

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

MON
615.274.3
M528a
TES/MEM

**AVALIAÇÃO GENOTÓXICA DA HIDROXIURÉIA
EM CÉLULAS SOMÁTICAS DE
*Drosophila melanogaster***

Aluna: Silma Maria Alves de Melo

UBERLÂNDIA-MG
2002

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA**

**AVALIAÇÃO GENOTÓXICA DA HIDROXIURÉIA
EM CÉLULAS SOMÁTICAS DE
*Drosophila melanogaster***

**Aluna: Silma Maria Alves de Melo
Orientador: Prof. Dr. Mário Antônio Spanó**

**Tese apresentada à Universidade Federal de
Uberlândia para obtenção do Título de
Doutor em Genética e Bioquímica (Área
Genética).**

**UBERLÂNDIA-MG
2002**

FICHA CATALOGRÁFICA

M528a Melo, Silma Maria Alves, 1957-
Avaliação genotóxica da hidroxiuréia em células somáticas de *Drosophila melanogaster* / Silma Maria Alves de Melo. – Uberlândia, 2002.
95f.: il.
Orientador: Mário Antônio Spanó
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.
Inclui bibliografia.
1. Hidroxiuréia - Teses. 2. *Drosophila melanogaster* - Teses. 3. Vitamina C - Teses I. Spanó, Mário Antônio. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. III. Título.

CDU: 615.277.3 (043.3)

DEDICATÓRIA

Dedico esta conquista à minha querida irmã,

Sueli Maria Alves de Melo Landim e ao meu cunhado "irmão",

Fernando de Souza Landim, que com compreensão e carinho,

souberam me incentivar no dia-a-dia.

Aos meus sobrinhos, **Felipe de Melo Landim** e **Vinícius de Melo Landim**,

mais do que a certeza.....a esperança!

Aos meus pais, **Durval de Melo** e **Diolina Pereira de Melo**

Agradeço pelo exemplo de luta e sacrifício em dar-me o melhor possível! Como

uma forma de superar a ausência e a dor da saudade de minha mãe.....é

acreditar que sua presença se faz em meu ser e fortalece o prazer de ver

realizado esse sonho em comum.....é uma forma de dar continuidade aos seus

ensinamentos e à sua memória.

À atual esposa de meu pai, **Sra. Neuza Lopes de Melo**, pelo incentivo.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A Deus,

Obrigada por oferecer, junto com as dificuldades, a força capaz para sobrepujá-las!

"Há homens que lutam um dia e são bons.
Há outros que lutam um ano e são melhores.
Há aqueles que lutam a vida inteira.
Estes são imprescindíveis"

Bertold Brecht

Ao meu orientador,

Prof. Dr. Mário Antônio Spanó

Por ter me ensinado os princípios fundamentais da PESQUISA, desde a época da Graduação, e da VIDA: a ética, a dignidade e, principalmente, o humanismo.

Obrigada, pelo esforço e competência em auxiliar-me neste trabalho, pelo exemplo de profissionalismo, ao mostrar não só o nosso envolvimento, mas principalmente, o nosso comprometimento com as tarefas, estes acrescidos de amizade, respeito e dedicação, dispensados em todos os momentos.

Muito Obrigada!.....

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Ulrich Graf, do Instituto de Toxocologia - Universidade de Zürich, Schwerzenbach, Suíça, pelo fornecimento das linhagens de *Drosophila melanogaster* e apoio necessário para a realização do Teste de Mutações e Recombinações Somáticas.

Aos membros da Banca Examinadora: Prof. Dr. Júlio César Nepomuceno, INGEB-UFU; Prof^a Dr^a Lusânia Maria Gregg Antunes, do Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Medicina do Triângulo Mineiro (Uberaba-MG); Prof. Dr. Salvador de Carvalho, do Departamento de Biologia Geral da Universidade Federal de Goiás (Goiânia-GO); Prof^a Dr^a Sandra Morelli, INGEB-UFU, pela participação dessa Banca e pelas valiosas sugestões.

À Prof^a Dr^a Francisca Luz Dias, do Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Medicina do Triângulo Mineiro (Uberaba-MG); e ao Prof. Dr. Malcon Antônio Manfredi Brandeburgo, INGEB-UFU, pela disponibilidade de participarem como membros suplentes dessa Banca.

Ao Prof. Dr. Júlio César Nepomuceno, INGEB-UFU; pela assessoria na análise estatística e, sobretudo, pela amizade desde a época de graduação.

Ao Prof. Dr. Malcon Antônio Manfredi Brandeburgo, Diretor do Instituto de Genética e Bioquímica e à Prof^a Dr^a Ana Maria Bonetti, Coordenadora do Curso de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia, pelo empenho na obtenção dos recursos materiais necessários ao desenvolvimento desta pesquisa.

Ao Dr. Sílvio César de Freitas Arantes, Coordenador Geral do Hemocentro Regional de Uberlândia-Fundação Hemominas-MG, por acreditar no sucesso desse projeto e incentivar a concretização do mesmo. Obrigada pela confiança, carinho e amizade! Que Deus continue abençoando a sua perseverança.

Ao Odelmo Roberto Marques Monteiro, Gerente Administrativo do Hemocentro Regional de Uberlândia - Fundação Hemominas-MG, pela amizade, pelo incentivo nos momentos difíceis e, principalmente, por acreditar na realização desse trabalho.

Ao Dr. Adilson Botelho Filho, Gerente Técnico do Hemocentro Regional de Uberlândia - Fundação Hemominas-MG, pelo incentivo e pelo auxílio na compreensão de alguns termos técnicos na área de Hematologia.

À Direção da Fundação Hemominas - Belo Horizonte-MG, pelo incentivo na realização do Curso de Doutorado e deste trabalho.

Aos professores e auxiliares do Curso de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica, da Universidade Federal de Uberlândia, que indiretamente contribuíram com a minha formação.

Aos colegas do Laboratório de Mutagênese: MSc. Ana Paula de Oliveira Ribeiro; Ângela Pfeifer de Oliveira; MSc. Bruno Lassmar Bueno Valadares; Cristina Celi da Costa; MSc. Denise Gonçalves Pereira; MSc. Édson José Fragiorge; Elaine Sílvia Dutra; Leila Leal da Silva Bonetti; Lidiane Gonçalves D. Diniz; MSc. Luciana Pereira Silva; MSc. Regildo Márcio Gonçalves da Silva; Renata Vilarinho; Shirleny Romualdo Cardoso; MSc. Silmara de Moraes Pantaleão; MSc. Vanessa Beatriz Monteiro Galassi Spini; Vânia Maria Sartini Dutra Pimenta; MSc. Wanderlene Blanco Nunes e Wender Ferreira Costa, pela convivência, experiências compartilhadas e lições aprendidas durante a realização deste trabalho. Foi muito gratificante conhecê-los.

Aos amigos do Hemocentro Regional de Uberlândia.....pelo apoio, incentivo e carinho.....aqui incluo a bióloga e estagiária do Curso de Enfermagem-UFU, **Karina de Souza Andrade**. Em especial, quero agradecer à **Ângela Ferreira da Silva Rocha.....**pela compreensão, pelo carisma e pela dedicação ao assumir nas minhas ausências, todas as tarefas do Setor de Hemoglobinopatias. Obrigada pelos "empurrões" de incentivo e pela amizade!.....Freqüentemente, meu cansaço e minhas preocupações foram sentidos e compartilhados com você.....A alegria dessa conquista, também, é sua!

A Sr^a Maria Aparecida Vilela, auxiliar técnica do Laboratório de Mutagênese, pela paciência, carisma e dedicação constantes na execução experimental deste trabalho.

Aos colegas do Curso de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia, pelo convívio, estímulo e pela troca de experiências.

À amiga Prof^a Dr^a **Cláudia Regina Bonini Domingos**, do Laboratório de Hemoglobinas e Genética das Doenças Hematológicas-UNESP, São José do Rio Preto-SP. Obrigada pelo incentivo.....você é uma amiga muito especial!

APOIO FINANCEIRO

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Mutagênese, do Instituto de Genética e Bioquímica, da Universidade Federal de Uberlândia (Uberlândia-MG) e recebeu apoio financeiro das seguintes Entidades e Instituições:

- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES);
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq);
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG);
- Universidade Federal de Uberlândia-UFU.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1. A Hidroxiuréia.....	1
1.2. Genotoxicidade da Hidroxiuréia.....	4
1.3. Terapia com Hidroxiuréia – Anemia Falciforme e Talassemia.....	7
1.4. O Ácido Ascórbico.....	14
1.5. A Doxorubicina.....	15
1.6. Teste para detecção de mutações e recombinações somáticas (Somatic Mutation And Recombination Test – SMART) em células de asas de <i>Drosophila melanogaster</i>	19

2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 26

CAPÍTULO ÚNICO

RESUMO.....	48
ABSTRACT.....	50
1. INTRODUÇÃO.....	53
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	57
2.1. Agentes Químicos.....	57
2.2. Procedimentos para coleta dos ovos.....	58
2.3. Tratamentos.....	58
2.4. Montagem das asas.....	60
2.5. Análise de lâminas.....	60
2.6. Análise Estatística.....	61
3. RESULTADOS.....	62
3.1. Avaliação genotóxica da hidroxiuréia (HU) – Cruzamento padrão (ST).....	62
3.2. Avaliação genotóxica da hidroxiuréia (HU) – Cruzamento de alta capacidade de bioativação metabólica (HB).....	64

3.3. Avaliação dos efeitos moduladores da hidroxiuréia, quando associada à doxorubicina – Cruzamento padrão.....	67
3.4. Avaliação dos efeitos moduladores do ácido ascórbico, quando associado à hidroxiuréia – Cruzamento padrão.....	71
3.5. Avaliação dos efeitos moduladores da hidroxiuréia e do ácido ascórbico, quando associados à doxorubicina–Cruzamento padrão.....	74
4. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO.....	80
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Freqüências de manchas mutantes observadas nos descendentes MH de *Drosophila melanogaster* do cruzamento padrão (ST) tratados com diferentes concentrações de hidroxiuréia.....63

Tabela 2. Freqüências de manchas mutantes observadas nos descendentes MH de *Drosophila melanogaster* do cruzamento de alta capacidade de bioativação metabólica (HB) tratados com diferentes concentrações de hidroxiuréia.....65

Tabela 3. Freqüências de manchas mutantes observadas nos descendentes MH de *Drosophila melanogaster* do cruzamento padrão (ST) tratados com diferentes concentrações de hidroxiuréia (HU) associadas à doxorrubicina (DXR).....69

Tabela 4. Freqüências de manchas mutantes observadas nos descendentes MH de *Drosophila melanogaster* do cruzamento padrão (ST) tratados com diferentes concentrações de hidroxiuréia (HU) associadas ao ácido ascórbico (AA).....72

Tabela 5. Freqüências de manchas mutantes observadas nos descendentes MH de *Drosophila melanogaster* do cruzamento padrão (ST) tratados com diferentes concentrações de hidroxiuréia (HU) associadas à DXR e ao AA.....75

Tabela 6. Freqüências de manchas mutantes observadas nos descendentes MH de *Drosophila melanogaster* do cruzamento padrão (ST) tratados com diferentes concentrações de hidroxiuréia (HU) associadas à DXR e ao AA e, comparadas com as das respectivas concentrações de HU associadas à DXR.....79

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO GERAL

Figura 1. Pêlo "flare" (A); Pêlos múltiplos (B)..... 21

Figura 2. Esquema representativo do cruzamento padrão (ST): Fêmea virgem da linhagem "flare" (+ *TM3*, *Bd^S* / + *flr³*) cruzada com macho "mwh" (*mwh* + / *mwh* +), originando descendentes trans-heterozigotos marcados (MH) (+ *flr³* / *mwh* +) e descendentes heterozigotos balanceados (BH) (+ *TM3*, *Bd^S* / *mwh* +)..... 23

Figura 3. Trans-heterozigoto marcado (+ *flr³* / *mwh* +, fenotipicamente com asas de bordas lisas) (A); balanceador-heterozigoto (+ *TM3*, *Bd^S* / *mwh* +, fenotipicamente com asas de bordas serrilhadas) (B)..... 24

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO ÚNICO

- Figura 1.** Fórmulas estruturais da Doxorubicina (DXR), Hidroxiuréia (HU) e do Ácido Ascórbico (AA)..... 57
- Figura 2.** Esquemas de exposição à HU e a co-tratamento entre HU + AA; HU + DXR; HU + DXR + AA..... 59
- Figura 3.** Distribuição dos tamanhos de manchas simples (pequenas e grandes), por mosca, dos descendentes MH, dos cruzamentos ST (A) e HB (B), tratados com HU (1,5; 3,0 e 6,0 mM) e água destilada estéril (controle negativo)..... 66
- Figura 4.** Frequências totais de manchas por mosca, observadas nos descendentes MH, do cruzamento ST, tratados com diferentes concentrações de HU (1,5; 3,0 e 6,0 mM) somadas às frequências totais de manchas por mosca observadas no tratamento com DXR (0,2 mM) (A); frequências totais de manchas por mosca, observadas nos descendentes MH, do cruzamento ST, co-tratados com diferentes concentrações de HU (1,5; 3,0 e 6,0 mM) + DXR (0,2 mM) (B)..... 70
- Figura 5.** Frequências de manchas por mosca, observadas nos descendentes MH, do cruzamento ST, tratados com HU (1,5; 3,0 e 6,0 mM) isoladamente e associadas com AA (50 mM)..... 73
- Figura 6.** Frequências de manchas observadas nos descendentes MH, tratados com: HU (1,5; 3,0 e 6,0 mM); AA (50 mM) e DXR (0,2 mM) isoladamente (A); HU (1,5; 3,0 e 6,0 mM) e DXR (0,2 mM) isoladamente (B); e com co-tratamento de HU (1,5; 3,0 e 6,0 mM) + AA (50 mM) + DXR (0,2 mM) (C)..... 78

LISTA DE ABREVIATURAS

AA – Ácido Ascórbico (Vitamina C)

BH – Balanceador Heterozigoto

BFU-E – burst-forming unit-erythroid

CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

CAR – Central Africa Republic

CAS – Chemical Abstract Service

CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

dNTPs – Trifosfatos de deoxinucleotídeos

DNA – Ácido Desoxirribonucléico

DXR – Doxorubicina

FDA – Food and Drug Administration

FAPEMIG – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais

Hb – Hemoglobina

HB – Cruzamento de alta capacidade de bioativação metabólica (High Bioactivation Cross)

HbF – Hemoglobina Fetal

HbS – Hemoglobina S

HbSS – Homozigoto para hemoglobina S

HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Performance

HU – Hidroxiuréia

MCL-5 – Células Linfoblásticas Mamárias

MH – Marcador-trans-heterozigoto

mM – milimolar

mwh – multiple wing hairs

NADH – Nicotinamida Nucleotídeo Reduzido

NDPR – Enzima Ribonucleotídeo Difosfato Redutase

PAF – Programa Nacional de Anemia Falciforme

PHHF – Persistência hereditária de Hemoglobina Fetal

RNA – Ácido Ribonucléico

ROS – Espécies de Oxigênio Reativas

SMART – Somatic Mutation And Recombination Test

ST – Cruzamento padrão (Standard cross)

t-BHP – t-Butil Hidroxiperóxido

UFU – Universidade Federal de Uberlândia

SUMÁRIO

CAPÍTULO ÚNICO

RESUMO.....	48
ABSTRACT.....	50
1. INTRODUÇÃO.....	53
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	57
2.1. Agentes Químicos.....	57
2.2. Procedimentos para coleta dos ovos.....	58
2.3. Tratamentos.....	58
2.3.1. Cruzamento Padrão (ST).....	58
2.3.2. Cruzamento de Alta Bioativação Metabólica.....	59
2.4. Montagem das asas.....	60
2.5. Análise de lâminas.....	60
2.6. Análise Estatística.....	61
3. RESULTADOS.....	62
3.1. Avaliação genotóxica da hidroxiuréia (HU) – Cruzamento padrão (ST).....	62
3.2. Avaliação genotóxica da hidroxiuréia (HU) – Cruzamento de alta capacidade de bioativação metabólica (HB).....	64
3.3. Avaliação dos efeitos moduladores da hidroxiuréia, quando associada à doxorrubicina – Cruzamento padrão.....	67
3.4. Avaliação dos efeitos moduladores do ácido ascórbico, quando associado à hidroxiuréia – Cruzamento padrão.....	71
3.5. Avaliação dos efeitos moduladores da hidroxiuréia e do ácido ascórbico, quando associados à doxorrubicina – Cruzamento padrão.....	74
4. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO.....	80
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	87

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1. A HIDROXIURÉIA

A Hidroxiuréia (HU) foi sintetizada na Alemanha em 1869 por Dresler e Stein, mas somente em 1928 demonstrou-se sua atividade biológica em experimentos com coelhos, devido à presença de leucopenia, anemia e alterações megaloblásticas na medula óssea desses animais (Rosenthal *et al.*, 1928 *apud* Timson, 1975).

Entre 1960 e 1970 uma série de estudos e relatos de casos documentou a atividade da HU em psoríase e em uma variedade de condições hematológicas (Kennedy e Yarbrow, 1966; Leavell e Yarbrow, 1970). Em um desses relatos foi demonstrado que a HU possuía atividade antitumoral contra o sarcoma 180, o que despertou interesse no composto como um possível agente antineoplásico (Stock *et al.*, 1960).

A HU é utilizada no tratamento de distúrbios mieloproliferativos (Malpas, 1967; Weil e Tanzer, 1967), síndrome hipereosinofílica (Parrillo *et al.*, 1978), melanoma maligno metastático, tumores sólidos (Becloff, 1967), infecções pelo HIV (Lori, 1999; Seminari *et al.*, 1999), hemoglobinopatias, dentre as quais destacam-se a anemia falciforme (Platt *et al.*, 1984; Dover *et al.*, 1986; Charache *et al.*, 1987; Charache, 1996) e a talassemia beta (Fucharoen *et al.*, 1996; Voskaridou *et al.*, 1995).

A HU é rapidamente absorvida no trato gastrointestinal após ingestão oral, sendo bem distribuída em todas as partes do corpo (Becloff, 1967; Blacow, 1972). A HU alcança os níveis de pico no sangue uma a duas horas após administração, penetra nas células por difusão passiva, entra rapidamente no fluido cerebrospinal e é excretada na urina com uma meia-vida menor que oito horas (Donehower, 1982; Yarbrow, 1992).

A HU inibe a ribonucleosídeo difosfato redutase (NDPR), enzima que converte ribonucleotídeos em trifosfatos de desoxirribonucleotídeos (dNTPs) para a síntese e reparo do DNA (Krakoff *et al.* 1968; Moore and Hurlbert, 1985), enzima alvo para os quimioterápicos.

A NDPR dos mamíferos é composta por duas subunidades, cada uma existindo como um dímero na enzima completa e contribuindo para a formação do centro catalítico. Cada uma das pequenas subunidades (M2) contém uma molécula de ferro, firmemente ligada, que estabiliza o radical livre tirosil, necessário para a reação. As subunidades maiores (M1), contém duas classes de sítios de ligação alostéricos para a regulação da atividade da enzima. Uma classe regula a atividade total da enzima e a outra regula a especificidade do substrato da enzima (Foye, 1995).

O ferro não-heme é um componente importante da enzima NDPR em tecidos de mamíferos. A HU pode formar complexos com o ferro e reduzir sua taxa de utilização pelas células vermelhas, mas isto parece não alterar a sobrevivência das mesmas (Agrawal e Sartorelli, 1975; Donehower, 1982).

A HU é usada como uma co-terapia anti-HIV (Vírus da Imunodeficiência Humana), possuindo ação favorável sobre a fosforilação e potenciação dos efeitos anti-retrovirais dos nucleosídeos análogos de natureza purínica, sendo eficaz na redução da carga viral e um excelente coadjuvante no tratamento de pacientes infectados pelo HIV (Lori, 1999).

A HU não tem atividade anti-retroviral direta, age principalmente como um inibidor da NDPR, tendo por resultado níveis intracelulares reduzidos de dNTPs, que são necessários para a síntese do DNA e podem regular positivamente a atividade dos vários análogos de pirimidina e purina. A depleção do *pool* de dNTP resulta no bloqueio do ciclo celular na fase G₁, antes da síntese do DNA. Devido à inibição da síntese de DNA, o principal efeito da HU é representado pela mielossupressão. Esse agente parece ser bem tolerado e desprovido de efeitos de toxicidade quando usada em portadores assintomáticos, HIV - positivo (Seminari *et al.*, 1999).

A HU age como um agente citotóxico e antineoplásico, especificamente na fase S do ciclo celular, inibindo a síntese de DNA e, com menos efeito, a síntese de RNA e proteínas (Smith *et al.*, 1968; Timson, 1975).

A ação da HU na inibição da síntese de DNA tem sido demonstrada *in vitro*, em cultura de fibroblastos (Adams e Lindsay, 1967) e linfócitos do sangue periférico humano (Topping *et al.*, 1968), assim como em cultura de diferentes tipos celulares, tais como, células leucêmicas humanas (Bosmann, 1972), de

embriões de camundongos (Skoog e Nordenskjöld, 1971), de hamster chinês (Jones *et al.*, 1972), e HeLa (Pfeiffer e Tolmach, 1967).

Em células HeLa foi verificado que a síntese de DNA no citoplasma é relativamente menos afetada pela HU, quando comparada com a síntese nuclear. Isso pode ser devido a uma menor exaustão do *pool* de desoxirribonucleotídeos no citoplasma (Vesco e Penman, 1969).

A HU, em concentrações usadas clinicamente, causa significativa depressão de mitoses de linfócitos humanos, em cultura (Nordenskjöld e Krakoff, 1968; Timson, 1969), o que pode ser reversível pela suspensão do tratamento (Adams e Lindsay, 1967; Coyle e Strauss, 1970).

A atividade antineoplásica da HU se deve à potente inibição da síntese de DNA (Maruyama *et al.*, 1973). Esta inibição foi demonstrada em *Allium*, reduzindo o índice mitótico do meristema de 5,1 para 2,6, quando tratado com HU a 10^{-4} M (Truhaut *et al.*, 1967).

O principal efeito tóxico da HU em humanos é a supressão hematopoiética, envolvendo leucopenia, anemia megaloblástica e, raramente, trombocitopenia. A recuperação da medula óssea, em geral, é rápida se a HU for suspensa por alguns dias. Outras reações adversas incluem distúrbios gastrintestinais (estomatite, perda de apetite, náusea, vômito, diarreia e constipação) e reações cutâneas (erupção maculopapular e vermelhidão da face); mais raramente, foram observadas manifestações neurológicas. Portanto, o tratamento com HU requer cuidadosa supervisão médica e exames de sangue periódicos, para detectar, precocemente, qualquer alteração hematológica, como anemia, queda do número de glóbulos brancos ou de plaquetas (Gilman *et al.*, 1987).

A HU é tóxica às células tanto em altas concentrações, como em exposição prolongada em baixas concentrações (Timson, 1975). Linfócitos humanos submetidos a 72 horas de cultura foram mortos pela concentração de HU equivalente a dose de 80 mg/kg (Timson, 1969), a qual é amplamente recomendada como dose terapêutica (Blacow, 1972). Essa concentração permanece no corpo, porém, somente por um curto período devido a sua rápida eliminação (Becloff, 1967).

A citotoxicidade após a administração de HU tem sido relatada em tecidos em proliferação (Philips *et al.*, 1967) e em embriões de rato *in vivo* (Scott *et al.*,

1971). Células de hamster não sobreviveram em culturas tratadas com HU, quando expostas a altas concentrações ou por um longo período. Essas células são particularmente sensíveis na fase-S (Yu e Sinclair, 1968). Células HeLa podem morrer na presença de HU na fase-S, embora elas sejam menos sensíveis a essa droga que as células de hamster chinês (Timson, 1969).

Nos seres humanos, a HU atravessa a barreira hemato-encefálica e é secretada no leite. Portanto, não deve ser utilizada por gestantes (Donehower, 1982). Quando administrada em ratas grávidas induziu redução no número de células do corpo, do cérebro e do fígado dos embriões (Scott *et al.*, 1971). Em ratos a HU induziu espermatozóides anormais (Wyrobek e Bruce, 1975) e em humanos provocou danos na estrutura da cromatina dos espermatozóides (Wiger *et al.*, 1995). Extrapolar resultados obtidos em experimentos animais para os humanos pode ser arriscado. Porém, sugere-se que o uso terapêutico desse medicamento seja contra-indicado durante a gravidez (Blacow, 1972).

1.2. GENOTOXICIDADE DA HIDROXIURÉIA

Visto que a ação da HU é prontamente reversível e que inibe mitoses, principalmente pela inibição da síntese de DNA na fase-S, a mesma tem sido empregada como agente sincronizante em cultura de células de vários sistemas (Timson, 1975). Células de hamster chinês podem ser sincronizadas em cultura (Sinclair, 1967) e as células resultantes desse processo não apresentaram aberrações cromossômicas (Yu e Sinclair, 1968).

Agentes químicos fase S-dependentes competem com deoxinucleotídeos endógenos, para incorporação na cadeia de DNA (Plunkett *et al.*, 1980) ou inibem a síntese de NDPR, que é a enzima que converte ribonucleotídeos em dNTPs, impedindo o progresso do complexo de replicação do DNA, a favor da síntese da nova cadeia, ou o reparo do DNA (Krakoff *et al.*, 1968; Moore e Hurlbert, 1985).

A HU impediu quebras de cromátides em cultura de fibroblastos de hamster tratados com citosina arabinoside, que na ausência de HU causa quebra de cromátides em todas as fases do ciclo celular, exceto na fase-M (Karon e Benedict, 1970).

A HU tem sido associada à radioterapia em carcinomas de cérvix, cabeça, pescoço e pulmão, devido a sua capacidade de sincronizar células neoplásicas *in vitro* na fase G₁ do ciclo celular, sensível às radiações (Gilman *et al.*, 1987).

