting any affiliations or financial agreements between authors and companies that may be interested in publishing this article;

- I certify that the manuscript is original and that the paper, in part or in whole, or any other paper with substantially similar content of my authorship, was not sent to another journal and will not be sent, while its publication is being considered by the Bioscience Journal, be it in printed or electronic format.

Address for submission of papers:

<http://www.seer.ufu.br/index.php/biosciencejournal/about/submissions#onlineSubmissions>

SUBMISSION PREPARATION CHECKLIST

As part of the submission process, authors are required to check off their submission's compliance with all of the following items, and submissions may be returned to authors that do not adhere to these guidelines.

1. Only papers written in English will be accepted. The contribution is original and unpublished and is not being evaluated for publication by any other journal, failing that, justify in "Comments to the Editor".
2. The files for submission are in Microsoft Word (2010), RTF or WordPerfect format.
3. The text is simple-spaced, using a 11-point font; uses italics, rather than underlining (except with URL addresses), with figures and tables inserted in the text and not at the end.
4. The identification of authorship of this paper was removed from the file (Word 2010) and the option Properties in Word, thus ensuring the confidentiality of the journal. The text meets the formatting standards of the journal cited in "Guidelines for authors" in the "About" section
5. At the moment of online submission, the main author should send a letter signed by all authors, requesting the submission of the article and possible publication, exclusively by this journal. The letter should be scanned and transferred in "additional documents".

6. All “URL” addresses in the text (e.g.: <http://pkp.ubc.ca>) are active.
7. The article is being submitted correctly to the corresponding section according to its reference area.
8. Manuscripts, even those presenting scientific relevance and being methodologically correct, may be refused if presented in a disorganized manner and outside the norms of the Bioscience Journal. Well written manuscripts and those presented in accordance with the standards are reviewed faster and also require less effort from reviewers.
9. A publication fee will be charged to the amount of R\$ 40.00 (forty reais) per published page, for the approved papers. (Form of payment will be informed later).
10. All of the items above are basic requirements for the submission of an article and, if not according to the standards of the journal, or if the metadata are not filled out correctly, that particular article WILL NOT be considered for review.

COPYRIGHT NOTICE

The copyright for articles published in this journal belong to the authors, with first publication rights granted to the journal. In virtue of their appearance in this journal of open access, the articles are free to use, with proper attribution, in educational and non- commercial applications.

PRIVACY STATEMENT

The names and email addresses entered in this site will be used exclusively for the purposes of the journal and are not available for any other purpose.

AUTHOR FEES

This journal charges the following author fees.

Authors	Fees:	40.00	(BRL)
---------	-------	-------	-------

A publication fee will be charged to the amount of R\$ 40.00 (forty reais) per published page of the approved papers to national authors and \$ 40 or € 40 (Forty US dollars or Forty Euros - €) for foreign authors. (Form of payment will be informed later).

