

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

**Efeitos moduladores do ácido ascórbico quando associado ao
cloridrato de doxorrubicina em células somáticas de *Drosophila*
melanogaster, tratadas na presença e ausência de luz.**

Edson José Fragiorge

UBERLÂNDIA – MG

2000

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

MON
575
F811e
TES/MEC

**Efeitos moduladores do ácido ascórbico quando associado ao
cloridrato de doxorubicina em células somáticas de *Drosophila*
melanogaster, tratadas na presença e ausência de luz.**

Edson José Fragiorge

**Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação
em Genética e Bioquímica da Universidade Federal de
Uberlândia (Uberlândia – MG), para obtenção do grau
de Mestre em Genética e Bioquímica.**

Orientador: Prof. Dr. Mário A. Spanó

SISBI/UFU



1000194181

Uberlândia – MG

2000

37 302

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
BIBLIOTECA

SISBI/UFU
DA/99 194181 ex. 1

FU-00011217-1

0046-95560

FICHA CATALOGRÁFICA

F811e Fragiorge, Edson José, 1962-

Efeitos moduladores do ácido ascórbico quando associado ao cloridrato de doxorrubicina em células somáticas de *Drosophila melanogaster*, tratadas na presença e ausência de luz / Edson José Fragiorge. – Uberlândia, 2000.

87f. : il.

Orientador: Mário A. Spanó.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Uberlândia, Curso de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.

Bibliografia: f. 71-87.

1. Genética - Teses. 2. SMART - Teses. 3. Testes de mutagenicidade - Teses. 4. *Drosophila melanogaster* - Teses. 5. Vitamina C - Teses. I. Universidade Federal de Uberlândia, Curso de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. II. Título.

CDU: 575

À minha esposa **Maria Lúcia**, pela constante
presença no trabalho que realizo.

Aos meus filhos, **Breno** e **Victória** pelos
momentos que tive que me ausentar.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

**Ao meu pai, José Fragiorge e minha mãe, Maria de Lourdes Ferreira Fragiorge,
pelas observações e palavras de estímulo, incentivando-me a cada encontro.**

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Mário A. Spanó**, pela oportunidade de um trabalho conjunto sob sua orientação geral.

Ao **Prof. Dr. Ulrich Graf** do Instituto de Toxicologia – Universidade de Zürich, Schwerzenbach, Suíça, pelo fornecimento das linhagens mutantes de *Drosophila melanogaster* e materiais necessários para a realização dos testes para detecção de mutações e recombinações somáticas em células de asas de *Drosophila melanogaster*.

Ao **Prof. Dr. Júlio César Nepomuceno** do Laboratório de Citogenética e Mutagênese da Universidade Federal de Uberlândia, pelas confirmações morfológicas entre manchas com pêlos “flare” e “multiple wing hairs”, durante as primeiras análises microscópicas das asas de *Drosophila melanogaster*.

Ao **Prof. Dr. Salvador de Carvalho** e à **Profª Drª Lee Chen Chen**, da Universidade Federal de Goiás, Goiânia – GO, pela disponibilidade em participarem da Banca Examinadora desta Dissertação de Mestrado e pelas valiosas sugestões apresentadas.

Aos estagiários, estudantes de mestrado e doutorado do Laboratório de Citogenética e Mutagênese da Universidade Federal de Uberlândia **Eloiza Peres Rodrigues**, **Bruno Lassmar Bueno Valadares**, **Regildo Márcio da Silva**, pela colaboração durante o Curso de Pós-graduação.

À auxiliar do Laboratório de Citogenética e Mutagênese da Universidade Federal de Uberlândia – MG, **Sra. Maria Aparecida Vilela Gomes**, pela amizade e colaboração.

Ao **Dr. Rogério Agenor de Araújo** do Setor de Oncologia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia, pela colaboração.

Aos **Diretores, Professores e Funcionários** da Escola Agrotécnica Federal de Uberlândia (Uberlândia – MG), pelo apoio e permissão para a realização da Pós-graduação na Universidade Federal de Uberlândia.

Aos **Diretores, Professores e Funcionários** do Centro Universitário do Triângulo – UNIT, pelo incentivo.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

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

- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)
- Universidade Federal de Uberlândia

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Mutação e câncer.....	1
1.2. Teste para detecção de mutações e recombinações somáticas (Somatic Mutation And Recombination Test - SMART) em células de asas de <i>D. melanogaster</i>	5
1.3. A doxorubicina.....	8
1.4. As topoisomerases.....	10
1.5. A vitamina C (ácido ascórbico - AA).....	12
2. OBJETIVOS	14
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	15
3.1. Agentes químicos	15
3.2. Agente físico	16
3.3. Teste para detecção de mutações e recombinações somáticas (Somatic Mutation And Recombination Test – SMART) (Graf et al., 1984).....	16
3.3.1. Linhagens mutantes de <i>Drosophila melanogaster</i> :	16
3.3.2. Cruzamentos entre as linhagens mutantes.....	17
3.4. Procedimentos.....	18
3.5. Montagem de asas	18
3.6. Análise de lâminas.....	18
3.7. Análise estatística.....	19
3.8. Verificação dos efeitos moduladores do ácido ascórbico quando associado ao cloridrato de doxorubicina em células somáticas de <i>Drosophila melanogaster</i> , tratadas na presença de luz.	19
3.9. Verificação dos efeitos moduladores do ácido ascórbico quando associado ao cloridrato de doxorubicina em células somáticas de <i>Drosophila melanogaster</i> , tratadas na presença e na ausência de luz.	20
4. RESULTADOS.....	22
4.1. Verificação dos efeitos moduladores do ácido ascórbico quando associado ao cloridrato de doxorubicina em células somáticas de <i>Drosophila melanogaster</i> , tratadas na presença de luz.	22

4.2. Verificação dos efeitos moduladores do ácido ascórbico quando associado ao cloridrato de doxorrubicina em células somáticas de <i>Drosophila melanogaster</i> , tratadas na presença e ausência de luz.....	39
4.2.1. Presença de luz.	39
4.2.2. Ausência de luz.....	40
5. DISCUSSÃO	55
5.1. Efeitos moduladores do ácido ascórbico quando associado ao cloridrato de doxorrubicina em células somáticas de <i>Drosophila melanogaster</i> , tratadas na presença de luz (Experimento 1).....	55
5.2. Efeitos moduladores do ácido ascórbico quando associado ao cloridrato de doxorrubicina em células somáticas de <i>Drosophila melanogaster</i> , tratadas na presença e ausência de luz (Experimento 2).....	57
5.2.1. Presença de luz (Experimento 2).....	59
5.2.2. Ausência de luz (Experimento 2)	60
5.3. Análise comparativa com dados da literatura	62
6. CONCLUSÕES	65
7. RESUMO.....	67
8. ABSTRACT.....	69
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71

1. INTRODUÇÃO

1.1. Mutação e câncer

A origem de um câncer inicia-se com um descontrole dos mecanismos intrínsecos que regulam a divisão celular, fazendo com que uma célula se torne habilitada em se dividir mais rapidamente em relação às adjacentes (Jones, 1986; Gonzalgo e Jones, 1997).

O desenvolvimento de um câncer geralmente envolve muitas etapas, cada qual governada por múltiplos fatores, alguns dependentes da constituição genética do indivíduo, outros dependentes do ambiente e do estilo de vida. Portanto, por mudança do ambiente ou hábitos, devemos, em princípio, ser capazes de reduzir drasticamente nossa chance de desenvolver quase todos os tipos de câncer (Alberts *et al.*, 1997).

Cânceres, como regra geral, resultam da ocorrência de vários acidentes independentes em uma célula com efeitos cumulativos. Há, entretanto, alguns agentes excepcionalmente carcinogênicos que aumentam a probabilidade de tornar os eventos críticos para o desenvolvimento do câncer, a ponto de serem virtualmente certos (Alberts *et al.*, 1997).

Alguns desses carcinógenos atuam diretamente na célula alvo. Muitos outros são efetivos somente após terem sido modificados para uma forma mais reativa através de processos metabólicos – especialmente por um conjunto de enzimas intracelulares conhecidas como citocromo oxidases P-450. Essas enzimas normalmente ajudam a conversão das toxinas ingeridas e materiais lipídicos solúveis estranhos, em compostos inócuos e facilmente excretáveis, mas essas falham nesta tarefa com certas substâncias convertendo os mesmos em carcinógenos. Embora os carcinógenos químicos conhecidos sejam muito diversificados, a maioria possui pelo menos uma propriedade em comum – causam mutações (Alberts *et al.*, 1997).

Assim, o desenvolvimento de um câncer é considerado como sendo um processo que envolve múltiplos estágios, no qual o evento mutacional é um dos mais importantes (Bronzetti *et al.*, 1996).

O corpo de um animal pode ser visto como uma sociedade ou um ecossistema, cujos membros individuais são as células, que se reproduzem por divisão celular e são organizadas em conjuntos colaborativos ou tecidos. O organismo sadio é uma sociedade muito peculiar, onde a regra é o auto-sacrifício, onde todas as linhagens de células somáticas são comprometidas com a morte, não deixam progênie, mas dedicam sua existência para o suporte às células germinativas que, por si, têm a chance de viver (Alberts *et al.*, 1997).

Para o corpo de um indivíduo a célula somática é um clone e o seu genoma é o mesmo das células germinativas. Pelo seu auto-sacrifício em favor das células germinativas, as células somáticas ajudam a propagar cópias de seus próprios genes. Assim, as células de um organismo multicelular são comprometidas para a colaboração. Qualquer mutação que dá origem ao comportamento egoísta por membros individuais da cooperativa irá colocar em risco o futuro de todo o empreendimento. Mutação, competição e seleção natural operando dentro da população de células somáticas são os ingredientes básicos do câncer que é uma doença na qual células individuais mutantes iniciam sua prosperidade a custa de seus vizinhos, mas no final destrói toda a sociedade celular e morre (Alberts *et al.*, 1997).

Mutação é toda alteração do material genético de uma célula que não resulta de segregação ou recombinação. Quando não é letal para a própria célula ela pode propagar-se pelo corpo em crescimento (mutação somática) ou transmitir-se às gerações seguintes (mutação germinal). A mutação pode ser espontânea ou induzida por agentes físicos, químicos ou biológicos. Incidindo sobre células somáticas, pode levar a um processo carcinogênico no próprio indivíduo. Se ocorrer em células germinativas, pode produzir doenças ou malformações nas gerações futuras (Rabello-Gay, 1991).

Atualmente sabe-se que as alterações genéticas podem ser de muitos tipos e serem induzidas por uma variedade de agentes, por vários mecanismos diferentes, alguns dos quais são parcialmente conhecidos, mas que há muito ainda para ser elucidado (Preston, 1995) (*apud* Corrales, 1997).

Alterações a nível global e mudanças regionais nos padrões de metilação do DNA são eventos mais freqüentes conhecidos para ocorrer câncer humano (Gama-Sosa *et al.*, 1983; Gonzalgo e Jones, 1997).

Células somáticas e germinativas são similarmente sensíveis a ação mutagênica de agentes quimioterápicos em sistemas de mamíferos *in vivo* e *in vitro* (Adler *et al.*, 1994).

Uma das propostas para minimizar esse problema é a associação de agentes genotóxicos com agentes antimutagênicos e anticarcinogênicos (Hartman e Shankel, 1990; Shankel e Clarke, 1990).

O termo “antimutagênico” foi usado originalmente por Novick e Szilard em 1952 (in Liviero e von Borstel, 1996) para descrever os compostos que reduzem a frequência ou a taxa de mutações espontâneas ou induzidas, independentemente dos mecanismos de proteção envolvidos. O termo “anticarcinogênico” também é usado no mesmo sentido geral para os agentes que reduzem ou inibem o desenvolvimento de tumores (in Antunes, 1997).

Os agentes antimutagênicos podem ser classificados em desmutagênicos e bioantimutagênicos. Os desmutagênicos são aqueles que inativam os agentes mutagênicos, pela inibição das enzimas metabólicas ou previnem a interação do mutágeno com o DNA. Os bioantimutagênicos são aqueles que reduzem os efeitos genotóxicos por meio da modulação de mudanças celulares envolvidas nos mecanismos de reparo do DNA danificado (Kada *et al.*, 1982).

A dieta humana contém uma grande variedade de agentes mutagênicos e carcinogênicos, assim como muitos agentes antimutagênicos e anticarcinogênicos naturais (Ames, 1983). O conhecimento atual nesta área de pesquisa começou a se desenvolver com a identificação de várias substâncias antimutagênicas presentes na dieta, uma vez que muitos suplementos alimentares são indicados para diminuir os efeitos colaterais desconfortantes da quimioterapia. Muitos desses suplementos alimentares são também ricos em agentes antimutagênicos e podem afetar a eficácia biológica das drogas antitumorais (Gentile *et al.*, 1998).

Tem sido demonstrado os efeitos antigenotóxicos de diferentes agentes químicos presentes na dieta, tais como legumes, verduras, temperos, chás e café (Abraham *et al.*, 1998), *Moringa oleifera* (Nepomuceno, 1999), vitaminas e compostos relacionados (Antunes e Takahashi, 1998; Badr *et al.*, 1998; Konopacka *et al.*, 1998; Gentile *et al.*, 1998; Xue *et al.*, 1998; Edenharder *et al.*, 1999; Antunes *et al.*, 2000); agentes organosulfurosos extraídos de *Allium* (Guyonnet *et al.*, 2000).

