

Universidade Federal de Uberlândia

Instituto de Genética e Bioquímica

Pós-Graduação em Genética e Bioquímica

MON
E 77.16
C 837 e
TES/MEM

Efeito protetor de antioxidantes (vitaminas C, E e beta-caroteno) e minerais (cobre, selênio e zinco) contra a ação genotóxica da doxorubicina em células somáticas de *Drosophila melanogaster*

Aluno: Wender Ferreira Costa

Orientador: Júlio César Nepomuceno

SISBI/UFU



1000220653

Uberlândia – MG

2005

Universidade Federal de Uberlândia

Instituto de Genética e Bioquímica

Pós-Graduação em Genética e Bioquímica

Efeito protetor de antioxidantes (vitaminas C, E e beta-caroteno) e minerais (cobre, selênio e zinco) contra a ação genotóxica da doxorubicina em células somáticas de *Drosophila melanogaster*

Aluno: Wender Ferreira Costa

Orientador: Prof. Dr. Júlio César Nepomuceno

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica, da Universidade Federal de Uberlândia, para a obtenção do grau de Mestre em Genética e Bioquímica (Área Genética)

Uberlândia – MG

2005

FICHA CATALOGRÁFICA

Elaborado pelo Sistema de Bibliotecas da UFU / Setor de
Catalogação e Classificação

C837e Costa, Wender Ferreira, 1976-
Efeito protetor de antioxidantes (vitaminas C, E e beta-caroteno) e
minerais (cobre, selênio e zinco) contra a ação genotóxica de doxorrubi-
cina em células somáticas de *Drosophila melanogaster* / Wender Ferreira
Costa. - Uberlândia, 2005.
43f. : il.
Orientador: Júlio César Nepomuceno.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pro-
grama de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.
Inclui bibliografia.
1. Vitaminas - Teses. 2. *Drosophila melanogaster* - Teses. 3. Doxor-
ubicina - Teses. 4. Vitergan zinco plus - Teses. I. Nepomuceno, Júlio
César. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Gradua-
ção em Genética e Bioquímica. III. Título.

CDU: 577.16(043.3)

Universidade Federal de Uberlândia

Instituto de Genética e Bioquímica

Pós-Graduação em Genética e Bioquímica

**Efeito protetor de antioxidantes (vitaminas C, E e beta-caroteno)
e minerais (cobre, selênio e zinco) contra a ação genotóxica da
doxorubicina em células somáticas de *Drosophila melanogaster***

Wender Ferreira Costa

Comissão organizadora

Presidente: Prof. Dr. Júlio César Nepomuceno (Orientador)

Examinadores: Prof^a. Dra. Lusânia Maria Gregg Antunes

Prof. Dr. Mário Antônio Spanó

Data da Defesa: 28 / 02 / 2005

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas da PGGB para o formato da Dissertação/Tese foram contempladas

Prof. Dr. Júlio César Nepomuceno

Uberlândia, ____ / ____ / _____

À minha esposa, **Luciene Pereira de Carvalho
Costa**, pelo constante apoio e compreensão.

Agradecimentos Especiais

Ao meu pai, Joaquim Teodoro Costa,

Minha mãe, Neuza Aparecida Ferreira Costa

Meu irmão, Marcelo Ferreira Costa

Minha Tia e madrinha, Sonea Maria Ferreira Cruz,

Meu Tio e padrinho Armando Parreira de Oliveira

Estas são pessoas sem as quais eu não teria a mínima condição de realizar este trabalho e principalmente são pessoas de um caráter inigualável.

À minha sobrinha e afilhada, recém chegada,
Lorena Nunes Ferreira

Agradecimentos

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Júlio César Nepomuceno**, pela paciência, amizade e principalmente pelo compromisso da aprendizagem contínua.

Aos membros da banca examinadora, pela disponibilidade na leitura e sugestões neste trabalho.

Ao **Prof. Dr. Ulrich Graf** do instituto de Toxicologia-Universidade de Zurich, Schwerzenbach, Suíça, pelo fornecimento das linhagens mutantes de *Drosophila melanogaster*.

Ao **Prof. Dr. Mário Antonio Spanó**, pelo carisma e incentivo durante a realização do trabalho.

Aos colegas do laboratório da Universidade Federal de Uberlândia, desde o nível de graduação, mestrado e doutorado, pela colaboração.

Aos colegas do laboratório de Citogenética e Mutagênese do UNIPAM (Centro Universitário de Patos de Minas), em especial ao Antonio Joaquim de Souza Castro, pelo constante apoio e pela sua colaboração no trabalho.

A técnica do Laboratório de Mutagênese, **Maria Aparecida Vilela Gomes**, pela sua amizade e confiança.

Sumário

Capítulo Geral

	Página
1. Introdução Geral	01
1.1 Radicais livres e antioxidantes	01
1.2 Vitaminas	04
1.2.1 Beta-caroteno	05
1.2.2 Vitamina E	05
1.2.3 Vitamina C	06
1.3 Doxorubicina	07
1.4 Teste para detecção de Mutação e Recombinação Somática (Somatic Mutation And Recombination Test– SMART) em células somáticas de <i>Drosophila melanogaster</i>	09

Capítulo Único

	Página
1. Introdução	15
1.1 Resumo	17
1.2 Abstract	18
2. Material e Métodos	19
2.1 Compostos químicos	19
2.2 Modo de preparo do polivitamínico e polimineral (PVM)	20
2.3 Linhagens estoques e testadoras de <i>Drosophila melanogaster</i>	20
2.4 Procedimentos para coleta de ovos	20
2.5 Procedimento Experimental	21

2.5.1 Co-tratamento	21
2.5.2 Pré-tratamento	21
2.6 Preparação e análise microscópica das asas	21
2.7 Análise estatística	22
3. Resultados e Discussão	23
3.1 Co-tratamento	23
3.2 Pré-tratamento	25
4. Referências Bibliográficas	35

Lista de Tabelas

Página

Tabela 1. Freqüências de manchas mutantes observadas nos descendentes trans-heterozigotos de *D. melanogaster*, dos cruzamentos padrão e alta bioativação metabólica, tratados com polivitamínico e polimineral (PVM) em três diferentes doses 29

Tabela 2. Freqüências de manchas mutantes observadas nos descendentes trans-heterozigotos e heterozigotos balanceados de *D. melanogaster*, do cruzamento padrão, tratados com o polivitamínico e polimineral (PVM) em três diferentes doses associadas com DXR (0,22mM) 30

Tabela 3. Freqüências de manchas mutantes observadas nos descendentes trans-heterozigotos e heterozigotos balanceados de *D. melanogaster*, do cruzamento de alta bioativação metabólica, tratadas com o polivitamínico e polimineral (PVM) em três diferentes doses associadas com DXR (0,22mM) 31

Tabela 4. Freqüências de manchas mutantes observadas nos descendentes trans-heterozigotos de *D. melanogaster*, dos cruzamentos padrão e alta bioativação metabólica, pré-tratados com polivitamínico e polimineral (PVM), em três diferentes doses e posteriormente tratados com DXR (0,22mM)..... 32

Lista de Figuras

Introdução Geral

	Página
Figura 1. Fórmula estrutural do beta-caroteno	05
Figura 2. Fórmula estrutural da vitamina E	06
Figura 3. Fórmula estrutural da vitamina C	07
Figura 4. Fórmula estrutural do quimioterápico Doxorubicina	08
Figura 5. (A ₂) Pêlos <i>multiple wing hairs</i> ; (A ₁) Pêlos normais; (B) Pêlos <i>flare</i> ³	10
Figura 6. (A) Fenótipo das asas dos descendentes trans-heterozigotos (<i>mwh / flr</i> ³); (B) Fenótipo das asas dos descendentes heterozigotos balanceados (<i>mwh / TM3, Bd</i> ^s)	11

Lista de Figuras

Capítulo Único

	Página
Figura 1. Distribuição de manchas nos descendentes trans-heterozigotos do cruzamento padrão (ST)	33
Figura 2. Distribuição de manchas nos descendentes trans-heterozigotos do cruzamento de alta bioativação metabólica (HB)	33
Figura 3. Freqüência percentual de mutação e recombinação, do cruzamento padrão (ST), obtidas dos descendentes marcadores trans-heterozigotos (MH) e heterozigotos balanceados (BH)	34
Figura 4. Freqüência percentual de mutação e recombinação, do cruzamento de alta bioativação metabólica (HB), obtidas dos descendentes marcadores trans-heterozigotos (MH) e heterozigotos balanceados (BH)	34

Lista de Abreviaturas

- DNA** – Ácido Desoxirribonucleico
- RNA** – Ácido Ribonucleico
- BH** – Heterozigoto balanceado
- CAS** – “Identidade Internacional” para todo composto químico manipulável
- CM** – Centímetro
- CNPq** – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
- DDT** - *para-diclorodifeniltricloroetano*
- DNA** – Ácido Desoxirribonucleico
- DXR** – Doxorubicina
- ERO** – Espécies Reativas de Oxigênio
- FAPEMIG** – Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais
- flr** – *Flare*
- GR** – Grama
- HB** – *High Bioactivation Cross*
- MH** – Marcador trans-Heterozigoto
- mM** – Milimolar
- mwh** – *multiple wing hairs*
- O₂** – Oxigênio
- OH** – Radical Hidroxila
- ORR** – *Oregon R (R)*
- RL** – Radicais Livres
- SMART** – *Somatic Mutation And Recombination Test*
- ST** – Standard Cross
- TM3 bd^s** – *Third Multiple3 Beaded Serrate*
- UFU** – Universidade Federal de Uberlândia
- UI/d** – Unidade Internacional / dia
- PVM** – Polivitamínico e polimineral

1. Introdução Geral

1.1 Radicais livres e antioxidantes

Um radical livre é uma espécie química (átomo ou molécula) que possui um elétron desemparelhado no seu orbital de valência (número ímpar de elétron). Esta situação confere ao radical uma alta reatividade química, especialmente como agente oxidante, pela tendência de adquirir o segundo elétron para estabilizar o seu orbital de valência. Os radicais livres mais importantes nos organismos vivos incluem os radicais hidroxil (OH^\bullet), ânion superóxido (O_2^-), óxido nítrico (NO), alcoxil (ROH), peroxil (ROOH). O peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o oxigênio simples (O_2) e o ozônio (O_3), não são radicais livres, mas estão muito envolvidos em reações que geram radicais livres nos organismos vivos. O termo espécies reativas de oxigênio (ERO) tem sido preferencialmente usado por incluir todas essas espécies, radicalares ou não, que contêm oxigênio (PICADA et al., 2003).

Estas espécies reativas de oxigênio reagem com biomoléculas nas células, incluindo o ácido desoxirribonucléico (DNA). A consequência dos danos ao DNA, que é também chamado de dano oxidativo ao DNA, desempenha um papel importante, sendo estudado na mutagênese, carcinogênese e envelhecimento (POULSEN et al., 1998; DIZDAROGLU et al., 2002; KASAI, 2002).

Radicais livres, particularmente OH^\bullet , geram um grande número de modificações no DNA por uma variedade de mecanismos. Estes incluem modificações no açúcar e na base, quebras na fita dupla e cross-links no DNA-proteína. A mensuração dos resultados produzidos é, atualmente, um enorme desafio para a ciência (DIZDAROGLU et al., 2002). As agressões celulares, que afetam o DNA, podem resultar em produtos nocivos pelo metabolismo do oxigênio e outros agentes ambientais. Embora a maioria das agressões ao DNA seja reparada, alguns tipos de lesões são parcialmente reparados e, com isso, acumulam-se nas células, levando a mudanças genéticas deletérias ao longo das divisões celulares (CHATGILIALOGLU; O'NEILL, 2001).

A produção contínua de ERO, durante os processos metabólicos, leva ao desenvolvimento de muitos mecanismos de defesa antioxidantes, para limitar os níveis intracelulares e impedir a indução de danos (SIES, 1993; BIANCHI e ANTUNES, 1999; SIES e STAHL, 1995). A produção excessiva de ERO ou a diminuição das defesas antioxidantes provocam um desequilíbrio no estado redox celular conhecido como estresse oxidativo (PICADA et al., 2003).