A HU, por ser um inibidor potente da NDPR, reduz o *pool* intracelular de dNTP que interfere, *in vitro*, não somente com a síntese de DNA, mas também, com os mecanismos de reparo de DNA (Snyder, 1984). Danos ao DNA, causados espontaneamente ou por mutágenos ambientais, não podem ser completamente reparados na presença de HU, levando à acumulação de mutações somáticas e danos cromossômicos (Li e Kaminskas, 1987).

Trabalhos preliminares mostraram que a HU inibiu os mecanismos de reparo de quebras de DNA induzidas por raios-X em linfócitos humanos e em células de mamíferos (Prempree e Merz, 1969; Horikawa *et al.*, 1972); em células HeLa e em células bovinas tratadas com luz ultravioleta (Ben-Hur e Ben-Oshai, 1971; Cleaver *et al.*, 1972), assim como em células leucêmicas (L1210) de camundongos, induzidas pelo 2-cloroetil isocianeto (Kann *et al.*, 1974).

Estudos mostraram que vários compostos químicos, como por exemplo, anilina, benzeno, bleomicina, cromato de sódio, etc., induziram danos ao DNA de células linfoblastóides mamárias (MCL-5), detectados pela técnica de micronúcleos (fragmentos cromossômicos acêntricos ou cromossomos inteiros que se atrasam em relação aos demais, na migração para os pólos da célula na anáfase) e pelo Teste Cometa (danos de DNA detectados em células individuais, por meio de eletroforese). Porém, quando esses compostos foram associados à HU (10 mM), que inibe a síntese de DNA e os mecanismos de reparo, foi observado aumento expressivo na formação de danos, detectados pelo teste cometa (Martin *et al.*, 1999).

No entanto, HU não inibiu mecanismos de reparo de quebras de DNA induzidas em linfócitos humanos expostos a raios-X (Wolff, 1972) e a agentes alquilantes (Lieberman *et al.*, 1971), assim como em *E. coli*, em concentrações que inibiam completamente a síntese de DNA (Sinha e Snustad, 1972).

Conclui-se que os efeitos da HU nos mecanismos de reparo, dependem dos procedimentos experimentais utilizados e, em particular, do organismo a ser testado, da composição do meio de cultura e se as células são ou não tratadas com HU imediatamente após a indução de quebras ou após um período de

recuperação. Essas diferenças podem explicar os conflitantes relatos e levar a conclusão que a HU pode ser capaz de impedir reparos, mas somente em certas circunstâncias (Timson, 1975).

Experimentalmente, tem sido mostrado que a HU possui efeitos clastogênicos (Oppenheimer e Fishbein, 1965; Gebhart, 1981), teratogênicos (Murphy e Chaube, 1964; Aliverti *et al.*, 1980) e mutagênicos (Ziegler-Skylakakis, *et al.*, 1985).

O uso terapêutico da HU causou, nos leucócitos de pacientes com câncer de pulmão, um significativo aumento de aberrações cromossômicas, quando comparado com o controle normal e com pacientes, antes do tratamento (Kaung e Swartzendruber, 1969).

Em cultura de linfócitos humanos normais, estimulados com fitohemaglutinina, a HU, em doses terapêuticas, provocou um grande número de fragmentações cromossômicas (Oppenheimer e Fishbein, 1965). Em cultura de células hepáticas incubadas com essa droga foram observadas acumulações de quebras na dupla fita de DNA, conforme o tempo de exposição (Coyle e Strauss, 1970).

A HU não causou aberrações cromossômicas em células de hamster chinês tratadas no período de uma a seis horas nas fases G₁, G₂ ou M do ciclo celular. Porém, naquelas que atingiram mitoses mais tardiamente, foram encontradas aberrações cromatídicas (Yu e Sinclair, 1968). Essas mesmas células, quando expostas à HU, acima de 72 horas, sofreram 51% de anomalias estruturais nas placas de metáfases, incluindo quebra de cromátides, fragmentação de cromossomos e translocações (Borenfreund *et al.*, 1964).

Fibroblastos de hamster também exibiram quebras de cromátides quando tratados com HU na fase-S do ciclo celular, mas não quando tratados na fase-G₂ (Karon e Benedict, 1970). Quebras cromossômicas também foram observadas em *Allium* expostos à HU (Truhaut *et al.*, 1967).

Em *S. cerevisiae*, a HU inibiu a replicação do DNA e induziu conversão gênica e *crossing-over* mitótico (recombinação somática) (Fabre, 1978; Staleva *et al.*, 1996) e aneuploidia (Mayer *et al.*, 1986).

Dados da literatura comprovam que existe uma ligação entre a atividade recombinogênica de compostos químicos e sua carcinogenicidade (Cairns, 1981).

Pacientes com desordens mieloproliferativas, como policitemia vera e trombocitopenia, submetidos a terapia prolongada com HU, apresentaram risco aumentado de desenvolver síndrome mielodisplásica e leucemia mielóide aguda, por deleção cromossômica, resultante de translocações não balanceadas, envolvendo genes localizados no cromossomo 17 (17p), inclusive o gene p53 (Sterkers *et al.*, 1998). Foi relatado, também, câncer de pele em pacientes submetidos a tratamento quimioterápico com HU por longos períodos (Jones *et al.*, 1983).

Alguns autores sugerem que aumentos nas freqüências de aberrações cromossômicas, observadas na presença de HU, possam ser devidos à inibição da síntese de dNTP, durante a fase G₂ do ciclo celular; à inibição dos mecanismos de reparo (Prempree e Merz, 1969; Cleaver *et al.*, 1972; Horikawa *et al.*, 1972; Snyder, 1984); ou à geração de radicais livres (Li e Kaminskas, 1987; Gomez *et al.*, 2000; Iyamu *et al.*, 2001). No entanto, outros autores sugerem que a HU possui efeitos antioxidantes (Agil e Sadrzadeh, 2000).

1.3. TERAPIA COM HIDROXIURÉIA - ANEMIA FALCIFORME E TALASSEMIA

Vários agentes farmacológicos têm sido correntemente avaliados para a indução de hemoglobina fetal (HbF) em pacientes com Anemia Falciforme e Talassemia Beta. A HU foi a primeira dessas drogas a ser aprovada pelo FDA (Food e Drug Administration) para o tratamento dessas alterações genéticas (Atweh e Loukopoulos, 2001).

O primeiro agente farmacológico testado para induzir síntese de HbF foi a 5-azacitidina, que estimulou significativamente essa síntese em babuínos e em pacientes com Anemia Falciforme (DeSimone *et al.*, 1982; Ley *et al.*, 1983; Dover *et al.*, 1985). Pelo fato de ser tóxica e potencialmente carcinogênica, seu uso foi desestimulado (Carr *et al.*, 1984; Dover *et al.*, 1985). Subseqüentemente, citarabina (Papayannopoulou *et al.*, 1984), hidroxiuréia (Veith *et al.*, 1985; Goldberg *et al.*, 1992) e outros agentes foram testados. A atenção de diferentes investigadores tende a se concentrar na HU, principalmente porque ela não é incorporada ao DNA; por ser convenientemente administrada oralmente; sua

toxicidade ser prognosticável e manuseável, seus efeitos mielossupressivos serem facilmente monitorados e rapidamente revertidos (Goldberg *et al.*, 1992).

A Anemia Falciforme é uma doença genética de herança autossômica recessiva, que causa alterações na hemoglobina (Hb), que é uma proteína encontrada no interior das hemácias, formada por quatro cadeias polipeptídicas (as globinas) e um grupo prostético (heme) ligado a cada uma das cadeias de globina. Essas cadeias se agrupam conforme suas similaridades genéticas e estruturais. As combinações entre as diferentes globinas determinam os tipos de hemoglobinas humanas produzidas. Um indivíduo adulto e normal possui os seguintes tipos de hemoglobinas: HbA₁ (96-98,0%); HbA₂ (2,5-3,7%) e Hb Fetal (0-2,0%) (Lehmann e Hunstman, 1974; Wood, 1976; Wood *et al.*, 1978).

A causa da Anemia Falciforme é uma mutação no sexto aminoácido da cadeia globínica beta, provocando a substituição do ácido glutâmico pela valina. A entrada da valina nessa posição favorece a polimerização sob condições de baixo teor de oxigênio, fazendo a hemoglobina assumir, na presença de fatores indutores, a forma de uma foice. Essa hemoglobina alterada é designada como hemoglobina S (HbS). A união de vários tetrâmeros de HbS forma inúmeras moléculas agregadas, geram longos polímeros e distorcem a hemácia (Ingran, 1958; Lehmann e Hunstman, 1974).

A denominação Anemia Falciforme é reservada para a forma da doença que ocorre nos homozigotos (HbSS). Além disso, o gene da hemoglobina S pode combinar-se com outras anormalidades hereditárias das hemoglobinas, como hemoglobina C e Talassemia Beta, entre outras, gerando combinações denominadas Doenças Falciformes, que são sintomáticas. Os portadores do Traço Falciforme são assintomáticos e herdaram um único gene afetado (heterozigotos), produzindo as hemoglobinas A e S (HbAS) (Chamone *et al.*, 1996).

As Doenças Falciformes acarretam complicações vasculares que ocasionam múltiplas lesões em órgãos afetados, como o cérebro, coração, fígado, rins, olhos, esqueleto e pulmões (Fester *et al.*, 2001). Essas doenças têm altas morbidade e mortalidade precoce (Miller *et al.*, 2000).

A distribuição da Anemia Falciforme é ampla, abrangendo todos os continentes, notadamente a África, a América do Norte e a América Latina

(Naoum, 1982). Estimam-se, no Brasil, cerca de trinta mil portadores das doenças falciformes (Naoum e Domingos, 1997), sendo uma das mais freqüentes doenças genéticas no Brasil (Alves, 1996).

Conforme dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) a cada ano nascem no Brasil, cerca de 2.500 crianças portadoras de Anemia Falciforme. Vinte por cento delas não atingem cinco anos de idade, devido a complicações diretamente relacionadas com a doença. Por esse motivo, o Ministério da Saúde, instituiu em 1996, o Programa Nacional de Anemia Falciforme (PAF), visando promover e implementar ações que permitam reduzir a morbimortalidade. Dentre algumas das medidas, destaca-se a disponibilidade de medicamentos básicos como o ácido fólico, a hidroxiuréia e a deferoxamina (Chamone, 1996).

Embora todo paciente com Anemia Falciforme apresente a mesma mutação genética, a diversidade relativa à severidade das manifestações clínicas é notável. Vários fatores modificantes vêm sendo estudados com o intuito de definir o por quê dessa diversidade. Os mais importantes atualmente são: os níveis de HbF, a coexistência de outras hemoglobinopatias hereditárias e, finalmente, os diferentes haplótipos para a HbS (Errol, 1997).

Os antropólogos utilizam haplótipos da HbS, que são os últimos fatores moduladores conhecidos atualmente, para traçar a migração dos genes da Anemia Falciforme da África para o Mediterrâneo e para o continente americano. Esses haplótipos são descritos como sítios polimórficos de endonucleases de restrição, localizados no interior e ao redor do gene da cadeia beta mutante. Eles são mais comumente designados de acordo com a área geográfica onde foram primeiramente identificados: Senegal, Benin, CAR ("Central Africa Republic" ou Banto) e Asiático (Indu Árábico). Foi descrito, também, o haplótipo Cameron, localizado em um único grupo étnico na República dos Camarões. No Brasil, predomina o haplótipo CAR (Banto) seguido pelo Benin, sendo quase ausente o haplótipo Senegal. Pacientes com o haplótipo Senegal, geralmente apresentam formas clínicas mais brandas, enquanto aqueles com haplótipo CAR apresentam as mais severas, e os com o Benin apresentam formas com gravidade intermediária. O mecanismo pelo qual cada haplótipo influencia na severidade da doença permanece um mistério. Experiências comprovam que cada um deles

possui níveis diferentes de HbF. Os pacientes com o haplótipo Senegal, por exemplo, apresentam mais de 20% de HbF (Errol, 1997).

A primeira indicação que a HbF interfere na falcização foi observada em estudos realizados com hemácias de recém-nascidos portadores de Traço Falciforme, as quais não falcizaram *in vitro* até o nível de HbF baixar para aqueles observados em adultos. Posteriormente, foi observado que todas as mães portadoras de Traço Falciforme apresentaram hemácias falcizadas *in vitro*, enquanto que seus recém-nascidos, portadores de Anemia Falciforme (HbSS), apresentaram, em média, apenas 11% de suas hemácias falcizadas *in vitro*, e que os sintomas da doença eram incomuns nos primeiros meses de vida (Watson *et al.*, 1948).

As hemácias do recém-nascido portador de Anemia Falciforme contêm de 80 a 90% de HbF. Pouco antes do nascimento ocorre um aumento da síntese de cadeias beta S. Após o nascimento, a HbF cai progressivamente, chegando a um mínimo em torno do 4º mês de idade. Porém, essa queda pode ser variável (Schiller, 1980). Os níveis de HbF entre 15 e 20% melhoram os sintomas da Anemia Falciforme, que pode ser benéfica mesmo em pequenas porcentagens. Como a HbF não participa da formação do polímero, ela exerce efeito inibidor do processo de polimerização, impedindo a falcização das hemácias (Platt *et al.*, 1991).

Como citado anteriormente, a HU é indicada no tratamento de outro tipo de hemoglobinopatia, a Talassemia Beta. Doença caracterizada por alterações nas cadeias beta da globina, cuja conseqüência se resume na supressão total ou parcial da produção dessas cadeias. A ausência ou a deficiência acentuada na produção de cadeias beta leva a uma anemia hipocrômica e microcítica grave, devido à hemólise que ocorre na medula óssea e no baço. As cadeias alfa em excesso e não pareadas precipitam dentro das hemácias e danificam a membrana celular, destruindo prematuramente as hemácias. Numa tentativa de suprir a deficiência dessas células, a eritropoese é aumentada na medula óssea. Contudo, grande parte desse processo é ineficaz, ou seja, as hemácias são destruídas ainda na fase de desenvolvimento, sem terem sido liberadas para a circulação periférica (Benz Junior e Forget, 1980; Weatherall e Clegg, 1981).

As reativações dos genes, gama glicina (γ^G) e gama alanina (γ^A), da globina fetal, são os métodos mais convenientes para tentar corrigir os desarranjos patofisiológicos das hemoglobinopatias, devido à presença de cadeias gama. Nas células dos portadores das síndromes falcêmicas, as cadeias gama inibem a polimerização da hemoglobina S (HbS) dificultando ou prolongando o processo de falcização das hemácias, principalmente pela possibilidade da formação de hemoglobina com cadeias híbridas ($\alpha_2\beta^S\gamma$) e a dispersão das moléculas de HbF entre as de HbS, diminuindo as chances de polimerização (Loukopoulos, 1997).

Os genes gama, ao serem reativados nos pacientes adultos portadores de talassemia beta, não somente adicionam HbF dentro das hemácias desses pacientes, como aumentam a capacidade dessas células de transportar o oxigênio, além do mais, as cadeias gama sintetizadas pareiam com as cadeias alfa em excesso, prevenindo a precipitação intracelular e evitando a morte prematura dos eritróides precursores, na medula óssea e das células vermelhas, no sangue periférico (Fessas e Loukopoulos, 1974; Weatherall e Clegg, 1981).

Experimentos utilizando HU 80 mM para tratar células eritroleucêmicas humanas (K562), mostraram que a HU, seletivamente, aumenta a expressão do gene gama glicina cerca de 2,3 vezes mais, enquanto que a expressão do gene gama alanina não alterou. O gene gama glicina é responsável por aproximadamente 70% da síntese de HbF no feto. A compreensão dos mecanismos pelos quais a HU, diferencialmente, regula a expressão desse gene, pode fornecer discernimento da regulação da expressão da HbF (Xu e Zimmer, 1998).

A HU aumenta significativamente a produção de HbF e concomitantemente afeta o transporte passivo de potássio (K) na hemácia e o volume celular em pacientes homocigotos para HbS, diminuindo, assim, a severidade da doença. Sabe-se que altos níveis de HbF nas hemácias, diminuem a capacidade de deformação das células falciformes e a adesividade das hemácias ao endotélio. Células vermelhas do sangue com HbS apresentam uma maior aderência às células do endotélio vascular do que as células com HbA, aumentando, assim, a probabilidade de crises vaso-oclusivas. Os efeitos da HU na estrutura e função do endotélio vascular são ainda desconhecidos (Adragna *et al.*, 1994; Steinberg, 1997).

A HU, ao causar toxicidade ao sistema hematopoiético e, conseqüentemente, a morte de eritróides precursores mais diferenciados, induz a síntese de HbF por recrutamento de novas células tronco. Como o programa de síntese da cadeia gama permanece dormente na medula óssea do adulto, uma súbita expansão da atividade eritróide durante a hemólise, estimulará transitoriamente a síntese da Hb Fetal. Com a regeneração da medula, devido a esse efeito citotóxico, muitas células primitivas capazes de expressar HbF, são reprogramadas e expandidas. A habilidade dessa resposta à HU pode depender da reserva de reticulócitos e neutrófilos na medula óssea ou da capacidade da medula de resistir a moderadas doses desse medicamento, fazendo evoluir a população de eritroblastos com altos níveis de HbF. O pré-requisito para a HU induzir aumento de HbF, talvez seja determinado pelos efeitos mielotóxicos da mesma, e pela capacidade proliferativa da medula óssea (DeSimone *et al.*, 1982; Galanello *et al.*, 1988; Yarbrow, 1992; Charache, 1994; Griffin, 1997).

Estudos, *in vitro*, com eritróides progenitores derivados de amostras de cordão umbilical, sangue periférico de pacientes com HbS/PHHF (Persistência Hereditária de Hemoglobina Fetal) e com doença HbSS, foram utilizados para verificar os efeitos da HU em diferentes situações: a) na fase-S dos progenitores de eritróides. Os níveis de eritróides progenitores da fase-S foram similares para todos os três grupos de amostras; b) no crescimento das colônias formadoras de eritróides (burst-forming unit-erythroid-BFU-E). Esse crescimento foi inibido cerca de 92 a 94% para todas as amostras de maneira dose-dependente; c) nos níveis de HbF nas colônias BFU-E. Os níveis de HbF aumentaram nas colônias de BFU-E de pacientes HbSS e diminuíram nas colônias derivadas de amostras de cordão umbilical ou de pacientes HbS/PHHF; e d) na síntese total de RNA, avaliada pela incorporação da 3H-uridina. Houve aumento da síntese total de RNA, conforme aumento da concentração de HU (Baliga *et al.*, 2000).

Tem sido previamente demonstrado que a HU é metabolizada em ratos para liberar óxido nítrico e, assim, postulado que o mesmo ocorre em humanos. Numa reação onde se misturam HU e HbS ocorre aumento na formação de metahemoglobina e óxido nítrico, quando a deoxihemoglobina S é combinada com a HU. Foi relatado que a administração oral de HU, para o tratamento de Anemia Falciforme, produziu hemoglobina nitrosil (HbNO). A formação dessa

hemoglobina envolve transferência específica de NO, do grupo NHOH, da hidroxiuréia. O complexo de hemoglobina nitrosil é capaz de atrasar a polimerização da HbS e possibilitar a vasodilatação. A HbNO pode ser detectada nos primeiros 30 minutos após administração e persistir por 4 horas, suportando a hipótese que a habilidade da HU para atenuar os fenômenos vaso-oclusivos, podem, em parte, ser atribuída a vasodilatação e/ou diminuição da ativação das plaquetas induzidas pelo óxido nítrico (Kim-Shapiro *et al.*, 1998; Glover *et al.*, 1999).

A HU foi avaliada *in vitro*, quanto a sua ação tóxica/genotóxica, em linfócitos do sangue periférico de indivíduos saudáveis e em células de pacientes com anemia falciforme; e *in vivo*, em pacientes com esta anemia submetidos a tratamento quimioterápico. Os resultados *in vitro*, em linfócitos de indivíduos saudáveis permitiram concluir que a HU é citotóxica somente em células que estão sintetizando DNA durante o período de exposição à droga, exatamente por agir sobre a enzima ribonucleotídeo redutase, inibindo a divisão celular. No experimento *in vitro*, com linfócitos de pacientes portadores de anemia falciforme, a HU não demonstrou efeitos citotóxicos e nem genotóxicos nas doses e condições utilizadas. Por outro lado, nos experimentos *in vivo*, com linfócitos de pacientes portadores desse tipo de anemia, a HU somente apresentou citotoxicidade na primeira dose. Nas outras doses houve uma estabilidade fisiológica que se manteve até o final do experimento. Acredita-se que o organismo adaptou-se à presença da droga e após um ano e dois meses de terapia, o aumento gradativo das doses empregadas não foi suficiente para inibir a atividade da ribonucleotídeo redutase, sendo considerado não genotóxico nas doses e condições utilizadas nesses experimentos, sustentando as hipóteses levantadas na literatura que sugerem que a HU é menos mutagênica que outros agentes quimioterápicos. Este fenômeno ocorre devido ao fato da HU não agir diretamente sobre o DNA e sim sobre a ribonucleotídeo redutase (Khayat *et al.*, 2001).

Estudos realizados com pacientes portadores de desordens mieloproliferativas, como policitemia vera e trombocitopenia; e anemia falciforme (crianças e adultos) submetidos a terapia prolongada com HU, demonstraram que a HU possui baixo potencial mutagênico/carcinogênico, sendo mais evidente em crianças portadoras de anemia falciforme (Hanft *et al.*, 2000).

A aplicação da HU gera preocupações, devido a uma série de questões ainda não determinadas, tais como a dosagem correta e o tempo de tratamento, a tolerância, a toxicidade e os riscos, a longo prazo, incluindo a sua mutagenicidade (Loukopoulos, 1997).

1.4. O ÁCIDO ASCÓRBICO

Cada célula do organismo necessita de uma fonte constante de oxigênio para converter o alimento consumido em energia. A queima de oxigênio, entretanto, libera os radicais livres, moléculas instáveis que danificam as células sadias, podendo provocar envelhecimento e o câncer, entre outros sintomas. Alguns agentes podem promover a formação desses radicais, tais como exercício, poluição ambiental, gordura saturada (dos alimentos), cigarro e álcool. Por outro lado, algumas substâncias combatem os radicais livres, podendo amenizar e/ou retardar os efeitos dos mesmos. Essas substâncias podem ser obtidas por meio da alimentação, dentre as quais destaca-se o ácido ascórbico (AA) (vitamina C) (Odin, 1997).

O AA foi sintetizado em 1933 pelo químico suíço Tadeusz Reichstein e pertence ao grupo das vitaminas hidrossolúveis, as quais não são armazenadas e devem ser obtidas diariamente por meio da dieta. O AA é um agente antioxidante capaz de sequestrar os radicais livres com eficiência, como, também, restringir a propagação das reações em cadeia iniciadas pelos radicais livres, formados pelos processos metabólicos ou como resultado da exposição aos fatores ambientais (Antunes, 1997; Odin, 1997).

Espécies de oxigênio reativas (Reactive Oxygen Species-ROS) são geradas durante respiração aeróbica e metabolismo normais. Para impedir os efeitos deletérios de ROS, as células têm desenvolvido mecanismos de defesa que agem como varredores de ROS, prevenindo, desse modo, a reação dessas espécies com macromoléculas celulares, assim como o DNA e os lipídeos. Em adição, alguns micronutrientes antioxidantes como o AA, a vitamina E, os carotenóides e flavonóides, também protegem as células contra os danos oxidativos (Antunes, 1997; Odin, 1997; Noroozi *et al.*, 1998).

A terapia com AA apresenta efeito protetor contra a radiação e a toxicidade aguda dos agentes químicos, atuando na destoxificação de vários poluentes, metais pesados, pesticidas e xenobióticos (Galley *et al.*, 1996).

O AA exerce atividade pró-oxidante *in vitro*, usualmente pela interação com íons metais, os quais promovem sua oxidação, acompanhada pela produção de H_2O_2 . Os íons metais oxidam o AA cerca de 80 vezes mais efetivamente que o íon ferro (Fe^{++}) (Lee *et al.*, 2001).

O AA secretado no suco gástrico pode auxiliar na redução do ferro inorgânico dietético insolúvel (Fe^{3+}) para a forma solúvel (Fe^{2+}), a qual é mais facilmente absorvida pelo intestino delgado, oferecendo proteção contra a anemia ferropriva (Waring *et al.*, 1996).

Estudos demonstraram efeitos benéficos dessa vitamina, principalmente quanto às suas propriedades anticarcinogênicas. O AA inibe a formação endógena de nitrosaminas carcinogênicas (Antunes, 1997). Dietas deficientes em frutas e vegetais têm, comumente, baixos teores de folatos e de antioxidantes, como por exemplo, a vitamina C, e muitos outros micronutrientes. Essa deficiência pode estar associada com altas taxas de câncer devido, em grande parte, ao aumento de danos ao DNA (Ames, 2001).

1.5. A DOXORRUBICINA

A doxorubicina (DXR), um antibiótico citotóxico do grupo das antraciclina, isolado a partir de culturas de fungos *Streptomyces peuceitius*, variedade *caesius* (Arcamone *et al.*, 1972), é um agente quimioterápico com uma potente ação antineoplásica, incluindo leucemia aguda, linfomas não-Hodgkin, câncer de mama, doença de Hodgkin e sarcomas (Young *et al.*, 1981).

A DXR pode gerar uma variedade de espécies de radicais livres. Acredita-se que os mesmos estejam envolvidos no seu mecanismo de citotoxicidade contra uma variedade de tumores sólidos e leucemias. Entretanto, muitos desses tipos de células tumorais não são mortos pelo mecanismo de citotoxicidade desses radicais livres. Um mecanismo eficiente de citotoxicidade, que não seja por radicais livres, também deve existir. Sabe-se que a DXR, em concentrações

muito baixas, interfere com a atividade da topoisomerase II, resultando em quebras no DNA, enquanto que ambas, a atividade da topoisomerase e as quebras no DNA, estão correlacionadas com a citotoxicidade da DXR. A topoisomerase II é uma enzima associada ao DNA que atenua o estresse causado pela torção do DNA, durante a transcrição e replicação (Keizer *et al.*, 1990).