Uma das tentativas para decrescer a taxa de mutações espontâneas ou induzidas nos seres humanos e, subseqüentemente, reduzir a incidência de câncer, é a identificação de agentes antimutagênicos e/ou anticarcinogênicos efetivos, e aumentar a exposição a esses compostos, especialmente por meio da dieta (Waters *et al.*, 1996).

Os agentes genotóxicos podem induzir mutações bem como recombinações no material genético. A mosca da fruta *Drosophila melanogaster* foi um dos primeiros sistemas experimentais utilizados para avaliar os efeitos mutagênicos e recombinogênicos de agentes físicos e químicos, sendo que esses efeitos podem ser observados tanto em células da linhagem germinativa como em células somáticas (Würgler, 1991).

Além disso, 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), por possuir um sistema enzimático semelhante ao dos mamíferos, que permite o metabolismo de agentes xenobióticos (Barrs, 1980; Hällström *et al.*, 1984), e por ser um organismo pequeno, de fácil manutenção, tempo de geração curto, de grande progênie, e baixo número de cromossomos (Graf *et al.*, 1984); além de ser um ensaio sensível e barato capaz de detectar uma grande variedade de genotoxinas (Würgler e Vogel, 1986).

Graf *et al.* (1984) desenvolveram um teste de curta duração (Somatic Mutation And Recombination Test - SMART) 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 nº 3 de *Drosophila melanogaster*.

1.2. Teste para detecção de mutações e recombinações somáticas (Somatic Mutation And Recombination Test - SMART) em células de asas de *D. melanogaster*

O teste da mancha da asa é baseado na indução de manchas mutantes (clones) que surgem a partir da perda da heterozigose de células em desenvolvimento, as quais são heterozigotas para um gene recessivo marcador, presente nas células das asas das moscas (Guzmán-Rincón e Graf, 1995; Frei e Würgler, 1996).

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).

Para a realização deste teste são utilizadas três linhagens mutantes de *Drosophila melanogaster*: 1) Linhagem multiple wing hairs (mwh), que possui um gene mutante (*mwh*) no cromossomo nº 3 (3-0,3) em condição homozigota, que corresponde a um mutante recessivo que determina que as células da asa 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) no cromossomo nº 3 (3-38,8), que afeta os pêlos das células da asa, modificando-os, parecendo uma chama (Guzmán-Rincón *et al.*, 1994); 3) Linhagem ORR; flare-3 (ORR; *flr*³), construída por Frölich e Würgler (1989), que possui um gene marcador recessivo em hemizigose (*flr*³) no cromossomo nº 3 (3-38,8), que afeta os pêlos das células das asas, modificando-os, parecendo uma chama, e um cromossomo nº 2, transferido de uma linhagem selvagem Oregon R (ORR), resistente ao DDT (Dapkus e Merrel, 1977). Esta linhagem "ORR; flare-3" é caracterizada por um aumento na atividade de enzimas P-450 (Hällström e Blanck, 1985; Guzmán-Rincón e Graf, 1995). A ativação de promutágenos e de pró-carcinógenos é realizada pelas enzimas citocromo P-450, que consiste de várias formas de isoenzimas que têm a capacidade de metabolizar uma variedade de substratos (Frölich e Würgler, 1989). García Bellido e Dapena (1974) e Lindsley e Zimm (1992) apresentam informações detalhadas sobre os marcadores genéticos acima descritos (*apud* Corrales, 1997).

O gene *flr*³ das linhagens "flare-3" e "ORR; flare-3" é letal em homozigose. Assim sendo, ambas linhagens possuem o gene *flr*³ em hemizigose, sendo que o cromossomo homólogo, balanceador (TM3, Bd^S), apresenta inversões múltiplas (Graf *et al.*, 1984) (*apud* Corrales, 1997).

O SMART para detecção de manchas mutantes nas asas de *Drosophila melanogaster* é realizado por meio de dois cruzamentos:

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

Destes cruzamentos são obtidos dois tipos de descendentes: marcador trans-heterozigoto (MH), e balanceador heterozigoto (BH). As larvas, de ambos genótipos, são tratadas com diferentes concentrações do agente químico a ser testado.

A escolha das condições ótimas de tratamento (concentração dos compostos, duração do tratamento e a idade das larvas no tratamento) é essencial (Graf *et al.*, 1990).

Nos adultos emergentes MH as manchas mutantes aparecem como manchas simples, apresentando o fenótipo "mwh" ou "flare" ou manchas gêmeas ("mwh/flare"). Essas manchas mutantes podem ser induzidas por diferentes mecanismos genéticos, tais como mutação, deleção ou recombinação somática (Haynie e Bryant, 1977, Graf *et al.*, 1984). A Figura 1 mostra fotomicrografia de pêlo normal. A Figura 2 mostra fotomicrografias de pêlos múltiplos e flare.

Nos adultos emergentes BH as manchas mutantes aparecem apenas como manchas simples do tipo "mwh", devido à presença do cromossomo balanceador, que apresenta inversões múltiplas, o que faz com que todos os eventos recombinacionais sejam eliminados, fazendo com que a frequência de manchas seja consideravelmente reduzida (Graf *et al.*, 1984).

Assim sendo, nos descendentes BH apenas os eventos mutacionais levam à formação de manchas mutantes.

Durante a análise é registrado o número de manchas, assim como o tipo e o número de pêlos mutantes existentes em cada mancha.

A Figura 1 mostra uma fotomicrografia de pêlos normais. A Figura 2 mostra fotomicrografias de pêlos múltiplos e pêlos flare.

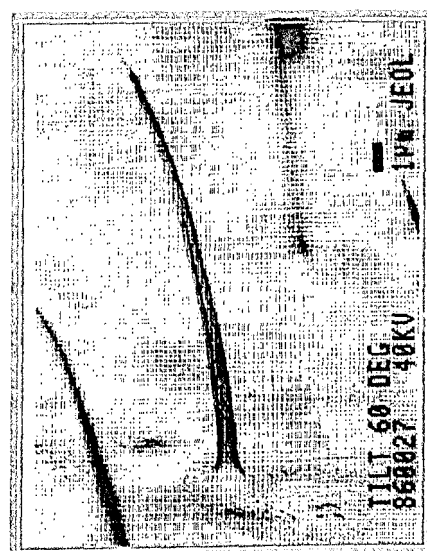


Figura 1. Fotomicrografia mostrando pêlos normais (Cortesia do Dr. Ulrich Graf, do Instituto de Toxicologia – Universidade de Zürich, Schwerzenbach, Suíça).

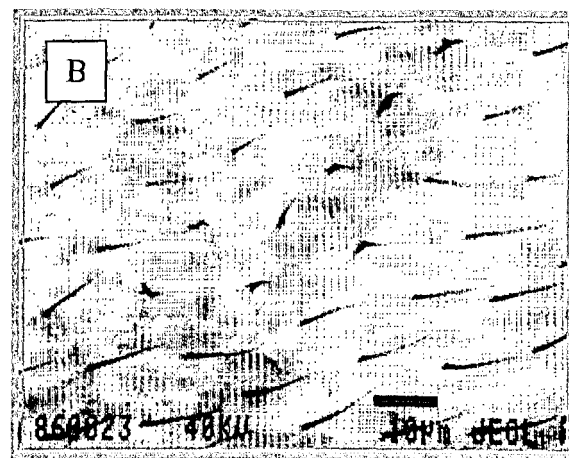
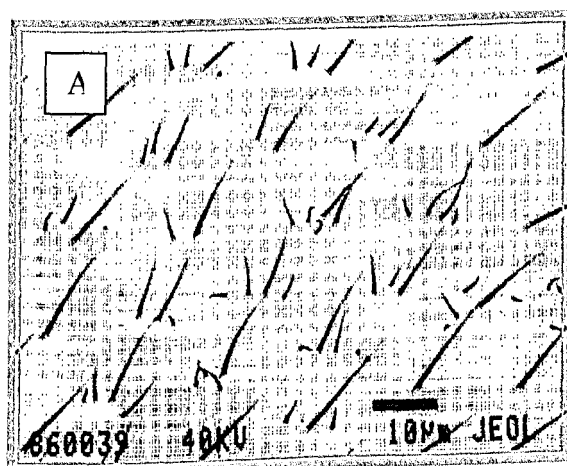


Figura 2. Fotomicrografias mostrando pêlos múltiplos (A) e pêlos flare (B) (Cortesia do Dr. Ulrich Graf, do Instituto de Toxicologia – Universidade de Zürich, Schwerzenbach, Suíça).

1.3. A doxorubicina

A quimioterapia citotóxica é rotineiramente utilizada no tratamento do câncer e tem sido um importante fator no aumento na taxa de sobrevivência de alguns tipos dessa doença. Diferentes agentes quimioterápicos são disponíveis, com diferentes modos de ação. Alguns causam efeitos tóxicos diretos, sendo que muitos, se não todos, são mutagênicos e carcinogênicos (Ferguson e Pearson, 1996; Gentile *et al.*, 1998).

O paradigma dos agentes citotóxicos anticâncer é uma antraciclina chamada doxorubicina (DXR) (Lown, 1993), também conhecida como adriamicina (Doroshov e Davies, 1986). A DXR é um dos principais agentes anti-tumorais disponíveis para uso clínico. Além de se intercalar à molécula de DNA, esta droga gera radicais livres (Antunes e Takahashi, 1998).

Alguns trabalhos demonstram que a DXR pode ser inativada quando submetida à luz visível, sendo que a taxa de inativação é dependente do meio ou veículo em que se encontra (Le Bot *et al.*, 1988).

Uma revisão sobre a descoberta das antraciclinas e a elucidação de seus vários mecanismos de ação, assim como os esforços para melhorar sua eficácia terapêutica são apresentados por Lown (1993).

A DXR é um quimioterápico com potente atividade contra uma ampla série de neoplasias malignas humanas, incluindo leucemia aguda, linfoma do tipo “non-Hodgkins”, câncer de mama e sarcomas (Young *et al.*, 1981 e Guano *et al.*, 1999) (*apud* Antunes, 1997).

Reações de superóxidos com antraciclinas *in vivo* desempenham um papel importante na atividade antitumoral e/ou na etiologia dos efeitos tóxicos colaterais dessa classe de drogas (Nakazawa *et al.*, 1985).

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 redutase, EC1.6.99.3), que catalizam a redução do ferrocitocromo c a ferrocitocromo c pela NADH (Thornalley *et al.*, 1986).

A degeneração mitocondrial é uma alteração morfológica associada à toxicidade da adriamicina, a qual pode ser consequência de dano peroxidativo aumentado pela adriamicina nos lipídios insaturados da membrana mitocondrial (Mimnaugh *et al.*, 1985).

Tem sido demonstrado, ainda, que as injúrias às mitocôndrias cardíacas, produzidas pelas antraciclinas, podem contribuir para o potencial metastático (Doroshov e Davies, 1986).

Embora preferencialmente citotóxica em linhagens tumorais, a DXR também afeta os tecidos normais (Berlin e Haseltine, 1981) (*apud* Antunes, 1997).

Tem sido demonstrado que a adsorção da DXR leva à necrose da pele e a significativa morbidade. No entanto, seqüestradores de radicais livres, como o DMSO e o ácido ascórbico são capazes de diminuir a incidência de úlceras na pele, induzidas pela DXR e pode diminuir significativamente a morbidade associada com a adsorção de DXR (Hajarizadeh *et al.*, 1994).

Fujita *et al.* (1982) examinaram os efeitos do AA na redução da toxicidade da DXR em camundongos e cobaias. Verificaram que o AA não teve efeitos sobre a atividade antitumoral da DXR em camundongos inoculados com células leucêmicas L1210, porém prolongaram significativamente a vida de camundongos e cobaias tratadas com DXR.

Os efeitos genotóxicos da DXR foram extensivamente investigados em pacientes submetidos ao tratamento quimioterápico (Boucher *et al.*, 1993), em linfócitos de doadores saudáveis em cultura (Vig, 1971) e em linhagens celulares de mamíferos (Bean *et al.*, 1992). Estes estudos mostraram que a DXR induziu aberrações cromossômicas em linfócitos humanos e em células de ovário de hamster Chinês *in vitro* (Vig, 1971; Drewinko e Gottlieb, 1973; Yu *et al.*, 1994) e em células da medula óssea de camundongos *in vitro* (Larramendy *et al.*, 1980; Dulout *et al.*, 1981; Bean *et al.*, 1992); causou lesões no DNA nas linhagens de leucemia de roedores P388 e L1210, por meio da estabilização de um complexo com o DNA Topoisomerase II (Ross *et al.*, 1979; Goldenberg *et al.*, 1986; Zunino *et al.*, 1980); provocou a formação de aductos na molécula de DNA (Phillips *et al.*, 1989) e mutações em sistemas de células de mamíferos, de *Xenopus* e em bactérias (Rosselli *et al.*, 1990; Risley e Phorenec, 1991; Anderson *et al.*, 1993; Helbig *et al.*, 1994; Péres-Chiesa *et al.*, 1994) (*apud* Antunes, 1997).