Os antioxidantes atuam em diferentes níveis na proteção dos organismos:

- O primeiro mecanismo de defesa contra os radicais livres é impedir a sua formação, principalmente pela inibição das reações em cadeia com o ferro e o cobre.
- Os antioxidantes são capazes de interceptar os radicais livres gerados pelo metabolismo celular ou por fontes exógenas, impedindo o ataque sobre os lipídeos, os aminoácidos das proteínas, a dupla ligação dos ácidos graxos poliinsaturados e as bases do DNA, evitando a formação de lesões e perda da integridade celular. Os antioxidantes obtidos da dieta, tais como as vitaminas C, E e A, os flavonóides e carotenóides são extremamente importantes na interceptação dos radicais livres.
- Outro mecanismo de proteção é o reparo das lesões causadas pelos radicais. Esse processo está relacionado com a remoção de danos da molécula de DNA e a reconstituição das membranas celulares danificadas.
- Em algumas situações pode ocorrer uma adaptação do organismo em resposta a geração desses radicais com o aumento da síntese de enzimas antioxidantes (BIANCHI e ANTUNES, 1999).

Os organismos eucarióticos possuem enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase, a catalase e a glutathione peroxidase que reagem com os compostos oxidantes e protegem as células e os tecidos do estresse oxidativo (TRABER, 1997).

As terapias empregadas para o combate ao câncer são a radioterapia, a quimioterapia, a imunoterapia, a hormonioterapia e a cirurgia. Cerca de 90% dos tumores podem ser tratados com antitumorais, o que faz da quimioterapia a modalidade mais utilizada. Este tratamento consiste na administração de

quimioterápicos, que constituem um grupo de aproximadamente 300 drogas que atuam no DNA para impedir o crescimento das células mutantes. Todavia, estas drogas não são seletivas, sendo tóxicas aos tecidos sadios, principalmente aqueles de rápida proliferação celular (ANDREOLI et al., 1994; BONASSA, 1998).

Durante a quimioterapia antineoplásica são, também, formados os radicais livres. Embora indesejados são necessários, pois é parte do mecanismo de ação destas drogas. A maioria dos agentes antitumorais interfere na síntese de DNA, ácido ribonucléico (RNA), de proteínas ou no funcionamento adequado de moléculas pré-formadas. Este fato proporciona a liberação de várias substâncias tóxicas ao organismo, que afetam células sadias de tecidos de rápida proliferação celular. Os efeitos terapêuticos e tóxicos dos quimioterápicos dependem do tempo de exposição, da concentração plasmática e da droga utilizada (SKEEL, 1993).

A terapia nutricional com antioxidantes, concomitante à administração de drogas antineoplásicas, apresenta vários benefícios ao tratamento de pacientes oncológicos. A oferta de vitaminas antioxidantes, como as vitaminas A, E e C, associada às drogas antitumorais, resulta em menores efeitos colaterais e permite que a continuidade do tratamento empregado não seja prejudicada, pois a toxicidade causada pelas drogas antineoplásicas é fator limitante desta terapia. Desta forma, a terapêutica nutricional, baseada na utilização de antioxidantes, pode ampliar os conceitos da terapia oncológica atual e permitir melhores resultados quanto ao controle do câncer (SANTOS e CRUZ, 2001).

Portanto, os nutrientes antioxidantes, como as vitaminas A, C e E minimizam os efeitos tóxicos produzidos pelas drogas antineoplásicas e interferem positivamente na resposta ao tratamento empregado. As interações entre antitumorais e antioxidantes promovem a potencialização do mecanismo de ação das drogas, resultando em diminuição do tamanho do tumor com produção de menores efeitos colaterais, melhoria da qualidade de vida dos pacientes oncológicos e maior tempo de sobrevivência (WEIJL et al., 1998; LAMSONI e BRIGNALL, 1999).

1.2 Vitaminas

Vitaminas são compostos orgânicos que não podem ser sintetizados pelo organismo humano. Portanto, têm que ser ingeridas para prevenir doenças. As deficiências em algumas vitaminas causam síndromes clássicas tais como, escorbuto, beribéri e pelagra (lesões na pele), muito comuns na sociedade ocidental. O consumo inadequado ou doses insuficientes de várias vitaminas são fatores de risco para o aparecimento de doenças crônicas, como o câncer, doenças cardiovasculares e osteoporose (FAIRFIELD e FLETCHER, 2002).

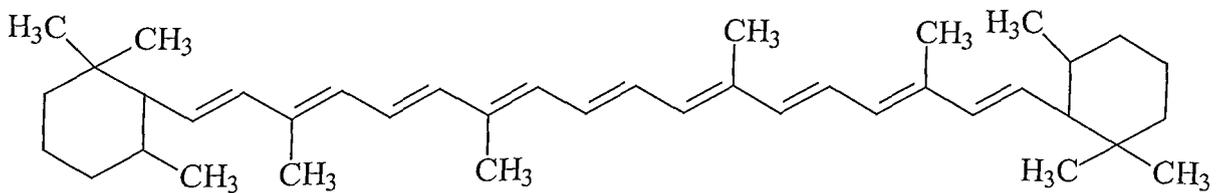
Nos últimos anos, o consumo de vitaminas, minerais e ervas como suplemento alimentar tem aumentado acentuadamente. As suplementações com vitaminas e minerais são geralmente mais utilizadas do que as ervas medicinais. As suplementações mais comuns entre os usuários nos Estados Unidos são as multivitaminas (75%), seguidas de vitamina C (42%), vitamina E (40%) e cálcio (36%). As ervas medicinais mais utilizadas são ginseng (14%) *ginkgo biloba* (13%) (PASCHEL, 1998). No período de julho de 1998 a final de junho de 1999 os Estados Unidos consumiram 10,4 bilhões de dólares em suplementação alimentar com vitaminas, minerais e ervas medicinais (GOTTLIEB, 1999). Estima-se que 30,6 milhões de consumidores usaram vitamina E, regularmente, em 1998 nos Estados Unidos. Destes, 60% eram mulheres com idade superior a 35 anos e média de 52 anos (HARTMAN GROUP, 2000). Em 1999 este consumo chegou a atingir 95% das famílias americanas (HASHIZUME e PARK, 2000). Dados mais recentes têm fornecido valores menores quanto ao consumo, chegando a pouco mais da metade da população adulta dos Estados Unidos (HALSTED, 2003). Em 1998 os japoneses comercializaram 18 bilhões de dólares em suplementação alimentar com vitaminas, 10 vezes mais que toda a Europa (TEAM CANADA, 1999).

1.2.1 Beta-caroteno

O beta-caroteno (Figura 1) é o carotenóide encontrado na natureza com maior poder de formação de vitamina A. Ele é capaz de conferir proteção contra diversos tipos de tumores em animais. Entre as suas funções está a capacidade de inibir a oxidação de compostos pelos peróxidos (LEDERER, 1990).

Lamsoni e Brignall (1999) observaram que em ratos a administração de vitamina A, associada ao metotrexato, minimiza o dano intestinal sem inibir a atividade antineoplásica da droga.

Nos pacientes que receberam quimioterapia e suplementação vitamínica, a média de sobrevivência foi de 12,3 meses, em comparação ao grupo controle, cuja média foi de 3,1 meses. As vitaminas antioxidantes proporcionam melhores condições de vida aos pacientes (PYRHONEN et al., 1995).



Fonte: Princípios de Bioquímica 1995.

Figura 1. Fórmula estrutural do beta-caroteno.

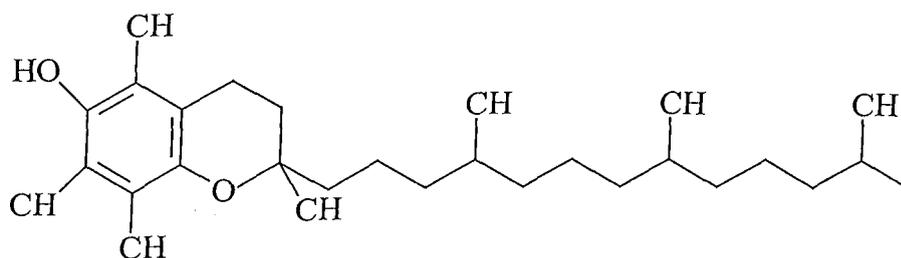
1.2.2 Vitamina E

A vitamina E (Figura 2) é outro antioxidante de grande importância, e sua forma mais importante é o alfa-tocoferol. Sua função como antioxidante é proteger os tecidos adiposos do ataque de radicais livres (LEDERER, 1990). Ela impede que as células tumorais continuem o ciclo celular, interrompendo-o na fase G₁ e conduzindo à apoptose (LAMSONI e BRIGNALL, 1999).

De acordo com Packer (1984) a vitamina E atua em nível de cadeia transportadora de elétrons, impedindo que os radicais livres atuem nos lipídios da

crista mitocondrial. Com isso, os radicais livres são convertidos em radicais peróxido e reduzidos posteriormente a álcoois.

Hussein (1993) mostrou que a administração de altas doses de alfa-tocoferol (1600 UI/d), dadas 72 horas antes do início da quimioterapia, impediu a alopecia em cerca de 69% dos pacientes. De acordo com o autor, entre as drogas com maior potencial para induzir a alopecia estão a doxorrubicina, ciclofosfamida e vincristina.



Fonte: Princípios de Bioquímica 1995.

Figura 2. Fórmula estrutural da vitamina E.

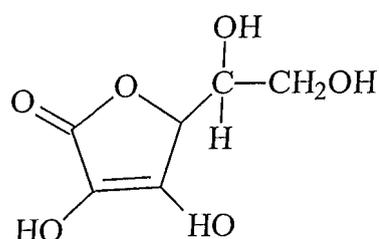
1.2.3 Vitamina C

A vitamina C (Figura 3), também conhecida como ácido ascórbico, é uma vitamina hidrossolúvel e antioxidante que reage diretamente com o oxigênio simples, radical hidroxila e radical superóxido. Além disto, esta vitamina mantém as enzimas em seus estados reduzidos e poupa a glutathione peroxidase, que é um importante antioxidante intracelular e co-fator enzimático (CARR e FREI, 1999).

O efeito modulador de altas doses de vitamina C e E e suas combinações, sobre o efeito clastogênico da doxorrubicina na medula óssea de animais, foi investigado e os resultados mostraram que os animais tratados somente com doxorrubicina apresentaram alta frequência de aberrações cromossômicas, bem como metáfases anormais. Quando as vitaminas C e E, foram administradas sozinhas ou em associação com a droga, na quantidade de 100 mg de

vitamina/Kg de peso, produziram redução no número total de aberrações cromossômicas e na percentagem de metáfases anormais, induzidas pela doxorrubicina. Então, pode-se dizer que a administração concomitante de vitaminas antioxidantes e antineoplásicos é importante, pois parecem proteger as células sadias dos danos causados pelas drogas, principalmente as células dos tecidos de rápida proliferação celular (ANTUNES e TAKAHASHI, 1998).

Apesar de tão promissores, os resultados provenientes da terapia nutricional com antioxidantes aplicada ao paciente oncológico, a pesquisa a respeito deste tema ainda é muito reduzida, se for levada em consideração a grande possibilidade de combinações entre estes nutrientes e agentes antineoplásicos. Além disto, esta terapia é ainda muito pouco empregada no tratamento de pacientes oncológicos no Brasil (SANTOS e CRUZ, 2001).



Fonte: Princípios de Bioquímica 1995.

Figura 3. Fórmula estrutural da vitamina C.

1.3 Doxorrubicina

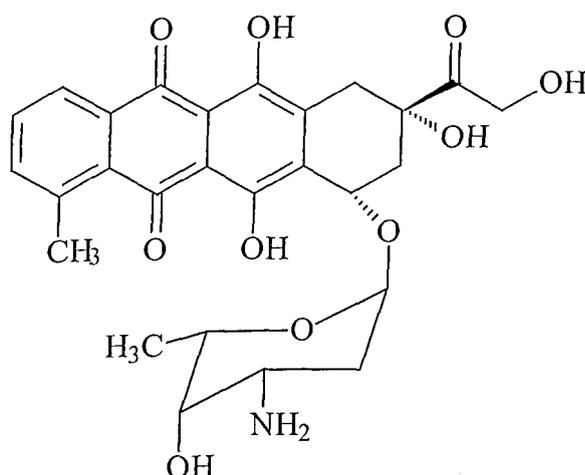
De acordo com o fabricante (Pharmacia & Upjohn S.p.A.) o cloridrato de doxorrubicina é um antibiótico antitumoral antraciclínico isolado de culturas de *Streptomyces peucetius var. caesius*.