Pelo fato da DXR intercalar-se ao DNA, possui, também, mecanismo de mutagenicidade (Sinha *et al.*, 1984). Possivelmente, como conseqüência, a DXR inibe as sínteses de DNA e RNA (Aubel-Sadron e Londos-Gagliardi, 1984).

O potencial clastogênico da DXR em células de mamíferos, *in vitro*, tem mostrado que as fases G₁/S e S do ciclo celular, apresentam mais sensibilidade a essa droga (Barranco *et al.*, 1973).

A DXR por ter alta afinidade pelo ferro inorgânico, Fe(III), pode formar complexos DXR-Fe(III) em sistemas biológicos. Estudos foram realizados em *Salmonella* TA102 para avaliar os mecanismos oxidativos na mutagenicidade do complexo DXR-Fe(III). Os resultados indicaram que esse complexo exerce mutagenicidade por meio dos radicais livres gerados, os quais causaram danos oxidativos ao DNA, e que o Fe(III) é um elemento requerido na mutagênese da DXR. O complexo DXR-Fe(III) pode reagir com o oxigênio para formar o radical superóxido. Esse radical pode transformar-se em H₂O₂, que difunde mais livremente dentro das células do que o radical superóxido, uma vez próximo ao DNA, produz o radical hidroxil. Na presença de seqüestradores de radicais livres e quelantes de ferro, a mutagenicidade, provocada por esse complexo, foi reduzida (Kostoryz e Yourtee, 2001). Entretanto, o complexo DXR-Fe(III) pode causar danos às membranas das hemácias e ao DNA celular, tanto na ausência quanto na presença de agentes redutores, provavelmente devido à ação do radical hidroxil (Keizer *et al.*, 1990).

A DXR pode causar peroxidação lipídica após ativação metabólica pelos microsossomos do coração, fígado ou do rim (Mimnaugh *et al.*, 1982), do núcleo (Mimnaugh *et al.*, 1985a) ou da mitocôndria (Mimnaugh *et al.*, 1985b).

A degeneração mitocondrial é uma alteração morfológica associada à toxicidade da DXR, que pode ser conseqüência de dano peroxidativo aumentado

por essa droga, nos lipídios insaturados da membrana mitocondrial (Mimnaugh *et al.*, 1985b).

Células musculares cardíacas são extremamente ricas em mitocôndrias, que podem render a essas células vulnerável particularidade para gerar radicais livres (Nohl e Jordan, 1983). O uso clínico da DXR é limitado pela sua cardiotoxicidade, que pode ser devida ao seu metabolismo pelas enzimas NADH dehidrogenases mitocondriais cardíacas (citocromo c e redutase, EC1.6.99.3), que catalizam a redução do ferricitocromo c a ferrocitocromo c pela NADH (Thornalley *et al.*, 1986).

Em camundongos, a DXR induziu cardiotoxicidade aguda e crônica (Lazzarino *et al.*, 1987) e peroxidação lipídica em tecidos cardíacos, embora esse processo não possa ser demonstrado em células tumorais (Myers *et al.*, 1977) ou em tecido do fígado do mesmo animal (Lazzarino *et al.*, 1987). Isso sugere que o tecido cardíaco é especificamente danificado pela produção do radical livre, causando peroxidação lipídica. Provavelmente, esse não é somente o resultado da abundância de mitocôndria e eficiente formação do radical hidroxil, mas, também, da defesa antioxidante relativamente insatisfatória, uma vez que o coração tem baixos níveis de superóxido dismutase e catalase (Doroshov *et al.*, 1980) e uma baixa taxa de glutathione quando comparada com a do tecido do fígado (Griffith e Meister, 1979). Além disso, durante tratamento com DXR a glutathione peroxidase tende a ser esgotada (Doroshov *et al.*, 1980).

Agentes podem proteger as células contra a peroxidação lipídica e cardiotoxicidade, incluindo *N*-acetilcisteína (Doroshov *et al.*, 1981), vitamina E (Myers *et al.*, 1977) e cisteína (Olson *et al.*, 1980).

Diferentes estudos demonstraram os efeitos genotóxicos da DXR em leucócitos humanos (Vig, 1971); em células de ovários de hamster chinês *in vitro* (Yu *et al.*, 1994; Antunes *et al.*, 1999); em células da medula óssea de camundongos *in vitro* (Larramendy *et al.*, 1980); em cultura de linfócitos humanos (Antunes e Takahashi, 1998) e em células de medula óssea de ratos Wistar (Antunes e Takahashi, 1999). A DXR induziu mutações e recombinações somáticas em células de asas de *Drosophila melanogaster* (Frei *et al.*, 1985; Fragiorge, 2000; Valadares, 2002).

Efeitos anticlastogênicos, contra os danos cromossômicos induzidos pela DXR, foram relatados, *in vivo* e *in vitro*, pelos agentes antioxidantes ácido ascórbico e vitamina E (Amara-Mokrane *et al.*, 1996; Antunes e Takahashi, 1998; Tavares *et al.*, 1998; Fragiorge, 2000).

Tem-se tornado evidente que muitos agentes que causam danos ao DNA, também têm atividade recombinogênica, a qual tem sido considerada uma medida indireta de mais danos ao DNA (Hoffmann, 1994). Estudos comprovam que a recombinação pode ser responsável pela perda da heterozigose em células germinativas e somáticas. Perda da heterozigose pode promover a manifestação de doenças recessivas herdáveis ou pode estar envolvida com a progressão de neoplasias. Esse mecanismo tem mostrado ser operacional nos casos de vários oncogenes e genes supressores de tumores (Bishop, 1991; Marshall, 1991; Sengstag, 1994; Happle, 1999).

Em toxicologia genética as ênfases têm-se concentrado na indução de mutações gênicas, aberrações cromossômicas e reparo no DNA, pelo fato dessas mudanças genéticas induzirem doenças hereditárias, bem como iniciarem o desenvolvimento de um câncer. Muito pouco é conhecido sobre o impacto da recombinação mitótica e das conversões, ampliações e não-disjunções gênicas. Os clássicos estudos dos eventos genéticos fundamentam-se no desenvolvimento de tumores, assim como o retinoblastoma, tumor de Wilm's e outros, que provam a importância da perda da heterozigose. Nessas doenças, com uma condição heterozigota pré-existente, outros eventos genéticos, que induzem mutações, podem levar à proliferação de células homozigotas nos descendentes. Após expansão clonal, elas podem desenvolver fenótipo tumoral. A conversão gênica e, em particular, a recombinação mitótica, são mecanismos potentes que levam a perda da heterozigose (Guzmán-Rincón e Graf, 1995).

A recombinação genética é um fenômeno de importância universal para todos os sistemas, desde os vírus até os eucariotos superiores. Os processos de recombinação contribuem para a variabilidade genética e, desta maneira, têm aspectos evolucionários importantes. Em 1936, foi demonstrado que na mosca-de-fruta *Drosophila melanogaster* a recombinação genética ocorre não somente nas células meióticas, como também, nas células somáticas durante a divisão celular mitótica (Stern, 1936).

Os fenômenos de recombinação são importantes para outras funções celulares, assim como reparos no DNA e variação das imunoglobulinas nos mamíferos (Engler e Strob, 1988).

Um teste de curta duração (Somatic Mutation And Recombination Test – SMART) foi desenvolvido para a detecção de diferentes tipos de manchas mutantes (simples ou gêmeas) que podem ser resultantes tanto de mutação, deleção ou recombinação somática, ocorridas no cromossomo 3 da mosca de fruta *Drosophila melanogaster* (Graf *et al.*, 1984).

1.6. TESTE PARA DETECÇÃO DE MUTAÇÕES E RECOMBINAÇÕES SOMÁTICAS (SOMATIC MUTATION AND RECOMBINATION TEST - SMART) EM CÉLULAS DE ASAS DE *Drosophila melanogaster*

A *Drosophila melanogaster* tem sido empregada na detecção de mutações induzidas por agentes químicos, e em testes para identificação de carcinógenos, por mais de 50 anos, (Würgler, 1991; Vogel *et al.*, 1999).

A *Drosophila melanogaster* tem sido considerada um organismo teste ideal para os estudos de genotoxicidade e de antigenotoxicidade de vários compostos e misturas (Graf *et al.*, 1998; Spanó *et al.*, 2001), além de ser um organismo eucarioto; pequeno; com tempo de geração curto (cerca de 10 dias a 25°C); possui caracteres morfológicos controlados geneticamente, fáceis de serem detectados; grande progênie e de fácil manutenção; baixo número de cromossomos e é capaz de ativar enzimaticamente promutágenos e procarcinógenos *in vivo* (Graf *et al.*, 1984; Würgler e Vogel, 1986; Vogel, 1987; Guzmán-Rincón *et al.*, 1990; Graf e Singer, 1992). Essa ativação é realizada pelas enzimas citocromo P-450, que consistem de várias formas de isoenzimas que têm a capacidade de metabolizar uma variedade de substratos (Frölich e Würgler, 1989).

O ensaio *in vivo* com a mosca da fruta *Drosophila melanogaster* pode ser visto como uma ponte de ligação entre sistemas testes de genotoxicidade em microrganismos *in vitro* e mamíferos *in vivo* (Frei e Würgler, 1996).

O teste de mutação e recombinação somática (SMART), tem sido amplamente utilizado em duas versões: uma baseada no marcador da cor de olho (Vogel e Zijlstra, 1987a, b; Vogel e Nivard, 1993) e a outra versão baseada em dois marcadores nas células das asas (Graf *et al.*, 1984; Würgler *et al.*, 1985).

Ambos os casos são baseados no fato de que, durante o desenvolvimento embrionário, grupos de células (discos imaginais) são divididos e proliferam mitoticamente durante o desenvolvimento larval até se diferenciarem durante a metamorfose, no estágio de pupa, em estruturas do corpo do adulto (olhos, asas, etc.). Se ocorrer uma alteração genética em um desses discos de células, a mesma estará presente em todas as células descendentes daquela originalmente mutada, formando um clone de células mutantes. O teste SMART foi desenvolvido para detectar a perda da heterozigose que leva à expressão dos genes marcadores recessivos nas células do disco imaginal das larvas. O gene marcador da cor de olho dá origem a clones de células mutantes manifestando-se como mosaico e os dois marcadores nas células das asas dão origem às manchas (Guzmán-Rincón e Graf, 1995; Frei e Würgler, 1996).

São utilizadas, para a realização do teste da mancha da asa, três linhagens mutantes de *Drosophila melanogaster*.

- 1) Linhagem multiple wing hairs (*mwh*), que possui um gene mutante (*mwh*) localizado próximo à extremidade do braço esquerdo do cromossomo 3 (3-0,3) em condição homozigota, que corresponde a um mutante recessivo que determina que as células das asas apresentem três ou mais pêlos, no lugar de um (**Figura 1**);
- 2) Linhagem flare-3 (*flr³*), que possui um gene mutante marcador recessivo em hemizigose (*flr³*) localizado no braço esquerdo do cromossomo 3 (3-38,8), mas em uma posição mais proximal. Ele afeta os pêlos das células das asas, modificando-os, parecendo uma chama. Os alelos mutantes de *flr* conhecidos são zigóticos recessivos letais (zigotos homozigotos para *flr* não são capazes de se desenvolverem em moscas adultas). Ao contrário, células homozigotas, nos discos imaginais das asas, são viáveis e conduzem às células mutantes nas asas. Devido à letalidade zigótica,

alelos *flr* são mantidos contrabalanceados por um cromossomo homólogo balanceador, que contém inversões múltiplas, e um gene marcador dominante (*TM3, Bd^s Third Multiple 3, Beaded-Serrate*) (Guzmán-Rincón *et al.*, 1994; Guzmán-Rincón e Graf, 1995) (**Figura 1**);

- 3) Linhagem ORR; flare-3 (ORR; *flr³*), construída por Frölich e Würigler (1989), que possui um gene marcador em hemizigose (*flr³*) no cromossomo 3 (3-38,8), que afeta os pêlos das células das asas, modificando-os, parecendo uma chama, e um no cromossomo 2, transferido de uma linhagem selvagem Oregon R (ORR), resistente ao DDT (Dapkus e Merrel, 1997). Esta linhagem "ORR; flare-3" é caracterizada por um aumento na atividade de enzimas citocromo P-450. O gene *flr³* dessa linhagem é letal em homozigose (Hällström e Blanck, 1985; Guzmán-Rincón e Graf, 1995).

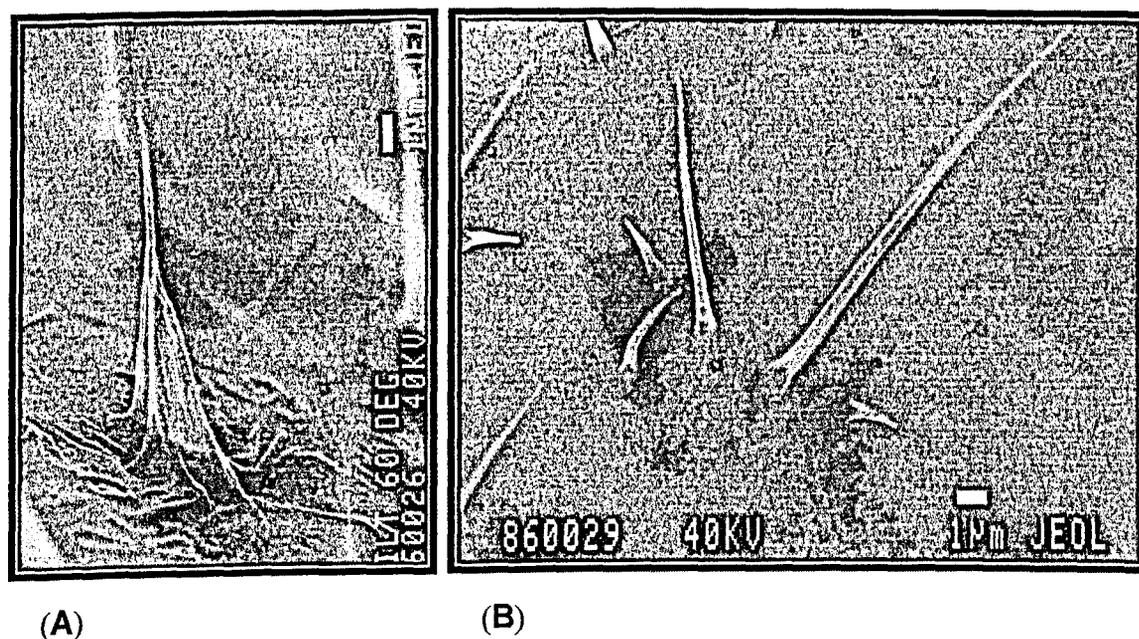


Figura 1. Pêlo "flare" (A); Pêlos múltiplos (B) (Cortesia do Dr. Ulrich Graf, do Institute of Animal Sciences, Swiss Federal Institute of Technology (ETH) Zurich, Schwerzenbach, Switzerland).

Para a detecção de manchas mutantes nas asas de *Drosophila melanogaster*, por meio do teste SMART, são utilizados dois cruzamentos:

- Cruzamento padrão (ST - Standard cross): Fêmeas virgens da linhagem "flare-3" cruzadas com machos "multiple wing hairs" (Graf *et al.*, 1989).
- Cruzamento de alta capacidade de bioativação metabólica (HB – High Bioactivation Cross): Fêmeas virgens da linhagem "ORR-flare-3" cruzadas com machos "multiple wing hairs" (Graf e van Schaik, 1992).

O cruzamento padrão (ST) é utilizado na detecção de agentes genotóxicos diretos, enquanto que o cruzamento de alta capacidade de bioativação (HB), na detecção de agentes genotóxicos indiretos ou promutágenos, que necessitam de ativação metabólica para induzir efeitos genotóxicos.

Desses cruzamentos são obtidos dois tipos de descendentes: trans-heterozigoto marcado (MH) e heterozigoto balanceado (BH) (**Figura 2**).

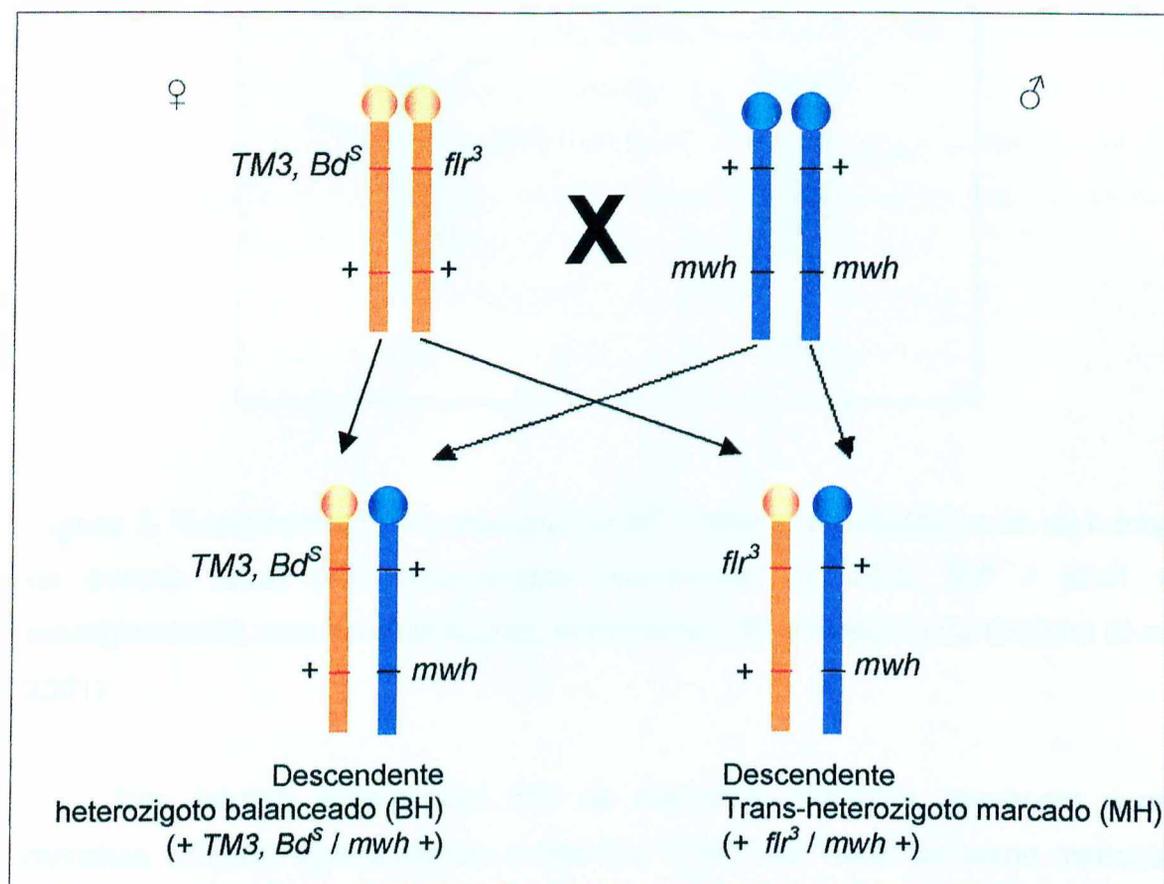


Figura 2. Esquema representativo do cruzamento padrão (ST): Fêmea virgem da linhagem “flare” ($+ TM3, Bd^S / flr^3$) cruzada com macho “*mwh*” ($mwh + / mwh +$), originando descendentes trans-heterozigotos marcados (MH) ($+ flr^3 / mwh +$) e descendentes heterozigotos balanceados (BH) ($+ TM3, Bd^S / mwh +$).

Ambos os cruzamentos ST e HB produzem dois tipos de progênie, as quais podem ser distinguidas fenotipicamente, baseado no marcador Bd^S :

- 1) trans-heterozigoto marcado ($+ flr^3 / mwh +$, fenotipicamente com asas de bordas lisas) (**Figura 3 - A**).
- 2) heterozigoto balanceado ($+ TM3, Bd^S / mwh +$, fenotipicamente com asas de bordas serrilhadas) (**Figura 3 - B**).

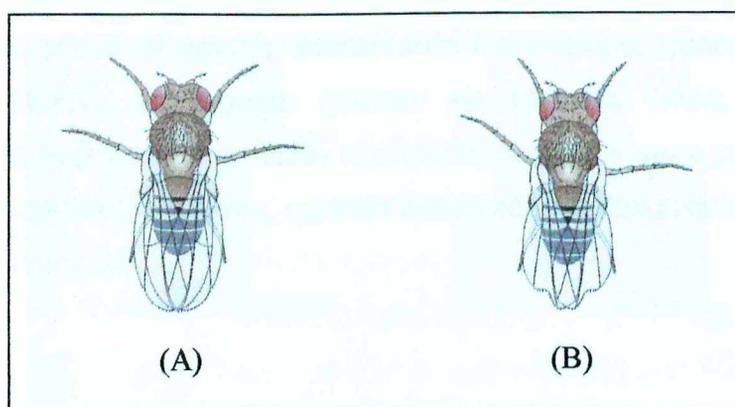


Figura 3. Trans-heterozigoto marcado ($+ flr^3 / mwh +$, fenotipicamente com asas de bordas lisas) (A); heterozigoto balanceado ($+ TM3, Bd^s / mwh +$, fenotipicamente com asas de bordas serrilhadas) (B) (Adaptado de Griffiths *et al.*, 2001).

Nos adultos emergentes MH as manchas mutantes aparecem como manchas simples, apresentando o fenótipo “mwh” ou “flare” ou como manchas gêmeas mostrando áreas adjacentes “mwh” e “flare”. As manchas simples podem ser induzidas por diferentes mecanismos genéticos, tais como mutação, deleção ou não-disjunção mitótica, enquanto que as manchas gêmeas ocorrem exclusivamente por recombinação somática (Graf *et al.*, 1984).

Nos adultos emergentes BH as manchas mutantes aparecem apenas como manchas simples do tipo “mwh”, produzidas por mutação, deleção ou não-disjunção, pois devido à presença de uma série de inversões múltiplas no cromossomo balanceador, as células resultantes de recombinação mitótica são inviáveis, fazendo com que a frequência de manchas seja consideravelmente reduzida (Graf *et al.*, 1984). Dessa forma, nos descendentes BH apenas os eventos mutacionais levam à formação de manchas mutantes.

Tendo em vista que nenhum dado foi encontrado, na literatura especializada, sobre os efeitos da HU, por meio do teste de detecção de mutações e recombinações somáticas em *Drosophila melanogaster*, este trabalho teve como objetivos avaliar: a) o potencial genotóxico da hidroxirúria (HU); b) os efeitos moduladores do agente antioxidante ácido ascórbico (AA), quando

associado à hidroxiuréia, provável geradora de radicais livres; c) os efeitos moduladores do provável agente antioxidante hidroxiuréia, quando associada à doxorubicina (DXR), um agente gerador de radicais livres; d) os efeitos moduladores da hidroxiuréia e ácido ascórbico, devido a seus possíveis efeitos seqüestradores de radicais livres, quando associados à doxorubicina, um agente gerador desses radicais.

2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, R.L.P. and LINDSAY, J.G (1967) Hydroxyurea. Reversal of inhibition and use as a cell-synchronising agent. *J. Biol. Chem.*, 242: 1314-1317.

ADRAGNA, N.C; FONSECA P. and LAUF, P.K (1994) Hydroxyurea affects cell morphology, cation transport, and red blood cell adhesion in cultured vascular endothelial cells. *Blood*, 83 (2): 553-60.

AGIL, A. and SADRZADEH, S.M. (2000) Hydroxyurea protects erythrocytes against oxidative damage. *Redox Rep.*, 5 (1): 29-34.

AGRAWAL, K.C. and SARTORELLI, A.C. (1975) α -(N)-heterocyclic carboxaldehyde thiosemicarbazones. In: *Antineoplastic and Immunosuppressive Agentes*, Pt. II. (SARTORELLI, A.C and JOHNS, D.G eds.) *Handbuch der Experimentellen Pharmakologie*. Springer-Verlag, Berlin, v. 38 p. 793-807.

ALIVERTI, V.; BONANOMI, L. and GIAVINI, E. (1980) Hydroxyurea as a reference standard in teratological screening. *Arch. Toxicol. Suppl.*, 4: 239-242.

ALVES, A.L (1996) Estudo da Mortalidade por Anemia Falciforme. *IESUS*, 4: 45-47.

AMARA-MOKRANE, M.P; LEBUCHER-MICHEL, G.; BALANSARD, G.; DUMÉNIL G. and BOTTA, B. (1996) Protective effects of α -hederin, chlorophyllin and ascorbic acid towards the induction of micronuclei by doxorubicin in cultured human lymphocytes. *Mutagenesis*, 11: 161-167.

AMES, B.N (2001) DNA damage from micronutrient deficiencies is likely to be a major cause of cancer. *Mutat. Res.*, 475: 7-20.

ARCAMONE, F.; CASSINELLI, G. and FRANCESCHI, G. (1972) Structure and physicochemical properties of adriamycin (doxorubicin). In: CARTER, S.K; DIMARCO, A. and GHIONE, M. (eds.) *Int. Symp. Adriamycin*. Springer, New York, p. 9-22.

ANTUNES, L.M.G. (1997) *Efeito protetor das vitaminas C e E sobre os danos cromossômicos induzidos pelo antitumoral doxorubicina em células de mamíferos in vivo e in vitro*. Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo, para a obtenção do grau de Doutor, 97p.

ANTUNES, L.M.G. and TAKAHASHI, C.S (1998) Effects of high doses of vitamins C and E against doxorubicin-induced chromosomal damage in Wistar rat bone marrow cells. *Mutat. Res.*, 419: 137-143.