A DXR é capaz de interagir com vários componentes celulares e apresenta múltiplos efeitos biológicos e bioquímicos, tais como: a) intercalação no DNA provocando a alteração da estrutura tridimensional da molécula de DNA e diminuindo a especificidade de ligação das DNA e RNA Topoisomerase II; b) ligação com o DNA e estabilização de um complexo ternário DXR-ácidos nucléicos-DNA Topoisomerase II;

c) interação com as camadas de fosfolípídeo da membrana celular e, d) formação de radicais livres intracelulares gerados pelo grupo quinona da DXR (Sinha *et al.*, 1987; Bodley *et al.*, 1989; Cummings *et al.*, 1992) (*apud* Antunes, 1997).

1.4. As topoisomerases

O agente antitumoral DXR estimula a quebra da dupla-hélice de ácidos nucléicos isolados de *Drosophila*. A cisão do DNA é geralmente feita por produtos endógenos de topoisomerase II (Udvardy *et al.*, 1986).

O complexo SDS/DNA topoisomerase induz clivagem do DNA e a enzima do complexo se liga covalentemente no terminal fosfato do DNA cortado. Há sítios específicos hipersensíveis localizados na posição 5' e 3' da histona H4. Preliminarmente a topoisomerase do tipo II é a principal responsável pela clivagem do DNA (Villeponteau, 1989).

Os sítios de quebra da topoisomerase II de *Drosophila* são áreas específicas de ligação com DNA (Lee *et al.*, 1989).

Em contraste com inibidores citotóxicos da Topoisomerase II (acridinas, epipodofilotoxinas), as antraciclinas produzem complexo de clivagem do DNA permanente. Isto é mais evidente com derivados de doxorubicina do que com derivados de daunorubicina (Zunino e Capranico, 1990).

A ação citotóxica das antraciclinas pode ser o resultado de uma interação do nível, persistência e localização genômica da quebra do DNA mediada pela topoisomerase II (Binaschi *et al.*, 1997).

A alteração do estado topológico de genes por meio de inibidores de DNA topoisomerase II, impede sua expressão fenotípica tanto *in vivo* como *in vitro*. (Preston e White, 1990).

Nem todos os inibidores de topoisomerase são genotóxicos em *Drosophila melanogaster* e induzem manchas na asa (Ferguson e Baguley, 1994; Ralph *et al.*, 1994).

De acordo com Leteurtre *et al.* (1994), a metilação do DNA também pode ter profundos efeitos na atividade das topoisomerases e pode alterar a distribuição de sítios de quebra, na cromatina, produzidos por drogas anticâncer.

Há regiões estruturais no DNA que estão envolvidas no funcionamento do complexo topoisomerase II/DNA. Tais regiões fazem mediação de reações de clivagem e reassociação do DNA (Solovyan e Andreyev, 1995).

A clivagem do DNA, pela ação da DNA topoisomerase II, se realiza pela interação química entre três regiões da dupla hélice e a enzima. (Alsner *et al.*, 1996).

Borde e Duguet. (1996) demonstraram que existem sítios de clivagens droga-dependente para a topoisomerase II no DNA ribossomal extracromossomal do eucarioto inferior *Physarum polycephalum*, durante a metáfase de mitose, sugerindo um papel para a topoisomerase II na segregação de microcromossomos no DNA ribossomal. A estrutura da cromatina também mostra um papel determinante nos sítios de interação da topoisomerase II com o DNA *in vivo*.

Há diferentes modos de ação entre os inibidores de topoisomerase (Frei e Würzler, 1996).

O padrão do sítio para clivagem, mediada pela topoisomerase II, foi determinado em 830 kb do DNA clonado a partir do cromossomo X de *Drosophila* (Miassod *et al.*, 1997).

Compostos que interferem na ação da topoisomerase podem ser divididos em duas categorias, baseadas no mecanismo de ação da droga: veneno e inibição catalítica. (Capranico *et al.*, 1997).

Compostos antitumores de pequenos pesos moleculares podem ter uma melhor habilidade em se ligar em interfaces Proteína/DNA, constituindo sítios específicos genômicos para ligação de drogas (Capranico *et al.*, 1997).

Estudos demonstram que várias formas de danos espontâneos no DNA estimulam clivagem mediada pela topoisomerase II de *Drosophila*. Três tipos de lesões (efeitos de sítios apurínicos, sítios apirimídicos e resíduos deaminados de citosina) atuaram como venenos da alfa topoisomerase II humana, estimulando clivagem do DNA (Kingma *et al.*, 1995; 1997a; 1997b; 1998).

Agentes químicos capazes de interferir com DNA topoisomerase II são muito difundidos na natureza, e alguns deles têm eficácia clínica como antitumor ou droga antibacteriana. Drogas que tem como alvo a DNA topoisomerase II podem ser divididas em duas categorias: venenos e inibidores catalíticos. Os venenos atuam estimulando a

quebra da topoisomerase; atuam assim, apresentando um padrão “droga específica” (Capranico e Binaschi, 1998).

Yoon *et al.* (1998) demonstraram quebras de regiões repetitivas do DNA telomérico por topoisomerase II somente quando associada a etoposide, tanto em sistemas *in vivo*, como *in vitro*, em células HeLa. De acordo com esses autores, podem existir sítios de quebra a cada 6 pares de bases 5'TTAGG*G3' (sítio de quebra marcado por um asterístico).

As principais conclusões sobre a preferência de ação dos sítios da topoisomerase até 1998 são os seguintes: i) os sítios da topoisomerase estão localizados próximos das origens de replicação e terminação onde teriam um papel na formação das moléculas filhas do DNA e sua ação na iniciação da replicação; ii) sítios de Topoisomerase II são achados na região promotora de alguns genes, mas eles parecem estar relacionados a um estado de condensação da cromatina nesta região, antes da transcrição; iii) sítios de topoisomerase apresentariam um papel de ancoradouro nas alças da cromatina e ou na topologia de cada alça cromatínica (Borde e Duguet, 1998).

1.5. A vitamina C (ácido ascórbico - AA)

As vitaminas são micronutrientes definidos como um grupo de compostos orgânicos que são necessários, em pequenas quantidades, para a manutenção das funções vitais dos organismos. Essas vitaminas são classificadas em lipossolúveis ou hidrossolúveis. As lipossolúveis (A, D, E e K) são armazenadas principalmente no fígado e podem ser acumuladas a níveis tóxicos para o corpo. As vitaminas hidrossolúveis (C e B) geralmente não são armazenadas e devem ser obtidas diariamente da dieta (Keith, 1989). O acúmulo de evidências dos efeitos benéficos das vitaminas sobre a saúde e a identificação da quinta fase, relacionada às propriedades antimutagênicas e anticarginogênicas das vitaminas C, E e A (Machlin, 1992). Além disso, essas vitaminas são consideradas excelentes agentes antioxidantes, capazes de sequestrar os radicais de oxigênio livres com grande eficiência (*apud* Antunes, 1997).

A definição mais abrangente de um agente antioxidante é qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações comparada àquelas do substrato

oxidante, atrasa ou inibe a oxidação do substrato de maneira eficaz (Sies e Stahl, 1995) (*apud* Antunes, 1997).

Os compostos antioxidantes como as vitaminas C, E e A são capazes de restringir a propagação das reações em cadeia iniciadas pelos radicais de oxigênio livres, os quais são formados pelos processos metabólicos ou como resultado da exposição aos fatores ambientais (Shamberger, 1984). Ao lado da sua importância biológica, algumas vitaminas têm apresentado efeitos protetores contra as lesões induzidas pelos agentes citostáticos, bem como atividade carcinogênica de radiações ionizantes ou agentes químicos em sistemas experimentais (Fujita *et al.*, 1982; Gebhart *et al.*, 1985; Ushakova *et al.*, 1996) (*apud* Antunes, 1997), assim como aumenta a sobrevivência de larvas de insetos submetidos à ação de radicais livres (Bruins *et al.*, 1997).

A vitamina C (ácido ascórbico - AA) é geralmente consumida em grandes doses pelos seres humanos, sendo adicionada a muitos produtos alimentares para inibir a formação de metabólitos nitrosos carcinogênicos (Stich *et al.*, 1979). Essa vitamina é absorvida da dieta de forma rápida e eficiente por um processo dependente de energia. Portanto, o consumo de altas doses pode aumentar a concentração da vitamina C nos tecidos e no plasma sanguíneo (Linder, 1991) (*apud* Antunes, 1997).

2. OBJETIVOS

A doxorubicina (DXR) é um antibiótico, da classe das antraciclinas, considerado como o paradigma dos agentes antineoplásicos, atualmente disponíveis para o uso clínico. Além de intercalar-se na molécula do DNA, esse antibiótico gera radicais livres de oxigênio. Agentes antioxidantes, como a vitamina C (ácido ascórbico – AA), podem proteger as células e os tecidos normais dos danos provocados pelos radicais livres, sem interferir com a citotoxicidade da DXR sobre as células neoplásicas. A DXR é instável quando exposta à energia luminosa.

O teste para detecção de mutações e recombinações somáticas em células de asas de *Drosophila melanogaster* é considerado um importante instrumento na detecção de agentes mutagênicos e antimutagênicos.

Diante do exposto, este trabalho teve como objetivos:

- Avaliar os efeitos genotóxicos do ácido ascórbico e da DXR, isoladamente, em células de asas de *Drosophila melanogaster*.
- Investigar os efeitos moduladores do ácido ascórbico quando associado à DXR em células de asas de *Drosophila melanogaster*, na presença e na ausência da luz.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Agentes químicos

- Cloridrato de doxorrubicina (DXR) [(85-cis) -10 - [(3 - Amino -2, 3, 6 - trideoxi - α - L - lixohexapiranosil) oxil] - 7, 8, 9, 10 - tetrahydro - 6, 8, 11 - trihidroxi - 8 (hidroxiacetil) - 1 - metoxi - 5, 12 - naftacenodiona], P. M. 543,5; F. M. $C_{27}H_{29}N-O_{11}.HCl$; CAS 23214-92-8 (Figura 3), conhecida comercialmente com os nomes de Adriblastina[®] e Doxina[®].
- Adriblastina[®], distribuída sob a forma liofilizada pela Pharmacia S.p.A., Milão - Itália, importada e distribuída por Pharmacia Ind. Com. Ltda., Duque de Caxias, RJ, Brasil. Cada frasco contém: 10 mg de doxorrubicina HCl; 1,0 mg de metilparabeno e 50 mg de lactose).
- Doxina[®], distribuída sob a forma liofilizada pelo Eurofarma Laboratórios Ltda., São Paulo, SP, Brasil. Cada frasco contém: 10 mg de cloridrato de doxorrubicina liofilizado.

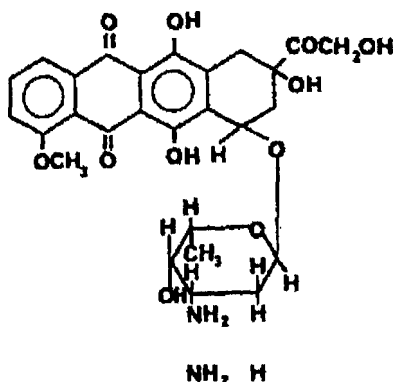


Figura 3. Fórmula estrutural do cloridrato de doxorrubicina.

- Ácido ascórbico (vitamina C) - P.M. 186,13; CAS 50-81-7; Fluka – Suíça.
- Etil carbamato ($\text{NH}_2\text{COOCH}_2\text{CH}_3$, CAS N° 51-79-6, P. M. 89,10) (uretano - URE), (Fluka AG, Buchs, Suíça).

Todas as soluções foram preparadas com água destilada estéril imediatamente antes do uso.

3.2. Agente físico

Energia luminosa emitida por lâmpada Osram, com fluxo luminoso de 2.700 Lumens, a uma distância de 2 metros da fonte.

3.3. Teste para detecção de mutações e recombinações somáticas (Somatic Mutation And Recombination Test – SMART) (Graf *et al.*, 1984)

O teste para detecção de mutações e recombinações somáticas em células de asas de *Drosophila melanogaster* foi desenvolvido por Graf *et al.* (1984).

3.3.1. Linhagens mutantes de *Drosophila melanogaster*:

- “Multiple wing hairs” (*mwh*), com constituição cromossômica $y; mwh\ jv$.
- “Flare-3 (*flr*³), com constituição genética *flr*³ / *In(3LR)TM3, ri p^p sep I(3)89Aa bx*^{34e} e *Bd*⁸.

- “ORR; flare-3” (*ORR; flr³*), com constituição genética *ORR; flr³ /In(3LR)TM3, ri p^p sep I(3)89Aa bx^{34e} e Bd^S*.

As linhagens mutantes foram mantidas em frascos de ¼ de litro contendo meio de cultura para *Drosophila melanogaster* (820 ml de água, 25 g de fermento de padaria (*Saccharomyces cerevisiae*), 11 g de ágar, 156 g de banana, 1 g de nipagin).

3.3.2. Cruzamentos entre as linhagens mutantes

Cruzamento padrão (ST - “Standard Cross”) (Graf *et al.*, 1989):

Fêmeas *flr³ /In(3LR)TM3, ri p^p sep I(3)89Aa bx^{34e} e Bd^S* cruzadas com machos *mwh/mwh*.

Cruzamento de alta capacidade de bioativação (HB - “High Bioactivation Cross”) (Graf e van Schaick, 1992):

Fêmeas *ORR; flr³ /In(3LR)TM3, ri p^p sep I(3)89Aa bx^{34e} e Bd^S*, cruzadas com machos *mwh/mwh*.