Também de acordo com o fabricante, as propriedades citotóxicas da doxorrubicina (Figura 4), sobre as células malignas e os seus efeitos tóxicos em vários organismos parecem estar relacionados com a intercalação dos seus anéis entre os pares de bases de nucleotídeos, com conseqüentes danos à síntese de DNA e atividade sobre a membrana lipídica celular. A intercalação ao DNA inibe a replicação nucleotídica e pode desencadear a quebra do DNA pela

topoisomerase-II, originando distúrbios sérios na estrutura terciária do DNA. A capacidade da doxorubicina de se ligar à membrana celular pode afetar uma variedade de funções. A doxorubicina também parece estar envolvida nas reações de oxidação/redução com a produção de radicais livres altamente reativos e altamente tóxicos. Células tratadas com doxorubicina têm manifestado alterações nas características morfológicas associadas a apoptose, o que pode ser um integrante do mecanismo de ação da doxorubicina.

Propriedades farmacocinéticas: a doxorubicina é ativa durante todo o ciclo celular, incluindo na interfase. Tecidos de rápida proliferação, como os tecidos tumorais (mas também a medula óssea, mucosa gastrointestinal e oral e folículos capilares) são os mais sensíveis aos efeitos antiproliferativos da doxorubicina. A droga é metabolizada principalmente no fígado, sendo que o seu principal metabólito é o 13-OH-doxorrubicinol, que possui atividade antitumoral.

A doxorubicina é um dos melhores agentes antitumorais disponíveis para uso clínico. Além disso, a intercalação na molécula de DNA, causada pela droga, gera radicais livres. Essa capacidade de gerar uma variedade de espécies de radicais livres nos sistemas subcelulares tem sido considerada essencial para sua ação antitumoral (KEIZER et al., 1990).



Fonte: www.s bq.org.br

Figura 4. Fórmula estrutural do quimioterápico Doxorubicina.

1.4 Teste para detecção de Mutação e Recombinação Somática (Somatic Mutation And Recombination Test – SMART) em células somáticas de *Drosophila melanogaster*

A *Drosophila melanogaster* é o organismo teste do SMART (Somatic Mutation And Recombination Test), também conhecido como o teste da mancha da asa. O teste, desenvolvido por Graf et al. (1984), para detecção de agentes genotóxicos, vem sendo usado também para detecção de antígenotóxicos. A *D. melanogaster*, organismo eucariótico, tem se mostrado ideal para estudos de genotoxicidade e antígenotoxicidade *in vivo*, por possuir pequeno número de cromossomos, sistema enzimático semelhante ao dos mamíferos, tempo curto de geração, grande número de mutantes e linhagens bem caracterizadas (GRAF et al., 1984; VOGEL e ZILSTRA, 1987).

O teste de mutação e recombinação somática possui uma alta eficiência para detectar a atividade genotóxica de mutágenos selecionados de várias classes químicas. O espectro de compostos cuja genotoxicidade pode ser detectada com este bioensaio vai desde agentes alquilantes, com forte atuação, a um grande número de promutágenos, ativados por diferentes vias metabólicas de biotransformação enzimática. A versatilidade do procedimento experimental permite testar desde compostos estáveis a compostos instáveis. Também é possível não apenas testar substâncias que são dissolvidas, mas também químicos gasosos (GRAF et al., 1984).

Para a realização do teste para detecção de mutação e recombinação somática são utilizadas três linhagens:

1) Linhagem *multiple wing hairs (mwh)*: esta linhagem possui no cromossomo-3, um alelo mutante que altera o fenótipo dos pêlos da asa de *D. melanogaster*. Esse alelo está presente em homozigose na linhagem *mwh*. As células da asa da *D. melanogaster* são caracterizadas por possuir um único pêlo por célula (Figura 5 – A₁), porém, quando esta possui o alelo mutante *mwh*, o fenótipo apresentado será de três ou mais pêlos por células (Figura 5 – A₂).

2) Linhagem *flare-3 (flr³)*: esta linhagem possui também no cromossomo-3, porém, em uma posição mais próxima ao centrômero, um alelo mutante que

altera o fenótipo dos pêlos da asa. O fenótipo provocado por este alelo mutante é um pêlo “deformado” que se assemelha a uma chama de fogo. Contudo, a linhagem não possui este alelo em homozigose nas células do seu corpo, pois seria letal para o indivíduo. Com isso, a linhagem estoque é mantida, portando em um cromossomo o gene *flr*³ e no mesmo locus, no outro cromossomo, um balanceador que possui múltiplas inversões, e recebe o nome de *TM3 bd*^s. Portanto, a mutação *flr*³ será viável, apenas quando algumas células do disco imaginal carregarem a mutação (Figura 5 - B).

3) Linhagem *ORR*: esta linhagem de *D. melanogaster* foi construída com o objetivo de aumentar a capacidade metabólica na ativação de promutágenos. Alguns aspectos do controle genético do metabolismo de xenobióticos em *D. melanogaster* já são conhecidos. Na linhagem resistente ao DDT, Oregon R (R), o gene *R1* na posição 65,0 do cromossomo-2, é responsável para os altos níveis de expressão da citocromo P-450, típicas para esta linhagem. Por conseguinte, os cromossomos 1 e 2 das linhagens *mwh* e *flr*³ foram substituídos pelos cromossomos 1 e 2 da linhagem Oregon R (R) (FRÖLICH e WÜRGLER, 1989).

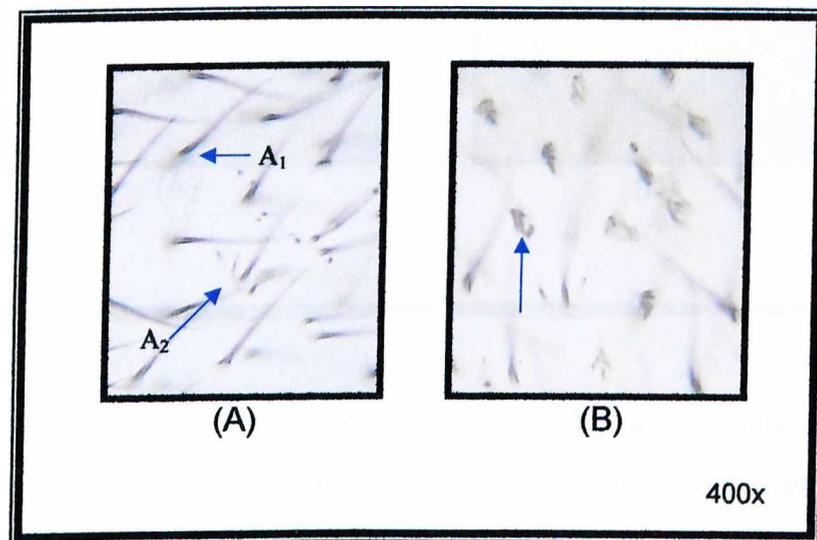


Figura 5. (A₂) Pêlos *multiple wing hairs*; (A₁) Pêlos normais; (B) Pêlos *flare*³.

Para a realização dos experimentos são feitos dois tipos de cruzamentos:

- Cruzamento padrão (ST – *Standard Cross*): fêmeas virgens *flr³* cruzadas com machos *mwh* (GRAF et al., 1989).
- Cruzamento de alta bioativação (HB - *High Bioactivation Cross*): fêmeas virgens *ORR / ORR; flr³ / TM3 Bd^s* cruzadas com machos *mwh* (GRAF e VAN SCHAİK, 1992).

O cruzamento de alta bioativação metabólica (HB), permite a detecção de promutágenos devidos aos altos níveis de citocromo P-450 da linhagem Oregon R (R), enquanto o cruzamento padrão permite a detecção de mutágenos diretos.

Desses cruzamentos foram obtidos dois tipos de descendentes: trans-heterozigotos marcados (MH: *mwh + /+ flr³*) que possuem asas fenotipicamente do tipo selvagem; e heterozigotos balanceados (BH: *mwh + / TM3, Bd^s*) que possuem asas fenotipicamente serrilhadas (Figuras 6).

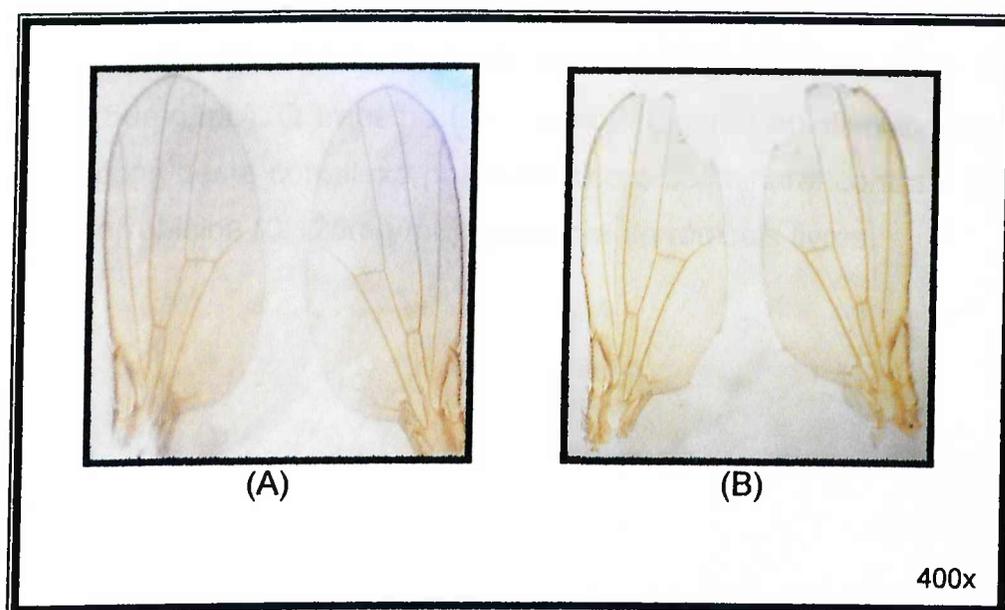


Figura 6. (A) Fenótipo das asas dos descendentes trans-heterozigotos (*mwh + /+ flr³*); (B) Fenótipo das asas dos descendentes heterozigotos balanceados (*mwh + / TM3, Bd^s*).

Nos descendentes MH é possível detectar a ocorrência de diferentes eventos genéticos, tais como mutação de ponto, aberrações cromossômicas, e recombinação mitótica. No entanto, nos descendentes BH são detectadas apenas

mutação e deleção, devido ao fato de o balanceador *TM3* carregar múltiplas inversões, que impedem a recombinação mitótica (GUZMÁN-RINCÓN; GRAF, 1995).

A suplementação alimentar com vitaminas antioxidantes é uma questão polêmica e que diverge entre autores. Existem evidências epidemiológicas, de que a suplementação alimentar com estas vitaminas poderia diminuir a incidência de diversos tipos de câncer em certas populações. Porém, não está claro se seria a ação antioxidante, ou outra propriedade das vitaminas responsável por esta ação. Há autores que afirmam que não justifica, em termos de prevenção de câncer, fazer uma suplementação alimentar com vitaminas antioxidantes se a pessoa tem uma boa dieta alimentar. Sendo assim, este trabalho teve como objetivo avaliar os possíveis efeitos genotóxicos de um complexo polivitamínico (vitaminas C, E e beta-caroteno) e polimineral (cobre, selênio e zinco), na forma de um composto conhecido comercialmente como Vitergan[®] Zinco Plus (nas doses: 12,5; 25 e 50mg/mL). O trabalho teve, também, como objetivo avaliar os efeitos antígenotóxicos deste complexo polivitamínico e polimineral contra a ação genotóxica da Doxorubicina (0,125mg/mL), geradora de radicais livres.

Capítulo Único

Efeito protetor de antioxidantes (vitaminas C, E e beta-caroteno) e minerais (cobre, selênio e zinco) contra a ação genotóxica da doxorubicina em células somáticas de *Drosophila melanogaster*

Protector effect from antioxidant (vitamins C, E and beta-carotene) and minerals (cooper, selenium and zinc) against the genotoxic action of the doxorubicin on somatic cells of *Drosophila melanogaster*

Sumário

Capítulo Único

	Página
1. Introdução	15
1.1 Resumo	17
1.2 Abstract	18
2. Material e Métodos	19
2.1 Compostos químicos	19
2.2 Modo de preparo do polivitamínico e polimineral (PVM)	20
2.3 Linhagens estoques e testadoras de <i>Drosophila melanogaster</i>	20
2.4 Procedimentos para coleta de ovos	20
2.5 Procedimento Experimental	21
2.5.1 Co-tratamento	21
2.5.2 Pré-tratamento	21
2.6 Preparação e análise microscópica das asas	21
2.7 Análise estatística	22
3. Resultados e Discussão	23
3.1 Co-tratamento	23
3.2 Pré-tratamento	25
4. Referências Bibliográficas	35

1. Introdução

Os inibidores naturais de agentes oxidantes, presentes na dieta, são importantes na mutagênese e carcinogênese, devido ao fato de serem úteis na prevenção do câncer e não possuírem efeitos xenobióticos, indesejáveis aos organismos vivos (ODIN, 1997). Algumas vitaminas como, por exemplo, as vitaminas antioxidantes A, E e C, mostram este efeito protetor (ODIN, 1997). A ingestão diária de alguns antioxidantes confere proteção contra certas doenças, incluindo doenças cardiovasculares, câncer e desordens degenerativas neurológicas (LÓPEZ – BURILLO et al., 2003).