ANTUNES, L.M.G. and TAKAHASHI, C.S. (1999) Protection and induction of chromosomal damage by vitamin C in human lymphocyte cultures. *Teratog. Carcinog. Mutagen.*, 19: 53-59.

ANTUNES, L.M.G.; ARAUJO, M.C.P; DIAS, F.L. and TAKAHASHI, C.S. (1999) Modulatory effects of curcumin on the chromosomal damage induced by doxorubicin in chinese hamster ovary cells. *Teratog. Carcinog. Mutagen.*, 19: 1-8.

ATWEH, G.F. and LOUKOPOULOS, D. (2001) Pharmacological induction of fetal hemoglobin in sickle cell disease and beta-thalassemia. *Sem. Hematol.*, 38 (4): 367-373.

AUBEL-SADRON, G. and LONDOS-GAGLIARDI, D. (1984) Daunorubicin and doxorubicin, anthracycline antibiotics, a physicochemical and biological review. *Biochimie*, 66: 333-352.

BALIGA, B.S; PACE, B.S.; CHEN, H.H.; SHAH, A.K. and YANG, Y.-M. (2000) Mechanism for fetal hemoglobin induction by hydroxyurea in sickle cell erythroid progenitors. *Am. J. Hematol.*, 65 (3): 227-233.

BARRANCO, S.C.; GERNER, E.W.; BURK, K.H. and HUMPHREY, R.M. (1973) Survival and cell kinetics effects of adriamycin on mammalian cells. *Cancer Res.*, 33: 11-16.

BECLOFF, G.I. (1967) Pharmacological, metabolic and clinical experience with hydroxyurea. *Clin. Trials J.*, 4: 873-883.

BEN-HUR, E. and BEN-OSHAII, R. (1971) DNA repair in ultraviolet light irradiated HeLa cells and its reversible inhibition by hydroxyurea. *Photochem. Photobiol.*, 13: 337-345.

BENZ JUNIOR, H.H. and FORGET, B.G. (1980) Pathogenesis of the thalassemia syndromes. *Pathol. Annu.*, 10: 1-33.

BISHOP, J.M. (1991) Molecular themes in oncogenesis. *Cell*, 64: 235-248.

BLACOW, N.W. (Ed.) (1972) *Martindale. The Extra Pharmacopoeia*. 26th. ed. The Pharmaceutical Press, London p. 1205-1206.

BORENFREUND, E.; KRIM, M. and BENDICH, A. (1964) Chromosomal aberrations induced by hyponitrite and hydroxylamine derivatives. *J. Natl. Cancer Inst.*, 32: 677-679.

BOSMANN, H.B. (1972) Antineoplastic drug activity in the mitotic cycle effects of six agents on macromolecular synthesis in synchronous mammalian leukemic cells. *Biochem. Pharmacol.*, 21: 1977-1988.

CAIRNS, J. (1981) The origin of human cancers. *Nature*, 289: 353-357.

CARR, B.I.; REILLY, J.G.; SMITH, S.S.; WINBERG, C. and RIGGS, A. (1984) The tumorigenicity of 5-azacytidine in the male Fischer rat. *Carcinogenesis*, 5: 1583-1590.

CHAMONE, D.A.F.; GUALANDRO, S.F.M.; ZAGO, M.A.; FERREIRA, M.F.O. and NOGUEIRA, R.B.G. (1996) Grupo de Trabalho para a Elaboração do Programa Nacional de Anemia Falciforme - Ministério da Saúde. Secretaria de Assistência à Saúde. Coordenação de Sangue e Hemoderivados. *Programa de Anemia Falciforme*. (Portaria MS Nº 951, de 10/05/96). Brasília 13 p.

CHARACHE, S.; DOVER, G.J.; MOYER, M.A. and MOORE, J.W. (1987) Hydroxyurea-induced augmentation of fetal hemoglobin production in patients with sickle cell anemia. *Blood*, 69: 109-116.

CHARACHE, S. (1994) Experimental therapy of sickle cell disease: use of hydroxyurea. *Am. J. Pediatr. Hematol. Oncol.*, 16: 62-66.

CHARACHE, S. (1996) *Sickle Cell Anemia: The Effect of Hydroxyurea on Painful Crises*. Bristol-Myers Squibb Company, Princeton, New Jersey-USA, 12 p.

CLEAVER, J.E.; THOMAS, G.H.; TROSKO, J.E. and LETT, J.T. (1972) Excision repair (dimer excision, strand breakage and repair replication) in primary cultures of eukaryotic (bovine) cells. *Exptl. Cell Res.*, 74: 67-80.

COYLE, M.B. and STRAUSS, B. (1970) Cell killing and the accumulation of breaks in the DNA of HEp-2 cells incubated in the presence of hydroxyurea. *Cancer Res.*, 30: 2314-2319.

DAPKUS, J. and MERREL, D.J. (1977) Chromosomal analysis of DDT resistance in a long-term selected population of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 87: 685-697.

DESIMONE, J.; BIEL, M. and HELLER, P. (1982) Maintenance of fetal hemoglobin (HbF) elevations in the baboon by prolonged erythropoietic stress. *Blood*, 60: 519-523.

DONEHOWER, R.C. (1982) Hydroxyurea. In: *Pharmacologic Principles of Cancer Treatment*. (CHABNER BA., ed.). WB Saunders Co., Philadelphia, p. 269-275.

DOROSHOW, J.H.; LOCKER, G.Y. and MYERS, C.E. (1980) Enzymatic defenses of the mouse heart against reactive oxygen metabolites; alterations produced by doxorubicin. *J. Clin. Invest.*, 65: 128-135.

DOROSHOW, J.H.; LOCKER, G.Y.; IFRIM, I. and MYERS, C.E. (1981) Prevention of doxorubicin cardiac toxicity in the mouse by *N*-acetylcysteine. *J. Clin. Invest.*, 68: 1053-1064.

DOVER, G.J.; CHARACHE, S.; BOYER, S.H.; VOGELSANG, G. and MOYER, M. (1985) 5-Azacytidine increases HbF production and reduces anemia in sickle cell disease: dose-response analysis of subcutaneous and oral dosage regimens. *Blood*, 66: 527-532.

DOVER, G.J.; HUMPHRIES, R.K.; MOORE, J.G.; LEY, T.J.; YOUNG, N.S.; CHARACHE, S. and NIENHUIS, A.W. (1986) Hydroxyurea induction of hemoglobin F production in sickle cell disease: relationship between cytotoxicity and F cell production. *Blood*, 67: 735-738.

DRESLER, W.F.C. and STEIN. R. (1869) Ueber den hydroxylharnstoff. *Ann. Chem. Pharm.*, 150: 242-252.

ENGLER, P. and STROB. U. (1988) Immunoglobulin gene rearrangement. In KUCHERLAPATI, R.; SMITH, G.R. (eds) *Genetic Recombination*. American Society for Microbiology, Washington, DC, p. 667-700.

ERROL, L. (1997) Fields. Phenotypic variation in sickle cell disease: An analysis. [www.rics.bwh.harvard.edu / sickle / sickle heterogeneity.html](http://www.rics.bwh.harvard.edu/sickle/sickle_heterogeneity.html). (Acesso em: 20 out. 2002).

FABRE, F. (1978) Induced intragenic recombination in yeast can occur during the G₁ mitotic phase. *Nature*, 272: 795-798.

FESSAS, P. and LOUKOPOULOS, D. (1974) The β -thalassaemias. *Clin. Haematol.*, 3: 411-435.

FESTER, A.; TAHRIRI, P.; VERMYLEN, C.; STURBOIS, G.; CORAZZA, F.; FONDU, P.; DEVALCK, C.; DRESSE, M.F.; FEREMANS, W.; HUNNINCK, K.; TOPPET, M.; PHILIPPET, P.; VAN GEET, C. and SARIBAN, E. (2001) Five years of experience with hydroxyurea in children and adults with sickle cell disease. *Blood*, 97 (11): 3628-3634.

FOYE, W.O. (1995) *Cancer Chemotherapeutic Agents*. Washington: ACS Professional Book, p. 66-68.

FRAGIORGE, E.J. (2000) *Efeitos moduladores do ácido ascórbico quando associado ao cloridrato de doxorubicina em células somáticas de Drosophila melanogaster, tratadas na presença ou ausência de luz*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia-MG. 87p.

FREI, H.; WÜRGLER, F.E.; JUON, H.; HALL, C.B. and GRAF, U. (1985) Aristolochic acid is mutagenic and recombinogenic in *Drosophila* genotoxicity tests. *Arch. Toxicol.*, 56: 158-166.

FREI, H. and WÜRGLER, F.E. (1996) Induction of somatic mutation and recombination by four inhibitors of eukaryotic topoisomerases assayed in the wing spot test of *Drosophila melanogaster*. *Mutagenesis*, 2 (4): 315-325.

FRÖLICH, A. and WÜRGLER, F.E. (1989) New tester strains with improved bioactivation capacity for the *Drosophila* wing-spot test. *Mutat. Res.* 216: 179-187.

FUCHAROEN, S.; SIRITANARATKUL, N.; WINICHAGOON, P.; CHOWTHAWORN, J.; SIRIBOON, W.; MUANGSUP, W.; CHAICHAROEN, S.; POOLSUP, N.; CHINDAVIJAK, B.; POOTRAKUL, P.; PIANKIJAGUM, A.; SCHECHTER, A.N. and RODGERS, G.P. (1996) Hydroxyurea increases

hemoglobin F levels and improves the effectiveness of erythropoiesis in β -thalassemia/hemoglobin E disease. *Blood*, 87: 887-892.

GALANELLO, R.; STAMATOYANNOPOULOS, G. and PAPAYANNOPOULOS, T. (1988) Mechanism of HbF stimulation by S-stage compounds: in vitro studies with bone marrow cells exposed to 5-azacytidine, ara-C, or hydroxyurea. *J. Clin. Invest.*, 81: 1209-1216.

GALLEY, H.F.; DAVIES, M.J. and WEBSTER, N.R. (1996) Ascorbyl radical formation in patients with sepsis: effect of ascorbate loading. *Free Radic. Biol. Med.*, 20: 139-143.

GEBHART, E. (1981) Sister chromatid exchange (SCE) and structural chromosome aberration in mutagenicity testing. *Hum. Genet.*, 58: 235-237.

GILMAN, A.G.; GOODMAN, L.S.; RALL, T.W. and MURAD, F. (1987) As Bases Farmacológicas da Terapêutica. In: *Quimioterapia das Doenças Neoplásicas*. CALABRESI, P. e PARKS, JUNIOR, R.E., Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., p. 845.

GLOVER, R.E.; IVY, E.D.; ORRINGER, E.P.; MAEDA, H. and MASON, R.P. (1999) Detection of nitrosyl hemoglobin in venous blood in the treatment of sickle cell anemia with hydroxyurea. *Mol. Pharmacol.*, 55 (6): 1006-1010.

GOLDBERG, M.G.; BRUGNARA, C. and DOVER, G.J. (1992) Hydroxyurea and erythropoietin therapy in sickle cell anemia. *Semin. Oncol.*, 19 (suppl. 9): 74-81.

GOMEZ, S.; MOLINA, B.; SÁNCHEZ, S. and CARNEVALE, A. (2000) Increased Level of Chromosomal Aberrations Induced by Hydroxyurea Treatment During the G₂ Phase of Fanconi Anemia Cells Groups A to D. *EMS Abstracts. Departamento de Investigación en Genética Humana, Instituto Nacional de Pediatría, México*, p. 24.

GRAF, U.; WÜRGLER, F.E.; KATZ, A.J.; FREI, H.; JUON, H.; HALL, C.B. and KALE, P.G. (1984) Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environ. Mutagen.*, 6:153-188.

GRAF, U. and SINGER, D. (1989) Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster* (wing spot test): Effects of extracts of airborne particulate matter fire-exposed and non fire-exposed building ventilation filters. *Chemosphere*, 19: 1094-1097.

GRAF, U. and SINGER, D. (1992) Genotoxicity testing of promutagens in the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Rev. Int. Contam. Ambient.*, 8: 15-27.

GRAF, U. and VAN SCHAİK, N. (1992) Improved high bioactivation cross for the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.*, 271: 59-67.

GRAF, U.; ABRAHAM, S.K.; GUZMÁN-RINCÓN, J. and WÜRGLER, F.E. (1998) Antigenotoxicity studies in *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.*, 402 (1-2): 203-209.

GRIFFIN, P.R. (1997) Overview of pathophysiology and rationale for treatment of sickle cell anemia. *Sem. Hematol.*, vol. 34, nº 3 (Suppl. 3): 8-14.

GRIFFITH, O.W. and MEISTER, A. (1979) Glutathione: interogan translocation, turnover, and metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 76: 5606-5610.

GRIFFITHS, A.J.F.; GELBART, W.M.; MILLER, J.H. and LEWONTIN, R.C. (2001) *Genética Moderna*. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 589p.

GUZMÁN-RINCÓN, J.; WÜRGLER, F.E. and VOGEL, E.W. (1990) Training course on *Drosophila* somatic genotoxicity assays in Mexico. *Mutat. Res.*, 234: 107-109.

GUZMÁN-RINCÓN, J.; GRAF, U.; VARELA, A.; POLICRONIADES, R. and DELFÍN, A. (1994) Mutación y recombinación somáticas inducidas por neutrones rápidos en la prueba de la mancha del ala de *Drosophila melanogaster*. *Rev. Int. Contam. Ambient*, 10: 29-30.

GUZMÁN-RINCÓN, J. and GRAF, U. (1995) *Drosophila melanogaster* somatic mutation and recombination test as a biomonitor. In: *Biomonitors and Biomarkers as Indicators of Environmental Change*, Edited by F.M. Butterworth *et al.*, Plenum Press, N.Y., pp 169-181.

HÄLLSTRÖM, I. and BLANCK, A. (1985) Genetic regulation of the cytochrome P-450-dependent reactions. *Chem. Biol. Interact.*, 56: 157-171.

HANFT, V.N.; FRUCHTMAN, S.R.; PICKENS, C.V.; ROSSE, W.F.; HOWARD, T.A. and WARE, R.E. (2000) Acquired DNA mutations associated with in vivo hydroxyurea exposure. *Blood*, 95 (11): 3589-3593.

HAPPLE, R. (1999) Loss of heterozygosity in the human skin. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 41: 143-161.

HOFFMANN, G.R. (1994) Induction of genetic recombination: consequences and model systems. *Environ. Mol. Mutagen.*, 24: 59-66.

HORIKAWA, M.; FUKUHARA, M. and SUZUKI, F. (1972) Comparative studies on induction and rejoining of DNA single-strand breaks by radiation and chemical carcinogen in mammalian cells *in vitro*. *Exp. Cell Res.*, 70: 349-359.

IYAMU, E.W.; FASOLD, H. and ROA, D. (2001) Hydroxyurea-induced oxidative damage of normal and sickle cell hemoglobins in vitro: amelioration by radical free scavengers. *J. Clin. Lab. Anal.*, 15 (1): 1-7.

INGRAN, V.M. (1958) Abnormal human haemoglobin. In: The comparison of normal human and sickle-cell haemoglobin by "Fingerprinting". *Biochim. Biophys. Acta*, 28: 539-545.

JONES, P.A.; TADERERA, J.V. and HAWTREY, A.O. (1972) Transformation of hamster cells *in vitro* by 1- β -D-arabinofuranosylcytosine, 5-fluorodeoxyuridine and hydroxyurea. *Eur. J. Cancer*, 8: 595-599.

JONES, R.B.; FRANK, R. and MASS, T. (1983) Safe handling of chemotherapeutic agents: a report from the Mount Sinai Medical Center. *CA-A Cancer J. Clin.*, 33: 258-263.

KANN, H.E.; KOHN, K.W. and LYLES, J.M. (1974) Inhibition of DNA repair by the 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea breakdown product, 2-chloroethyl isocyanate. *Cancer Res.*, 34: 398-402.

KARON, M. and BENEDICT, W. (1970) Locus of action of DNA inhibitors in the cell cycle as assessed by chromatid damage. *Blood*, 36: 825.

KAUNG, D.T. and SWARTZENDRUBER, A.A. (1969) Effect of chemotherapeutic agents in chromosomes of patients with lung cancer. *Dis. Chest.*, 55: 98-100.

KAYA, B.; CREUS, A.; VELÁZQUEZ A.; YANIKOGLU, A. and MARCOS, R. (2002) Genotoxicity is modulated by ascorbic acid studies using the wing spot test in *Drosophila*. *Mutat. Res.*, 520: 93-101.

KEIZER, H.G.; PINEDO, H.M.; SCHUURUIS, G.J. and JOENJE, H. (1990) Doxorubicin (Adriamycin): A critical review of free radical-dependent mechanisms of cytotoxicity. *Pharmacol. Ther.*, 47: 219-231.

KENNEDY, B.J. and YARBRO, J.W. (1966) Metabolic and therapeutic effects of hydroxyurea in chronic myeloid leukemia. *JAMA*, 195: 1038-1043.

KHAYAT, A.S., GUIMARÃES, A.C.; SELIGMANN, I.C.; CARDOSO, P.C.S.; LIMA, P.D.L.; LIMA, E.M.; BAHIA, M.O.; LEMOS, J.A.; ANTUNES, L.M.G. and BURBANO, R.R. (2001) Estudos genotóxicos *in vitro* e *in vivo* em pacientes com

anemia de células falciformes tratados com hidroxiuréia. In: CONGRESSO NACIONAL DE GENÉTICA, 47, Águas de Lindóia. CD-ROM... São Paulo.

KIM-SHAPIRO, D.B.; KING, S.B.; BONIFANT, C.L.; KOLIBASH, C.P. and BALLAS, S.K. (1998) Time resolved absorption study of the reaction of hydroxyurea with sickle cell hemoglobin. *Biochim. Biophys. Acta*, 1380 (1): 64-74.

KOSTORYZ, E.L. and YOURTEE, D.M. (2001) Oxidative mutagenesis of doxorubicin-Fe(III) complex. *Mutat. Res.*, 490: 131-139.

KRAKOFF, I.H.; BROWN, N.C. and REICHARD, P. (1968) Inhibition of ribonucleoside diphosphate reductase by hydroxyurea. *Cancer Res.*, 28: 1559-1561.

LARRAMENDY, M.L.; DULOUT, F.N.; BIANCHI, N.O. and OLIVERO, O.A. (1980) *In vivo* dose-response relationship in bone marrow cells of mice treated with adriamycin. *Mutat. Res.*, 79: 133-140.

LAZZARINO, G.; VIOLA, A.R.; MULIERI, L.; ROTILIO, G. and MAVELLI, I. (1987) Prevention by fructose-1,6-biphosphate of cardiac oxidative damage induced in mice by subchronic doxorubicin treatment. *Cancer Res.*, 47: 6511-6516.

LEAVELL, U.W. and YARBRO, J.W. (1970) Hydroxyurea: a new treatment for psoriasis. *Arch. Dermatol.*, 102: 144-150.

LEE, S.H.; OE, T. and BLAIR, I.A. (2001) Vitamin C-induced decomposition of lipid hydroperoxides to endogenous genotoxins. *Science*, 292: 2083-2086.

LEHMANN, H. and HUNSTMAN, R.G. (1974) *Man's haemoglobins*. Amsterdam, North Holland Publ., 478 p.

LEY, T.J.; DESIMONE, J.; NOGUCHI, C.T.; TURNER, P.H.; SCHTER, A.N.; HELLER, P. and NIENHUIS, A.W. (1983) 5-Azacytidine increases γ -globin

synthesis and reduces the proportion of dense cells in patients with sickle cell anemia. *Blood*, 62: 370-380.

LI, J.C. and KAMINSKAS, E. (1987) Progressive formation of DNA lesions in cultured Ehrlich ascites tumor cells treated with hydroxyurea. *Cancer Res.*, 47: 2755.

LIEBERMAN, M.W.; SELL, S. and FARBER, E. (1971) Deoxyribonucleoside incorporation and the role of hydroxyurea in a model lymphocyte system for studying DNA repair in carcinogenesis. *Cancer Res.*, 31: 1307-1312.

LORI, F. (1999) Hydroxyurea and HIV: 5 years later from antiviral to immunomodulating effects. *AIDS*, 13: 1433-42.

LOUKOPOULOS, D. (1997) New therapies for the haemoglobinopathies. *J. Intern. Med.*: 242 (Supplement 740): 43-48.

MALPAS, J.S. (1967) Assessment of hydroxyurea in leukaemia. *Clin. Trials J.*, 4: 887-893.

MARSHALL, C.J. (1991) Tumor suppressor genes. *Cell*. 64: 313-326.

MARUYAMA, Y.; LEE, T.C. and SULLIVAN, S. (1973) Age cohort variation of tumor cells. *Radiologe*, 109: 213-216.

MARTIN, F.L.; COLE, K.J.; ORME, M.H.; GROVER, P.L.; PHILLIPS, D.H. and VENIT, S. (1999) The DNA repair inhibitors hydroxyurea and cytosine arabinoside enhance the sensitivity of the alkaline single-cell gel electrophoresis ('comet') assay in metabolically-competent MCL-5 cells. *Mutat. Res.*, 445: 21-43.

MAYER, V.W.; GOIN, C.J. and ZIMMERMANN, F.K. (1986) Aneuploidy and other genetic effects induced by hydroxyurea in *S. cerevisiae*. *Mutat. Res.*, 160: 19-26.

MILLER, S.T.; SLEEPER, L.A.; PEGELOW, C.H.; ENOS, L.E.; WANG, W.C.; WEINER, S.J.; WETHERS, D.L.; SMITH, J. and KINNEY, T.R. (2000) Prediction of adverse outcomes in children with sickle cell disease. *N. Engl. J. Med.*, 342 (2): 83-89.

MIMNAUGH, E.G.; TRUSH, M.A.; GINSBURG, E. and GRAM, T.E. (1982) Differential effects of anthracycline drugs on rat heart and liver microsomal reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-dependent lipid peroxidation. *Cancer Res.*, 42: 3574-3582.

MIMNAUGH, E.G.; KENNEDY, K.A.; TRUSH, M.A. and SINHA, B.K. (1985a) Adriamycin-enhanced membrane lipid peroxidation in isolated rat nuclei. *Cancer Res.*, 45: 3296-3304.

MIMNAUGH, E.G.; TRUSH, M.A.; BHATNAGAR, M. and GRAM, T.E. (1985b) Enhancement of reactive oxygen-dependent mitochondrial membrane lipid peroxidation by the anticancer drug adriamycin. *Biochem. Pharmacol.*, 34: 847-856.

MOORE, E.C. and HURLBERT, R.B. (1985) The inhibition of ribonucleoside diphosphate reductase by hydroxyurea, guanazole and pyrazoloimidazole (IPMY). *Pharmacol. Ther.*, 27: 167.

MURPHY, M.L. and CHAUBE, S. (1964) Preliminary survey of hydroxyurea (NSC-32065) as a teratogen. *Cancer Chemother. Rep.*, 40: 1-3.

MYERS, C.E.; LISS, R.H.; IFRIM, I.; GROTZINGER, K. and YOUNG, R.C. (1977) Adriamycin: the role lipid peroxidation in cardiac toxicity and tumor response. *Science*, 197: 165-167.

NAOUM, P.C. (1982) *Hemoglobinopatias no Estado de São Paulo – Métodos de estudo, prevalência, distribuição geográfica e relações históricas e antropológicas.*

Tese de Livre-Docência. Universidade Júlio de Mesquita Filho, São José do Rio Preto-SP. 279p.

NAOUM, P.C. and DOMINGOS, C.R.B. (1997) Hemoglobinopatias e Talassemias. In: *Hemoglobina S (Hb S) e as Síndromes Falcêmicas*. São Paulo: SARVIER, p. 36-47.

NOHL, H. and JORDAN, W. (1983) OH-generation by adriamycin semiquinone and H_2O_2 : an explanation for the cardiotoxicity of anthracycline antibiotics. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 114: 197-205.

NORDENSKJÖLD, B.A. and KRAKOFF, I.H. (1968) Effects of hydroxyurea on Polyoma virus replication. *Cancer Res.*, 28: 1686-1691.

NOROOZI, M.; ANGERSON, W.J. and LEAN, M.E. (1998) Effect of flavonoids and Vitamin C on oxidative DNA damage to human lymphocytes. *Am. J. Clin. Nutr.*, 67: 1210-1218.

ODIN, A.P. (1997) Vitamins as antimutagens: advantages and some possible mechanisms of antimutagenesis action. *Mutat. Res.*, 386: 39-67.

OLSON, R.D.; MACDONALD, J.S.; VAN BOXTEL, C.J.; BOERTH, R.G.; HARBISON, R.D.; SHONIM, A.E.; FREEMAN, R.W. and OATES, J.A. (1980) Regulatory role of glutathione and soluble sulfhydryl groups in the toxicity of adriamycin. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 215: 450-454.

OPPENHEIMER, J.J. and FISHBEIN, W.N. (1965) Induction of chromosome breaks in cultured normal human leukocytes by potassium arsenit, hydroxyurea and related compounds. *Cancer Res.*, 25: 980-985.

PAPAYANNOPOULOU, T.; TORREALBA, D.E.; RON, A. and VEITH, R. (1984) Arabinosylcytosine induces fetal hemoglobin in baboons by perturbing erythroid cell differentiation kinetics. *Science*, 224: 617-619.

PARRILLO, J.E., FAUCI, A.S. and WOLFF, S.M. (1978) Therapy of the hypereosinophilic syndrome. *Ann. Intern. Med.*, v. 89, p. 167-172.

PFEIFFER, S.E. and TOLMACH, L.J. (1967) Inhibition of DNA synthesis in HeLa cells by hydroxyurea. *Cancer Res.*, 27: 124-129.

PHILIPS, F.S.; STERNBERG, S.S.; SCHWARTZ, H.S. (1967) Hydroxyurea. I. Acute cell death in proliferating tissues in rats. *Cancer Res.*, 27: 61-74.