De ambos cruzamentos são obtidos dois tipos de descendentes: marcador trans-heterozigoto (MH: *mwh + / + flr³*), e balanceador heterozigoto (BH: *mwh + / TM3, Bd^S*).

3.4. Procedimentos

A coleta de ovos foi realizada por 8 h em frascos contendo uma base sólida de ágar (4% de ágar em água), e uma camada de fermento com açúcar. Após 72 ± 4 h, as larvas de ambos genótipos, emergentes destes cruzamentos foram retiradas por lavagem em água corrente, coletadas em peneira de malha fina e transferidas para frascos contendo 1,5 g de meio de purê de batata (Yoki Alimentos S.A.) e 5,0 ml de diferentes concentrações dos agentes teste.

As moscas adultas emergentes foram coletadas e fixadas em etanol 70%.

3.5. Montagem de asas

As asas foram estendidas e fixadas, sobre lâminas secas, com solução de Faure (30 g de goma arábica, 20 ml de glicerol, 1,5 g de hidrato de cloral, e 50 ml de água destilada) e colocadas para secar em placas aquecedoras (40° C) por 24 h. Após esse período as lâminas foram montadas com laminulas, em solução de Faure. Sobre a laminula foi adicionado um peso de metal (aproximadamente 400 g), para que as asas ficassem com a superfície plana, e deixado secar por 48 h.

3.6. Análise de lâminas

A análise das lâminas foi realizada em microscópio óptico 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.

3.7. Análise estatística

Para avaliar os efeitos genotóxicos do cloridrato de doxorrubicina e da vitamina C, quando empregados isoladamente, as frequências de manchas por asa das séries tratadas foram comparadas com o controle negativo (água destilada estéril). Duas hipóteses alternativas foram usadas para distinguir entre as possibilidades de um resultado positivo, inconclusivo ou negativo. Na hipótese nula foi assumido que não há diferença na frequência de mutações entre o controle e a série tratada. A hipótese alternativa postula *a priori* que o tratamento resulta em um aumento na frequência de mutações que é *m* vezes maior que a frequência espontânea. Para testar contra as hipóteses foi aplicado um teste binomial condicional, de acordo com Kastenbaum e Bowman ou teste do X^2 para proporções (Frei e Würgler, 1988).

Para a análise estatística de antigenotoxicidade das séries tratadas com ácido ascórbico associado à doxorrubicina, as frequências de manchas por mosca foram comparadas aos pares (ex. controle negativo (água) *versus* ácido ascórbico; controle positivo (DXR) *versus* ácido ascórbico + DXR) usando o teste *-U* não paramétrico, de Mann, Whitney e Wilcoxon, de acordo com Frei e Würgler (1995).

3.8. Verificação dos efeitos moduladores do ácido ascórbico quando associado ao cloridrato de doxorrubicina em células somáticas de *Drosophila melanogaster*, tratadas na presença de luz.

Larvas de 72 ± 4 h provenientes dos cruzamentos padrão (ST) e de alta capacidade de bioativação (HB) foram transferidas para frascos contendo 1,5 g de purê de batata (Yoki Alimentos S.A.), aos quais foram adicionados 5 ml de solução de DXR (Adriblastina, Pharmacia Ind. Com. Ltda.) (0,1 e 0,2 mg DXR/ml) associados ou não com ácido ascórbico (50 e 100 mM AA). Um controle positivo (uretano (URE) 10 mM) e um controle negativo (água destilada) foram incluídos em ambos cruzamentos.

Os tratamentos foram realizados de acordo com o protocolo apresentado na figura 4.

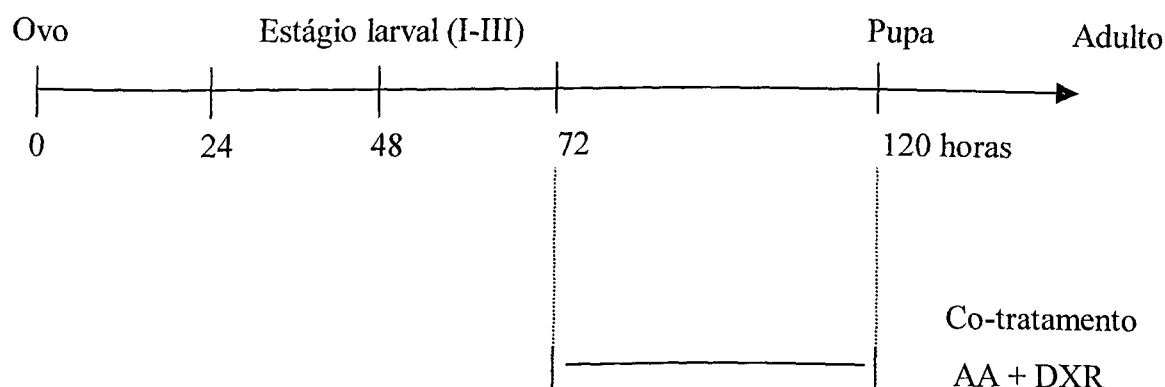


Figura 4. Protocolo de co-tratamento de larvas de *Drosophila melanogaster* dos cruzamentos ST e HB com doxorubicina (DXR) e ácido ascórbico (AA), na presença de luz.

3.9. Verificação dos efeitos moduladores do ácido ascórbico quando associado ao cloridrato de doxorubicina em células somáticas de *Drosophila melanogaster*, tratadas na presença e na ausência de luz.

Larvas de 72 ± 4 h provenientes dos cruzamentos padrão (ST) e de alta capacidade de bioativação (HB) foram transferidas para frascos contendo 1,5 g de purê de batata (Yoki Alimentos S.A.), aos quais foram adicionados 5 ml de solução de DXR (Doxina, Eurofarma Laboratórios Ltda.) (0,1 mg DXR/ml) associados ou não com ácido ascórbico (50 e 100 mM AA). Como controle negativo foi utilizada a água destilada estéril e como controle positivo foi utilizado o próprio cloridrato de doxorubicina. Cada tratamento foi feito em duplicata, sendo que um deles foi conservado no escuro e o outro permaneceu no claro.

Os tratamentos foram realizados de acordo com o protocolo apresentado na Figura 5.

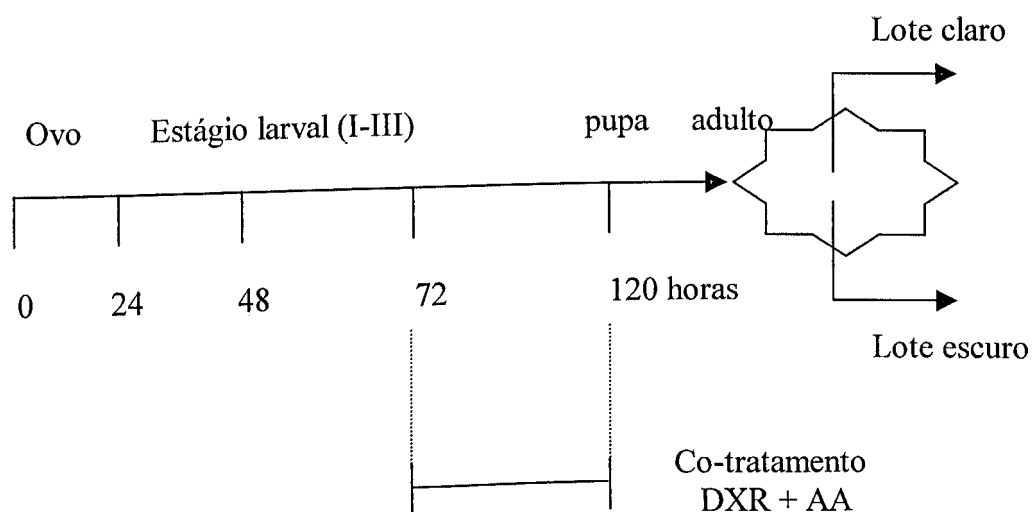


Figura 5. Protocolo de co-tratamento de larvas de *Drosophila melanogaster* dos cruzamentos ST e HB com doxorrubicina (DXR) e ácido ascórbico (AA), na presença e na ausência de luz.

4. RESULTADOS

4.1. Verificação dos efeitos moduladores do ácido ascórbico quando associado ao cloridrato de doxorrubicina em células somáticas de *Drosophila melanogaster*, tratadas na presença de luz.

A Tabela 1 mostra as freqüências de manchas mutantes observadas nos descendentes MH de *D. melanogaster* do cruzamento padrão (ST), tratados isoladamente com diferentes concentrações de ácido ascórbico (AA) (50 e 100 mM) e doxorrubicina (DXR) (0,1 e 0,2 mg/ml), na presença de luz.

A DXR, nas concentrações de 0,1 e 0,2 mg/ml de água destilada estéril, induziu um aumento estatisticamente significativo ($P < 0,05$) nas freqüências de manchas pequenas simples, grandes simples, gêmeas e no total de manchas, quando comparado com o controle negativo (água destilada estéril).

O AA, nas concentrações de 50 e 100 mM, não foi capaz de induzir aumento estatisticamente significativo na freqüência de manchas de nenhuma das classes de manchas.

O controle positivo (uretano – URE) induziu aumento estatisticamente significativo nas freqüências de manchas pequenas simples e no total de manchas, quando comparado com o controle negativo. No entanto, não foi capaz de induzir aumento estatisticamente significativo na freqüência de manchas grandes simples e gêmeas.

A Tabela 2 mostra as freqüências de manchas mutantes observadas nos descendentes MH de *D. melanogaster* do cruzamento padrão (ST), tratados com associação de diferentes concentrações de ácido ascórbico (AA) (50 e 100 mM) e doxorrubicina (DXR) (0,1 e 0,2 mg/ml), na presença de luz.

O co-tratamento com AA (50 mM) + DXR (0,1 mg/ml) apresentou uma diminuição estatisticamente significativa na freqüência total de manchas mutantes, enquanto que as freqüências de manchas pequenas simples, grandes simples e gêmeas não diminuíram estatisticamente, quando comparado com o tratado com DXR (0,1 mg/ml).

Moscas co-tratadas com AA (100 mM) + DXR (0,1 mg/ml) não apresentaram diminuição estatisticamente significativa nas frequências de manchas mutantes de todas as classes.

Os co-tratamentos com AA (50 e 100 mM) + DXR (0,2 mg/ml) não apresentaram diminuição estatisticamente significativa nas frequências de manchas mutantes de todas as classes, quando comparado com o tratado com DXR (0,2 mg/ml). No entanto, verificou-se um aumento fraco positivo nas frequências de manchas mutantes gêmeas e no total de manchas, nos tratados com AA (100 mM) + DXR (0,2 mg/ml).

A Tabela 3 mostra as frequências de manchas mutantes observadas nos descendentes BH de *D. melanogaster* do cruzamento padrão (ST), tratados isoladamente com diferentes concentrações de ácido ascórbico (AA) (50 e 100 mM) e doxorrubicina (DXR) (0,1 e 0,2 mg/ml), na presença de luz.

Quando comparado com o controle negativo (água destilada estéril), a DXR (0,1 e 0,2 mg/ml de água destilada estéril) e o AA (50 e 100 mM) não induziram aumento estatisticamente significativo nas frequências de manchas mutantes de nenhuma das classes, enquanto que o URE (10 mM) induziu aumento estatisticamente significativo nas frequências de manchas pequenas simples e no total de manchas, mas não foi capaz de induzir aumento estatisticamente significativo na frequência de manchas grandes simples.

A Tabela 4 mostra as frequências de manchas mutantes observadas nos descendentes BH de *D. melanogaster* do cruzamento padrão (ST), tratados com associação de diferentes concentrações de ácido ascórbico (AA) (50 e 100 mM) e doxorrubicina (DXR) (0,1 e 0,2 mg/ml), na presença de luz.

As frequências de manchas mutantes observadas nos tratados com associação de AA (50 e 100 mM) + DXR (0,1 e 0,2 mg/ml) não diminuíram significativamente quando comparado com as frequências de manchas mutantes observadas nos tratados com DXR (0,1 e 0,2 mg/ml).

A Tabela 5 mostra as frequências de manchas mutantes observadas nos descendentes MH de *D. melanogaster* do cruzamento de alta capacidade de bioativação (HB), tratados isoladamente com diferentes concentrações de ácido ascórbico (AA) (50 e 100 mM) e doxorrubicina (DXR) (0,1 e 0,2 mg/ml), na presença de luz.

A DXR, nas concentrações de 0,1 e 0,2 mg/ml de água destilada estéril, induziu um aumento estatisticamente significativo ($P < 0,05$) nas freqüências de manchas grandes simples, gêmeas e no total de manchas, quando comparado com o controle negativo (água destilada estéril), enquanto que a freqüência de manchas pequenas simples aumentou estatisticamente apenas para os tratados com DXR 0,1 mg/ml.

O AA, nas concentrações de 50 e 100 mM, não foi capaz de induzir aumento estatisticamente significativo na freqüência de manchas de nenhuma das classes de manchas.

O controle positivo (uretano - URE) induziu aumento estatisticamente significativo nas freqüências de todas as classes de manchas, quando comparado com o controle negativo (água).