Lamsoni e Brignall (1999) observaram que em ratos a administração de vitamina A, associada ao metotrexato, minimiza o dano intestinal sem inibir a atividade antineoplásica da droga. Em pacientes que receberam quimioterapia e suplementação vitamínica antioxidante, apresentaram média de sobrevida de 12,3 meses, em comparação ao grupo controle, cuja média foi de 3,1 meses. As vitaminas antioxidantes proporcionam melhores condições de vida aos pacientes (PYRHONEN et al., 1995).

De acordo com Packer (1984) a vitamina E (alfa-tocoferol) atua em nível de cadeia transportadora de elétrons impedindo que os radicais livres atuem nos lipídios da crista mitocondrial. Com isso, os radicais livres são convertidos em radicais peróxido e reduzidos posteriormente a álcoois. Hussein (1993) mostrou que a administração de altas doses de alfa-tocoferol (1600 UI/d), administradas 72 horas antes do início da quimioterapia, impediu a alopecia em cerca de 69% dos pacientes.

Quando as vitaminas C e E, foram administradas sozinhas ou em associação com a doxorrubicina, na quantidade de 100 mg/Kg de peso, de cada vitamina, produziram redução no número total de aberrações cromossômicas e na percentagem de metáfases anormais, induzidas pela doxorrubicina. Então, a administração concomitante de vitaminas antioxidantes e antineoplásicos é importante, pois parecem proteger as células sadias dos danos causados pelas drogas, principalmente as células dos tecidos de rápida proliferação celular (ANTUNES e TAKAHASHI, 1998).

Para Fenech e Ferguson (2001) a dieta, com vitaminas e minerais, tem um papel determinante na estabilidade genômica. Para eles, os estudos mais recentes mostram que o selênio é o mineral mais importante na prevenção contra o câncer e a deficiência de zinco está associada com o aumento nas alterações na molécula de DNA.

Os antioxidantes agem nas três linhas de defesa orgânica contra as espécies reativas de oxigênio (ERO). A primeira linha, que é a de prevenção, se caracteriza pela proteção contra a formação das substâncias agressoras. A segunda linha é a interceptação, e neste estágio os antioxidantes precisam interceptar os radicais livres (RL), os quais, uma vez formados, iniciam suas atividades destrutivas. E a última linha é o reparo. Os mecanismos de reparo ocorrem quando a prevenção e a interceptação não foram completamente efetivas e os produtos da oxidação pelos RL estão sendo continuamente formados em baixas quantidades e desta forma podem se acumular no organismo (KONG e LILLHEY, 1998).

O teste para detecção de mutação e recombinação somática (SMART), desenvolvido em *Drosophila melanogaster*, é capaz de detectar um amplo espectro de alterações genéticas: mutações, deleções e recombinações mitóticas (GRAF et al., 1984; WÜRGLER et al., 1984). Esse teste tem como base o fato que, durante o início do desenvolvimento embrionário da *D. melanogaster*, grupos de células (discos imaginais) proliferam mitoticamente durante o desenvolvimento larval até diferenciarem-se, durante a metamorfose, em estruturas do corpo da mosca adulta (olhos, asas, etc.). Caso ocorra uma alteração genética em uma das células do disco imaginal, tal alteração estará presente em todas as células descendentes, e formará um clone de células mutantes. Assim sendo, as células mutantes serão detectadas como uma mancha de pêlos mutantes na asa da mosca adulta (GUZMÁN-RINCÓN e GRAF, 1995).

A droga antineoplásica doxorrubicina (DXR) é capaz de gerar uma variedade de espécies de radicais livres no sistema celular e esta capacidade tem sido considerada crítica para sua ação antitumoral (KEIZER et al., 1990). A geração de radicais livres atua diretamente no núcleo celular, e com isso, inviabiliza o processo de divisão celular, logo esse mecanismo citotóxico parece ser o principal efeito antitumoral da DXR (KEIZER et al., 1990). Em *D. melanogaster*, a DXR foi

avaliada pelo SMART, onde foi verificada a indução do aparecimento de manchas simples e gêmeas (FRÖLICH e WÜRGLER, 1990).

A suplementação alimentar com vitaminas antioxidantes é uma questão polêmica e que diverge entre autores. Existem evidências, epidemiológicas, de que a suplementação alimentar com vitaminas antioxidantes poderia diminuir a incidência de diversos tipos de câncer em certas populações, e, também, a oferta dessas vitaminas antioxidantes, como as vitaminas A, E e C, associada às drogas antineoplásicas, poderia resultar em menores efeitos colaterais durante a quimioterapia. Sendo assim, este trabalho teve como objetivo avaliar os possíveis efeitos genotóxicos de um complexo polivitamínico (vitaminas C, E e beta-caroteno) e polimineral (cobre, selênio e zinco), na forma de um composto conhecido comercialmente como Vitergan[®] Zinco Plus (nas doses: 12,5; 25 e 50mg/mL). O trabalho teve, também, como objetivo avaliar os efeitos antígeno-tóxicos deste complexo polivitamínico e polimineral contra a ação genotóxica da doxorubicina (0,125mg/mL), geradora de radicais livres.

1.1 RESUMO

As vitaminas são importantes compostos biológicos que podem inativar moléculas altamente reativas como os radicais livres, formados nos processos bioquímicos do organismo. Atualmente, existem quimioterápicos utilizados no tratamento de câncer, que têm como efeitos colaterais a geração de radicais livres. Exemplo disso é o cloridrato de doxorubicina (DXR). Em função do uso associado de agentes quimioterápicos e polivitamínicos, utilizou-se o teste da mancha da asa em *Drosophila melanogaster* (Somatic Mutation And Recombination Test – SMART) para avaliar os possíveis efeitos genotóxicos de um complexo polivitamínico (vitaminas C, E e beta-caroteno) e polimineral (cobre, selênio e zinco), na forma de um composto conhecido comercialmente como Vitergan[®] Zinco Plus (nas doses: 12,5; 25 e 50mg/mL). O trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos genotóxicos deste complexo polivitamínico e polimineral e seus efeitos antígeno-tóxicos contra a ação genotóxica da DXR (0,125mg/mL), geradora de radicais livres. Os resultados obtidos demonstraram que não houve

aumento, estatisticamente significativo nas frequências de manchas mutantes, quando se compara o controle negativo com o polivitamínico, nos descendentes trans-heterozigotos de ambos os cruzamentos. Porém, houve redução, estatisticamente significativa, no número de manchas quando o polivitamínico foi associado com a DXR (0,125mg/mL), nos descendentes trans-heterozigotos de ambos os cruzamentos. O efeito protetor foi observado quando as larvas foram pré e co-tratadas com o polivitamínico e associada a DXR. Pode-se concluir que, nestas condições experimentais, o polivitamínico e polimineral não é genotóxico, porém, possui efeito protetor contra a ação genotóxica do quimioterápico DXR.

UNITERMOS: *Drosophila melanogaster*, SMART, polivitamínico, polimineral, doxorubicina.

1.2 Abstract

Vitamins are important biological components that are able to deactivate highly active molecules such as, free radicals, generated throughout biochemical processes of the organism. Currently, chemotherapy used in the treatment of cancer, generates free radicals as a side effect of this type of therapy drug. An example of this is Doxorubicin (DXR). When used in association with chemotherapy and multivitamins, the wing spot test was administered to *Drosophila melanogaster* (somatic mutation and recombination test- SMART) in order to evaluate possible genotoxic effect of a multivitamin compound (Vitamin C, E and beta- carotene) and minerals (copper, selenium and zinc), commercially known as Vitergan® Zinc Plus (12.5; 25 and 50mg/mL). The objective of this study was to evaluate the genotoxic effect of these multivitamins and minerals as well as their antigenotoxic effects as compared to the genotoxic effect of DXR (0.125mg/mL), producing free radicals. Results showed no statistically significant

increase in the frequency of mutation spots, as compared to the negative control group with the multivitamin group, in the trans-heterozygous descendants of both crosses. However, there was a statistically significant reduction in the number of spots when the multivitamin is given in conjunction with DXR (0.125mg/mL) to trans-heterozygous descendants of both crosses. The protector effect was observed when the larvae received pre and co-treatments with the multivitamin in conjunction with DXR. Therefore, it is possible to conclude that in these experimental conditions, the multivitamin and minerals are not genotoxic. However it demonstrates a protective effect against the genotoxic effect of the chemotherapeutic agent DXR.

Keywords: *Drosophila melanogaster*, SMART, multivitamin, minerals, doxorubicin.

2. Material e Métodos

2.1 Compostos químicos

Polivitamínico e polimineral, Vitergan[®] Zinco Plus (lote nº 1766) fabricado pelo laboratório Marjan Industria e Comércio Ltda. Cada cápsula de comprimido contém: beta-caroteno 10.000 UI (CAS 7235-40-7); ácido ascórbico 600mg (CAS 50-81-7); acetato de tocoferol 200UI (CAS 59-02-9); cobre 1,0 mg (CAS 13.1739-1); selênio 100 mg; zinco 40 mg (CAS 1314-13-2). Registrado no Ministério da Saúde sob o número: 1.0155.0091.

O cloridrato de doxorubicina (DXR) conhecido comercialmente como Adriblastina[®] RD (CAS 23214-92-8) (lote nº G0421), fabricado por Pharmacia & Upjohn S.p.A. – Milão Itália e importado e distribuído por Pharmacia do Brasil Ltda. Cada frasco-ampola de Adriblastina[®] RD contém: cloridrato de doxorubicina

(10 mg); metilparabeno (1 mg); lactose (50 mg). Registrado no Ministério da Saúde sob o número: 1.2389.0046.

2.2 Modo de preparo do polivitamínico e polimineral (PVM)

Cada cápsula de comprimido foi triturada, mantendo aspecto de pó, para posteriormente serem pesados e as alíquotas distribuídas nas seguintes doses: 12,5; 25 e 50mg/mL.

2.3 Linhagens estoques e testadoras de *Drosophila melanogaster*

Para realização do teste foram utilizadas três linhagens mutantes de *Drosophila melanogaster* (*ORR*, *flr³* e *mwh*), portadoras dos marcadores genéticos *multiple wing hairs* (*mwh*, 3-0,3) e *flare-3* (*flr³*, 3-38,8).

Para a realização do cruzamento padrão, as linhagens estoques foram cruzadas do seguinte modo: fêmeas virgens *flr³/ln(3 LR)TM3, ri pp sep I(3)89Aa bx^{34e}* e *Bd^s* cruzadas com machos *mwh/mwh* (GRAF et al., 1989).

O cruzamento de alta bioativação metabólica, o qual possui altos níveis de citocromo P-450, foi realizado cruzando as linhagens estoques do seguinte modo: fêmeas virgens *ORR / ORR; flr³/ln(3 LR)TM3, ri p^o sep I(3)89Aa bx^{34e}* e *Bd^s* cruzadas com machos *mwh/mwh* (GRAF e VAN SCHAİK, 1992).

As larvas, de ambos os genótipos, emergentes destes cruzamentos, foram tratadas simultaneamente e pré-tratadas com PVM, para posteriormente entrarem em contato com os agentes químicos testados.

2.4 Procedimentos para coleta de ovos

Ovos dos descendentes dos cruzamentos padrão e alta bioativação foram coletados por um período de 8 horas em frascos contendo uma base sólida de ágar (3% de ágar em água) e uma camada de fermento biológico (*Saccharomyces cerevisiae*) suplementado com açúcar. Após 72 ± 4 horas (co-tratamento) e 68 ± 4 horas (pré-tratamento) as larvas foram lavadas com água corrente e coletadas com auxílio de uma peneira de malha fina.

2.5 Procedimento Experimental

2.5.1 Co-tratamento

Larvas de ambos os cruzamentos foram transferidas para tubos de vidro (2,5 cm de diâmetro e 8,0 cm de altura) contendo 1,5 gr de meio de purê de batatas (Marca HIKARI, Lote nº L3068DD) e 5,0 mL do polivitamínico e polimineral (PVM) (12,5; 25 e 50mg/mL) associados ou não com DXR (0,125mg/mL). Para o controle positivo foi utilizado a DXR (0,125mg/mL) e, para o controle negativo, água destilada estéril. Pelo fato de haver alguns compostos que são fotossensíveis todos os frascos do tratamento foram envolvidos com papel alumínio.