PLATT, O.S.; ORKIN, S.H. and DOVER, G. (1984) Hydroxyurea enhances fetal hemoglobin production in sickle cell disease. *J. Clin. Invest.*, 74: 652-656.

PLATT, O.S.; THORINGTON, B.D.; BRAMBILLA, D.J.; MILNER, P.F.; ROSSE W.F.; VICHINSKY, E. and KINNEY, T.R. (1991) Pain in sickle cell disease: rates and risk factors. *N. Engl. J. Med.*, 325: 11-16.

PLUNKETT, W.; CHUBB, S.; ALEXANDER, L. and MONTGOMERY, J.A. (1980) Comparison of the toxicity and metabolism of 9- β -D-arabinofuranosyl-2-fluoroadenine and 9- β -D-arabinofuranosyladenine in human lymphoblastoid cells. *Cancer Res.*, 40: 2349-2355.

PREMPREE, J. and MERRZ, T. (1969) Does hydroxyurea inhibit chromosome repair in cultured human lymphocytes? *Nature*, 224: 603-604.

ROSENTHAL, F.; WISLICKI, L. and KOLLEK, L. (1928) Über die Beziehungen von schwersten Blutgiften zu Abbauprodukten des Eiweisses. *Klin. Wochenschr.*, v. 7, p. 972-974 (*apud* TIMSON, J. (1975) Hydroxyurea. *Mutat. Res.*, 32: 115-132).

SCHILLER, P.G. (1980) Hemoglobinas: Morfologia, síntese, tipos e propriedades. In: VAZ, F.A.C. *Hematologia Neonatal*. São Paulo: Sarvier, p. 25-30.

SCOTT, W.J.; RITTER, E.J.; WILSON, J.G. (1971) DNA synthesis and cell death associated with hydroxyurea teratogenesis in rat embryos. *Dev. Biol.*, 26: 306-315.

- SEMINARI, E.; LISZIEWICZ, J.; TINELLI, C.; FOLI, A.; LORI, F. and MASERATI, R. (1999) Hydroxyurea toxicity combined with didanosine (ddl) in HIV-1 seropositive asymptomatic individuals. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther. Toxicol.*, 37 (10): 514-518.
- SENGSTAG, C. (1994) The role of mitotic recombination in carcinogenesis. *Crit. Rev. Toxicol.*, 24: 323-353.
- SINCLAIR, W.K. (1967) Hydroxyurea. Effects on Chinese hamster cells grown in culture. *Cancer Res.*, 27: 297-308.
- SINHA, B.K.; TRUSH, M.A.; KENNEDY, K.A. and MIMNAUGH, E.G. (1984) Enzymatic activation and binding of adriamycin to nuclear DNA. *Cancer Res.*, 44: 2892-2896.
- SINHA, N.K. and SNUSTAD, D.P. (1972) Mechanism of inhibition of deoxyribonucleic acid synthesis in *Escherichia coli* by hydroxyurea. *J. Bacteriol.*, 112: 1321-1334.
- SKOOG, L. and NORDENSKJÖLD, B. (1971) Effects of hydroxyurea and 1- β -D-arabinofuranosylcytosine on deoxyribonucleotide pools in mouse embryo cells. *Eur. J. Biochem.*, 19: 81-89.
- SMITH, H.C.; BOUTWELL, R.K.; and POTTER VAN, R. (1968) Effects of hydroxyurea on DNA and RNA synthesis in mouse skin, liver, and thymus and on skin tumorigenesis initiated by β -propiolactone. *Cancer Res.*, 28: 2217-2227.
- SNYDER, R.D. (1984) The role of deoxynucleoside triphosphate pools in the inhibition of DNA-excision repair and replication in human cells by hydroxyurea. *Mutat. Res.*, 131: 163-166.

- SPANÓ, M.A.; FREI, H.; WÜRGLER, F.E. and GRAF, U. (2001) Recombinagenic activity of four compounds in the standard and high bioactivation crosses of *Drosophila melanogaster* in the wing spot test. *Mutagenesis*, 16: 385-394.
- STALEVA, L.; WALTSCHIEVA, L.; GOLOVINSKY, E. and VENKOV, P. (1996) Enhanced cell permeability increases the sensitivity of a yeast test for mutagens. *Mutat. Res.*, 370: 81-89.
- STEINBERG, M.H.; LU, Z.H.; BARTON, F.B.; TERRIN, M.L.; CHARACHE, S.; DOVER, G.J. and MULTICENTER STUDY OF HYDROXYUREA (1997) Fetal hemoglobin in sickle cell anemia: determinants of response to hydroxyurea: Multicenter study of hydroxyurea. *Blood*, 89:1078-1088.
- STERKERS, Y.; PREUDHOMME, C.; LAÏ, J.-L.; DEMORY, J.-L.; CAULIER, M.-T.; WATTEL, E.; BORDESSOULE, D.; BAUTERS, F. and FENAUX, P. (1998) Acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes following essential thrombocythemia treated with hydroxyurea: high proportion of cases with 17p deletion. *Blood*, 91 (2): 616-622.
- STERN, C. (1936) Somatic crossing-over and segregation in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 21 625-730.
- STOCK, C.C.; CLARKE, D.A. and PHILIPS, F.S. (1960) Sarcoma 180 screening data. *Cancer Res.*, 20: 193-382.
- TAVARES, D.C.; CECCHI, A.O.; ANTUNES, L.M.G. and TAKAHASHI, C.S. (1998) Protective effects of the amino acid glutamine and of ascorbic acid against chromosomal damage induced by doxorubicin in mammalian cells. *Teratog. Carcinog. Mutagen.*, 18: 153-161.
- TIMSON, J. (1969) Hydroxyurea. Comparison of cytotoxic and antimetabolic activities against human lymphocytes *in vitro*. *Br. J. Cancer*, 23: 337-339.

- TIMSON, J. (1975) Hydroxyurea. *Mutat. Res.*, 32: 115-132.
- TOPPING, N.E.; KIERSKI, J. and COOPER, E.H. (1968) Inhibitory action of hydroxyurea on nucleic acid synthesis in cultures of human lymphocytes stimulated by pokeweed mitogen. *Biochem. Pharmacol.*, 17: 227-234.
- THORNALLEY, P.J.; BANNISTER, W.H. and BANNISTER, J.V. (1986). Reduction of oxygen by NADH/NADH dehydrogenase in the presence of adriamycin. *Free Radic. Res. Commun*, 2 (3): 163-171.
- TRUHAUT, R.; DEYSSON, G. and BRADEL, Y. (1967) Caractéristiques, sur le test *Allium*, des propriétés antimitotique de l'hydroxyuréebnet de l'hydroxylamine. *C. R. Acad. Sci. Paris Ser. D.*, 265: 1756-1759.
- VALADARES, B.L.B. (2002) *Ação anti-recombinogênica da própolis contra efeitos genotóxicos da doxorubicina em Drosophila melanogaster*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia-MG. pp. 01-83.
- VEITH, R.; GALANELLO, R.; PAPAYANNOPOULOU, T. and STAMATOYANNOPOULOS, G. (1985) Stimulation of F-cell production in patients with sickle-cell anemia treated with cytarabine or hydroxyurea. *N. Engl. J. Med.*, 313: 1571-1575.
- VESCO, C. and PENMAN, S. (1969) Purified cytoplasmic DNA from HeLa cells. Resistance to inhibition by hydroxyurea. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 35: 249-257.
- VIG, B.K. (1971) Chromosome aberrations induced in human leukocytes by the antileukemic antibiotic adriamycin. *Cancer Res.*, 31: 28-32.
- VOGEL, E.W. (1987) Evaluation of potential mammalian genotoxins using *Drosophila*: the need for a change in test strategy. *Mutagenesis*, 3:161-171.

VOGEL, E.W. and ZIJLSTRA, J.A. (1987a) Mechanistic and methodological aspects of chemically-induced somatic mutation and recombination in *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.*, 182: 243-264.

VOGEL, E.W. and ZIJLSTRA, J.A. (1987b) Somatic cell mutagenicity in *Drosophila melanogaster* in comparison with genetic damage in early germ-cell stages. *Mutat. Res.*, 180: 189-200.

VOGEL, E.W. and NIVARD, M.M.J. (1993) Performance of 181 chemicals in recombination. *Mutagenesis*, 8: 57-81.

VOGEL, E.W.; GRAF, U.; FREI, H.J. and NIVARD, M.M.J. (1999) *The results of assays in Drosophila as indicators of exposure to carcinogens*. In: *The use short and medium-term tests for carcinogens and data on genetic effects in carcinogenic Hazard Evaluation*. (McGREGOR, D.B.; RICE, J.M. and VENIT, S. eds.) IARC Scientific Publications N° 146. International Agency for Research on Cancer, Lyon.

VOSKARIDOU, V.; KALOTYCHOU, V. and LOUKOPOULOS, D. (1995) Clinical and Laboratory effects of long term administration of hydroxyurea to patients with sickle cell/ β -thalassemia. *Br. J. Haematol.*, 89: 479-484.

WARING, A.J.; DRACKE, I.M.; SCORAH, C.J.; WHITE, K.L.; LYNCH, D.A.; AXON, A.D. and DIXON, M.F. (1996) Ascorbic acid and total Vitamin C concentrations in plasma, gastric juice and gastro-intestinal mucosa: effects of gastritis and oral supplementation. *Gut*, 38: 171-176.

WATSON, J.; STAHPMAN, A.W. and BILELLO, F.P. (1948) The significance of the paucity of sickle cells in newborn negro infants. *Am. J. Med. Sci.*, 215: 419-423.

WEATHERALL, D.J. and CLEGG, J.B. (1981) *The Thalassaemia Syndromes*. 3rd eds. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 875 p.

- WEIL, M. and TANZER, J. (1967) The effect of hydroxyurea on chronic myeloid leukaemia. *Clin. Trials J.*, 4: 895-899.
- WIGER, R.; HONGSLO, J.K.; EVENSON, D.P.; DE ANGELIS, P.; SCHWARZE, P.E. and HOLME, J.A. (1995) Effects of acetaminophen and hydroxyurea on spermatogenesis and sperm chromatin structure in laboratory mice. *Reprod. Toxicol.*, 9: 21-33.
- WOLFF, S. (1972) The repair of X-ray induced chromosome aberrations in stimulated and unstimulated human lymphocytes. *Mutat. Res.*, 15: 435-444.
- WOOD, W.G. (1976) Haemoglobin synthesis during human fetal development. *Br. Med. Bull.*, 32: 282-287.
- WOOD, W.G.; OLD, J.M.; ROBERTS, A.V.; CLEGG, J.B. and WEATHERALL, D.J. (1978) Human globin gene expression: control of beta, gamma and delta-beta chain production. *Cell*, 15: 437-446.
- WÜRGLER, F.E.; GRAF, U. and FREI, H. (1985) Somatic mutation and recombination test in wings of *Drosophila melanogaster*. In: ASHBY, J.; DE SERRES, F.J.; DRAPER, M. and ISHIDATE, M. (eds) *Progress in Mutation Research*, vol. 5, *Collaborative Study of Short-term Tests for Carcinogens*. Elsevier/North-Holland, Amsterdam, The Netherlands, p. 325-340.
- WÜRGLER, F.E. and VOGEL, E.W. (1986) *In vivo* mutagenicity testing using somatic cells *Drosophila melanogaster*. In: DE SERRES, F.J (Ed.) *Chemical Mutagens: Principles and Methods for their Detection*. Plenum Press, New York, p. 1-72.
- WÜRGLER, F.E. (1991) Effects of chemical and physical agents on recombination events in cells of the germ line of male and female *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.*, 250 (1-2): 275-290.

- WYROBEK, A.J. and BRUCE, W.R. (1975) Chemical induction of sperm abnormalities in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 72: 4425-4429.
- XU, J. and ZIMMER, D.B. (1998) Differential regulation of A gamma and G gamma fetal hemoglobin mRNA levels by hydroxyurea and butyrate. *Exp. Hematol.*, 26 (3): 265-272.
- YARBRO, J.W. (1992) Mechanism of action of hydroxyurea. *Sem. Oncol.*, 19 (suppl. 9): 1-10.
- YOUNG, R.C.; OZOLS, R.F. and MYERS, C.E. (1981) The anthracycline antineoplastic drugs. *N. Engl. J. Med.*, 305: 139-153.
- YU, C.R. and SINCLAIR, W.K. (1968) Cytological effects on Chinese hamster cell of synchronising concentrations of hydroxyurea. *J. Cell Physiol.*, 72: 39-42.
- YU, Y.; XU, Z. and HSIE, A.W. (1994) Adriamycin induces large deletions a major type of mutation in CHO cells. *Mutat. Res.*, 325: 91-98.
- ZIEGLER-SKYLAKAKIS, K.; SCHWARZ, L.R. and ANDRAE, U. (1985) Microsome-and hepatocyte-mediated mutagenicity of hydroxyurea and related aliphatic hydroxamic acids in V79 Chinese hamster cells. *Mutat. Res.*, 152: 225.

CAPÍTULO ÚNICO

AVALIAÇÃO GENOTÓXICA DA HIDROXIURÉIA EM CÉLULAS SOMÁTICAS DE *Drosophila melanogaster*

RESUMO

A Hidroxiuréia (HU) é um agente antineoplásico, com atuação específica na fase S do ciclo celular, que age como inibidor da ribonucleosídeo difosfato redutase (NDPR), enzima que converte ribonucleotídeos em desoxirribonucleotídeos (dNTPs), os quais são responsáveis pela síntese e reparo do DNA. Experimentalmente tem sido demonstrado que a HU tem efeitos citotóxico, clastogênico, teratogênico e mutagênico. Estudos preliminares têm sugerido que a HU possui efeitos oxidantes, enquanto outros sugerem que a mesma possui efeitos antioxidantes. Devido a estas observações conflitantes, neste trabalho foram empregadas associações da HU com o ácido ascórbico (AA), um agente antioxidante capaz de seqüestrar radicais livres, e com a doxorrubicina (DXR), um antibiótico utilizado como antineoplásico que, além de intercalar-se à molécula do DNA, atua como gerador de radicais livres. Este trabalho teve como objetivos avaliar o potencial genotóxico da HU (1,5; 3,0 e 6,0 mM); os efeitos moduladores do AA (50 mM), combinado com a HU; os efeitos moduladores da HU, combinada com a DXR (0,2 mM); e os efeitos moduladores da HU e do AA, combinado com a DXR, por meio do teste para detecção de mutações e recombinações somáticas (Somatic Mutation And Recombination Test - SMART), em células de asas de *Drosophila melanogaster*. Dois cruzamentos foram utilizados para a detecção de manchas mutantes: [1] Cruzamento padrão (ST), fêmeas *flr3 / In(3LR) TM3, ri* *p^{sep} I(3)89Aa bx^{34e} e Bd^S* cruzadas com machos *mwh*; e [2] Cruzamento de alta capacidade de bioativação metabólica (HB), fêmeas *ORR; flr3 / In(3LR) TM3, ri* *p^{sep} I(3)89Aa bx^{34e} e Bd^S* cruzadas com machos *mwh*. Este último cruzamento é caracterizado por uma alta sensibilidade a promutágenos e a procarcinógenos. Desses cruzamentos são obtidos dois tipos de descendentes: 1) Trans-heterozigoto marcado (MH), que permite detectar a ocorrência de mutações, deleções e recombinações mitóticas; 2) Heterozigoto balanceado (BH), que permite detectar a ocorrência apenas de mutações e deleções, uma vez que todos eventos recombinacionais são eliminados, devido à presença de múltiplas inversões localizadas no cromossomo balanceador *TM3, Bd^S*. Larvas de terceiro estágio, emergentes de ambos cruzamentos, foram submetidas a tratamentos

com HU, enquanto que larvas de terceiro estágio, emergentes do cruzamento ST, foram submetidas a co-tratamentos entre HU+AA; HU+DXR e HU+AA+DXR. Asas dos adultos emergentes MH foram analisadas quanto à ocorrência de diferentes tipos de manchas mutantes. Água destilada estéril e AA foram empregados como controles negativos, enquanto que a DXR foi utilizada como controle positivo. Os resultados obtidos demonstraram que a HU é um agente genotóxico direto. Os resultados observados nos descendentes do cruzamento ST submetidos a co-tratamentos entre HU+DXR, sugeriram que a HU não é um agente seqüestrador de radicais livres induzidos pela DXR; e que os aumentos verificados nas freqüências de manchas mutantes dos co-tratados, correspondem às somatórias das freqüências de manchas mutantes observadas no tratamento com DXR, isoladamente, com as observadas nos tratamentos com as diferentes concentrações de HU (efeito aditivo). Nos co-tratamentos entre HU com AA, foi verificado que, todos os aumentos ou diminuições nas freqüências de manchas mutantes, foram não significativos ou não conclusivos, sugerindo que a HU não teve ação geradora de radicais livres, ou que o AA foi incapaz de atuar como seqüestrador de possíveis radicais induzidos pela HU. Nos co-tratamentos entre HU + AA + DXR, os resultados estão de acordo com os observados no co-tratamento de HU + DXR, onde foi verificado que a HU não age como seqüestradora de radicais livres, mas possui efeitos genotóxicos aditivos aos efeitos da DXR. Esses resultados também confirmaram aqueles observados no co-tratamento de HU + AA, nos quais foram verificados que o AA não foi genotóxico, mas foi inativo como seqüestrador de possíveis radicais livres induzidos pela HU. Em conclusão, os resultados destes experimentos sugerem que a HU, nas condições experimentais empregadas, é um agente genotóxico direto, provavelmente por indução de lesões complexas (aberrações cromossômicas), as quais, possivelmente, não são induzidas pela geração de radicais livres. A HU não tem ação seqüestradora desses radicais, quando associada a DXR; e o AA foi inativo quanto à inibição da genotoxicidade da HU. No entanto, outros experimentos devem ser realizados para confirmar estes resultados e para determinar as condições em que a mesma pode ser utilizada, sem riscos para a saúde humana.

ABSTRACT

Hydroxyurea (HU) is an anti-neoplastic agent, S-phase-specific, which acts as a ribonucleoside diphosphate reductase inhibitor, the enzyme that converts ribonucleotides into deoxyribonucleotides. HU has been experimentally shown to have cytotoxic, clastogenic, teratogenic and mutagenic effects. Some studies have suggested that HU has oxidative effects while others suggested that it has antioxidative effects. Due to these contradictory results, we tested combinations of HU with ascorbic acid (AA), an antioxidant that acts as a free radical scavenger, and with Doxorubicin (DXR), an antibiotic widely used as anti-neoplastic agent, which in addition to its intercalation into DNA is a generator of free radicals. The aim of this study was to evaluate the genotoxic potential of HU (1.5; 3.0 and 6.0 mM); the modulatory effects of AA (50 mM) combined with HU; the modulatory effects of HU combined with DXR (0.2 mM); and the modulatory effects of both HU and AA combined with DXR. The wing spot test of *Drosophila melanogaster* (Somatic Mutation And Recombination Test - SMART) was used. Two crosses were carried out to detect mutant wing clones: [1] Standard cross (ST), where $flr^3 / In(3LR) TM3, ri p^{sep} I(3)89Aa bx^{34e} e Bd^S$ females were mated with *mwh* males; [2] High Bioactivation cross (HB) where $ORR; flr^3 / In(3LR) TM3, ri p^{sep} I(3)89Aa bx^{34e} e Bd^S$ females were mated with *mwh* males. The latter cross is characterized by a high sensitivity to promutagens and procarcinogens. From both crosses emerge two types of progeny: [1] marker-heterozygous flies (MH) which allow to detect the occurrence of mutation, deletion and mitotic recombination; [2] balancer-heterozygous flies (BH) which allow to detect deletion and mutational events only, because all recombination events are eliminated owing to multiple inversions present on the *TM3* balancer chromosome. Third-instar larvae from these two crosses were treated with HU alone, while third-instar larvae from the standard cross were co-treated with HU+AA, HU+DXR, and HU+AA+DXR. Distilled water and AA were used as negative controls, while DXR was used as positive control. The wings of the surviving marker-heterozygous adults were analyzed for the occurrence of different types of mutant spots. The positive results obtained in the ST cross and the negative results in the HB cross demonstrate that

HU is a direct genotoxic agent. The results obtained after co-treatments with HU+DXR suggest that HU did not act as a scavenger of free radicals induced by DXR. The enhanced frequencies of mutant spots in the co-treated series correspond to the sum of the frequencies observed with DXR alone plus that observed with different HU concentrations (additive effect). In the combined treatments with HU+AA, no increase or reduction in the frequencies of mutant spots was observed, suggesting that HU was not responsible for free radical generation, or that AA failed to scavenge possible free radicals generated by HU. In the co-treatments with HU+AA+DXR, the results were in line with those observed in the co-treatments with HU+DXR: HU did not act as a free radical scavenger, but had genotoxic effects which were additive to those of DXR. These results also confirm the effects observed in the co-treatments of HU+AA, where AA was not genotoxic, but was inactive as a scavenger of free radicals possibly induced by HU. In conclusion, the results of our experiments suggest that HU, under our experimental conditions, is a direct genotoxic agent, possibly through the induction of complex lesions (chromosomal aberrations), which were probably not induced by the generation of free radicals. HU was not a free radical scavenger when combined with DXR; and AA failed to inhibit the genotoxicity of HU. Nevertheless, further experiments must be carried out to confirm these results and to determine the conditions where HU can be employed without risk for human health.

SUMÁRIO

CAPÍTULO ÚNICO

RESUMO.....	48
ABSTRACT.....	50
1. INTRODUÇÃO.....	53
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	57
2.1. Agentes Químicos.....	57
2.2. Procedimentos para coleta dos ovos.....	58
2.3. Tratamentos.....	58
2.3.1. Cruzamento Padrão (ST).....	58
2.3.2. Cruzamento de Alta Bioativação Metabólica.....	59
2.4. Montagem das asas.....	60
2.5. Análise de lâminas.....	60
2.6. Análise Estatística.....	61
3. RESULTADOS.....	62
3.1. Avaliação genotóxica da hidroxiuréia (HU) – Cruzamento padrão (ST).....	62
3.2. Avaliação genotóxica da hidroxiuréia (HU) – Cruzamento de alta capacidade de bioativação metabólica (HB).....	64
3.3. Avaliação dos efeitos moduladores da hidroxiuréia, quando associada à doxorubicina – Cruzamento padrão.....	67
3.4. Avaliação dos efeitos moduladores do ácido ascórbico, quando associado à hidroxiuréia – Cruzamento padrão.....	71
3.5. Avaliação dos efeitos moduladores da hidroxiuréia e do ácido ascórbico, quando associados à doxorubicina – Cruzamento padrão.....	74
4. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO.....	80
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	87

1. INTRODUÇÃO

A Hidroxiuréia (HU) é um quimioterápico utilizado no tratamento de distúrbios mieloproliferativos (Malpas, 1967), síndrome hipereosinofílica (Parrillo *et al.*, 1978), melanoma maligno metastático, tumores sólidos (Becloff, 1967), infecções pelo HIV (Seminari *et al.*, 1999), hemoglobinopatias, dentre as quais destacam-se a anemia falciforme (Charache, 1996) e a talassemia beta (Voskaridou *et al.*, 1995).

O principal efeito tóxico da HU em humanos é a supressão hematopoiética, envolvendo leucopenia, anemia megaloblástica e, raramente, trombocitopenia. A recuperação da medula óssea em geral é rápida se a HU for suspensa por alguns dias (Gilman *et al.*, 1987).

A HU inibe a ribonucleosídeo difosfato redutase (NDPR), enzima que converte ribonucleotídeos em desoxirribonucleotídeos (dNTPs) para a síntese e reparo do DNA (Moore e Hurlbert, 1985), age especificamente na fase S do ciclo celular, inibindo a síntese de DNA; podendo também inibir a síntese de RNA e de proteínas (Timson, 1975).

Vários agentes farmacológicos têm sido correntemente avaliados para a indução de hemoglobina fetal (HbF) em pacientes com Anemia Falciforme e Talassemia Beta. A HU foi a primeira dessas drogas a ser aprovada pelo FDA (Food and Drug Administration) para o tratamento dessas alterações genéticas (Atweh e Loukopoulos, 2001).

A reativação dos genes da globina fetal, gama glicina (γ^G), e gama alanina (γ^A), é o método mais conveniente para tentar corrigir os desarranjos patofisiológicos das hemoglobinopatias, devido à presença de cadeias gama. Nas células dos portadores das síndromes falcêmicas, as cadeias gama inibem a polimerização da hemoglobina S (HbS) dificultando ou prolongando o processo de falcização das hemácias (Loukopoulos, 1997). Nas células dos pacientes adultos, portadores de Talassemia Beta, as cadeias gama pareiam-se com as cadeias alfa em excesso, prevenindo a precipitação intracelular e evitando a morte prematura dos eritróides precursores (Fessas e Loukopoulos, 1974).

Experimentalmente, tem sido demonstrado que a HU possui efeitos clastogênicos (Gebhart, 1981), teratogênicos (Aliverti *et al.*, 1980), e mutagênicos (Ziegler-Skylakakis *et al.*, 1985).

Alguns autores sugerem que aumentos nas freqüências de aberrações cromossômicas, observadas na presença de HU, possam ser devidos à inibição da síntese de dNTP, durante a fase G₂ do ciclo celular; à inibição dos mecanismos de reparo (Snyder, 1984); ou à geração de radicais livres (Iyamu *et al.*, 2001). No entanto, outros autores sugerem que a HU possui efeitos antioxidantes (Agil e Sadrzadeh, 2000).

Devido às observações preliminares conflitantes, sugerindo que a HU possa ser geradora de radicais livres, ou atuar como seqüestradora desses radicais, neste trabalho foram empregadas associações da HU com o AA, um agente antioxidante capaz de seqüestrar radicais livres com eficiência (Antunes, 1997); e da HU com a DXR, que é um quimioterápico gerador dos mesmos (Keizer *et al.*, 1990).