A Tabela 6 mostra as freqüências de manchas mutantes observadas nos descendentes MH de *D. melanogaster* do cruzamento de alta capacidade de bioativação (HB), tratados com associação de diferentes concentrações de ácido ascórbico (AA) (50 e 100 mM) e doxorubicina (DXR) (0,1 e 0,2 mg/ml), na presença de luz.

O co-tratamento com AA (50 mM) + DXR (0,1 mg/ml) apresentou uma diminuição estatisticamente significativa nas freqüências de manchas pequenas, grandes e no total de manchas. No entanto, não apresentou diminuição estatisticamente significativa na freqüência de manchas gêmeas, quando comparado com o tratado com DXR (0,1 mg/ml).

Moscas co-tratadas com AA (100 mM) + DXR (0,1 mg/ml) não apresentaram diminuição estatisticamente significativa nas freqüências de manchas mutantes de todas as classes. No entanto, foi verificado um aumento fraco positivo na freqüência de manchas gêmeas, quando comparado com o tratado com DXR (0,1 mg/ml).

Os co-tratamentos com AA (50 e 100 mM) + DXR (0,2 mg/ml) não apresentaram diminuição estatisticamente significativa nas freqüências de manchas mutantes de todas as classes, quando comparado com o tratado com DXR (0,2 mg/ml). No entanto, verificou-se um aumento fraco positivo na freqüência total de manchas, nos tratados com AA (100 mM) + DXR (0,2 mg/ml), quando comparado com o tratado com DXR (0,2 mg/ml).

A Tabela 7 mostra as freqüências de manchas mutantes observadas nos descendentes BH de *D. melanogaster* do cruzamento de alta capacidade de bioativação (HB), tratados isoladamente com diferentes concentrações de ácido ascórbico (AA) (50 e 100 mM) e doxorubicina (DXR) (0,1 e 0,2 mg/ml), na presença de luz.

Quando comparado com o controle negativo (água destilada estéril), a DXR (0,1 e 0,2 mg/ml de água destilada estéril) e o AA (50 e 100 mM) não induziram aumento estatisticamente significativo nas freqüências de manchas mutantes de nenhuma das classes, enquanto que o URE (10 mM) induziu aumento estatisticamente significativo nas freqüências de manchas pequenas simples e no total de manchas, mas não foi capaz de induzir aumento estatisticamente significativo na freqüência de manchas grandes simples.

A Tabela 8 mostra as freqüências de manchas mutantes observadas nos descendentes BH de *D. melanogaster* do cruzamento de alta capacidade de bioativação (HB), tratados com associação de diferentes concentrações de ácido ascórbico (AA) (50 e 100 mM) e doxorubicina (DXR) (0,1 e 0,2 mg/ml), na presença de luz.

As freqüências de manchas mutantes observadas nos tratados com associação de AA (50 e 100 mM) + DXR (0,1 e 0,2 mg/ml) não diminuíram significativamente quando comparado com as freqüências de manchas mutantes observadas nos tratados com DXR (0,1 e 0,2 mg/ml).

No entanto, foi verificado que a freqüência total de manchas mutantes observadas nos tratados com associação de AA (50 mM) + DXR (0,2 mg/ml) aumentou significativamente quando comparado com a freqüência total de manchas mutantes observadas nos tratados com DXR (0,2 mg/ml).

A Figura 6 mostra as freqüências totais de manchas por mosca, observadas em asas de *Drosophila melanogaster* dos descendentes MH e BH do cruzamento padrão (ST) tratados com água (controle negativo), AA (50 e 100 mM) e URE (10 mM), na presença de luz.

A Figura 7 mostra as freqüências totais de manchas por mosca, observadas em asas de *Drosophila melanogaster* dos descendentes MH e BH do cruzamento padrão (ST) tratados com associação de AA (50 e 100 mM) e DXR (0,1 e 0,2 mg/ml de água), na presença de luz.

A Figura 8 mostra as freqüências totais de manchas por mosca, observadas em asas de *Drosophila melanogaster* dos descendentes MH e BH do cruzamento de alta capacidade de bioativação metabólica (HB) tratados com água (controle negativo), AA (50 e 100 mM) e URE (10 mM), na presença de luz.

A Figura 9 mostra as freqüências totais de manchas por mosca, observadas em asas de *Drosophila melanogaster* dos descendentes MH e BH do cruzamento de alta

capacidade de bioativação metabólica (HB) tratados com associação de AA (50 e 100 mM) e DXR (0,1 e 0,2 mg/ml de água), na presença de luz.

Tabela 1. Frequências de manchas mutantes observadas nos descendentes MH de *D. melanogaster* do cruzamento padrão (ST), tratados isoladamente com diferentes concentrações de ácido ascórbico (AA) (50 e 100 mM) e doxorrubicina (DXR) (0,1 e 0,2 mg/ml), na presença de luz. Experimento 1.

Tratamento (concentração)	Número de moscas	Manchas por mosca (nº de manchas) Diag. estatíst. *			Total m=2
		Pequenas simples (1-2 células) m=2	Grandes simples (> 2 células) m=5	Gêmeas m=5	
Controle negativo	20	0,25 (05)	0,20 (04)	0,05 (01)	0,50 (10)
Uretano (10 mM)	20	1,90 (38) +	0,20 (04) -	0,10 (02) i	2,20 (44) +
AA (mM) + DXR mg/ml					
0 + 0,1	20	1,25 (25) +	1,20 (24) +	1,60 (32) +	4,05 (81) +
0 + 0,2	20	1,00 (20) +	1,20 (24) +	0,70 (14) +	2,90 (58) +
50 + 0	20	0,30 (06) i	0,05 (01) -	0,05 (01) -	0,40 (08) -
100 + 0	20	0,45 (09) i	0,10 (02) -	0,05 (01) -	0,60 (12) i

* Diagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würgler (1988): +, positivo; f+, fraco positivo; -, negativo; i, inconclusivo; m, fator de multiplicação. Teste do X² para proporções, bicaudal. Níveis de significância: α=β=0,05.

Tabela 2. Frequências de manchas mutantes observadas nos descendentes MH de *D. melanogaster* do cruzamento padrão (ST), tratados com associação de diferentes concentrações de ácido ascórbico (AA) (50 e 100 mM) e doxorrubicina (DXR) (0,1 e 0,2 mg/ml), na presença de luz. Experimento 1.

Tratamento (concentração)	Número de moscas	Manchas por mosca (nº de manchas) Diag. estatíst. *			
		Pequenas simples (1-2 células)	Grandes simples (> 2 células)	Gêmeas	Total
		m=2	m=5	m=5	m=2
AA (mM) + DXR mg/ml					
0 + 0,1	20	1,25 (25)	1,20 (24)	1,60 (32)	4,05 (81)
50 + 0,1	20	0,70 (14) i	1,10 (22) -	0,75 (15) f+	2,55 (51) +
100 + 0,1	20	1,50 (30) -	1,40 (28) -	0,70 (14) f+	3,60 (72) -
0 + 0,2	20	1,00 (20)	1,20 (24)	0,70 (14)	2,90 (58)
50 + 0,2	20	0,85 (17) i	0,90 (18) -	0,50 (10) -	2,25 (45) -
100 + 0,2	20	0,95 (19) -	1,20 (24) -	1,80 (36) -f+	3,95 (79) -f+

* Diagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würgler (1995): +, positivo; f+, fraco positivo; -, negativo; i, inconclusivo; ↑f+, tratamento combinado aumenta a frequência de manchas e o diagnóstico estatístico é fraco positivo; m, fator de multiplicação. Teste U. Níveis de significância P < 0,05.

Tabela 3. Frequências de manchas mutantes observadas nos descendentes BH de *D. melanogaster* do cruzamento padrão (ST), tratados isoladamente com diferentes concentrações de ácido ascórbico (AA) (50 e 100 mM) e doxorrubicina (DXR) (0,1 e 0,2 mg/ml), na presença de luz. Experimento 1.

Tratamento (concentração)	Número de moscas	Manchas por mosca (nº de manchas) Diag. estatíst. *		
		Pequenas simples (1-2 células) m=2	Grandes simples (> 2 células) m=5	Total m=2
Controle negativo	20	0,55 (11)	0,20 (04)	0,75 (15)
Uretano (10 mM)	20	1,65 (33) +	0,20 (04) -	1,85 (37) +
AA (mM) + DXR mg/ml)				
0 + 0,1	20	0,65 (13) i	0,20 (04) -	0,85 (17) i
0 + 0,2	20	1,10 (22) +	0,15 (03) -	1,25 (25) i
50 + 0	20	0,30 (06) -	0,00 (00) -	0,30 (06) -
100 + 0	20	0,15 (03) -	0,05 (01) -	0,20 (04) -

* Diagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würgler (1988): +, positivo; f+, fraco positivo; -, negativo; i, inconclusivo; m, fator de multiplicação. Teste do X² para proporções, bicaudal. Níveis de significância: α=β=0,05.

Tabela 4. Frequências de manchas mutantes observadas nos descendentes BH de *D. melanogaster* do cruzamento padrão (ST), tratados com associação de diferentes concentrações de ácido ascórbico (AA) (50 e 100 mM) e doxorubicina (DXR) (0,1 e 0,2 mg/ml), na presença de luz. Experimento 1.

Tratamento (concentração)	Número de moscas	Manchas por mosca (nº de manchas) Diag. estatíst. *		
		Pequenas simples (1-2 células) m=2	Grandes simples (> 2 células) m=5	Total m=2
AA (mM) + DXR mg/ml)				
0 + 0,1	20	0,65 (13)	0,20 (04)	0,85 (17)
50 + 0,1	20	0,55 (11) i	0,00 (00) i	0,55 (11) i
100 + 0,1	20	0,75 (15) -	0,10 (02) i	0,85 (17) -
0 + 0,2	20	1,10 (22)	0,15 (03)	1,25 (25)
50 + 0,2	20	0,70 (14) i	0,10 (02) i	0,80 (16) i
100 + 0,2	20	0,80 (16) i	0,15 (03) -	0,95 (19) i

* Diagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würbler (1995): +, positivo; f+, fraco positivo; -, negativo; i, inconclusivo; m, fator de multiplicação. Teste U. Níveis de significância P < 0,05.

Tabela 5. Frequências de manchas mutantes observadas nos descendentes MH de *D. melanogaster* do cruzamento de alta capacidade de bioativação (HB), tratados isoladamente com diferentes concentrações de ácido ascórbico (AA) (50 e 100 mM) e doxorubicina (DXR) (0,1 e 0,2 mg/ml), na presença de luz. Experimento 1.

Tratamento (concentração)	Número de moscas	Manchas por mosca (nº de manchas) Diag. estatíst. *			Total m=2
		Pequenas simples (1-2 células) m=2	Grandes simples (> 2 células) m=5	Gêmeas m=5	
Controle negativo	20	0,95 (19)	0,05 (01)	0,05 (01)	1,05 (21)
Uretano (10 mM)	20	6,45 (129) +	2,20 (44) +	1,40 (28) +	10,05 (201) +
AA (mM) + DXR mg/ml					
0 + 0,1	20	2,25 (45) +	1,25 (25) +	0,70 (14) +	4,20 (84) +
0 + 0,2	20	1,25 (25) i	0,80 (16) +	0,65 (13) +	2,70 (54) +
50 + 0	20	1,25 (25) i	0,05 (01) -	0,00 (00) -	1,30 (26) i
100 + 0	20	0,40 (08) -	0,20 (04) i	0,05 (01) -	0,65 (13) -

* Diagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würgler (1988): +, positivo; f+, fraco positivo; -, negativo; i, inconclusivo; m, fator de multiplicação. Teste do X² para proporções, bicaudal. Níveis de significância: α=β=0,05.

Tabela 6. Frequências de manchas mutantes observadas nos descendentes MH de *D. melanogaster* do cruzamento de alta capacidade de bioativação (HB), tratados com associação de diferentes concentrações de ácido ascórbico (AA) (50 e 100 mM) e doxorubicina (DXR) (0,1 e 0,2 mg/ml), na presença de luz. Experimento 1.

Tratamento (concentração)	Número de moscas	Manchas por mosca (nº de manchas) Diag. estatíst. *			Total
		Pequenas simples (1-2 células) m=2	Grandes simples (> 2 células) m=5	Gêmeas m=5	
AA (mM) + DXR mg/ml)					
0 + 0,1	20	2,25 (45)	1,25 (25)	0,70 (14)	4,20 (84)
50 + 0,1	20	1,05 (21) +	0,60 (12) f+	0,55 (11) -	2,20 (44) +
100 + 0,1	20	2,15 (43) -	1,10 (22) -	1,30 (26) -↑f+	4,55 (91) -
0 + 0,2	20	1,25 (25)	0,80 (16)	0,65 (13)	2,70 (54)
50 + 0,2	20	1,35 (27) -	0,75 (15) -	0,30 (06) i	2,40 (48) -
100 + 0,2	20	1,90 (38) -	1,05 (21) -	0,95 (19) -	3,90 (78) -↑f+

* Diagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würbler (1995): +, positivo; f+, fraco positivo; -, negativo; i, inconclusivo; ↑f+, tratamento combinado aumenta a frequência de manchas e o diagnóstico estatístico é fraco positivo; m, fator de multiplicação. Teste U. Níveis de significância P < 0,05.