2.5.2 Pré-tratamento

Larvas de ambos os cruzamentos foram pré-tratadas com PVM, por um período de 4 horas. Além do PVM foi adicionado no meio sacarose, com a intenção de fornecer a reserva energética para o desenvolvimento das larvas. Os frascos com pré-tratamento foram envolvidos com papel alumínio para evitar a fotodegradação.

Posteriormente, as larvas foram transferidas para tubos de vidro (2,5 cm de diâmetro e 8,0 cm de altura) contendo 1,5 gr de meio de purê de batatas (Marca HIKARI, Lote nº L3068DD) e 5,0 mL do agente DXR (0,125mg/mL). Para o controle positivo foi utilizado a DXR (0,125mg/mL) e para o controle negativo água destilada estéril.

Os agentes testados (PVM, DXR e a combinação de PVM com DXR) foram preparados em água destilada no momento do tratamento das larvas. Todos os experimentos foram realizados à temperatura de $25^{\circ} \text{C} \pm 2^{\circ} \text{C}$ e 65% de umidade relativa.

2.6 Preparação e análise microscópica das asas

Após a eclosão, os indivíduos adultos foram transferidos para um recipiente contendo etanol 70%. Para destacar as asas do corpo da *D. melanogaster*,

utilizou-se um microscópio estereoscópico e pinças entomológicas. As asas foram embebidas em solução de Faure e estendidas sobre uma lâmina seca. Para a confecção final da lâmina permanente, sobre as asas foi adicionada uma lamínula, e sobre estas foram adicionados pesos de aproximadamente 400g para a eliminação de possíveis espaços preenchidos pelo ar. Esses pesos ficaram aproximadamente por um período de 72 horas.

As asas da *D. melanogaster* foram analisadas em microscópio de luz (objetiva 40x). Foram registrados o número e os tipos de manchas encontradas (simples ou gêmeas), assim como o tamanho das mesmas, e a posição em que se encontravam na asa. Ao final da análise, foram comparadas as frequências de mutações encontradas nas moscas tratadas com PVM com as encontradas nos controles positivo e negativo, respectivamente.

2.7 Análise estatística

A análise estatística do experimento, para a verificação da possível ação genotóxica do PVM foi realizada por meio do teste descrito por Frei e Würzler (1988). Para a análise estatística de antigenotoxicidade, as frequências de cada tipo de mancha por mosca, foram comparadas aos pares (ex. controle negativo versus PVM; agente genotóxico isoladamente versus PVM + agente genotóxico), usando o teste *U* de Mann, Whitney e Wilcoxon (FREI; WÜRGLER, 1995). As porcentagens de inibição do PVM foram calculadas, utilizando-se as frequências de clones 10^5 células, corrigidas pelo controle, como se segue: $(DXR - DXR \text{ associada ao PVM/ DXR}) \times 100$ (Abraham, 1994).

3. Resultados e Discussão

3.1 Co-tratamento

As Tabelas 1, 2, 3 e 4 mostram os tamanhos das manchas em asas de *Drosophila melanogaster*, classificadas em: manchas simples pequenas, simples grandes, manchas gêmeas e o total de manchas. As Tabelas ainda informam a quantidade de clones *mwh*, em cada tratamento realizado e a frequência de clones (10^5 células) observada e corrigida pelo controle. Os descendentes portadores da constituição genética, *mwh/flr³*, são os indivíduos trans-heterozigotos marcados e os *mwh/TM3* são os heterozigotos balanceados. Em cada asa foram analisadas, aproximadamente, 24.400 células (GRAF *et al.*, 1984).

A Tabela 1 mostra as frequências de manchas mutantes observadas nos descendentes trans-heterozigotos, dos cruzamentos padrão e de alta bioativação metabólica. Não houve aumento estatisticamente significativo ($\alpha = 0,05$) na frequência de manchas induzidas pelo PVM, nas três doses tratadas, quando comparado com o controle negativo, em todas as classes de manchas.

A ausência de efeitos genotóxicos do PVM está de acordo com vários autores que testaram alguns dos componentes do PVM isoladamente. De acordo com Fragiorge (2000), baixas doses de vitamina C protegem as células somáticas de *D. melanogaster* contra a ação do quimioterápico doxorrubina (DXR). A vitamina C mostrou não ter ação genotóxica quando testadas em células somáticas de *D. melanogaster* em três dosagens (25, 75 e 250mg/mL) (KAYA *et al.*, 2002).

Os dados da Tabela 2, observados nos descendentes trans-heterozigotos e heterozigotos balanceados, do cruzamento padrão, demonstram que o quimioterápico doxorrubina (DXR) possui efeito genotóxico, aumentando o número de manchas mutantes, quando comparado ao controle negativo. Esse aumento é estatisticamente significativo ($\alpha = 0,05$) em todas as classes de manchas. A alta frequência de manchas, no cruzamento padrão, evidencia que a DXR é uma droga com ação genotóxica direta.

Pelo fato de apresentar resposta genotóxica direta, a priori, não haveria a necessidade de testar os descendentes do cruzamento HB. Porém, de acordo com Fragiorge (2000), a eficiência da vitamina C, na proteção das células somáticas de *D. melanogaster*, contra mutações e recombinações somáticas induzidas pela DXR, é dependente da dose utilizada e a eficiência na proteção está diretamente ligada às condições de ativação metabólica por enzimas P-450.

O aparecimento de manchas gêmeas indica a atividade recombinogênica da DXR. A relação entre o aumento das freqüências de manchas gêmeas e o aumento da atividade recombinogênica foi confirmada na análise dos descendentes heterozigotos balanceados. Nesta análise verificou-se que nos descendentes do cruzamento padrão ocorreu 6% de mutação e 94% de recombinação, devido à ação genotóxica da DXR. Nos descendentes do cruzamento de alta bioativação metabólica ocorreram 10% de mutação e 90% de recombinação, mostrando a forte ação recombinogênica do quimioterápico DXR. Resultados da ação recombinogênica da DXR, em células somáticas de *D. melanogaster*, foram encontrados em Lehmann *et al.* (2003) e Rodriguez-Arnaiz *et al.* (2004).

Verifica-se ainda, na Tabela 2, que na associação do PVM ao quimioterápico DXR houve redução, estatisticamente significativa, em todas as classes de manchas. Nos descendentes trans-heterozigotos marcados (*mwh/flr³*) a redução na freqüência de manchas do PVM, quando associado a DXR, foi de 93% para PVM 12,5mg/mL; 95% PVM 25mg/mL e 99% PVM 50mg/mL. Para os descendentes heterozigotos balanceados (*mwh/TM3*) a redução na associação foi 50% para PVM 12,5mg/mL; 63% PVM 25mg/mL e 75% PVM 50mg/mL.

A redução de manchas nos descendentes do heterozigoto balanceado, em relação ao trans-heterozigoto marcado, permite o cálculo da taxa de mutação e recombinação. Para o cálculo da freqüência de recombinação foi utilizada a seguinte fórmula: freqüência de mutação = a/b [a = freqüência de clones *mwh* ($\times 10^5$ células) nos indivíduos BH, b = freqüência de clones *mwh* ($\times 10^5$ células) nos indivíduos MH]; freqüência de recombinação = $1 - \text{freqüência de mutação}$.

Os dados da Tabela 3 demonstram que na associação do PVM com o quimioterápico DXR, houve uma redução (inibição) estatisticamente significativa ($\alpha = 0,05$), em relação ao controle DXR, em todas as categorias de manchas

mutantes. A inibição, nos descendentes trans-heterozigotos marcados (*mwh/flr³*), foi de 76% para PVM 12,5mg/mL; 91% PVM 25mg/mL e 99,5% PVM 50mg/mL. Para os descendentes heterozigotos balanceados (*mwh/TM3*) a redução na associação foi 70% para PVM 12,5mg/mL; 84% para PVM 25mg/mL e 65% para PVM 50mg/mL.

As Figuras 1 e 2 mostram a distribuição do tamanho de manchas nos descendentes trans-heterozigotos do cruzamento padrão e alta bioativação metabólica. A Figura 1 mostra o efeito protetor do PVM, na associação contra a ação genotóxica da DXR. Essa ação protetora foi conferida nas três doses do PVM (12,5; 25 e 50mg/mL) e em todas as classes de manchas mutantes. Essa ação protetora mostra uma relação dose dependente sem que a maior concentração possui maior efeito protetor.

As Figuras 3 e 4 demonstram as porcentagens de mutação e recombinação de *D. melanogaster*, do cruzamento padrão e alta bioativação metabólica, tratados com DXR (0,125mg/mL) e PVM. Na Figura 3, o controle DXR apresenta 6% de mutação e 94% de recombinação. Na associação PVM 12,5; 25 e 50mg/mL com DXR ocorre 67%; 66% e 55,5% de eventos recombinacionais, respectivamente. Observa-se, por meio da Figura 3, que aumentando a concentração do PVM na associação, reduz o efeito recombinogênico do quimioterápico DXR.

Na Figura 4, observam-se 10% de mutação e 90% de recombinação nos indivíduos descendentes do cruzamento de alta bioativação metabólica, tratados com DXR. Na associação PVM 12,5; 25 e 50mg/mL com DXR ocorre 85%; 80% e 43% de eventos recombinacionais, respectivamente. A ação do PVM sobre a DXR assemelha-se aos resultados do cruzamento padrão, porém a dose resposta na proteção dos eventos recombinacionais torna-se mais evidente no cruzamento de alta bioativação.

3.2 Pré-tratamento.

A Tabela 4 mostra a freqüência de manchas observadas nos descendentes trans-heterozigotos, do cruzamento padrão e alta bioativação metabólica, submetidos a um período de pré-tratamento por 4 horas. Nos descendentes do

cruzamento padrão, pré-tratados com PVM, e posteriormente expostos a DXR, ocorreu uma redução, estatisticamente significativa, em todas as classes de manchas, exceto na dose de 12,5mg/mL que não houve redução nas manchas gêmeas.

Nos descendentes do cruzamento de alta bioativação metabólica, na dose 25mg/mL do PVM, houve uma redução estatisticamente significativa em todas as classes de manchas, exceto nas manchas simples pequenas ($\forall = 0,05$). Na maior concentração PVM 50mg/mL houve uma redução estatisticamente significativa em todas as classes de manchas.

A proteção do PVM contra a ação genotóxica da DXR torna-se mais efetiva nas maiores doses, PVM 50mg/mL, sendo uma inibição de 77% e 74%, para os descendentes do cruzamento padrão e alta bioativação metabólica, respectivamente. Porém, a dose resposta torna-se mais evidente para os descendentes do cruzamento de alta bioativação metabólica, maior dose maior resposta protetora.

Os mecanismos pelos quais o PVM exerce sua ação protetora contra a DXR, não foram analisados. Contudo, devido à ação geradora de radicais livres pela DXR e sua intercalação com a molécula de DNA (KEIZER et al., 1990), é possível propor os mecanismos de proteção do PVM contra a ação genotóxica da DXR. No co-tratamento pode-se propor a ação desmutagênica do PVM. A ação desmutagênica é caracterizada pela inativação química ou enzimática do agente genotóxico (KADA et al., 1982). Neste caso, é possível que o PVM tenha inativado a DXR, ou seus produtos metabólitos, que são os radicais livres gerados na transformação deste agente genotóxico. Esta inativação ocorreu provavelmente, pela presença de vitaminas antioxidantes (A, C e E) no PVM. Resultados similares da ação desmutagênica de vitaminas (vitamina C) foram observados em linfócitos humanos *in vitro* (AMARA-MOKRANE et al., 1996). Esta ação desmutagênica da vitamina C, envolvendo a inativação química ou metabólica do mutágeno, foi proposta, também por Kuroda et al. (2001). A atividade protetora de vitaminas antioxidantes, especialmente a vitamina C, tendo como mecanismo de ação o seqüestro de radicais livres gerados pela DXR, foi proposto, também, por Antunes et al. (1999). Os Carotenóides, de acordo com

Picada et al. (2003), têm uma atividade estabilizadora principalmente do oxigênio simples, que transfere sua energia de excitação à molécula antioxidante.