Um teste de curta duração (Somatic Mutation And Recombination Test – SMART) foi desenvolvido para a detecção de diferentes tipos de manchas mutantes (simples ou gêmeas) que podem ser resultantes tanto de mutação, deleção ou recombinação somática, ocorridas no cromossomo 3 da mosca de fruta *Drosophila melanogaster* (Graf *et al.*, 1984).

A *Drosophila melanogaster* tem sido considerada um organismo teste ideal para os estudos de genotoxicidade e de antigenotoxicidade de vários compostos e misturas (Graf *et al.*, 1998; Spanó *et al.*, 2001), além de ser um organismo eucarioto; pequeno; com tempo de geração curto (cerca de 10 dias a 25°C); que possui caracteres morfológicos controlados geneticamente, fáceis de serem detectados; grande progênie e de fácil manutenção; baixo número de cromossomos e é capaz de ativar, enzimaticamente, promutágenos e procarcinógenos *in vivo* (Guzmán-Rincón e Graf, 1995). Essa ativação é realizada pelas enzimas citocromo P-450, que consistem de várias formas de isoenzimas que têm a capacidade de metabolizar uma variedade de substratos (Frölich e Würigler, 1989).

O teste de mutação e recombinação somática (SMART), tem sido amplamente empregado, em duas versões, uma baseada no marcador da cor dos

olhos (Vogel e Zijlstra, 1987a, b; Vogel e Nivard, 1993), e a outra baseada em dois marcadores de células das asas (Graf *et al.*, 1984; Würgler *et al.*, 1985).

São utilizadas, para a realização do teste da mancha da asa, três linhagens mutantes de *Drosophila melanogaster*. 1] Linhagem multiple wing hairs (*mwh*), que possui um gene mutante (*mwh*) localizado no cromossomo 3 (3-0,3), que determina que as células das asas apresentem três ou mais pêlos, no lugar de um; 2] Linhagem flare-3 (*flr*³), que possui um gene mutante marcador recessivo em hemizigose (*flr*³) localizado no cromossomo 3 (3-38,8), que afeta os pêlos das células das asas, modificando-os, parecendo uma chama. Devido à letalidade zigótica, alelos *flr* são mantidos conservados em um cromossomo homólogo balanceador que comporta múltiplas inversões e um marcador dominante, o qual é letal em homozigose (*TM3, Bd^S Third Multiple 3, Beaded-Serrate*) (Guzmán-Rincón *et al.*, 1994; Guzmán-Rincón e Graf, 1995); 3] Linhagem ORR; flare-3 (*ORR; flr*³), construída por Frölich e Würgler (1989), que possui um gene marcador em hemizigose (*flr*³) no cromossomo 3 (3-38,8), que afeta os pêlos das células das asas, modificando-os, parecendo uma chama, e um no cromossomo 2, transferido de uma linhagem selvagem Oregon R (*ORR*), resistente ao DDT (Dapkus e Merrel, 1997). Esta linhagem "ORR; flare-3" é caracterizada por um aumento na atividade de enzimas citocromo P-450. O gene *flr*³ dessa linhagem é letal em homozigose (Hällström e Blanck, 1985; Guzmán-Rincón e Graf, 1995).

Para a detecção de manchas mutantes nas asas de *Drosophila melanogaster*, por meio do teste SMART, são utilizados dois cruzamentos: [1] Cruzamento padrão (ST), fêmeas *flr3 / In(3LR) TM3, ri p^osep I(3)89Aa bx^{34e} e Bd^S* cruzadas com machos *mwh* (Graf *et al.*, 1989); e [2] Cruzamento de alta capacidade de bioativação metabólica (HB), fêmeas *ORR; flr3 / In(3LR) TM3, ri p^osep I(3)89Aa bx^{34e} e Bd^S* cruzadas com machos *mwh* (Graf e van Schaik, 1992).

O cruzamento padrão (ST) é utilizado na detecção de agentes genotóxicos diretos, enquanto que o cruzamento de alta capacidade de bioativação (HB), na detecção de agentes genotóxicos indiretos ou promutágenos, que necessitam de ativação metabólica para induzir efeitos genotóxicos.

Desses cruzamentos são obtidos dois tipos de descendentes: trans-heterozigoto marcado (MH) e heterozigoto balanceado (BH).

Nos adultos emergentes MH as manchas mutantes aparecem como manchas simples "mwh" ou "flare" ou como manchas gêmeas mostrando áreas adjacentes "mwh" e "flare". Nos adultos emergentes BH as manchas mutantes aparecem apenas como manchas simples do tipo "mwh" (Graf *et al.*, 1984).

Diante do acima exposto, e por meio do SMART, este trabalho teve como objetivos avaliar: a) o potencial genotóxico da hidroxiuréia; b) os efeitos moduladores do ácido ascórbico, quando associado à hidroxiuréia; c) os efeitos moduladores da hidroxiuréia, quando associada à doxorubicina; e d) os efeitos moduladores da hidroxiuréia e do ácido ascórbico, quando associados à doxorubicina.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. AGENTES QUÍMICOS

Hidroxiuréia (HU) (CAS 127-07-1) fabricada pelo Laboratório Bristol-Myers Squibb, conhecida comercialmente como Hydrea, possui os seguintes ingredientes inativos: ácido cítrico, corantes (D & S Amarelo nº 10, FD & C Azul nº 1, FD & C Vermelho 40 e D & C Vermelho 28), gelatina, lactose, estearato de magnésio, fosfato de sódio e dióxido de titânio. Possui Peso Molecular de 76,05 e fórmula molecular HONHCONH_2 . Ácido ascórbico (AA) (vitamina C) (CAS 50-81-7), Fluka – Suíça. Peso molecular 186,13; fórmula molecular $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$. Doxorrubicina (DXR) cloridrato de (8S-cis)-10-[(3-amino-2,3,6,-trideoxi-alfa-1,1ioxohexopiranosil)oxi]-7,8,9,10-tetrahidro-6,8,11-trihidroxi-8-(hidroxiacetil)-1-etóxi 5,12-naftacenodiona (CAS 23214-92-8), Eurofarma Laboratório Ltda., São Paulo, SP, Brasil. Cada frasco contém 10 mg de DXR liofilizado. Possui peso molecular 580,0 e fórmula molecular $\text{C}_{27}\text{H}_{29}\text{NO}_{11} \cdot \text{HCl}$ (Figura 1).

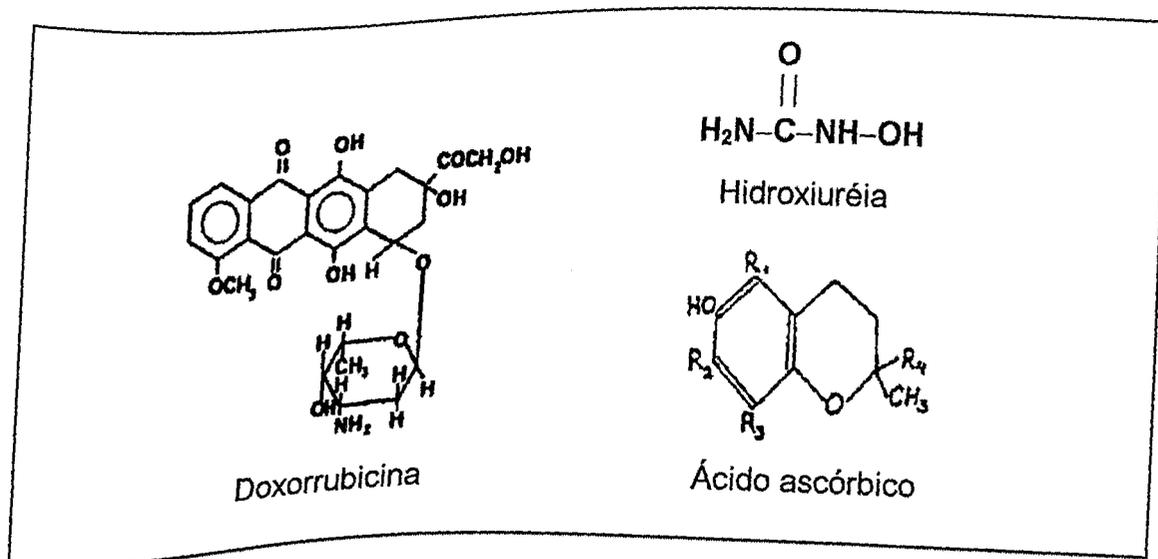


Figura 1. Fórmulas estruturais da doxorrubicina (Blum e Karter, 1974); hidroxiuréia (Gilman *et al.*, 1987) e ácido ascórbico (Odin, 1997).

2.2. PROCEDIMENTOS PARA COLETA DOS OVOS

Os ovos foram coletados, por um período de 8 horas, em frascos contendo uma base sólida de ágar (4% de ágar em água), e uma camada de fermento com açúcar. Após 72 ± 4 horas, larvas de 3^o estágio foram lavadas em água corrente e coletadas com auxílio de uma peneira de malha fina.

2.3. TRATAMENTOS

2.3.1. CRUZAMENTO PADRÃO (ST):

Grupos de aproximadamente 100 larvas, provenientes do cruzamento ST foram transferidos para frascos de vidro contendo 1,5 g de purê de batata (Yoki Alimentos S.A.), aos quais foram adicionados 5 ml de solução de HU (1,5; 3,0 e 6,0 mM) associados ou não com DXR (0,2 mM) e AA (50 mM). Como controle positivo foi utilizada a DXR (0,2 mM) e como controle negativo água destilada estéril. As larvas foram alimentadas com esse meio até o seu desenvolvimento completo. A temperatura dentro do laboratório foi monitorada e controlada a $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ e 65% de umidade relativa do ar, durante todo o período experimental.

Os tratamentos foram realizados de acordo com o protocolo apresentado na **Figura 2**.

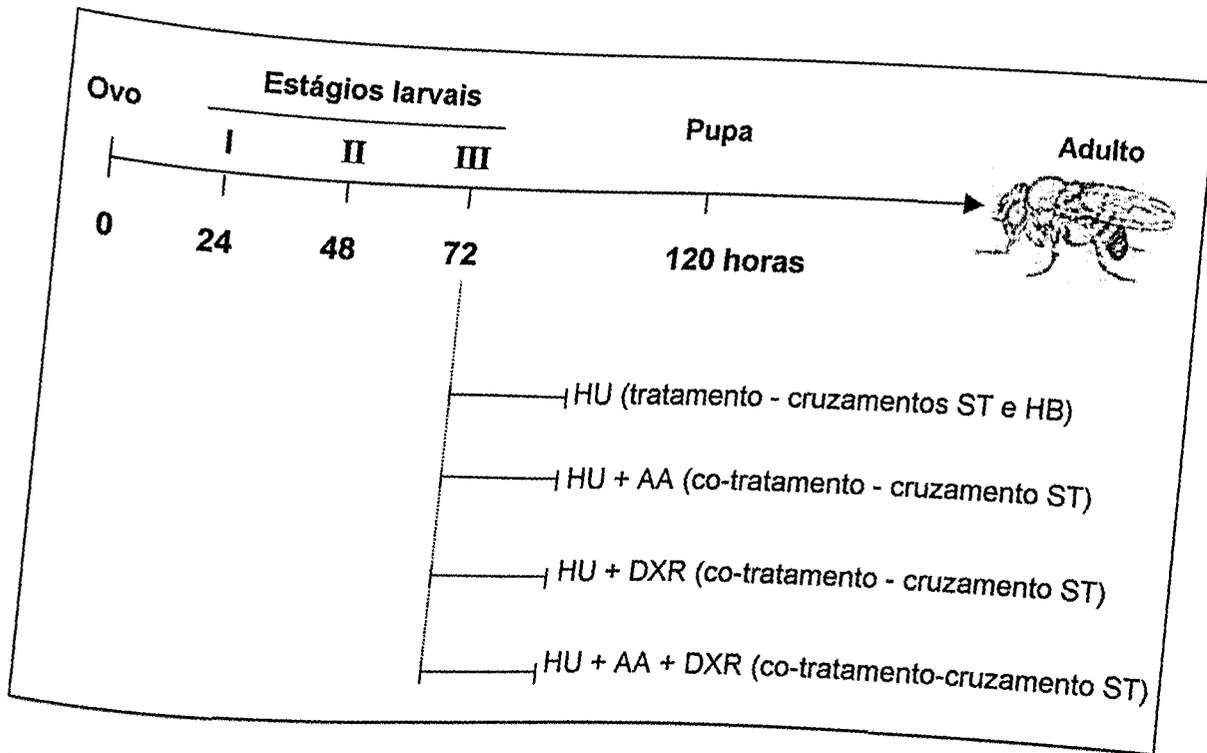


Figura 2. Esquemas de exposição à HU e a co-tratamentos entre HU + AA; HU + DXR; HU + DXR + AA (macho adulto de *Drosophila melanogaster* adaptado de <http://flystocks.bio.indiana.edu/>).

2.3.2. CRUZAMENTO DE ALTA BIOATIVAÇÃO METABÓLICA (HB):

Grupos de aproximadamente 100 larvas, provenientes do cruzamento HB foram transferidos para frascos de vidro contendo 1,5 g de purê de batata (Yoki Alimentos S.A.), aos quais foram adicionados 5 ml de solução de HU (1,5; 3,0 e 6,0 mM). Como controle positivo foi utilizada a DXR (0,2 mM) e como controle negativo a água destilada estéril. As larvas foram alimentadas com esse meio até o seu desenvolvimento completo. A temperatura dentro do laboratório foi monitorada e controlada a $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ e 65% de umidade relativa do ar, durante todo o período experimental.

2.4. MONTAGEM DE ASAS

Após a eclosão, os adultos emergentes foram coletados e fixados em etanol 70%. Ambos os cruzamentos ST e HB produzem dois tipos de progênie, as quais podem ser distinguidas fenotipicamente, baseado no marcador Bd^s : trans-heterozigoto marcado ($mwh + / + flr^3$, fenotipicamente com asas de bordas lisas); e heterozigoto balanceado ($mwh + / + TM3, Bd^s$, fenotipicamente com asas de bordas serrilhadas).

Nesse experimento, apenas os descendentes trans-heterozigotos marcados foram estudados. Um total de 40 indivíduos (80 asas) foi analisado para cada concentração. As asas foram retiradas, embebidas em solução de Faure (30 g de goma arábica, 20 ml de glicerol, 50 g de hidrato de cloral e 50 ml de água destilada) e extendidas sobre lâminas secas.

As lâminas permaneceram secando por 24 horas sobre placa aquecedora (40°C), e posteriormente foram montadas com lamínulas em solução de Faure. Sobre a lamínula foi adicionado um peso de metal (aproximadamente 400 g), para que as asas ficassem com a superfície plana, onde ficaram por mais de 48 horas para secarem.

2.5. ANÁLISE DE LÂMINAS

Ambas as superfícies dorsal e ventral das asas foram analisadas em microscópio óptico de luz (objetiva de 40X). Durante a análise, foi registrado o número de manchas, como também, os tipos de manchas mutantes encontradas (simples ou gêmeas), assim como o número de pêlos mutantes existentes em cada mancha e a posição em que eram encontradas na asa.

Os diferentes tipos de manchas são devidos a diferentes mecanismos genéticos: eventos mutacionais (mutações de ponto, deleções ou tipos específicos de translocações), bem como, recombinações mitóticas e, talvez, monossomias (Graf *et al.*, 1984).

2.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

O diagnóstico estatístico, para avaliação da atividade genotóxica em *Drosophila*, foi realizado de acordo com o teste do X^2 para proporções. Um método de múltipla-decisão foi usado para decidir se o resultado é positivo, fraco positivo, inconclusivo ou negativo. Esse método é baseado em duas hipóteses:

1. Hipótese nula: admite-se que não há diferença na frequência de mutações entre o controle negativo e o indivíduo tratado;
2. Hipótese alternativa: postula, a priori, que os resultados encontrados no tratamento têm um aumento nas frequências de mutação que é m vezes maior que a frequência espontânea observada no controle (Frei e Würigler, 1988).

As manchas mutantes são distribuídas em pequenas simples (1-2 células), grandes simples (>2 células) e manchas gêmeas. Devido às manchas pequenas simples e o total de manchas terem uma frequência espontânea comparativamente alta, m é fixado a um valor de 2 (testando para o dobro de frequências espontâneas para definir um resultado negativo). Para as manchas grandes simples e as manchas gêmeas, as quais têm uma baixa frequência espontânea, é usado $m = 5$. Ambas as hipóteses são testadas a um nível de significância 5% (Frei e Würigler, 1988).

3. RESULTADOS

3.1. Avaliação genotóxica da hidroxiuréia (HU) – Cruzamento padrão (ST)

Os cruzamentos padrão (ST) e de alta capacidade de bioativação (HB) foram realizados em paralelo, de modo que as larvas obtidas de ambos cruzamentos fossem tratadas sob idênticas condições.

Os resultados obtidos na análise dos descendentes trans-heterozigotos marcados (MH), do cruzamento padrão (ST), tratados com diferentes concentrações de HU (1,5; 3,0 e 6,0 mM) e o controle negativo (água destilada estéril), estão apresentados na **Tabela 1**.

As freqüências dos totais de manchas mutantes observadas nos indivíduos tratados com as concentrações 1,5 e 6,0 mM de HU foram estatisticamente significativas ($\alpha < 0,05$), quando comparadas com as freqüências de manchas observadas no controle negativo. Essas mesmas concentrações de HU apresentaram freqüências, também, estatisticamente significativas para as manchas mutantes pequenas simples.

As freqüências de manchas mutantes de diferentes categorias, foram inconclusivas para o tratamento com HU (3,0 mM), assim como para as freqüências de manchas gêmeas, para os tratamentos com as diferentes concentrações de HU.

A HU na concentração de 6,0 mM induziu maior número total de manchas mutantes (pequenas simples, grandes simples e gêmeas), do que as concentrações de HU 1,5 e 3,0 mM.

A **Figura 3 (A)** apresenta a distribuição dos tamanhos de manchas simples (pequenas e grandes), por mosca, dos descendentes MH, do cruzamento ST, tratados com HU (1,5; 3,0 e 6,0 mM) e água destilada estéril (controle negativo).

Tabela 1. Freqüências de manchas mutantes observadas nos descendentes MH de *Drosophila melanogaster* do cruzamento padrão (ST) tratados com diferentes concentrações de hidroxiuréia

Tratamento (concentração)	Número de indivíduos	Freqüência de manchas por indivíduo (nº de manchas) Diagnóstico estatístico*			
		Pequenas simples (1-2 células) m=2	Grandes Simples (>2 células) m=5	Gêmeas m=5	Total m=2
Água	40	0,28 (11)	0,08 (3)	0,05 (2)	0,40 (16)
HU (mM)					
1,5	40	0,70 (28) +	0,00 (0) -	0,05 (2) i	0,75 (30) +
3,0	40	0,38 (15) i	0,10 (4) i	0,05 (2) i	0,53 (21) i
6,0	40	0,73 (29) +	0,18 (7) i	0,13 (5) i	1,03 (41) +

* Diagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würigler (1988): +, positivo; f+, fraco positivo; -, negativo; i, inconclusivo; m, fator de multiplicação para a avaliação de resultados significativamente negativos. Teste do X^2 para proporções, bicaudal. Níveis de significância: $\alpha = \beta = 0,05$.

3.2. Avaliação genotóxica da hidroxiuréia (HU) – Cruzamento de alta capacidade de bioativação metabólica (HB)

Os resultados obtidos na análise dos descendentes MH do cruzamento de alta capacidade de ativação metabólica (HB), tratados com diferentes concentrações de HU (1,5; 3,0 e 6,0 mM) e o controle negativo (água destilada estéril), estão apresentados na **Tabela 2**.

Com relação às freqüências totais de manchas observadas nos indivíduos tratados com as diferentes concentrações de HU, foi verificado que somente a freqüência obtida naqueles submetidos à HU 6,0 mM foi estatisticamente significativa, quando comparada com a observada no controle negativo.

As freqüências resultantes das diferentes categorias de manchas mutantes, distribuídas entre as concentrações de HU, aumentaram em relação ao controle negativo, no entanto, apenas o aumento observado nas manchas simples pequenas, dos indivíduos tratados com HU 6,0 mM, foi estatisticamente significativo.

A **Figura 3 (B)** apresenta a distribuição dos tamanhos de manchas simples (pequenas e grandes), por mosca, dos descendentes MH, do cruzamento HB, tratados com HU (1,5; 3,0 e 6,0 mM) e água destilada estéril (controle negativo).

Os resultados obtidos na análise dos descendentes MH dos cruzamentos ST e HB permitiram concluir que, nessas condições experimentais, a HU é um agente genotóxico direto, em células de asas de *Drosophila melanogaster*, tratados na forma de larva.

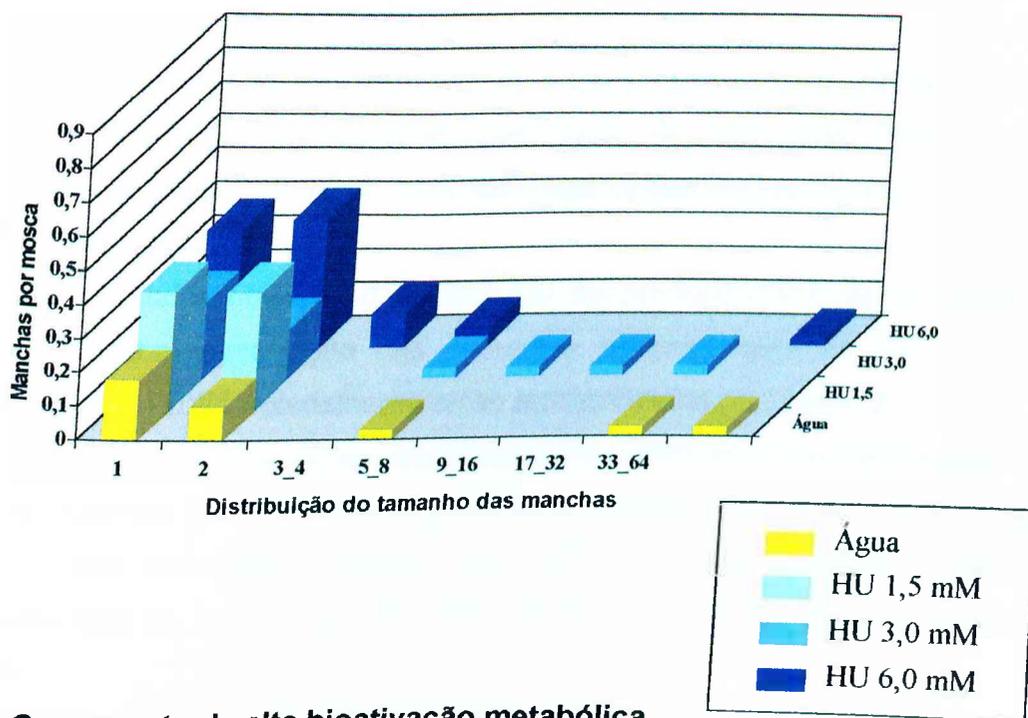
Diante dos resultados acima descritos e de resultados prévios obtidos em experimentos com AA e DXR, no Laboratório de Mutagênese da UFU, as associações (co-tratamentos) entre HU+AA; HU+DXR e HU+AA+DXR foram realizadas apenas com larvas provenientes do cruzamento ST.

Tabela 2. Frequências de manchas mutantes observadas nos descendentes MH de *Drosophila melanogaster* do cruzamento de alta capacidade de bioativação metabólica (HB) tratados com diferentes concentrações de hidroxiuréia

Tratamento (concentração)	Número de indivíduos	Frequência de manchas por indivíduo (n ^o de manchas) Diagnóstico estatístico*			
		Pequenas simples (1-2 células) m=2	Grandes Simples (>2 células) m=5	Gêmeas m=5	Total m=2
Água	40	0,73 (29)	0,20 (8)	0,05 (2)	0,97 (39)
HU (mM)					
1,5	40	1,00 (40) i	0,20 (8) i	0,13 (5) i	1,33 (53) -
3,0	40	0,78 (31) -	0,38 (15) i	0,08 (3) i	1,23 (49) -
6,0	40	1,23 (49) +	0,40 (16) i	0,02 (8) i	1,83 (73) +

*Diagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würigler (1988): +, positivo; f+, fraco positivo; -, negativo; i, inconclusivo; m, fator de multiplicação para a avaliação de resultados significativamente negativos. Teste do X² para proporções, bicaudal. Níveis de significância: $\alpha=\beta=0,05$.

(A) Cruzamento padrão



(B) Cruzamento de alta bioativação metabólica

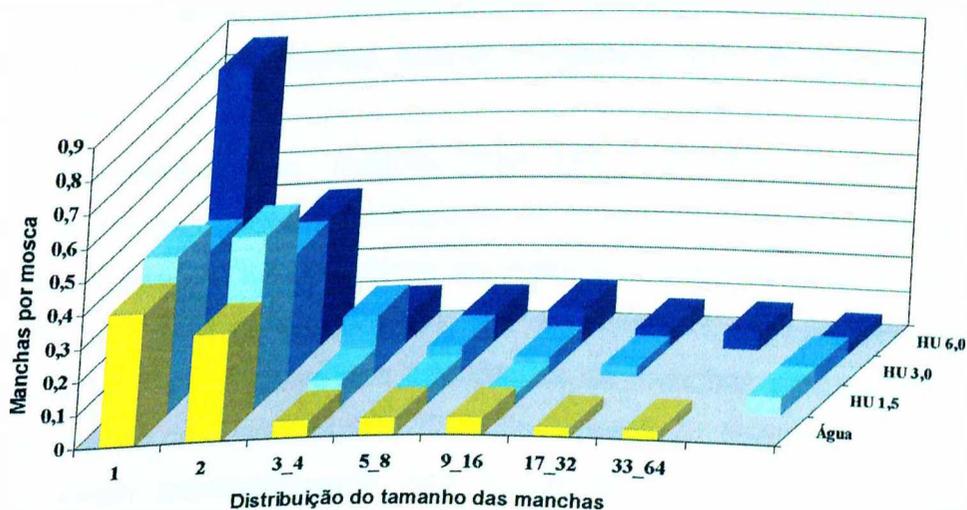


Figura 3. Distribuição dos tamanhos de manchas simples (pequenas e grandes), por mosca, dos descendentes MH, dos cruzamentos ST (A) e HB (B), tratados com HU (1,5; 3,0 e 6,0 mM) e água destilada estéril (controle negativo).