Tabela 7. Frequências de manchas mutantes observadas nos descendentes BH de *D. melanogaster* do cruzamento de alta capacidade de bioativação (HB), tratados isoladamente com diferentes concentrações de ácido ascórbico (AA) (50 e 100 mM) e doxorubicina (DXR) (0,1 e 0,2 mg/ml), na presença de luz. Experimento 1.

Tratamento (concentração)	Número de moscas	Manchas por mosca (nº de manchas) Diag. estatíst. *		
		Pequenas simples (1-2 células) m=2	Grandes simples (> 2 células) m=5	Total m=2
Controle negativo	20	1,15 (23)	0,10 (02)	1,25 (25)
Uretano (10 mM)	20	6,30 (126) +	0,40 (08) i	6,70 (134) +
AA (mM) + DXR mg/ml)				
0 + 0,1	20	1,30 (26) -	0,05 (01) -	1,35 (27) -
0 + 0,2	20	1,15 (23) -	0,05 (01) -	1,20 (24) -
50 + 0	20	1,50 (30) i	0,15 (03) i	1,65 (33) i
100 + 0	20	1,00 (20) -	0,05 (01) -	1,05 (21) -

* Diagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würgler (1988): +, positivo; f+, fraco positivo; -, negativo; i, inconclusivo; m, fator de multiplicação. Teste do X² para proporções, bicaudal. Níveis de significância: α=β=0,05.

Tabela 8. Frequências de manchas mutantes observadas nos descendentes BH de *D. melanogaster* do cruzamento de alta capacidade de bioativação (HB), tratados com associação de diferentes concentrações de ácido ascórbico (AA) (50 e 100 mM) e doxorubicina (DXR) (0,1 e 0,2 mg/ml), na presença de luz. Experimento 1.

Tratamento (concentração)	Número de moscas	Manchas por mosca (nº de manchas) Diag. estatíst. *		
		Pequenas simples (1-2 células) m=2	Grandes simples (> 2 células) m=5	Total m=2
AA (mM) + DXR mg/ml)				
0 + 0,1	20	1,30 (26)	0,05 (01)	1,35 (27)
50 + 0,1	20	1,00 (20) i	0,10 (02) -	1,10 (22) i
100 + 0,1	20	1,15 (23) -	0,10 (02) -	1,25 (25) -
0 + 0,2	20	1,15 (23)	0,05 (01)	1,20 (24)
50 + 0,2	20	1,70 (34) -	0,25 (05) -	1,95 (39) -↑+
100 + 0,2	20	1,05 (21) -	0,10 (02) -	1,15 (23) -

* Diagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würgler (1995): +, positivo; f+, fraco positivo; -, negativo; i, inconclusivo; ↑↑+, tratamento combinado aumenta a frequência de manchas e o diagnóstico estatístico é forte positivo; m, fator de multiplicação. Teste U. Níveis de significância P < 0,05.

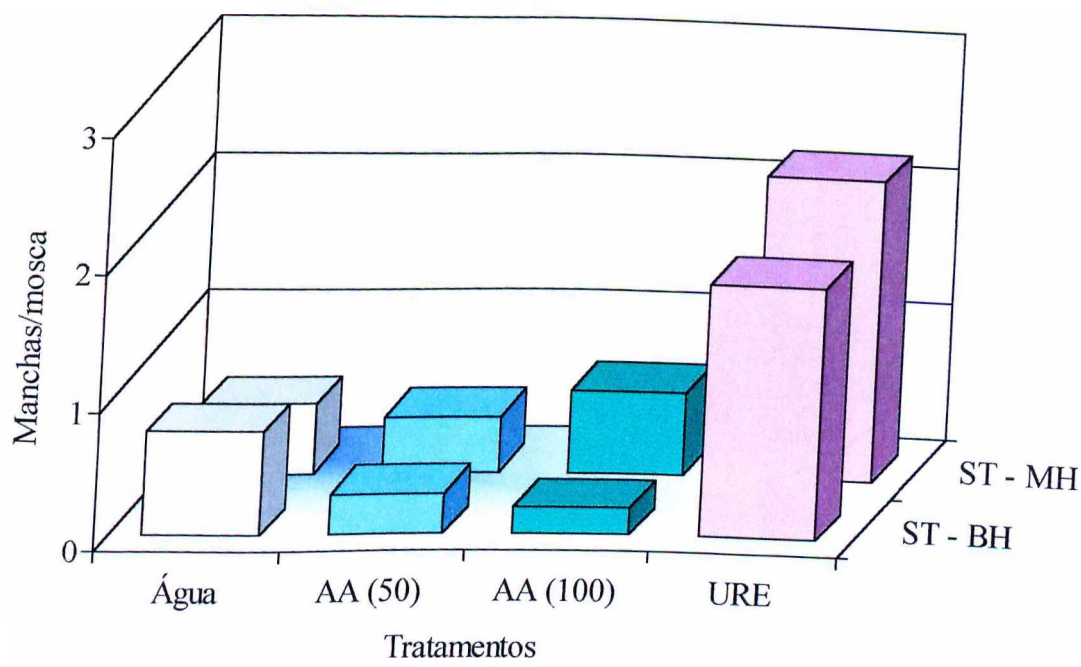


Figura 6. Frequências totais de manchas por mosca observadas em asas de *Drosophila melanogaster* dos descendentes MH e BH do cruzamento padrão (ST) tratados com água (controle negativo), ácido ascórbico (50 e 100 mM) e uretano (10 mM) (controle positivo), na presença de luz. Experimento 1.

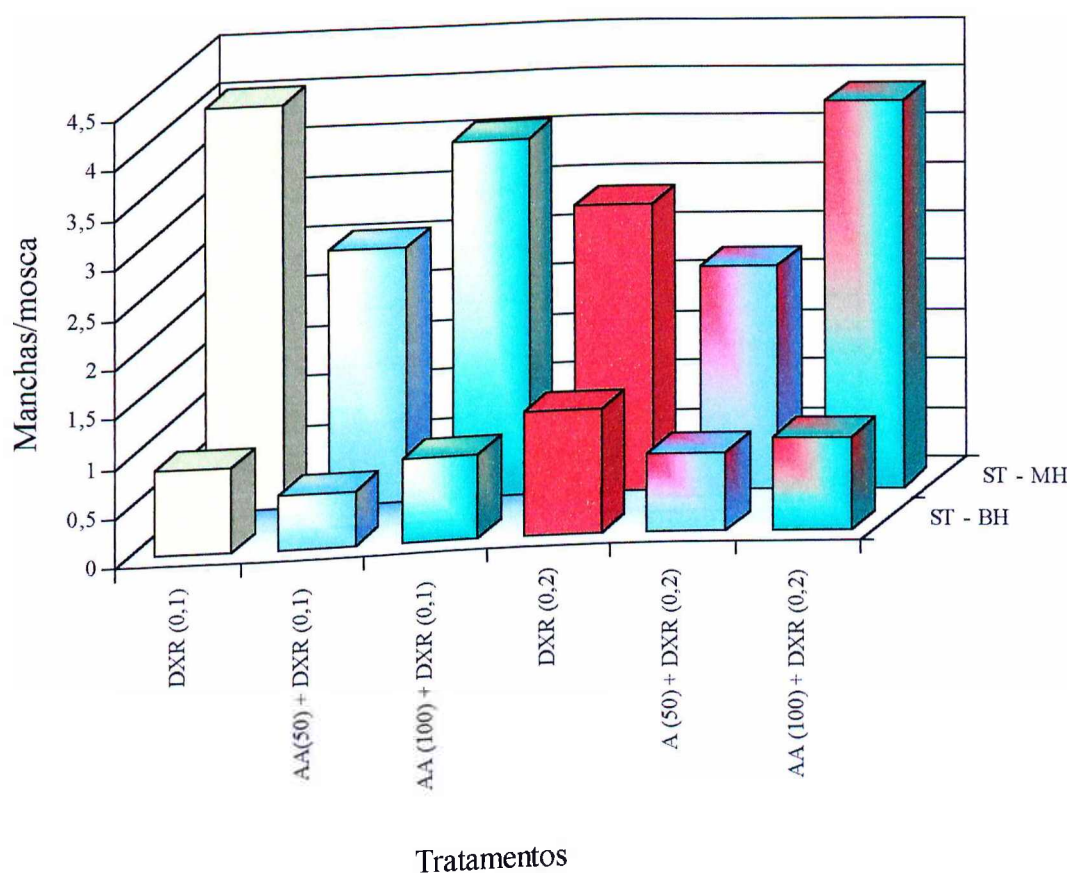


Figura 7. Frequências totais de manchas por mosca observadas em asas de *Drosophila melanogaster* dos descendentes MH e BH do cruzamento padrão (ST) tratados com associação de ácido ascórbico (50 e 100 mM) e doxorrubicina (adriblastina) (0,1 e 0,2 mg/ml), na presença de luz. Experimento 1.

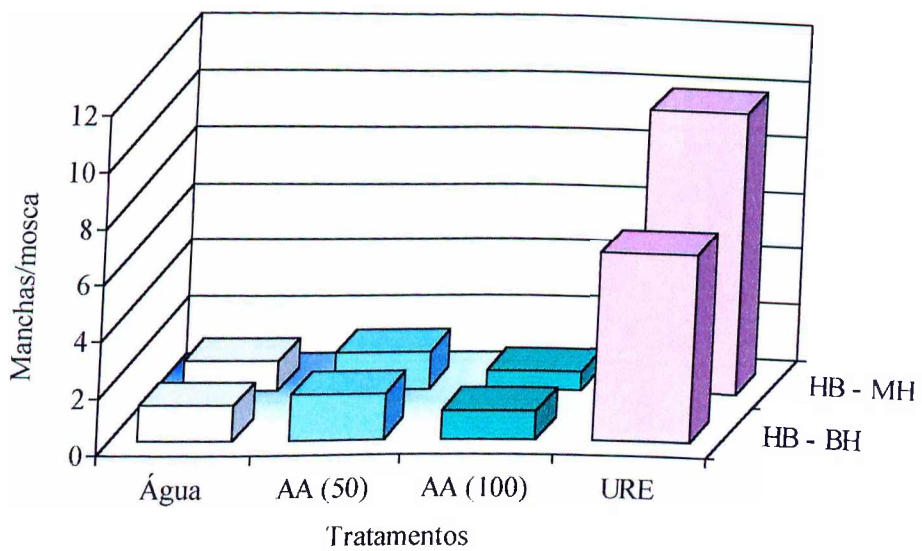


Figura 8. Frequências totais de manchas por mosca observadas em asas de *Drosophila melanogaster* dos descendentes MH e BH do cruzamento de alta capacidade de bioativação (HB) tratados com água (controle negativo), ácido ascórbico (50 e 100 mM) e uretano (10 mM) (controle positivo), na presença de luz. Experimento 1.

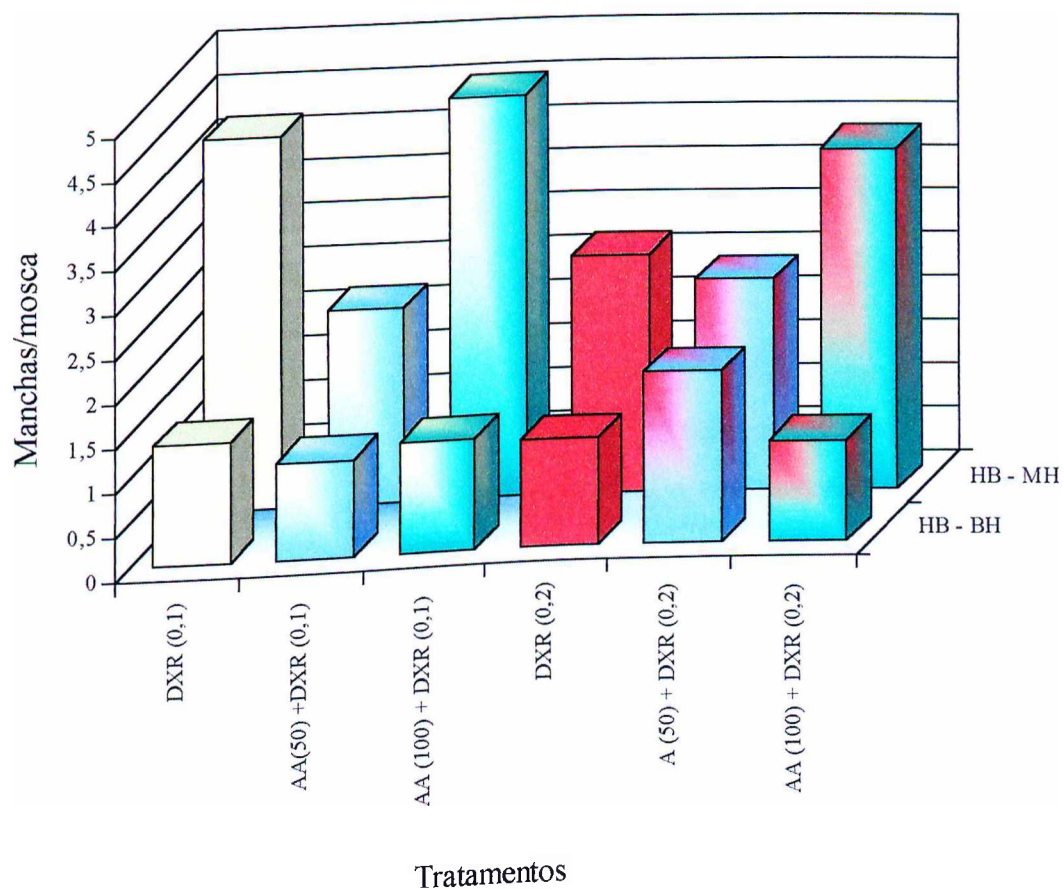


Figura 9. Frequências totais de manchas observadas em asas de *Drosophila melanogaster* dos descendentes MH e BH do cruzamento de alta capacidade de bioativação (HB) tratados com associação de ácido ascórbico (50 e 100 mM) e doxorubicina (adriblastina) (0,1 e 0,2 mg/ml), na presença de luz. Experimento 1.