Sendo assim, a administração simultânea da DXR com o PVM possibilitou, provavelmente, uma interação direta entre os constituintes do PVM e a DXR, ou seus metabólitos, levando a redução da atividade genotóxica. Para avaliar se este era o único caminho na proteção contra a DXR, larvas de ambos os descendentes (ST e HB) foram pré-tratadas, com diferentes doses de PVM e, após, expostas a DXR (0,125mg/mL). Em ambos os descendentes (ST e HB) foram verificados reduções nas freqüências de manchas mutantes induzidas pela DXR. Estes resultados sugerem que a presença simultânea do PVM, durante o tratamento com DXR, não é o único caminho na prevenção contra a ação deste agente genotóxico. O pré-tratamento com PVM mostrou-se, também, eficiente na prevenção da ação genotóxica da DXR. Uma provável explicação seria uma inibição das enzimas citocromo P-450, pelo PVM, levando a uma redução na taxa de bioativação da DXR. Apesar de ser um mutágeno direto a DXR requer biotransformação redutiva do seu anel quinona a radical semiquinona o qual pode exercer efeito tóxico direto (RAMJI et al., 2003).

Abraham e Graf (1996) propuseram este mesmo mecanismo quando avaliaram a redução nas freqüências de manchas mutantes em larvas de *D. melanogaster*, pré-tratadas com café instantâneo e posteriormente tratadas com uretano. O pré-tratamento com vitaminas antioxidantes (C e E) e selênio foi avaliado em camundongos tratados por um período de quinze dias com suplementação vitamínica e posterior tratamento com DXR. Os autores (KORAC; BUZADZIC, 2001) verificaram que a suplementação com antioxidantes previne contra a ação genotóxica da DXR.

Uma outra explicação, para a redução de manchas no pré-tratamento seria a ativação do mecanismo de reparo. Konopacka et al. (1998) mostraram que a ação radioprotetora das vitaminas C e E, bem como do beta-caroteno, pode estar associada (dependendo de suas concentrações) não apenas com o seqüestro de radicais livres mas também com o aumento da taxa do mecanismo de reparo do DNA. Os resultados deste estudo indicaram, pelo teste do micronúcleo, que a administração oral da vitamina C, E e A podem exercer efeito protetor contra danos genéticos induzidos pela exposição *in vivo* a raios gama, sendo estes

efeitos dependentes da dose e da seqüência de administração (antes ou após a irradiação).

O estilo de vida pode levar a formação de radicais livres de oxigênio, o quais podem afetar os níveis de quebra oxidativa em cada indivíduo (KASAI, 2002). Com isso, é importante que as células mantenham um adequado balanço entre os níveis de radicais livres e antioxidantes para garantir a integridade estrutural de componentes críticos. Quando os níveis de radicais livres excedem o de antioxidantes, biomoléculas sensíveis tais como lipídios, proteínas e DNA, em particular, podem ser danificadas (HALLIWELL, 1994; REITER, 1995).

Finalmente, pode-se concluir, com base nos resultados e nas condições experimentais mencionadas no trabalho, que o PVM não é genotóxico, nas doses utilizadas neste trabalho e, também, exerce um efeito protetor quando associado ao quimioterápico DXR (0,125mg/mL), usando-se como organismo teste a *D. melanogaster*. A proteção do polivitamínico abrange tanto a administração simultânea com o agente genotóxico quanto também, no pré-tratamento com o polivitamínico.

Agradecimentos:

Os autores agradecem CAPES/CNPq/UFU pelo apoio financeiro o qual permitiu a realização do projeto. Agradecemos também, o Professor Dr. Mário Antônio Spanó pelo incentivo, críticas e sugestões durante o desenvolvimento desse trabalho.

Tabela 1. Frequências de manchas mutantes observadas nos descendentes trans-heterozigotos de *D. melanogaster*, dos cruzamentos padrão e alta bioativação metabólica, tratadas com polivitamínico e polimineral (PVM) em três diferentes doses

Tratamento			Manchas por indivíduo (Nº de manchas) diag. Estatístico ^a							Média das classes de tam. clones <i>mwh</i> ^c (\bar{t})	Frequência de clones (10 ⁵ células) ^d			
			Pequenas simples (1-2 cels) ^b <i>m</i> = 2		Grandes simples (>2 cels) ^b <i>m</i> = 5		Gêmeas <i>m</i> = 5		Total <i>m</i> = 2		manchas <i>mwh</i> ^c	Observada	Corrigida pelo controle	
DXR (mg/mL)	PVM (mg/mL)	Nº de Moscas												
Cruzamento ST														
0	0	20	0,70	(14)	0,00	(00)	0,00	(00)	0,70	(14)	13	2,20	1,54	
0	12,5	20	0,60	(12) -	0,15	(03) -	0,15	(03) i	0,90	(18) i	18	2,10 {2,40}	1,02	-0,51
0	25,0	20	0,30	(06) -	0,20	(04) -	0,00	(00) -	0,50	(10) -	10	2,06 {1,00}	1,74	0,20
0	50,0	20	0,80	(16) -	0,05	(01) -	0,05	(01) i	0,90	(18) i	18	1,21 {16,00}	1,43	-0,10
Cruzamento HB														
0	0	20	0,80	(16)	0,20	(04)	0,05	(01)	1,05	(21)	20	1,70	2,05	
0	12,5	20	0,75	(15) -	0,15	(03) -	0,05	(01) -	0,95	(19) -	18	1,61 {2,50}	1,84	-0,20
0	25,0	20	0,55	(11) -	0,15	(03) -	0,10	(02) -	0,80	(16) -	16	2,00 {1,00}	1,43	-0,61
0	50,0	20	0,45	(09) -	0,05	(01) -	0,15	(03) -	0,65	(13) -	13	1,90 {1,50}	1,02	-1,02

^aDiagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würigler (1988) : +, positivo em relação ao controle negativo; -, negativo; i, inconclusivo.

^b*m*, fator de multiplicação para a avaliação de resultados significativamente negativos. Níveis de significância $\alpha = \beta = 0,05$.

^cIncluindo manchas simples *flr*³ raras.

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

^eFrequências de clone por mosca dividido pelo número de células analisadas por mosca (48.800).

Tabela 2. Frequências de manchas mutantes observadas nos descendentes trans-heterozigotos e balanceador heterozigoto de *D. melanogaster*, do cruzamento padrão, tratados com o polivitamínico e polimineral (PVM) em três diferentes doses associadas com DXR (0,22mM)

Tratamento			Manchas por indivíduo (Nº de manchas) diag. Estatístico ^a					Manchas <i>mwh</i> ^c	Média das classes de tam. clones <i>mwh</i> ^c (\bar{x})	Frequência de clones (10 ⁵ células) ^d		
DXR (mg/mL)	PVM (mg/mL)	Nº de moscas	Pequenas simples (1-2 cels) ^b	Grandes simples (>2 cels) ^b	Gêmeas	Total	Corrigida pelo Observada			Corrigida pelo controle	Inibição ^e %	
<i>mwh/flr</i>³												
0	0	20	0,70 (14)	0,00 (00)	0,00 (00)	0,70 (14)	13	1,21	1,43			
0,125	0	20	10,60 (212)	6,15 (123)	4,15 (83)	20,90 (418)	412	2,23 {2,27}	34,32	32,89		
0,125	12,5	20	1,50 (30) *	0,30 (06) *	0,40 (08) *	2,20 (44) *	44	1,81 {2,18}	3,69	2,25	93,0	
0,125	25,0	20	1,35 (27) *	0,10 (02) *	0,30 (06) *	1,75 (35) *	34	1,69 {2,13}	2,97	1,54	95,0	
0,125	50,0	20	0,75 (15) *	0,15 (03) *	0,20 (04) *	1,10 (22) *	21	2,00 {4,75}	1,84	0,41	99,0	
<i>mwh/TM3</i>												
0	0	20	0,15 (03)	0,05 (01)		0,20 (04)	4	1,75	0,41			
0,125	0	20	0,75 (15)	0,25 (05)	f	1,00 (20)	20	1,95 {2,00}	2,05	1,64		
0,125	12,5	20	0,50 (10) i	0,10 (02) i		0,60 (12) i	12	1,50 {1,38}	1,23	0,82	50,0	
0,125	25,0	20	0,40 (08) i	0,10 (02) i		0,50 (10) *	10	2,00 {2,17}	1,02	0,61	63,0	
0,125	50,0	20	0,35 (07) *	0,05 (01) *		0,40 (08) *	8	1,50 {1,25}	0,82	0,41	75,0	

^aDiagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würzler (1995): Teste U - Mann, Whitney: * = redução estatisticamente significativa (comparado com o controle doxorrubicina 0,22mM). Níveis de significância $\alpha = \beta = 0,05$.

^bIncluindo manchas simples *flr3* raras.

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

^dFrequências de clone por mosca dividido pelo número de células analisadas por mosca (48.800).

^eCalculado de acordo com Abraham (1994): (DXR - DXR associado ao PVM/ DXR) x 100.

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

Tabela 3. Freqüências de manchas mutantes observadas nos descendentes trans-heterozigotos e balanceador heterozigoto de *D. melanogaster*, do cruzamento de alta bioativação metabólica, tratados com o polivitamínico e polimineral (PVM) em três diferentes doses associadas com DXR (0,22mM)

Tratamento			Manchas por indivíduo (Nº de manchas) diag. Estatístico ^a					Manchas <i>mwh</i> ^c	Média das classes de tam. clones <i>mwh</i> ^c (\bar{f})	Freqüência de clones (10^5 células) ^d		Inibição ^e %
DXR (mg/mL)	PVM (mg/mL)	Nº de moscas	Pequenas simples (1-2 cels) ^b	Grandes simples (>2 cels) ^b	Gêmeas	Total	Observada			Corrigida pelo controle		
<i>mwh/flr³</i>												
0	0	20	0,80 (16)	0,20 (04)	0,05 (01)	1,05 (21)	20	1,70	2,05			
0,125	0	20	7,10 (142)	5,20 (104)	3,90 (78)	16,20 (324)	319	2,40 {2,46}	25,20	23,16		
0,125	12,5	20	2,95 (59) *	0,75 (15) *	0,80 (16) *	4,50 (90) *	89	2,00 {2,11}	7,58	5,53		76,0
0,125	25,0	20	1,60 (32) *	0,40 (08) *	0,20 (04) *	2,20 (44) *	39	2,03 {2,35}	4,10	2,05		91,0
0,125	50,0	20	0,85 (17) *	0,20 (04) *	0,15 (03) *	1,20 (24) *	24	2,24 {13,00}	2,15	0,1		99,5
<i>mwh/TM3</i>												
0	0	20	0,25 (05)	0,00 (00)		0,25 (05)	5	1,40	0,51			
0,125	0	20	1,15 (23)	0,15 (03)	^f	1,30 (26)	26	1,72 {1,80}	2,56	2,05		
0,125	12,5	20	0,50 (10) *	0,05 (01) ⁱ		0,55 (11) *	11	1,45 {1,50}	1,13	0,61		70,0
0,125	25,0	20	0,40 (08) *	0,00 (00) *		0,40 (08) *	8	1,25 {1,00}	0,82	0,31		84,0
0,125	50,0	20	0,35 (07) *	0,25 (05) ⁺		0,60 (12) *	12	2,17 {2,71}	1,23	0,72		65,0

^aDiagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würigler (1995): Teste U - Mann, Whitney: * = redução estatisticamente significativa (comparado com o controle doxorrubicina 0,22mM). Níveis de significância $\alpha = \beta = 0,05$.

^bIncluindo manchas simples *flr3* raras.

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

^dFreqüências de clone por mosca dividido pelo número de células analisadas por mosca (48.800).

^eCalculado de acordo com Abraham (1994): (DXR - DXR associado ao PVM/ DXR) x 100.