3.3. Avaliação dos efeitos moduladores da hidroxiuréia, quando associada à doxorubicina – Cruzamento padrão

Com o objetivo de verificar se a HU é um agente seqüestrador de radicais livres, foi realizado o co-tratamento com larvas de *Drosophila melanogaster*, provenientes do cruzamento ST, com diferentes concentrações de HU (1,5; 3,0 e 6,0 mM) + DXR (0,2 mM).

Os resultados obtidos na análise dos descendentes MH, do cruzamento ST, tratados com associação das diferentes concentrações de HU e DXR, comparados com DXR isoladamente estão representados na **Tabela 3**.

Foi verificado um aumento estatisticamente significativo nas freqüências de manchas mutantes (pequenas simples, grandes simples e gêmeas) e no total de manchas, nos indivíduos tratados com DXR (controle positivo), quando comparado com as freqüências de manchas mutantes observadas no controle negativo.

Indivíduos tratados com HU (1,5 e 6,0 mM), associada com DXR (0,2 mM), apresentaram aumento estatisticamente significativo (fraco positivo) nas freqüências totais de manchas, quando comparado com a freqüência total obtida com a DXR.

Os descendentes tratados com HU (1,5 mM) associada à DXR apresentaram, nas diferentes categorias de manchas, aumento estatisticamente significativo apenas na freqüência de manchas mutantes pequenas simples, enquanto que os tratados com 6,0 mM de HU+DXR, apresentaram aumento estatisticamente significativo nas freqüências de manchas pequenas e grandes simples, quando comparado com DXR isoladamente. As freqüências de manchas gêmeas foram estatisticamente não significativas ($\alpha > 0,05$), para todas as concentrações de HU, sendo que apenas na associação de HU 6,0 mM e DXR essas manchas foram reduzidas.

A **Figura 4 (A)** mostra as freqüências totais de manchas por mosca, observadas nos descendentes MH, do cruzamento ST, tratados com diferentes concentrações de HU (1,5; 3,0 e 6,0 mM) somadas às freqüências totais de manchas por mosca observadas no tratamento com DXR (0,2 mM) (A). A **Figura 4 (B)** mostra as freqüências totais de manchas por mosca, observadas nos

descendentes MH, do cruzamento ST, co-tratados com diferentes concentrações de HU (1,5; 3,0 e 6,0 mM) + DXR (0,2 mM).

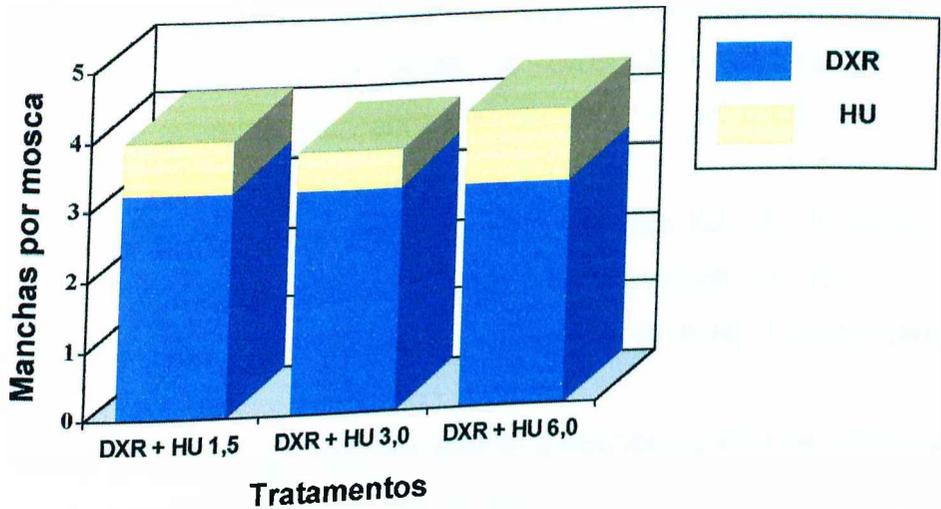
Os resultados encontrados permitiram concluir que, nessas condições experimentais a HU não teve ação antigenotóxica contra a ação da DXR, como também, que os aumentos verificados nas freqüências de manchas mutantes dos co-tratados com diferentes concentrações de HU (1,5; 3,0 e 6,0 mM) + DXR (0,2 mM), correspondem às somatórias das freqüências observadas no tratado com DXR isoladamente, com as freqüências observadas nos tratados com diferentes concentrações de HU (efeito aditivo).

Tabela 3. Freqüências de manchas mutantes observadas nos descendentes MH de *Drosophila melanogaster* do cruzamento padrão (ST) tratados com diferentes concentrações de hidroxiuréia (HU) associadas à doxorubicina (DXR)

Tratamento			Número de indivíduos	Freqüência de manchas por indivíduo (nº de manchas)			Diagnóstico estatístico*
HU (mM)	+	DXR (mM)		Pequenas simples (1-2 células) m=2	Grandes Simples (>2 células) m=5	Gêmeas m=5	Total m=2
0	+	0	40	0,28 (11)	0,08 (03)	0,05 (02)	0,40 (016)
0	+	0,2	40	0,83 (33) +	1,18 (47) +	1,25 (50) +	3,25 (130) +
1,5	+	0,2	40	1,23 (49) +	1,28 (51) -	1,53 (61) -	4,03 (161) f ⁺
3,0	+	0,2	40	0,98 (39) -	1,08 (43) -	1,60 (64) -	3,65 (146) -
6,0	+	0,2	40	1,65 (66) +	1,78 (71) +	0,98 (39) -	4,40 (176) f ⁺

* Diagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würigler (1988): +, positivo; f+, fraco positivo; -, negativo; i, inconclusivo; m, fator de multiplicação para a avaliação de resultados significativamente negativos. Teste do X² para proporções, bicaudal. Níveis de significância: $\alpha = \beta = 0,05$.

(A) Tratamento com DXR + tratamento com HU



(B) Co-tratamento com DXR + HU

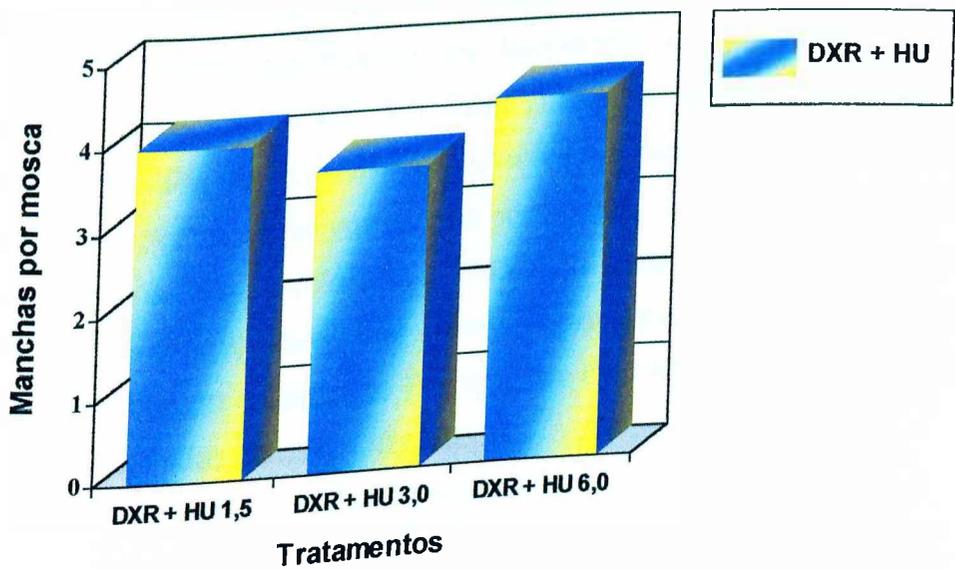


Figura 4. Frequências totais de manchas por mosca, observadas nos descendentes MH, do cruzamento ST, tratados com diferentes concentrações de HU (1,5; 3,0 e 6,0 mM) somadas às frequências totais de manchas por mosca, observadas no tratamento com DXR (0,2 mM) (A); frequências totais de manchas por mosca, observadas nos descendentes MH, do cruzamento ST, co-tratados com diferentes concentrações de HU (1,5; 3,0 e 6,0 mM) + DXR (0,2 mM) (B).

3.4. Avaliação dos efeitos moduladores do ácido ascórbico, quando associado à hidroxiuréia – Cruzamento padrão

Com o objetivo de verificar se a HU é um agente gerador de radicais livres, foi realizado o co-tratamento de larvas de *Drosophila melanogaster*, do cruzamento ST, com diferentes concentrações de HU (1,5; 3,0 e 6,0 mM) + AA (50 mM), que é um agente sequestrador de radicais livres.

Os resultados obtidos na análise dos descendentes MH, do cruzamento ST, tratados com associação das diferentes concentrações de HU e AA, comparados com os das respectivas concentrações de HU estão representados na Tabela 4.

Verificou-se que o AA (50 mM) não alterou a freqüência total de manchas, quando associado à HU 1,5 e 6,0 mM, mas induziu um aumento estatisticamente inconclusivo na freqüência total de manchas, quando associado à HU 3,0 mM.

Com relação às demais freqüências de manchas mutantes (pequenas simples, grandes simples e gêmeas), foi verificado que o AA (50 mM) induziu aumento estatisticamente significativo na freqüência de manchas grandes simples, quando associado à HU 1,5 mM. Todos os demais aumentos ou diminuições nas freqüências de manchas mutantes, verificados nas associações de HU + AA, foram não significativos ou não conclusivos, sugerindo que, nessas condições experimentais, possivelmente, a HU não foi geradora de radicais livres.

Na Figura 5 estão representadas as freqüências totais de manchas obtidas nos descendentes MH, do cruzamento ST, tratados com HU (1,5; 3,0 e 6,0 mM) isoladamente e associadas com AA (50 mM).

Tabela 4. *Freqüências de manchas mutantes observadas nos descendentes MH de Drosophila melanogaster do cruzamento padrão (ST) tratados com diferentes concentrações de hidroxauréia (HU) associadas ao ácido ascórbico (AA)*

Tratamento			Número de indivíduos	Freqüência de manchas por indivíduo (nº de manchas) Diagnóstico estatístico*			
HU (mM)	+	AA (mM)		Pequenas simples (1-2 células)	Grandes Simples (>2 células)	Gêmeas	Total
				m=2	m=5	m=5	m=2
0	+	0	40	0,28 (11)	0,08 (3)	0,05 (2)	0,40 (16)
0	+	50	40	0,50 (20)	0,08 (3)	0,00 (0)	0,58 (23)
1,5	+	0	40	0,70 (28)	0,00 (0)	0,05 (2)	0,75 (30)
1,5	+	50	40	0,60 (24) -	0,15 (6) +	0,03 (1) i	0,78 (31) -
3,0	+	0	40	0,38 (15)	0,10 (4)	0,05 (2)	0,53 (21)
3,0	+	50	40	0,65 (26) i	0,03 (1) i	0,05 (2) i	0,73 (29) i
6,0	+	0	40	0,73 (29)	0,18 (7)	0,13 (5)	1,03 (41)
6,0	+	50	40	0,83 (33) -	0,18 (7) i	0,08 (3) i	1,08 (43) -

* Diagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würigler (1988): +, positivo; f+, fraco positivo; -, negativo; i, inconclusivo; m, fator de multiplicação para a avaliação de resultados significativamente negativos. Teste do X² para proporções, bicaudal. Níveis de significância: $\alpha = \beta = 0,05$.

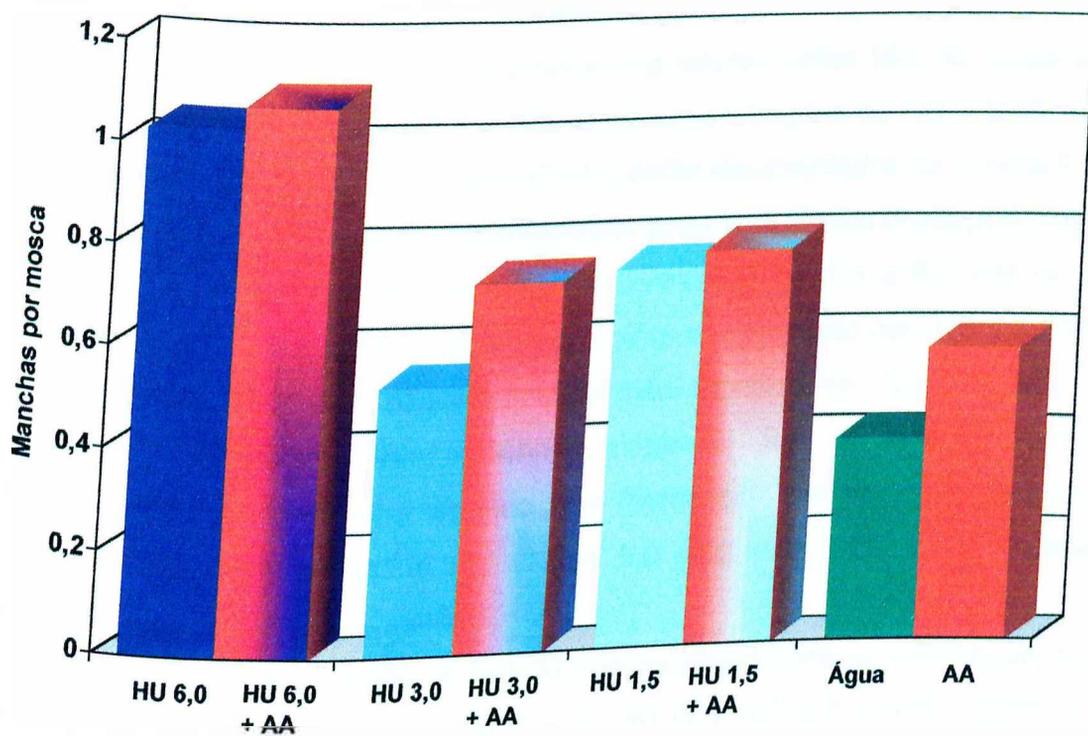


Figura 5. Frequências totais de manchas por mosca, observadas nos descendentes MH, do cruzamento ST, tratados com HU (1,5; 3,0 e 6,0 mM) isoladamente e associado com AA (50 mM).

3.5. Avaliação dos efeitos moduladores da hidroxiuréia e do ácido ascórbico, quando associados à doxorubicina – Cruzamento padrão

Com o objetivo de verificar se a HU é um agente seqüestrador de radicais livres e se esta ação é potencializada pelo AA, foi realizado o co-tratamento de larvas de *Drosophila melanogaster*, do cruzamento ST, com a associação de diferentes concentrações de HU (1,5; 3,0 e 6,0 mM) + AA (50 mM), com DXR (0,2 mM), que é um agente gerador de radicais livres.

Os resultados obtidos na análise dos descendentes MH, do cruzamento ST, tratados com associação das diferentes concentrações de HU + DXR + AA, comparados com o controle positivo (DXR), estão representados na Tabela 5.

Foi observado um aumento estatisticamente significativo (fraco positivo), no total de manchas mutantes, para as concentrações de 1,5 e 6,0 mM de HU associadas com DXR e AA, enquanto que, para a associação com HU 3,0 mM o aumento observado foi estatisticamente não significativo. Com relação às diferentes categorias de manchas mutantes foi verificado aumento estatisticamente significativo apenas nas freqüências de manchas pequenas simples, nas associações de HU (1,5 e 3,0 mM) com DXR e AA, quando comparado com o controle positivo.

Esses resultados estão de acordo com os observados na associação (co-tratamento) de diferentes concentrações de HU (1,5; 3,0 e 6,0 mM) + DXR (0,2 mM), nos quais foram verificados que a HU, nessas condições experimentais não age como seqüestradora de radicais livres, mas possui efeito genotóxico aditivo aos efeitos induzidos pela DXR. Esses resultados ainda confirmaram aqueles observados na associação (co-tratamento) de diferentes concentrações de HU (1,5; 3,0 e 6,0 mM) + AA (50 mM), nos quais foram verificados que, nessas condições experimentais o AA não apresentou efeitos genotóxicos, assim como não teve efeito seqüestrador de radicais livres.

Tabela 5. Frequências de manchas mutantes observadas nos descendentes MH de *Drosophila melanogaster* do cruzamento padrão (ST) tratados com diferentes concentrações de hidroxiuréia (HU) associadas à DXR e ao AA

Tratamento				Número de indivíduos	Frequência de manchas por indivíduo (nº de manchas) Diagnóstico estatístico*			
HU (mM)	+ DXR (mM)	+ AA (mM)	Pequenas simples (1-2 células) m=2		Grandes Simples (>2 células) m=5	Gêmeas m=5	Total m=2	
0	+	0,2	+ 0		40	0,83 (33)	1,18 (47)	1,25 (50)
1,5	+	0,2	+ 50	40	1,30 (52) +	1,38 (55) -	1,33 (53) -	4,00 (160) f ⁺
3,0	+	0,2	+ 50	40	1,25 (50) +	1,20 (48) -	1,18 (47) -	3,63 (145) -
6,0	+	0,2	+ 50	40	1,05 (42) -	1,43 (57) -	1,58 (63) -	4,05 (162) f ⁺

* Diagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würzler (1988): +, positivo; f+, fraco positivo; -, negativo; i, inconclusivo; m, fator de multiplicação para a avaliação de resultados significativamente negativos. Teste do X² para proporções, bicaudal. Níveis de significância: $\alpha = \beta = 0,05$.

Na **Figura 6 (A)** estão representadas as somatórias das freqüências de manchas observadas nos descendentes MH, tratados com HU (1,5; 3,0 e 6,0 mM); AA (50 mM) e DXR (0,2 mM) isoladamente. A **Figura 6 (B)** mostra as somatórias das freqüências de manchas observadas nos descendentes MH, tratados com HU (1,5; 3,0 e 6,0 mM) e DXR (0,2 mM) isoladamente. A **Figura 6 (C)** mostra as freqüências de manchas observadas no co-tratamento entre HU (1,5; 3,0 e 6,0 mM) + AA (50 mM) + DXR (0,2 mM). As análises das **Figuras 6 (B) e 6 (C)** permitiram concluir que nos co-tratamentos de HU + AA + DXR, os resultados observados devem-se às manchas mutantes induzidas pela HU, somadas às induzidas pela DXR. No entanto, o AA, por não apresentar efeitos genotóxico, nem antígenotóxico, não teve influência nas freqüências de manchas observadas nesses tratamentos. Caso o AA também tivesse induzido efeito aditivo de manchas, as freqüências observadas na **Figura 6 (C)** deveriam estar de acordo com o apresentado na **Figura 6 (A)**, que mostra a somatória das freqüências de manchas mutantes observadas nos tratados com HU + AA + DXR, isoladamente.

Com o objetivo de confirmar esses resultados, procedeu-se a comparação dos efeitos induzidos pela associação das diferentes concentrações de HU (1,5; 3,0 e 6,0 mM) + AA (50 mM) + DXR (0,2 mM) com os tratados com essas diferentes concentrações de HU + DXR (**Tabela 6**).

Foi verificada uma redução, porém estatisticamente não significativa, no total de manchas mutantes para todas as concentrações de HU associadas com DXR e AA, quando comparado com os tratados com HU + DXR.

Nas concentrações de HU (1,5 e 3,0 mM), associadas com DXR e AA foram verificados aumentos nas manchas pequenas e grandes simples, enquanto que houve redução nas manchas gêmeas, sendo estatisticamente não significativas as diferenças nas freqüências de todos esses resultados.

Na associação de HU 6,0 mM com DXR e AA foram observados resultados contrários, ou seja, reduções nas manchas pequenas e grandes simples, mas com freqüência estatisticamente significativa somente para as manchas pequenas e um aumento nas manchas gêmeas, cuja freqüência foi estatisticamente significativa.

Diante dos resultados encontrados concluiu-se que, nessas condições experimentais, o AA não possui efeitos genotóxicos; que tanto a HU como o AA, possivelmente, não agiram como seqüestradores de radicais livres, mas que a HU apresentou efeito genotóxico aditivo aos efeitos induzidos pela DXR.

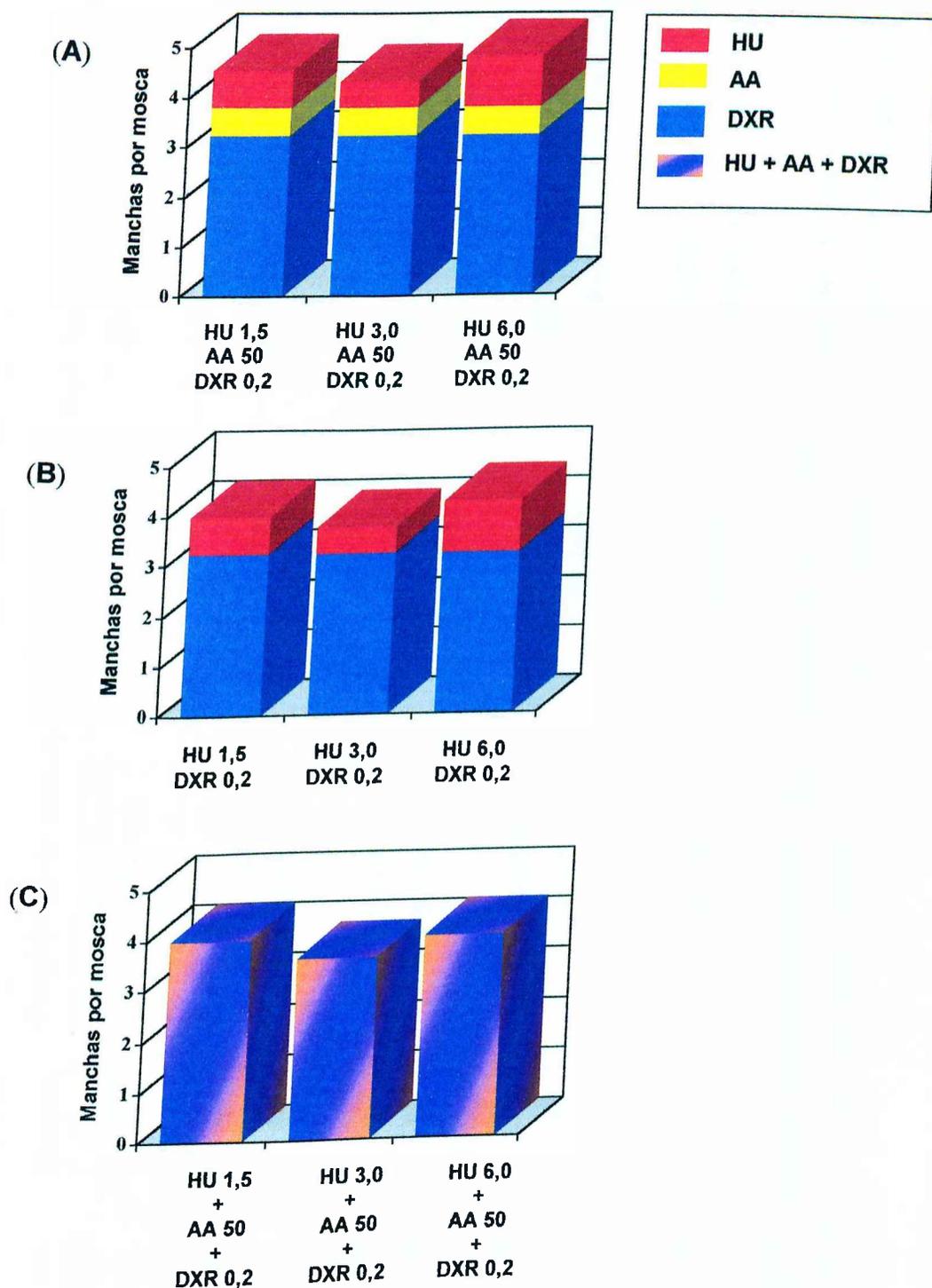


Figura 6. Frequências de manchas observadas nos descendentes MH, tratados com: HU (1,5; 3,0 e 6,0 mM); AA (50 mM) e DXR (0,2 mM) isoladamente (A); HU (1,5; 3,0 e 6,0 mM) e DXR (0,2 mM) isoladamente (B); e com co-tratamento de HU (1,5; 3,0 e 6,0 mM) + AA (50 mM) + DXR (0,2 mM) (C).

Tabela 6. Frequências de manchas mutantes observadas nos descendentes MH de *Drosophila melanogaster* do cruzamento padrão (ST) tratados com diferentes concentrações de hidroxipuréia (HU) associadas à DXR e ao AA

Tratamento					Número de indivíduos	Frequência de manchas por indivíduo (nº de manchas)			Diagnóstico estatístico*
HU (mM)	+	DXR (mM)	+	AA (mM)		Pequenas simples (1-2 células) m=2	Grandes Simples (>2 células) m=5	Gêmeas m=5	Total m=2
0	+	0	+	50		40	0,50 (20)	0,08 (03)	0,00 (00)
0	+	0,2	+	0	40	0,83 (33)	1,18 (47)	1,25 (50)	3,25 (130)
1,5	+	0,2	+	0	40	1,23 (49)	1,28 (51)	1,53 (61)	4,03 (161)
1,5	+	0,2	+	50	40	1,30 (52) -	1,38 (55) -	1,33 (53) -	4,00 (160) -
3,0	+	0,2	+	0	40	0,98 (39)	1,08 (43)	1,60 (64)	3,65 (146)
3,0	+	0,2	+	50	40	1,25 (50) -	1,20 (48) -	1,18 (47) -	3,63 (145) -
6,0	+	0,2	+	0	40	1,65 (66)	1,78 (71)	0,98 (39)	4,40 (176)
6,0	+	0,2	+	50	40	1,05 (42) +	1,43 (57) -	1,58 (63) +	4,05 (162) -

* Diagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würigler (1988): +, positivo; f+, fraco positivo; -, negativo; i, inconclusivo; m, fator de multiplicação para a avaliação de resultados significativamente negativos. Teste do X^2 para proporções, bicaudal. Níveis de significância: $\alpha = \beta = 0,05$.

4. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

O número de descendentes trans-heterozigotos marcados (MH), obtidos dos cruzamentos padrão (ST) e o do cruzamento de alta capacidade de bioativação metabólica (HB), foi semelhante em todos os tratamentos crônicos com diferentes concentrações de HU (1,5; 3,0 e 6,0 mM), permitindo concluir que a HU, nessas condições experimentais, não apresentou efeitos citotóxicos. No entanto, concentrações superiores a 6,0 mM apresentaram efeitos tóxicos/citotóxicos quando avaliadas no teste piloto deste experimento, sendo letal a dose acima de 15 mM.

Com relação à avaliação genotóxica, nos descendentes do cruzamento ST apenas os indivíduos submetidos a 1,5 e a 6,0 mM de HU apresentaram aumentos estatisticamente significativos nas freqüências de manchas mutantes, enquanto que nos descendentes do cruzamento HB, apenas aqueles submetidos ao tratamento com HU 6,0 mM exibiram aumento estatisticamente significativo. Nos descendentes HB, as freqüências obtidas, em todas as concentrações, foram cerca de duas vezes maior do que àquelas observadas nos descendentes do cruzamento ST. No entanto, a freqüência de manchas mutantes observada no controle negativo do cruzamento HB foi maior que o dobro da observada no cruzamento ST, permitindo concluir que, as altas freqüências de manchas mutantes observadas nos tratados com HU, nos descendentes do cruzamento HB, são devidas às altas freqüências espontâneas e que, em células de asas de *Drosophila melanogaster*, a HU teve efeito genotóxico direto.

Trabalhos preliminares demonstraram que o AA (50 mM) não possui efeitos genotóxicos em ambos cruzamentos, e que a DXR (0,2 mM) é um agente genotóxico direto que apresentou, praticamente, o mesmo nível de resposta tanto no cruzamento ST quanto no HB (Fragiorge, 2000).

Desta forma, todos os co-tratamentos, do presente trabalho, foram realizados apenas em descendentes do cruzamento ST, uma vez que, diante do acima exposto, não justificava o emprego do cruzamento HB.

Nos adultos emergentes MH as manchas mutantes aparecem como manchas simples, apresentando o fenótipo "mwh" ou "flare" ou como manchas gêmeas, mostrando áreas adjacentes "mwh" e "flare". As manchas simples podem ser induzidas por diferentes mecanismos genéticos, tais como mutação, deleção ou não-disjunção mitótica, enquanto que as manchas gêmeas ocorrem exclusivamente por recombinação somática (Graf *et al.*, 1984).

Nos adultos emergentes BH as manchas mutantes aparecem apenas como manchas simples do tipo "mwh", produzidas por mutação, deleção ou não-disjunção, pois devido à presença de uma série de inversões múltiplas no cromossomo balanceador, as células resultantes de recombinação mitótica são inviáveis, fazendo com que a frequência de manchas seja consideravelmente reduzida (Graf *et al.*, 1984). Dessa forma, nos descendentes BH apenas os eventos mutacionais levam à formação de manchas mutantes.

Nesse estudo, a maioria das manchas mutantes induzidas pela HU, nas asas dos descendentes MH, de ambos os cruzamentos, provavelmente foi causada por mutação de ponto ou deleção, sendo que as manchas pequenas simples apresentaram maiores frequências em todas as concentrações, enquanto que as manchas gêmeas foram mais frequentes na concentração de HU 6,0 mM. No entanto, esse aumento não foi estatisticamente significativo. Desta forma, foram analisados apenas os descendentes MH, uma vez que não justificava a análise de descendentes BH.

Alguns estudos demonstraram que a HU pode gerar radicais livres (Gomez *et al.*, 2000; Iyamu *et al.*, 2001). Gomez *et al.* (2000) trabalharam com linhagens de células linfoblastóides de indivíduos normais, e de pacientes com Anemia de Fanconi, dos tipos A e D, objetivando verificar se a inibição da síntese de dNTPs, pela HU, durante a fase G₂ do ciclo celular, produzia aumento na frequência de aberrações cromossômicas. Como a Anemia de Fanconi é uma síndrome de instabilidade cromossômica, sugere-se que a deficiência de reparo pós-replicativo possa estar envolvida. Foi observado que a HU induziu aumento significativo de aberrações cromossômicas, em células de pacientes portadores dos dois tipos de Anemia de Fanconi ($p < 0,05$), quando comparado com o controle negativo. Foi realizado, também, pré-tratamento com mitomicina C em linhagens de ambos os tipos de Anemia de Fanconi, sendo que a HU induziu um aumento aditivo de

aberrações cromossômicas em todas as linhagens, exceto nas do tipo A, onde foi verificado um efeito sinérgico, três vezes maior ($p < 0,05$). Esses resultados mostraram que a HU interfere com a atividade de reparo do DNA, na fase G₂, em linhagens de células com Anemia de Fanconi de um modo heterogêneo. A linhagem do tipo A foi a mais sensível, sugerindo que ela requer um competente reparo pós-replicativo e um amplo suprimento de dNTPs. No entanto, os autores sugerem que estudos subseqüentes sejam realizados para avaliar se as aberrações cromossômicas, induzidas pela HU, foram devidas às depleções de dNTPs ou por geração de radicais livres.

Outro estudo, com o objetivo de verificar se a HU gera radicais livres, foi realizado em células humanas expostas *in vitro* a várias concentrações de HU, em intervalos de tempo predeterminados. Foi observado que a HU induziu progressiva oxidação, ou seja, formação de metahemoglobina, conforme aumento da dose, em ambas as hemoglobinas de adulto: HbAA e falciforme (HbSS). O efeito oxidativo de HU em HbSS foi três vezes maior que o efeito em HbAA. Mudanças similares, mas menos intensas, foram observadas em amostras tratadas com H₂O₂. Observou-se que a HbF foi relativamente resistente aos danos oxidativos da HU. Um substancial efeito protetor da Hb pelo alfa-tocoferol, ácido ascórbico e D-manitol foi observado durante pré-tratamento em amostras de sangue de HbAA e HbSS. Análise das hemoglobinas e dos componentes de suas cadeias globínicas, por HPLC (Cromatografia Líquida de Alta Performance), revelaram considerável efeito protetor por esses seqüestradores de radicais livres. Esses resultados indicaram que os danos induzidos pela HU à hemoglobina e aos componentes de suas cadeias globínicas podem ser reduzidos pelo seqüestro dos radicais livres (Iyamu *et al.*, 2001).

Como o organismo humano não dispõe de enzimas que atuam sobre o radical hidroxila, verdadeiro causador de estresse oxidativo, nosso organismo pode utilizar moléculas pequenas que diminuem a reatividade do radical hidroxila, tais como as vitaminas A, C e E, o beta caroteno, o ácido úrico e a molécula de glutathione reduzida (Percário *et al.*, 1994).

O AA *in vivo* é um co-fator essencial para enzimas envolvidas em reações de hidroxilação e por inativar o radical livre hidroxila, que pode destruir as

membranas celulares por meio de peroxidação lipídica (Halliwell, 2001; Lee *et al.*, 2001).

Tendo em vista os dados apresentados acima, sobre a possibilidade da HU gerar radicais livres, e sobre o efeito protetor do AA contra esses radicais, no presente trabalho foi realizado o co-tratamento de larvas de *Drosophila melanogaster*, com diferentes concentrações de HU, associado com AA, objetivando verificar se o AA possui efeito protetor contra os danos oxidativos induzidos pela HU. Os resultados encontrados permitiram sugerir que, nas condições experimentais utilizadas, possivelmente, a HU não atuou como geradora de radicais livres, assim como o AA não possui efeito protetor contra danos induzidos pela HU.

Com o objetivo de confirmar esses resultados, procedeu-se a comparação dos efeitos induzidos pela associação das diferentes concentrações de HU (1,5; 3,0 e 6,0 mM) + AA (50 mM) + DXR (0,2 mM) com os tratados com essas diferentes concentrações de HU + DXR, já que a DXR é um agente gerador de radicais livres. Concluiu-se que, nessas condições experimentais, o AA não possui efeitos genotóxicos; que tanto a HU como o AA, possivelmente, não agiram como seqüestradores de radicais livres, mas que a HU apresentou efeito genotóxico aditivo aos efeitos induzidos pela DXR.

A maioria dos trabalhos realizados com o AA demonstrou seus efeitos antimutagênicos, tanto em testes *in vitro* como *in vivo* em diferentes tecidos eucariotos, em linfócitos humanos, no teste do micronúcleo em *Allium* e em experimentos com *Drosophila* (Graf *et al.*, 1998), assim como, foi verificado que a DXR associada com o AA induziu decréscimo nas freqüências de aberrações cromossômicas, em células de medula óssea de ratos Wistar (Antunes e Takahashi, 1998).

Com relação ao efeito genotóxico do AA, recentemente, foram testadas várias concentrações de AA (25, 75 e 250 mM) em asas de *Drosophila melanogaster*, por meio do teste SMART, sendo que não houve aumento significativo na freqüência de manchas mutantes em nenhuma dessas concentrações, portanto o AA não parece ser genotóxico, confirmando os resultados obtidos nesse trabalho quanto a esse efeito. Co-tratamento de dicromato de potássio, composto altamente genotóxico em *Drosophila*, com as

três concentrações de AA, mencionadas anteriormente, reduziu drasticamente a frequência de clones mutantes induzida por esse composto. A menor concentração usada (25 mM) reduziu os danos ao nível do controle. Ao contrário, quando o 4-NQO (4-nitroquinolina 1-óxido) foi submetido aos mesmos procedimentos do dicromato de potássio, as diferentes concentrações de AA não fizeram nenhum efeito na genotoxicidade causada pelo 4-NQO, ou seja, o total de frequências de manchas após o co-tratamento não diferiu da induzida por esse composto sozinho (Kaya *et al.*, 2002). Tem sido indicado que o 4-NQO produz lesões complexas no DNA (Snyderwine e Bohr, 1992).

Ainda que, em geral, o AA não mostre efeitos genotóxicos *in vitro* ou *in vivo*, sob algumas condições, sua atividade genotóxica tem sido relatada em alguns estudos (Antunes, 1997). Fragiorge (2000), observou que na associação de AA (50 mM) e DXR (0,2 mM) houve diminuição na frequência de manchas mutantes nas células de asas de *Drosophila melanogaster*, enquanto que na associação de AA (100 mM) e DXR (0,2 mM) houve aumento dessa frequência. Experimentos *in vitro* com linfócitos humanos indicaram que o AA em alta concentração (1000 µg/ml) induziu aumento significativo na frequência de metáfases anormais (Antunes e Takahashi, 1999). Esses dados suportam que a concentração do AA (50 mM) utilizada neste experimento não é genotóxica.

Atividade clastogênica tem sido atribuída ao H₂O₂, resultante da oxidação do AA, na presença de oxigênio ou íons metais. Em alguns casos o AA age como um comutágeno, podendo promover a geração de radicais livres e induzir quebra de cromátides irmãs em cultura de células de mamíferos (Weitberg, 1987). Alguns trabalhos mostraram que, em cultura de linfócitos humanos, o AA foi efetivo na redução de micronúcleos induzidos pela DXR, em co-tratamento, sugerindo uma atividade desmutagênica do AA (Amara-Mokrane *et al.*, 1996). Enquanto que, outros mostraram que não há evidências claras sobre o efeito protetor do AA sobre a frequência de aberrações cromossômicas, incidência de micronúcleos ou quebras nos filamentos de DNA (Crott e Fenech, 1999). Neste experimento, o fato da HU apresentar efeito genotóxico direto, provavelmente por indução de lesões complexas (aberrações cromossômicas), as quais, possivelmente, não ocorreram por geração de radicais livres, pode explicar o motivo pelo qual o AA não agiu como seqüestrador de radicais livres.

Embora, a proteção antioxidante seja assumida para o AA contra danos oxidativos, os detalhes dessa proteção não são ainda completamente compreendidos. Em adição, sob diferentes condições, o AA parece ter atividade cognotóxica em vez de ação antigenotóxica normal. Porém, todos esses estudos são de interesse quando se investiga os diferentes modos pelos quais o AA pode interferir *in vivo* com os mecanismos de agentes genotóxicos. Outros experimentos deverão ser realizados para avaliar as ações anti e comutagênica do AA (Kaya *et al.*, 2002).

Alguns estudos sugerem que mutações da célula falciforme levam à formação de HbS instável e liberação de ferro, o que pode resultar na peroxidação de lipídeos e eventual danos à célula. Baseado nesses fatos, foi investigada a propriedade antioxidante da HU em células vermelhas do sangue. Estas células intactas ou suas membranas foram expostas ao t-butil hidroxiperoxido (t-BHP) ou ao ferro (sulfato ferroso) na presença ou ausência de HU. A extensão dos danos oxidativos foi avaliada pela peroxidação dos lipídeos, oxidação da Hb (% de metahemoglobina) e pelo decréscimo da atividade da membrana (Na^+/K^+ - ATPase e Ca_2 - ATPases). Os resultados mostraram que a HU inibiu a peroxidação dos lipídeos pelo t-BHP tanto nas membranas como na formação de metahemoglobina nas células intactas. A HU, também, inibiu a ação do ferro na peroxidação dos lipídeos e na formação de metahemoglobina em células intactas. Em adição, a HU bloqueou a ação do t-BHP nas mudanças das atividades da ATPase na membrana e na geração do radical hidroxila (OH) pelo ferro, de maneira dose-dependente. Concluiu-se, portanto, que a propriedade antioxidante da HU contribui para sua ação terapêutica nas células falciformes (Agil e Sadrzadeh, 2000).

Em conclusão, os resultados obtidos no presente trabalho sugerem que:

A Hidroxiuréia:

- teve efeito genotóxico direto, provavelmente por meio de indução de aberrações cromossômicas, as quais possivelmente não devem ter ocorrido por meio de geração de radicais livres;

- não foi seqüestradora de radicais livres, quando associada à DXR;
- não foi geradora de radicais livres, quando associada ao AA;
- apresentou efeito genotóxico aditivo aos da DXR.

A Doxorrubicina:

- teve efeito genotóxico direto, de acordo com dados preliminares do Laboratório de Mutagênese – UFU.

O Ácido Ascórbico:

- não apresentou efeitos genotóxicos;
- não protegeu contra efeitos genotóxicos da HU;
- não apresentou efeito genotóxico aditivo aos da HU.

No entanto, outros experimentos devem ser realizados para uma melhor avaliação dos possíveis riscos e/ou potencial protetor da HU, como também determinar as condições em que a mesma pode ser utilizada sem riscos para a saúde humana.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGIL, A. and SADRZADEH, S.M. (2000) Hydroxyurea protects erythrocytes against oxidative damage. *Redox Rep.*, 5 (1): 29-34.
- ALIVERTI, V.; BONANOMI, L. and GIAVINI, E. (1980) Hydroxyurea as a reference standard in teratological screening. *Arch. Toxicol. Suppl.*, 4: 239-242.
- AMARA-MOKRANE, Y.A.; LEBUCHER-MICHEL, M.P., BALANSARD, G.; DUMÉNIL, G. and BOTTA, A. (1996) Protective effects of α -hederin, chlorophyllin and ascorbic acid towards the induction of micronuclei by doxorubicin in cultured human lymphocytes. *Mutagenesis*, 11: 161-167.
- ANTUNES, L.M.G. (1997) *Efeito protetor das vitaminas C e E sobre os danos cromossômicos induzidos pelo antitumoral doxorubicina em células de mamíferos in vivo e in vitro*. Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo, para a obtenção do grau de Doutor, p 01-97.
- ANTUNES, L.M.G. and TAKAHASHI, C.S. (1998) Effects of high doses of vitamins C and E against doxorubicin-induced chromosomal damage in Wistar rat bone marrow cells. *Mutat. Res.*, 419: 137-143.
- ANTUNES, L.M. and TAKAHASHI, C.S. (1999) Protection and induction of chromosomal damage by Vitamin C in human lymphocyte cultures. *Teratog. Carcinog. Mutagen.*, 19: 53-59.
- ATWEH, G.F. and LOUKOPOULOS, D. (2001) Pharmacological induction of fetal hemoglobin in sickle cell disease and beta-thalassemia. *Sem. Hematol.*, 38 (4): 367-373.
- BECLOFF, G.I. (1967) Pharmacological, metabolic and clinical experience with hydroxyurea. *Clin. Trials J.*, 4: 873-883.

- BLUM, R.H. and KARTER, S.K. (1974) Adriamicin: A new anticancer drug with significant clinical activity. *Ann. Intern. Med.*, 80 (2): 249-259.
- CHARACHE, S. (1996) *Sickle Cell Anemia: The Effect of Hydroxyurea on Painful Crises*. Bristol-Myers Squibb Company, Princeton, New Jersey-USA, 12 p.
- CROTT, J.W. and FENECH, M. (1999) Effect of Vitamin C supplementation on chromosome damage, apoptosis and necrosis in vivo. *Carcinogenesis*, 23: 1035-1041.
- DAPKUS, D. and MERREL, D.J. (1997) Chromosomal analysis of DDT-resistance in a long-term select population of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 87: 685-697.
- FESSAS, P. and LOUKOPOULOS, D. (1974) The β -thalassaemias. *Clin. Haematol.*, 3: 411-435.
- FRAGIORGE, E.J. (2000) *Efeitos moduladores do ácido ascórbico quando associado ao cloridrato de doxorubicina em células somáticas de Drosophila melanogaster, tratadas na presença ou ausência de luz*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia-MG. 87p.
- FREI, H. and WÜRGLER, F.E. (1988) Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative or inconclusive result. *Mutat. Res.*, 203: 297-308.
- FRÖLICH, A. and WÜRGLER, F.E. (1989) New tester strains with improved bioactivation capacity for the *Drosophila* wing-spot test. *Mutation Research* 216: 179-187.
- GEBHART, E. (1981) Sister chromatid exchange (SCE) and structural chromosome aberration in mutagenicity testing. *Hum. Genet.*, 58: 235-237.

GILMAN, A.G.; GOODMAN, L.S.; RALL, T.W. and MURAD, F. (1987) As Bases Farmacológicas da Terapêutica. In: *Quimioterapia das Doenças Neoplásicas*. CALABRESI, P. e PARKS JUNIOR, R.E., Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., p. 845.

GOMEZ, S.; MOLINA, B.; SÀNCHEZ, S. and CARNEVALE, A. (2000) Increased Level of Chromosomal Aberrations Induced by Hydroxyurea Treatment During the G₂ Phase of Fanconi Anemia Cells Groups A to D. *EMS Abstracts. Departamento de Investigación en Genética Humana, Instituto Nacional de Pediatría, México*, p. 24.

GRAF, U.; WÜRGLER, F.E.; KATZ, A.J.; GRAF, U.; WÜRGLER, F.E.; KATZ, A.J.; FREI, H.; JUON, H.; HALL, C.B. and KALE, P.G. (1984) Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environ. Mutagen.*, 6:153-188.

GRAF, U.; FREI, H.; KÄGI, A.; KATZ, A.J. and WÜRGLER, F.E. (1989) Thirty compounds tested in the *Drosophila* wing spot test. *Mutat. Res.*, v. 222: p.359-373.

GRAF, U. and VAN SCHAIK, N. (1992) Improved high bioactivation cross for the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.*, 271: 59-67.

GRAF, U.; ABRAHAM, S.K.; GUZMÁN-RINCÓN, J. and WÜRGLER, F.E. (1998) Antigenotoxicity studies in *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.*, 402 (1-2): 203-209.

GUZMÁN-RINCÓN, J.; GRAF, U.; VARELA, A.; POLICRONIADES, R. and DELFÍN, A. (1994) Mutación y recombinación somáticas inducidas por neutrones rápidos en la prueba de la mancha del ala de *Drosophila melanogaster*. *Rev. Int. Contam. Ambient*, 10: 29-30.

GUZMÁN-RINCÓN, J. and GRAF, U. (1995) *Drosophila melanogaster* somatic mutation and recombination test as a biomonitor. In: *Biomonitoring and Biomarkers as Indicators of Environmental Change*, Edited by F.M. Butterworth et al., Plenum Press, N.Y., pp 169-181.

HALLIWELL, B. (2001) Vitamin C and genomic stability. *Mutat. Res.*, 475: 29-35.

HÄLLSTRÖM, I. and BLANCK, A. (1985) Genetic regulation of the cytochrome P-450-dependent reactions. *Chem. Biol. Interact.*, 56: 157-171.

IYAMU, E.W.; FASOLD, H. and ROA, D. (2001) Hydroxyurea-induced oxidative damage of normal and sickle cell hemoglobins in vitro: amelioration by radical scavengers. *J. Clin. Lab. Anal.*, 15 (1): 1-7.

KAYA, B.; CREUS, A.; VELÁZQUEZ, A.; YANIKOGLU, A. and MARCOS, R. (2002) Genotoxicity is modulated by ascorbic acid studies using the wing spot test in *Drosophila*. *Mutat. Res.*, 520: 93-101.

KEIZER, H.G.; PINEDO, H.M.; SCHUURUIS, G.J. and JOENJE, H. (1990) Doxorubicin (Adriamycin): A critical review of free radical-dependent mechanisms of cytotoxicity. *Pharmacol. Ther.*, 47: 219-231.

LEE, S.H.; OE, T. and BLAIR, I.A. (2001) Vitamin C-induced decomposition of lipid hydroperoxides to endogenous genotoxins. *Science*, 292: 2083-2086.

LOUKOPOULOS, D. (1997) New therapies for the haemoglobinopathies. *J. Intern. Med.*: 242 (Supplement 740): 43-48.

MALPAS, J.S. (1967) Assessment of hydroxyurea in leukaemia. *Clin. Trials J.*, 4: 887-893.

- MOORE, E.C. and HURLBERT, R.B. (1985) The inhibition of ribonucleoside diphosphate reductase by hydroxyurea, guanazole and pyrazoloimidazole (IPMY). *Pharmacol. Ther.*, 27: 167.
- ODIN, A.P. (1997) Vitamins as antimutagens: advantages and some possible mechanisms of antimutagenesis action. *Mutat. Res.*, 386: 39-67.
- PARRILLO, J.E.; FAUCI, A.S. and WOLFF, S.M. (1978) Therapy of the hypereosinophilic syndrome. *Ann. Intern. Med.*, v. 89, p. 167-172.
- PERCÁRIO, S.; VITAL, A.C.C. and FELIPPE JUNIOR, J. (1994) Efeito de duas formas farmacêuticas da Vitamina E sobre peroxidação lipídica. *Rev. Soc. Bras. Med. Biomolec. Rad. Livres*, 1 (1): 17-18.
- SEMINARI, E.; LISZIEWICZ, J.; TINELLI, C.; FOLI, A.; LORI, F. and MASERATI, R. (1999) Hydroxyurea toxicity combined with didanosine (ddI) in HIV-1 seropositive asymptomatic individuals. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther. Toxicol.*, 37 (10): 514-518.
- SNYDER, R.D. (1984) The role of deoxynucleoside triphosphate pools in the inhibition of DNA-excision repair and replication in human cells by hydroxyurea. *Mutat. Res.*, 131: 163-166.
- SNYDERWINE, E.G. and BOHR, V.A. (1992) Gene and strand-specific and repair in Chinese hamster ovary cells treated with 4-nitroquinoline 1-oxide. *Cancer Res.*, 52: 4183-4189.
- SPANÓ, M.A.; FREI, H.; WÜRGLER, F.E. and GRAF, U. (2001) Recombinogenic activity of four compounds in the standard and high bioactivation crosses of *Drosophila melanogaster* in the wing spot test. *Mutagenesis*, 16: 385-394.
- TIMSON, J. (1975) Hydroxyurea. *Mutat. Res.*, 32: 115-132.

VOGEL, E.W. and ZIJLSTRA, J.A. (1987a) Mechanistic and methodological aspects of chemically-induced somatic mutation and recombination in *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.*, 182: 243-264.

VOGEL, E.W. and ZIJLSTRA, J.A. (1987b) Somatic cell mutagenicity in *Drosophila melanogaster* in comparison with genetic damage in early germ-cell stages. *Mutat. Res.*, 180: 189-200.

VOGEL, E.W. and NIVARD, M.M.J. (1993) Performance of 181 chemicals in recombination. *Mutagenesis*, 8: 57-81.

VOSKARIDOU, V.; KALOTYCHOU, V. and LOUKOPOULOS, D. (1995) Clinical and Laboratory effects of long term administration of hydroxyurea to patients with sickle cell/ β -thalassemia. *Br. J. Haematol.*, 89: 479-484.

WEITBERG, A.B. (1987) Antioxidants inhibit the effects of Vitamin C on oxygen radical-induced sister-chromatid exchanges. *Mutat. Res.*, 191: 53-56.

WÜRGLER, F.E.; GRAF, U. and FREI, H. (1985) Somatic mutation and recombination test in wings of *Drosophila melanogaster*. In: ASHBY, J.; DE SERRES, F.J.; DRAPER, M. and ISHIDATE, M. (eds) *Progress in Mutation Research*, vol. 5, *Collaborative Study of Short-term Tests for Carcinogens*. Elsevier/North-Holland, Amsterdam, The Netherlands, p. 325-340.

ZIEGLER-SKYLAKAKIS, K.; SCHWARZ, L.R. and ANDRAE, U. (1985) Microsome- and hepatocyte-mediated mutagenicity of hydroxyurea and related aliphatic hydroxamic acids in V79 Chinese hamster cells. *Mutat. Res.*, 152: 225.