4.2. Verificação dos efeitos moduladores do ácido ascórbico quando associado ao cloridrato de doxorrubicina em células somáticas de *Drosophila melanogaster*, tratadas na presença e ausência de luz.

4.2.1. Presença de luz.

A Tabela 9 mostra as freqüências de manchas mutantes observadas nos descendentes MH de *D. melanogaster* do cruzamento padrão (ST), tratados isoladamente com diferentes concentrações de ácido ascórbico (AA) (50 e 100 mM) e doxorrubicina (DXR) (0,1 mg/ml), na presença de luz.

A DXR (0,1 mg/ml de água destilada estéril), induziu um aumento estatisticamente significativo ($P < 0,05$) nas freqüências de manchas grandes simples, gêmeas e no total de manchas, quando comparado com o controle negativo (água destilada estéril).

O AA, nas concentrações de 50 e 100 mM, não foi capaz de induzir aumento estatisticamente significativo na freqüência de nenhuma das classes de manchas.

A Tabela 10 mostra as freqüências de manchas mutantes observadas nos descendentes MH de *D. melanogaster* do cruzamento padrão (ST), tratados com associação de diferentes concentrações de AA (50 e 100 mM) e DXR (0,1 mg/ml), na presença de luz.

O co-tratamento com AA (50 e 100 mM) + DXR (0,1 mg/ml) apresentou uma diminuição estatisticamente não significativa nas freqüências de manchas grandes simples e um aumento estatisticamente significativo nas freqüências de manchas pequenas simples, gêmeas e no total de manchas, quando comparado com o tratado com DXR (0,1 mg/ml).

A Tabela 11 mostra as freqüências de manchas mutantes observadas nos descendentes MH de *D. melanogaster* do cruzamento de alta capacidade de bioativação (HB), tratados isoladamente com diferentes concentrações de ácido ascórbico (AA) (50 e 100 mM) e doxorrubicina (DXR) (0,1 mg/ml), na presença de luz.

A DXR (0,1 mg/ml) induziu um aumento estatisticamente significativo ($P > 0,05$) nas freqüências de manchas grandes simples, gêmeas e no total de manchas,

quando comparado com o controle negativo (água destilada estéril), enquanto que a frequência de manchas pequenas simples teve um aumento estatisticamente não significativo.

O AA (50 e 100 mM) não foi capaz de induzir aumento estatisticamente significativo na frequência de nenhuma classe de manchas.

A Tabela 12 mostra as frequências de manchas mutantes observadas nos descendentes MH de *D. melanogaster* do cruzamento de alta capacidade de bioativação (HB), tratados com associação de diferentes concentrações de AA (50 e 100 mM) e DXR (0,1 mg/ml), na presença de luz.

O co-tratamento com AA (50 mM) + DXR (0,1 mg/ml) apresentou uma diminuição estatisticamente não significativa na frequência de manchas pequenas simples; uma diminuição estatisticamente significativa nas frequências de manchas grandes simples, gêmeas e no total de manchas, quando comparado com o tratado com DXR (0,1 mg/ml).

O co-tratamento com AA (100 mM) + DXR (0,1 mg/ml) apresentou um aumento estatisticamente significativo na frequência de manchas pequenas simples; uma diminuição estatisticamente significativa na frequência de manchas grandes simples, mas não alterou a frequência de manchas gêmeas e o total de manchas, quando comparado com o tratado com DXR (0,1 mg/ml).

4.2.2. Ausência de luz.

A Tabela 13 mostra as frequências de manchas mutantes observadas nos descendentes MH de *D. melanogaster* do cruzamento padrão (ST), tratados isoladamente com diferentes concentrações de ácido ascórbico (AA) (50 e 100 mM) e doxorrubicina (DXR) (0,1 mg/ml), na ausência de luz.

A DXR (0,1 mg/ml), induziu um aumento estatisticamente significativo ($P > 0,05$) nas frequências de manchas grandes simples, gêmeas e no total de manchas, quando comparado com o controle negativo (água destilada estéril).

O AA (50 e 100 mM) não foi capaz de induzir aumento estatisticamente significativo na frequência de nenhuma das classes de manchas.

A Tabela 14 mostra as frequências de manchas mutantes observadas nos descendentes MH de *D. melanogaster* do cruzamento padrão (ST), tratados com associação de diferentes concentrações de AA (50 e 100 mM) e DXR (0,1 mg/ml), na ausência de luz.

O co-tratamento com AA (50 mM) + DXR (0,1 mg/ml) apresentou uma diminuição estatisticamente não significativa na frequência de manchas grandes simples, e aumentou de modo estatisticamente significativo a frequência das demais classes de manchas, quando comparado com o tratado com DXR (0,1 mg/ml).

O co-tratamento com AA (100 mM) + DXR (0,1 mg/ml) apresentou um aumento estatisticamente significativo na frequência de todas as classes de manchas mutantes.

A Tabela 15 mostra as frequências de manchas mutantes observadas nos descendentes MH de *D. melanogaster* do cruzamento de alta capacidade de bioativação (HB), tratados isoladamente com diferentes concentrações de ácido ascórbico (AA) (50 e 100 mM) e doxorubicina (DXR) (0,1 mg/ml), na ausência de luz.

A DXR (0,1 mg/ml) induziu um aumento estatisticamente significativo ($P > 0,05$) nas frequências de todas as classes de manchas, quando comparado com o controle negativo.

O AA (50 e 100 mM) não foi capaz de induzir aumento estatisticamente significativo na frequência de nenhuma classe de manchas.

A Tabela 16 mostra as frequências de manchas mutantes observadas nos descendentes MH de *D. melanogaster* do cruzamento de alta capacidade de bioativação (HB), tratados com associação de diferentes concentrações de AA (50 e 100 mM) e DXR (0,1 mg/ml), na ausência de luz.

O co-tratamento com AA (50 mM) + DXR (0,1 mg/ml) apresentou uma diminuição estatisticamente não significativa na frequência de manchas pequenas simples, grandes simples e no total de manchas; e um aumento estatisticamente não significativo na frequência de manchas gêmeas, quando comparado com o tratado com DXR (0,1 mg/ml).

O co-tratamento com AA (100 mM) + DXR (0,1 mg/ml) apresentou um aumento estatisticamente não significativo na frequência de manchas pequenas e grandes simples; e um aumento estatisticamente significativo na frequência de manchas gêmeas e no total de manchas, quando comparado com o tratado com DXR (0,1 mg/ml).

A Figura 10 mostra as frequências totais de manchas por mosca, observadas em asas de *Drosophila melanogaster* dos descendentes MH dos cruzamentos padrão (ST) e de alta capacidade de bioativação metabólica (HB), tratados com água (controle negativo), AA (50 e 100 mM) e DXR (0,1 mg/ml), na presença de luz.

A Figura 11 mostra as frequências totais de manchas por mosca, observadas em asas de *Drosophila melanogaster* dos descendentes MH dos cruzamentos padrão (ST) e de alta capacidade de bioativação metabólica (HB), tratados com DXR (0,1 mg/ml), associada ou não com AA (50 e 100 mM), na presença de luz.

A Figura 12 mostra as frequências totais de manchas por mosca, observadas em asas de *Drosophila melanogaster* dos descendentes MH, dos cruzamentos padrão (ST) e de alta capacidade de bioativação metabólica (HB), tratados com água (controle negativo), AA (50 e 100 mM) e DXR (0,1 mg/ml), na ausência de luz.

A Figura 13 mostra as frequências totais de manchas por mosca, observadas em asas de *Drosophila melanogaster* dos descendentes MH dos cruzamentos padrão (ST) e de alta capacidade de bioativação metabólica (HB), tratados com DXR (0,1 mg/ml), associada ou não com AA (50 e 100 mM), na ausência de luz.

Tabela 9. Frequências de manchas mutantes observadas nos descendentes MH de *D. melanogaster* do cruzamento padrão (ST), tratados com diferentes concentrações de ácido ascórbico (AA) (50 e 100 mM) e doxorrubicina (DXR) (0,1 mg/ml), na presença de luz. Experimento 2.

Tratamento (concentração)	Número de moscas	Manchas por mosca (nº de manchas) Diag. estatíst. *			Total
		Pequenas simples (1-2 células) m=2	Grandes simples (> 2 células) m=5	Gêmeas m=5	
Controle negativo	20	0,70 (14)	0,10 (02)	0,10 (02)	0,90 (18)
DXR (0,1 mg/ml)	20	1,00 (20) i	2,90 (58) +	1,60 (32) +	5,50 (110) +
AA (mM)					
50	20	1,00 (20) i	0,05 (01) -	0,05 (01) -	1,10 (22) i
100	20	1,00 (20) i	0,25 (05) i	0,00 (00) -	1,25 (25) i

* Diagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würbler (1988): +, positivo; f+, fraco positivo; -, negativo; i, inconclusivo; m, fator de multiplicação. Teste do X² para proporções, bicaudal. Níveis de significância: α=β=0,05.

Tabela 10. Frequências de manchas mutantes observadas nos descendentes MH de *D. melanogaster* do cruzamento padrão (ST), tratados com diferentes concentrações de ácido ascórbico (AA) (50 e 100 mM) e doxorrubicina (DXR) (0,1 mg/ml), na presença de luz. Experimento 2.

Tratamento (concentração)	Número de moscas	Manchas por mosca (n° de manchas) Diag. estatíst. *			Total m=2
		Pequenas simples (1-2 células) m=2	Grandes simples (> 2 células) m=5	Gêmeas m=5	
DXR (0,1 mg/ml)	20	1,00 (20)	2,90 (58)	1,60 (32)	5,50 (110)
AA (mM) + DXR mg/ml)					
50 + 0,1	20	1,90 (38) -↑+	2,05 (41) -	2,05 (41) -↑-	6,00 (120) -↑-
100 + 0,1	20	3,00 (60) -↑+	2,70 (54) -	3,35 (67) -↑f+	9,05 (181) -↑+

* Diagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würbler (1995): +, positivo; f+, fraco positivo; -, negativo; i, inconclusivo; ↑f+, tratamento combinado aumenta a frequência de manchas e o diagnóstico estatístico é fraco positivo; ↑+, tratamento combinado aumenta a frequência de manchas e o diagnóstico estatístico é forte positivo; ↑-, tratamento combinado aumenta a frequência de manchas e o diagnóstico estatístico é negativo; m, fator de multiplicação. Teste U. Níveis de significância P < 0,05.

Tabela 11. Frequências de manchas mutantes observadas nos descendentes MH de *D. melanogaster* do cruzamento de alta capacidade de bioativação (HB), tratados com diferentes concentrações de ácido ascórbico (AA) (50 e 100 mM) e doxorubicina (DXR) (0,1 mg/ml), na presença de luz. Experimento 2.

Tratamento (concentração)	Número de moscas	Manchas por mosca (nº de manchas) Diag. estatíst. *			Total m=2
		Pequenas simples (1-2 células) m=2	Grandes simples (> 2 células) m=5	Gêmeas m=5	
Controle negativo	20	1,30 (26)	0,40 (08)	0,05 (01)	1,75 (35)
DXR (0,1 mg/ml)	20	1,60 (32) -	2,85 (57) +	2,15 (43) +	6,60 (132) +
AA (mM)					
50	20	1,15 (23) -	0,25 (05) -	0,00 (00) -	1,40 (28) -
100	20	1,30 (26) -	0,10 (02) -	0,00 (00) -	1,40 (28) -

* Diagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würgler (1988): +, positivo; f+, fraco positivo; -, negativo; i, inconclusivo; m, fator de multiplicação. Teste do X² para proporções, bicaudal. Níveis de significância: α=β=0,05.

Tabela 12. Frequências de manchas mutantes observadas nos descendentes MH de *D. melanogaster* do cruzamento de alta capacidade de bioativação (HB), tratados com diferentes concentrações de ácido ascórbico (AA) (50 e 100 mM) e doxorubicina (DXR) (0,1 mg/ml), na presença de luz. Experimento 2.

Tratamento (concentração)	Número de moscas	Manchas por mosca (nº de manchas) Diag. estatíst. *			
		Pequenas simples (1-2 células) m=2	Grandes simples (> 2 células) m=5	Gêmeas m=5	Total m=2
DXR (0,1 mg/ml)	20	1,60 (32)	2,85 (57)	2,15 (43)	6,60 (132)
AA (mM) + DXR mg/ml					
50 + 0,1	20	1,35 (27) -	0,85 (17) +	0,90 (18) f+	3,10 (62) +
100 + 0,1	20	2,75 (55) -↑↑+	1,40 (28) f+	2,15 (43) -	6,30 (126) -

* Diagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würbler (1995): +, positivo; f+, fraco positivo; -, negativo; i, inconclusivo; ↑↑+, tratamento combinado aumenta a frequência de manchas e o diagnóstico estatístico é forte positivo; m, fator de multiplicação. Teste U. Níveis de significância P < 0,05.