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

Tabela 4. Frequências de manchas mutantes observadas nos descendentes trans-heterozigotos de *D. melanogaster*, dos cruzamentos padrão e alta bioativação metabólica, pré-tratados com polivitamínico e polimineral (PVM) em três diferentes doses e posteriormente tratados com DXR (0,22mM)

Tratamento		Manchas por indivíduo (Nº de manchas) diag. Estatístico ^a						Médias das classes de tam. clones <i>mwh</i> ^c (\bar{x})	Frequência de clones (10 ⁵ células) ^d		
DXR (mg/mL)	PVM (mg/mL)	Nº de moscas	Pequenas simples (1-2 cels) ^b	Grandes simples (>2 cels) ^b	Gêmeas	Total	Manchas <i>mwh</i> ^c		Observada	Corrigida pelo controle	Inibição ^e %
Cruzamento ST											
0	0	20	0,50 (10)	0,00 (00)	0,00 (00)	0,50 (10)	10	1,10	1,02		
0,125	0	20	4,85 (97)	2,35 (47)	1,85 (37)	9,05 (181)	179	2,29 {2,38}	14,75	13,73	
0,125	12,5	20	1,40 (28) *	1,45 (29) *	2,35 (47) ^{ns}	5,20 (104) *	98	2,98 {3,38}	5,84	4,82	60,0
0,125	25,0	20	1,20 (24) *	0,60 (12) *	0,60 (12) *	2,40 (48) *	47	2,31 {2,77}	3,69	2,66	75,0
0,125	50,0	20	1,30 (26) *	0,35 (07) *	0,45 (09) *	2,10 (42) *	42	2,15 {2,61}	3,38	2,36	77,0
Cruzamento HB											
0	0	20	1,10 (22)	0,15 (03)	0,00 (00)	1,25 (25)	25	1,68	2,56		
0,125	0	20	2,60 (52)	2,10 (42)	1,65 (33)	6,35 (127)	126	2,50 {2,80}	9,63	7,07	
0,125	12,5	20	3,85 (77) ^{ns}	1,75 (35) ^{ns}	1,35 (27) ^{ns}	6,95 (139) ^{ns}	138	2,19 {2,33}	11,48	8,91	
0,125	25,0	20	2,50 (50) ^{ns}	1,10 (22) *	0,40 (08) *	4,00 (80) *	77	2,38 {2,74}	7,38	4,82	32,0
0,125	50,0	20	1,50 (30) *	0,65 (13) *	0,40 (08) *	2,55 (51) *	48	2,40 {3,39}	4,41	1,84	74,0

^aDiagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würzler (1995): Teste U - Mann, Whitney: * = redução estatisticamente significativa (comparado com o controle doxorrubicina 0,22mM). Níveis de significância $\alpha = \beta = 0,05$.

^bIncluindo manchas simples *flr3* raras.

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

^dFrequências de clone por mosca dividido pelo número de células analisadas por mosca (48.800).

^eCalculado de acordo com Abraham (1994): (DXR - DXR associado ao PVM/ DXR) x 100.

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

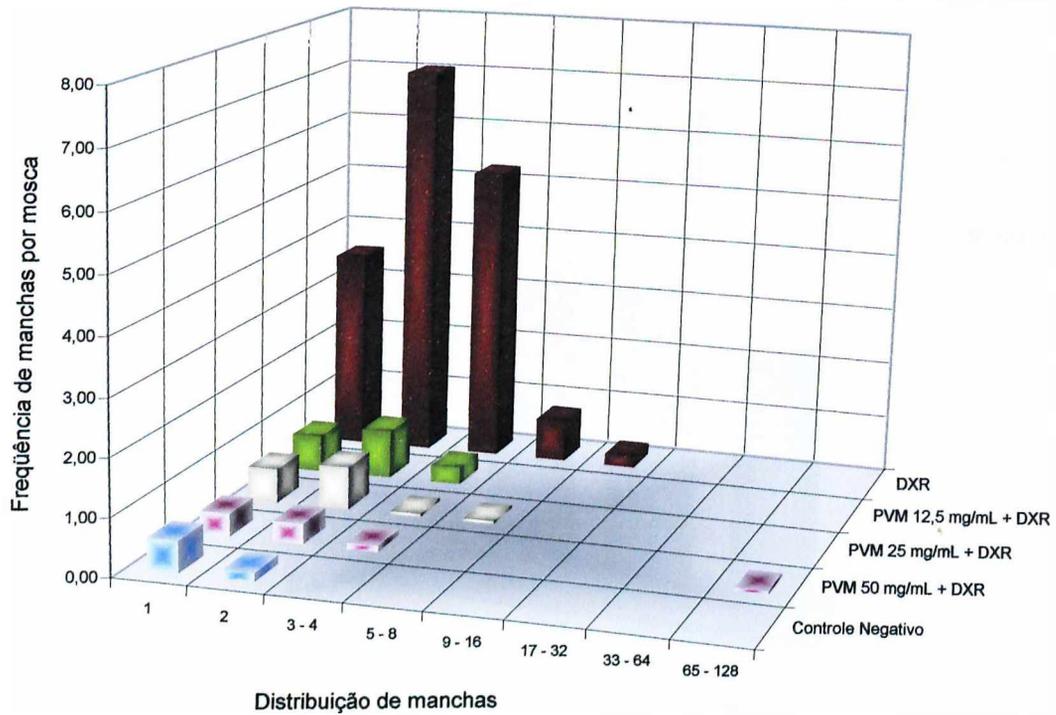


Figura 1 - Distribuição do tamanho de manchas nos descendentes trans-heterozigotos do cruzamento padrão (ST)

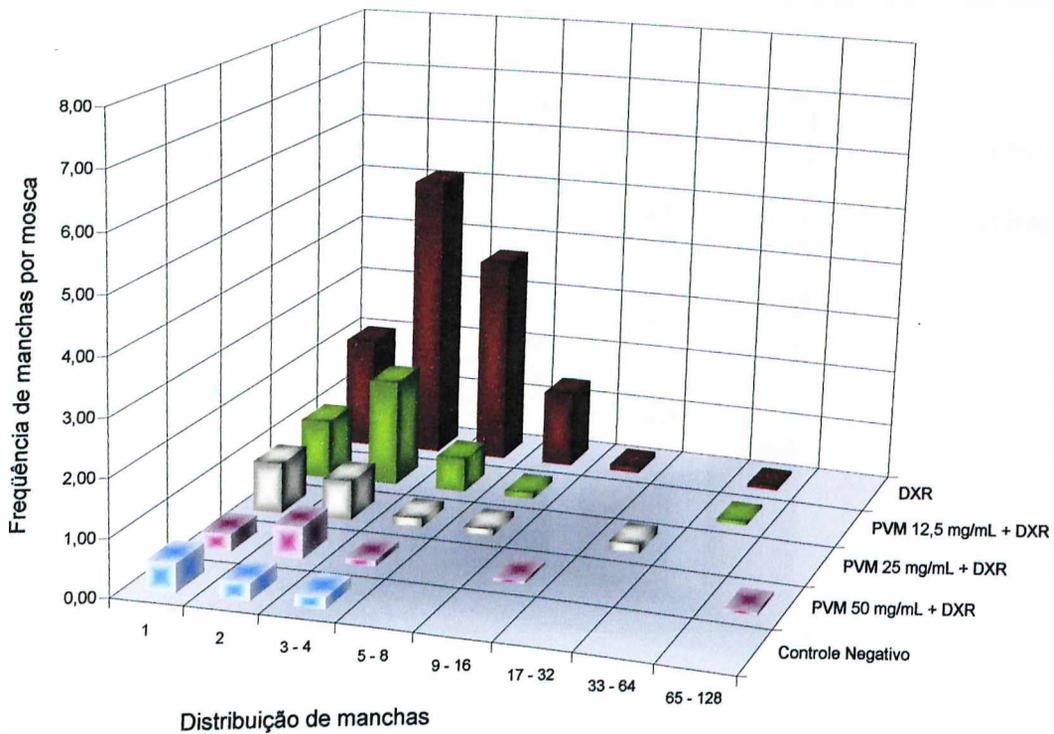


Figura 2 - Distribuição do tamanho de manchas nos descendentes trans-heterozigotos do cruzamento de alta bioativação metabólica (HB)

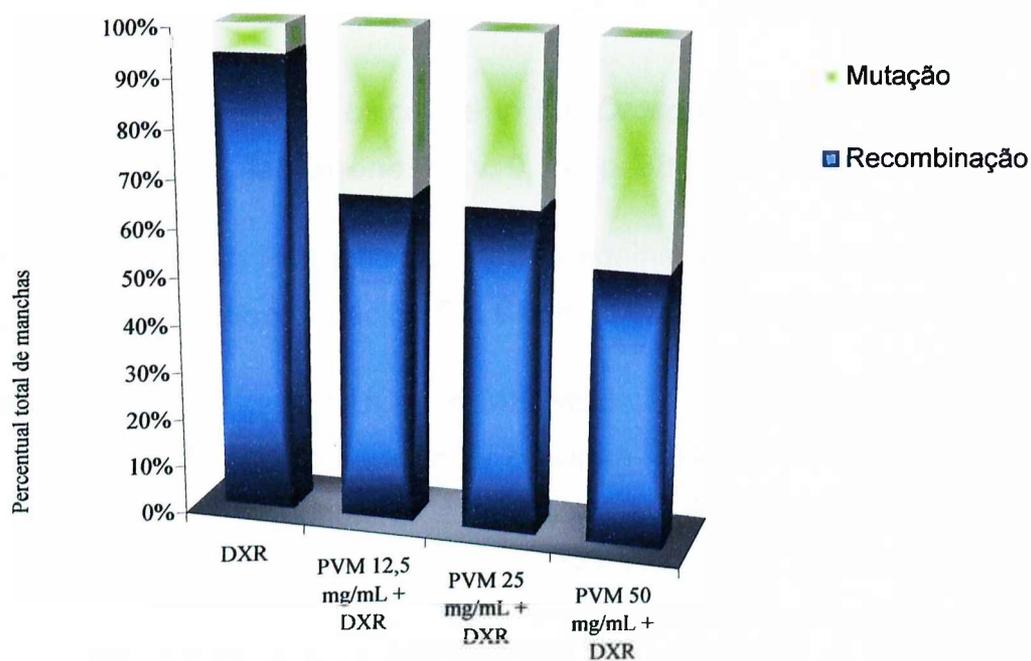


Figura 3 - Frequência percentual de mutação e recombinação, do cruzamento padrão (ST), obtidas dos descendentes marcadores trans-heterozigotos (MH) e balanceadores heterozigotos (BH)

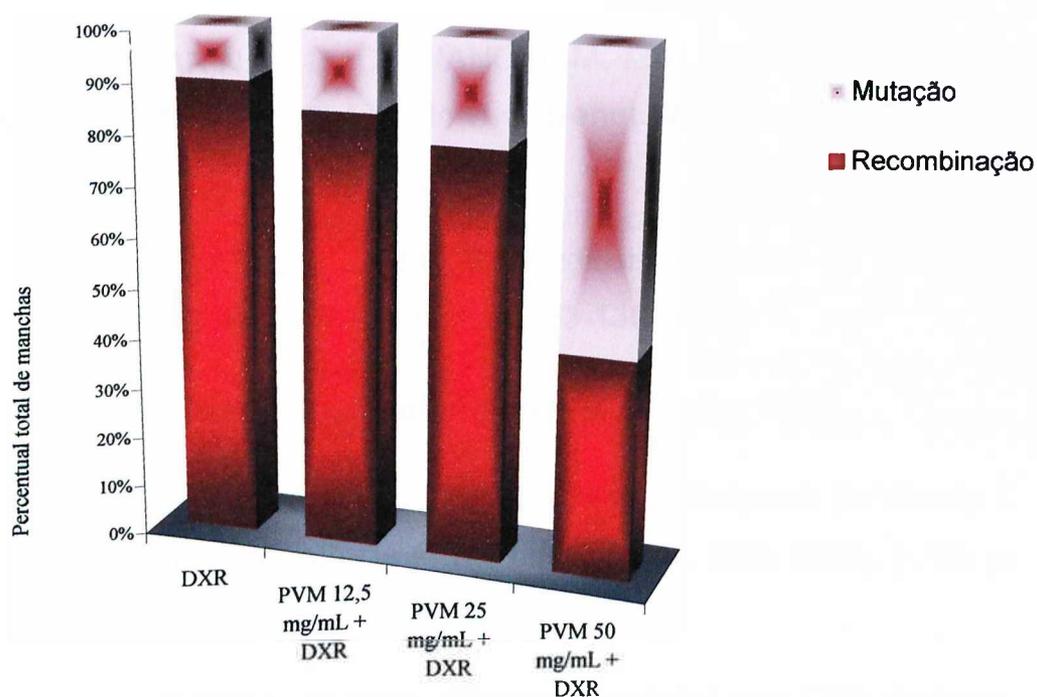


Figura 4 - Frequência percentual de mutação e recombinação, do cruzamento de alta bioativação metabólica (HB), obtidas dos descendentes marcadores trans-heterozigotos (MH) e balanceadores heterozigotos (BH)

4. Referências Bibliográficas

- ABRAHAM, S. K. Antigenotoxicity of coffee in the *Drosophila* assay for somatic mutation and recombination. **Mutagenesis**, v. 9, . 4, p. 383-386, 1994.
- ABRAHAM, S. K.; GRAF, U. Protection by coffee against somatic genotoxicity in *Drosophila*: role of bioactivation capacity. **Fd. Chem. Toxic.**, v. 34, p. 1-14, 1996.
- AMARA-MOKRANE, Y. A.; LEHUCHER-MICHEL, M. P.; BALASARD, G.; DUMENIL, G.; BOTTA, A. Protective effects of alpha-hederin, chlorophyllin and ascorbic acid towards the induction of micronuclei by doxorubicin in cultured human lymphocytes. **Mutagenesis**, v. 11, n. 2, p. 161-167, 1996.
- ANDREOLI, T. E.; BENNETT, J. C.; CARPENTER, C. C. J.; PLUM, F.; SMITH, L. H. **Cecil medicina interna básica**. 3ª ed. Guanabara Koogan, 1994.
- ANTUNES, L. M. G.; TAKAHASHI, C. S. Effects of high doses of vitamins C and E against doxorubicin induced chromosomal damage in Wistar rat bone marrow cells. **Mutat. Res.**, v. 419, p. 137-143, 1998.
- ANTUNES, L. M. G.; DARIN, J. D. C.; BIANCHI, M. L. P. ANTICLASTOGENIC EFFECT OF VITAMIN C ON CISPLATIN *in vivo*. **Genet. Mol. Biol.**, v. 22, n. 3, p. 415-417, 1999.
- BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Rev. Nutr.**, v. 12, n. 2, p. 123-130, 1999.
- BONASSA, E. M. A. **Enfermagem em quimioterapia**. Atheneu, 1998.
- CARR, A. C.; FREI, B. Toward a new recommended dietary allowance for vitamin C based on antioxidant and health effects in humans. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 69, p. 1086-1107, 1999.
- CHATGILIALOGLU, C.; O'NEILL, P. Free radicals associated with DNA damage. **Exp. Geront.**, v. 36, p. 1459-1471, 2001.

DIZDAROGLU, M.; JARUGA, P.; BIRINCIOCLU, M.; RODRIGUEZ, H. Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 32, n. 11 p. 1102-1115, 2002.

FAIRFIELD, K. M.; FLETCHER, R. H. Vitamins for Chronic Disease Prevention in Adults. **Am. Med. Assoc.**, v. 287, n. 23, 2002.

FENECH, M.; FERGUSON, L. R. Vitamins/ minerals and genomic stability in humans. **Mutat. Res.**, v. 45, p. 1-6, 2001.

FRAGIORGE, E. J. **Efeitos moduladores do ácido ascórbico quando associado ao cloridrato de doxorrubicina em células somática se *Drosophila melanogaster*, tratadas na presença ou ausência de luz.** Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia – MG. 87p, 2000.

FREI, H.; WÜRGLER, F. E. Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative, or inconclusive result. **Mutat. Res.**, v. 203, p. 297-308, 1988.

FREI, H.; WÜRGLER, F. E. Optimal experimental design and sample size for the statistical evaluation of data from somatic mutation and recombination test (SMART) in *Drosophila*. **Mutat. Res.**, v. 334, p. 247-258, 1995.

FRÖLICH, A.; WÜRGLER, F.E. New tester strains with improved bioactivation capacity for the *Drosophila* wing-spot test. **Mutat. Res.**, v. 216, n. 3, p.179-87, 1989.

FRÖLICH, A.; WÜRGLER, F. E. Genotoxicity of ethyl carbamate in the *Drosophila* wing spot test: dependence on genotype-controlled metabolic capacity. **Mutat. Res.**, v. 244, p. 201-208, 1990.

GOTTLIEB, B. Vitamins, Minerals, Herbs and Supplements: a year in review. **Nat. Sensib.**, v. 2, n. 2, 1999. Disponível em: <<http://www.hartman-group.com/natsensII-2.html>>. Acesso em: 6 nov. 2001.

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

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

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

GUZMÁN-RINCÓN, J.; GRAF, U. *Drosophila melanogaster* somatic mutation and recombination test as a biomonitor. In BUTTERWORTH, F. M.; CORKUN, L. D.; GUZMÁN - RINCÓN, J (eds) **Biomonitoring and Biomarkers as Indicators of Environmental Change**. Phenunm Press, New York, N Y, pp. 169-181, 1995.

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants: a personal view. **Nutr. Rev.**, v. 52, p. 253-265, 1994.

HALSTED, C. H. Dietary supplements and functional foods: 2 sides of a coin? **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, v. 77, n. 4, p. 1001-1007, Apr. 2003.

HARTMAN GROUP. An excerpt from dietary supplement market view. **Nat. Sensib.**, Washington, v. 2, n. 5, 2000. Disponível em: <<http://www.hartman-group.com/natsensII-5.html>>. Acesso em: 7 nov. 2001.

HASHIZUME, R.; PARK, J. M. Vitamins, minerals, herbs and supplements: industry trends and analysis. **Nat. Sensib.**, Washington, v. 2, n. 7, 2000. Disponível em: <<http://www.hartman-group.com/natsensII-7.html>>. Acesso em: 6 nov. 2001.

HUSSEIN, A. M. Chemotherapy-induced alopecia: new developments. **South Med. J.**, v. 86, p. 489-496, 1993.

KADA, T.; INOUE, T.; NAMIKI, M. Environmental desmutagens and antimutagens, in: E. J. Krekowsky (Ed.), **Environmental Mutagenesis, Carcinogenesis and Plant Biology**, Praeger, New York, 1982, pp. 133-152.

KAYA, B.; CREUS, A.; VELÁZQUEZ, A.; YANIKO, A.; MARCOS, R. Genotoxicity is modulated by ascorbic acid. Studies using the wing spot test in *Drosophila*. **Mutat. Res.**, v. 520, n. 1-2, p. 93-101, 2002.

KASAI, H. Chemistry-based studies on oxidative DNA damage: formation, repair, and mutagenesis. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 33, n. 4, p. 450-456, 2002.

KEIZER, H. G.; PINEDO, H. M.; SCHUURHUIS, G.J.; JOENJE, H. Doxorubicin (adriamycin): A critical review of free radical-dependent mechanisms of cytotoxicity. **Pharmacol. Ther.** v. 47, n. 2, p. 219-231, 1990.

KONG, Q.; LILLHEI, K. O. Antioxidant inhibitors for cancer therapy. **Med. Hypot.**, v. 51, p. 405-409, 1998.

KONOPACKA, M.; WIDEL, M.; RZESZOWSKA-WOLNY, J. Modifying effect of vitamins C, E and beta-carotene against gamma-ray-induced DNA damage in mouse cells. **Mutat. Res.**, v. 417, p. 85-94, 1998.

KORAC, B.; BUZADZIC, B. Doxorubicin toxicity to the skin: possibility of protection with antioxidants enriched yeast. **J. Dermatol. Sci.**, v. 25, n. 1, p. 45-52, 2001.

KURODA, Y.; SHIMA, N.; YAZAWA, K.; KAJI, K. Desmutagenic and bio-antimutagenic activity of docosahexaenoic acid and eicosapentaenoic acid in cultured Chinese hamster V79 cells. **Mutat. Res.**, v. 497, p. 123-130, 2001.

LAMSONI, D. W.; BRIGNALL, M. S. Antioxidants in cancer therapy; their actions and interactions with oncologic therapies. **Alternative Med. Rev.**, v. 4, p. 304-329. 1999.

LEDERER, J. **Alimentação e câncer**. 3^a ed. Ed. Manole Dois, 1990.

LEHMANN, M.; FRANCO, A.; VILAR, K. S. P.; LUKZA REGULY, M.; ANDRADE, H. H. Doxorubicin and two of its analogues are preferential inducers of homologous recombination compared with mutational events in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Mutat. Res.**, v. 539, n. 1-2, p. 167-75, 2003.

LÓPEZ – BURILLO, S.; TAN, D, X. MAYO, J. C. SAINS, R. M.; MANCHESTER, L. C.; REITER, R. J. Melatonin, xanthurenic acid, resveratrol, EGCC, vitamin C and γ -lipoic acid differentially reduce oxidative DNA damage induced by Fenton reagents: a study of their individual and synergistic actions. **J. Pineal Res.**, v. 34, p. 269-277. 2003.

ODIN, A. P. Vitamins as antimutagens: Advantages and some possible mechanisms of antimutagenic action. **Mutat. Res.**, v. 386, n.1, p. 39-67, 1997.

PACKER, J. E.; MAHOOD, J. S.; MORA-ARELLANO, V. O.; SLATER, T. F.; WILSON, R. L.; WOLFENDEN, B. S. Free radicals and singlet oxygen scavengers: reaction of a peroxy-radical with beta-carotene, diphenyl furan and 1,4-diazobicyclo (2,2,2)-octane. **Biochem. Biophys. Res. Comg/mLum.** Orlando, v.98, n. 4, p. 901-906, 1981.

PACKER, L. Vitamin E, physical exercise and tissue damage in animals. **Med. Biol.**, v. 62, n. 2, p. 105-109, 1984.

PICADA, J. N.; KERN, A. L.; RAMOS, L. L. P.; SAFFI, J. O extresse oxidativo e as defesas antioxidantes. In: SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J. A. P. **Gen. Toxic.**, Porto Alegre: Alcance, 2003. p. 251-264.

POULSEN, H.E., PRIEME, H., LOFT, S. Role of oxidative DNA damage in cancer initiation and promotion. **Eur. J. Cancer Prev.**, v. 7, n. 1, p. 9-16, 1998.

PYRHONEN, S, KUITUNEN, T, NYANDOTO, P.; KOURI, M. Randomised comparison of fluorouracil, epidoxorubicin and methotrexate (FEMTX) plus supportive care with supportive care alone in patients with non-resectable gastric cancer. **Br. J. Cancer**, v. 71, p. 587-591, 1995.

- RAMJI, S.; LEE, C.; INABA, T.; PATTERSON, A. V.; RIDDICK, D. S. Human NADPH-cytochrome P-450 reductase overexpression does not enhance the aerobic cytotoxicity of doxorubicin in human breast cancer cell lines. **Cancer Res.** v. 63, n. 20, p. 6914-6919, 2003.
- REITER, R. J. Oxidative process and antioxidative defense mechanisms in the aging brain. **FASEB J.**, v. 9, p. 526-533, 1995.
- RODRIGUEZ-ARNAIZ, R.; SORTIBRAN, A. C.; TELLEZ, G. O. Detection of mitotic recombination and sex chromosome loss induced by adriamycin, chlorambucil, demecolcine, paclitaxel and vinblastine in somatic cells of *Drosophila melanogaster* in vivo. **Mutagenesis.** v. 19, n. 2, p. 121-127, 2004.
- SANTOS, H. S.; CRUZ, W. M. S. A terapia nutricional com vitaminas antioxidantes e o tratamento quimioterápico oncológico. **Ver. Bras. Onc.**, v. 47, n. 3, p. 303-308, 2001.
- SIES, H. Strategies of antioxidant defence. Review. **Eur. J. Biochem.**, v. 215, n. 2, p. 213-219, 1993.
- SIES, H., STAHL, W. Vitamins E and C, β -carotene, and other carotenoids as antioxidants. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 62, n. 6, p. 1315-1321, 1995.
- SKEEL, R. T. **Manual de quimioterapia.** 3ª ed. Ed. Medsi, 1993.
- TEAM CANADA. The vitamin, nutraceutical and dietary supplement market in Japan. 1999. Disponível em: <<http://ats-sea.agr.ca/public/htmldocs/e2815.htm>>. Acesso em: 7 nov. 2001.
- TRABER, M.G. Cellular and molecular mechanisms of oxidants and antioxidants. **Miner. Electrolyte Metab.**, v. 23, n. 3, p. 135-139, 1997.
- VOGEL, E. W.; ZILSTRA, J. A. Somatic cell mutagenicity in *Drosophila melanogaster* in comparison with genetic damage in early germ-cell stages. **Mutat. Res.**, v. 180, p. 189-200, 1987.

WEIJL, N. I.; HOPMAN, G. D.; WIPKINK-BAKKER, A. Cisplatin combination chemotherapy induces a fall in plasma antioxidants of cancer patients. **Ann. Oncol.**, v. 9, n. 12, p. 1331-1337, 1998.

WÜRGLER, F. E.; SOBELS, F. H.; VOGEL, E. Drosophila as an assay system for detecting genetic changes. In: **Handbook of mutagenicity test procedure** (B. J., KILBEY *et al.*, Eds.) 2nd ed. Elsevier, Amsterdam, 1984. pp. 555-601.

FU00034898-1