Tabela 13. Frequências de manchas mutantes observadas nos descendentes MH de *D. melanogaster* do cruzamento padrão (ST), tratados com diferentes concentrações de ácido ascórbico (AA) (50 e 100 mM) e doxorrubicina (DXR) (0,1 mg/ml), na ausência de luz. Experimento 2.

Tratamento (concentração)	Número de moscas	Manchas por mosca (nº de manchas) Diag. estatíst. *			Total m=2
		Pequenas simples (1-2 células) m=2	Grandes simples (> 2 células) m=5	Gêmeas m=5	
Controle negativo	20	1,35 (27)	0,05 (01)	0,00 (00)	1,40 (28)
DXR (0,1 mg/ml)	20	1,40 (28) -	2,25 (45) +	0,80 (16) +	4,45 (89) +
AA (mM)					
50	20	0,60 (12) -	0,10 (02) i	0,05 (01) i	0,75 (15) -
100	20	0,60 (12) -	0,25 (05) i	0,10 (02) i	0,95 (19) -

* Diagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würbler (1988): +, positivo; f+, fraco positivo; -, negativo; i, inconclusivo; m, fator de multiplicação. Teste do X² para proporções, bicaudal. Níveis de significância: α=β=0,05.

Tabela 14. Frequências de manchas mutantes observadas nos descendentes MH de *D. melanogaster* do cruzamento padrão (ST), tratados com diferentes concentrações de ácido ascórbico (AA) (50 e 100 mM) e doxorrubicina (DXR) (0,1 mg/ml), na ausência de luz. Experimento 2.

Tratamento (concentração)	Número de moscas	Manchas por mosca (nº de manchas) Diag. estatíst. *			Total m=2
		Pequenas simples (1-2 células) m=2	Grandes simples (> 2 células) m=5	Gêmeas m=5	
DXR (0,1 mg/ml)	20	1,40 (28)	2,25 (45)	0,80 (16)	4,45 (89)
AA (mM) + DXR mg/ml)					
50 + 0,1	20	2,30 (46) -↑+	2,80 (56) -	1,95 (39) -↑f+	7,05 (141) -↑f+
100 + 0,1	20	2,55 (51) -↑+	3,25 (65) -↑f+	3,45 (69) -↑+	9,25 (185) -↑+

* Diagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würbler (1995): +, positivo; f+, fraco positivo; -, negativo; i, inconclusivo; ↑f+, tratamento combinado aumenta a frequência de manchas e o diagnóstico estatístico é fraco positivo; ↑+, tratamento combinado aumenta a frequência de manchas e o diagnóstico estatístico é forte positivo. Teste U. Níveis de significância P < 0,05.

Tabela 15. Frequências de manchas mutantes observadas nos descendentes MH de *D. melanogaster* do cruzamento de alta capacidade de bioativação (HB), tratados com diferentes concentrações de ácido ascórbico (AA) (50 e 100 mM) e doxorubicina (DXR) (0.1 mg/ml), na ausência de luz. Experimento 2.

Tratamento (concentração)	Número de moscas	Manchas por mosca (n° de manchas) Diag. estatíst. *			Total m=2
		Pequenas simples (1-2 células) m=2	Grandes simples (> 2 células) m=5	Gêmeas m=5	
Controle negativo	20	1,20 (24)	0,30 (06)	0,30 (06)	1,80 (36)
DXR (0,1 mg/ml)	20	2,15 (43) +	1,65 (33) +	1,15 (23) +	4,95 (99) +
AA (mM)					
50	20	1,55 (31) i	0,10 (02) -	0,25 (05) -	1,90 (38) -
100	20	1,55 (31) i	0,05 (01) -	0,00 (00) -	1,60 (32) -

* Diagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würbler (1988): +, positivo; f+, fraco positivo; -, negativo; i, inconclusivo; m, fator de multiplicação. Teste do X² para proporções, bicaudal. Níveis de significância: α=β=0,05.

Tabela 16. Frequências de manchas mutantes observadas nos descendentes MH de *D. melanogaster* do cruzamento de alta capacidade de bioativação (HB), tratados com diferentes concentrações de ácido ascórbico (AA) (50 e 100 mM) e doxorubicina (DXR) (0,1 mg/ml), na ausência de luz. Experimento 2.

Tratamento (concentração)	Número de moscas	Manchas por mosca (nº de manchas)			Diag. estatíst. *
		Pequenas simples (1-2 células) m=2	Grandes simples (> 2 células) m=5	Gêmeas m=5	
					Total m=2
DXR (0,1 mg/ml)	20	2,15 (43)	1,65 (33)	1,15 (23)	4,95 (99)
AA (mM) + DXR mg/ml)					
50 + 0,1	20	1,45 (29) i	1,10 (22) -	1,40 (28) -↑-	3,95 (79) -
100 + 0,1	20	2,95 (59) -↑-	2,30 (46) -↑-	2,85 (57) -↑f+	8,10 (162) -↑+

* Diagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würbler (1995): +, positivo; f+, fraco positivo; -, negativo; -↑, forte negativo; i, inconclusivo; ↑f+, tratamento combinado aumenta a frequência de manchas e o diagnóstico estatístico é fraco positivo; ↑+, tratamento combinado aumenta a frequência de manchas e o diagnóstico estatístico é forte positivo; ↑-, tratamento combinado aumenta a frequência de manchas e o diagnóstico estatístico é negativo; m, fator de multiplicação. Teste U. Níveis de significância P < 0,05.

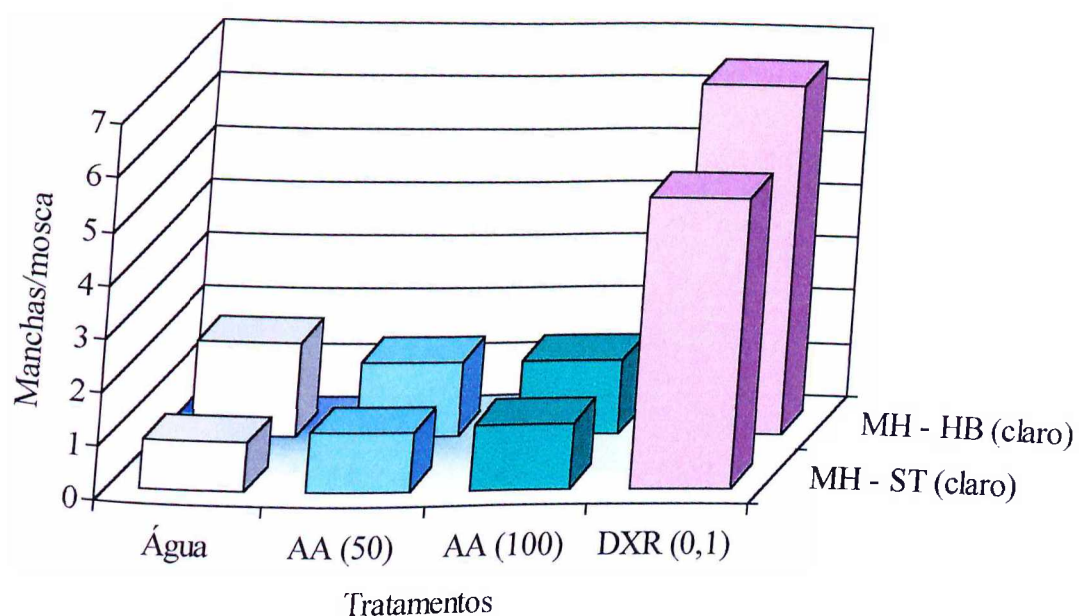


Figura 10. Frequências totais de manchas por mosca observadas em asas de *Drosophila melanogaster* dos descendentes MH, dos cruzamentos padrão (ST) e de alta capacidade de bioativação, tratados com água (controle negativo), ácido ascórbico (50 e 100 mM) e doxorrubicina (doxina) (0,1 mg/ml) (controle positivo), na presença de luz. Experimento 2.

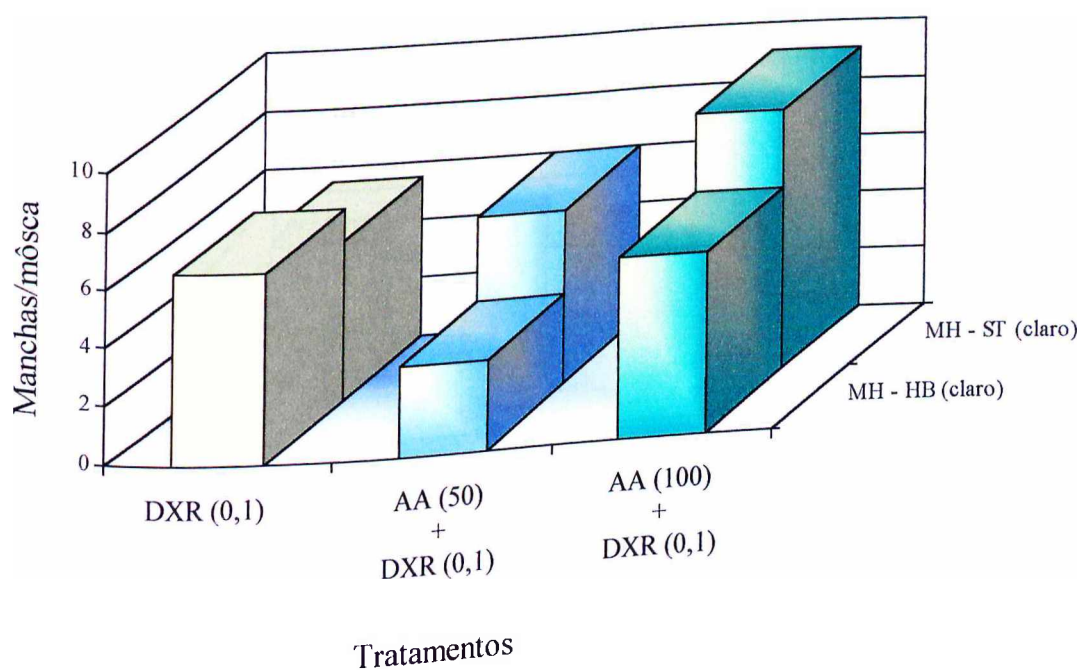


Figura 11. Frequências totais de manchas observadas em asas de *Drosophila melanogaster* dos descendentes MH dos cruzamentos padrão (ST) e de alta capacidade de bioativação (HB) tratados com doxorrubicina (doxina) (0,1 mg/ml), associada ou não com ácido ascórbico (50 e 100 mM), na presença de luz. Experimento 2.

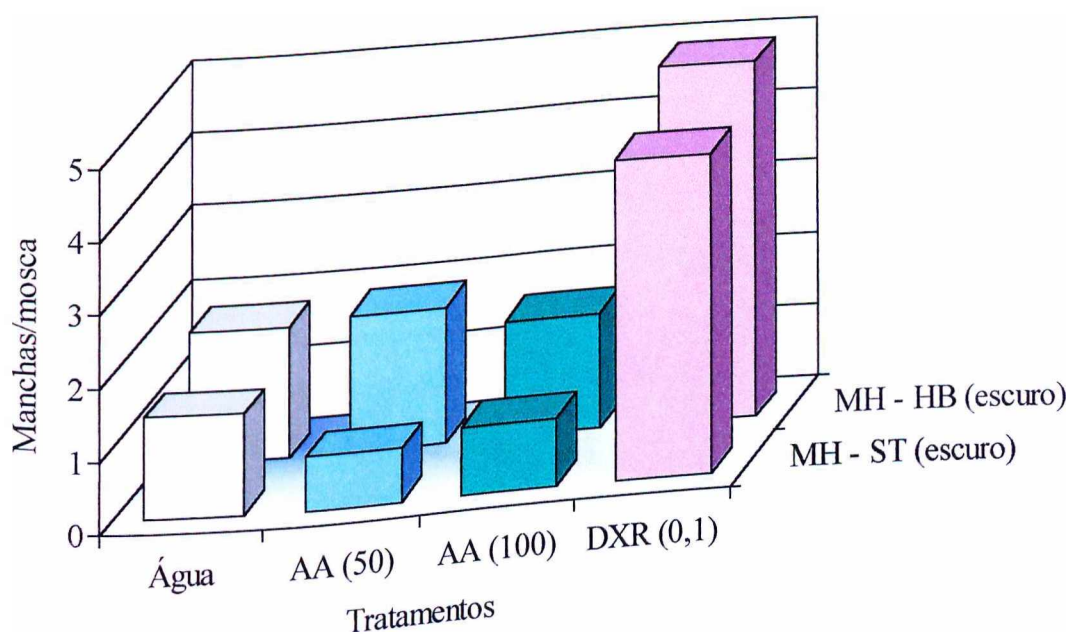


Figura 12. Frequências totais de manchas por mosca observadas em asas de *Drosophila melanogaster* dos descendentes MH, dos cruzamentos padrão (ST) e de alta capacidade de bioativação, tratados com água (controle negativo), ácido ascórbico (50 e 100 mM) e doxorubicina (doxina) (0,1 mg/ml) (controle positivo), na ausência de luz. Experimento 2.

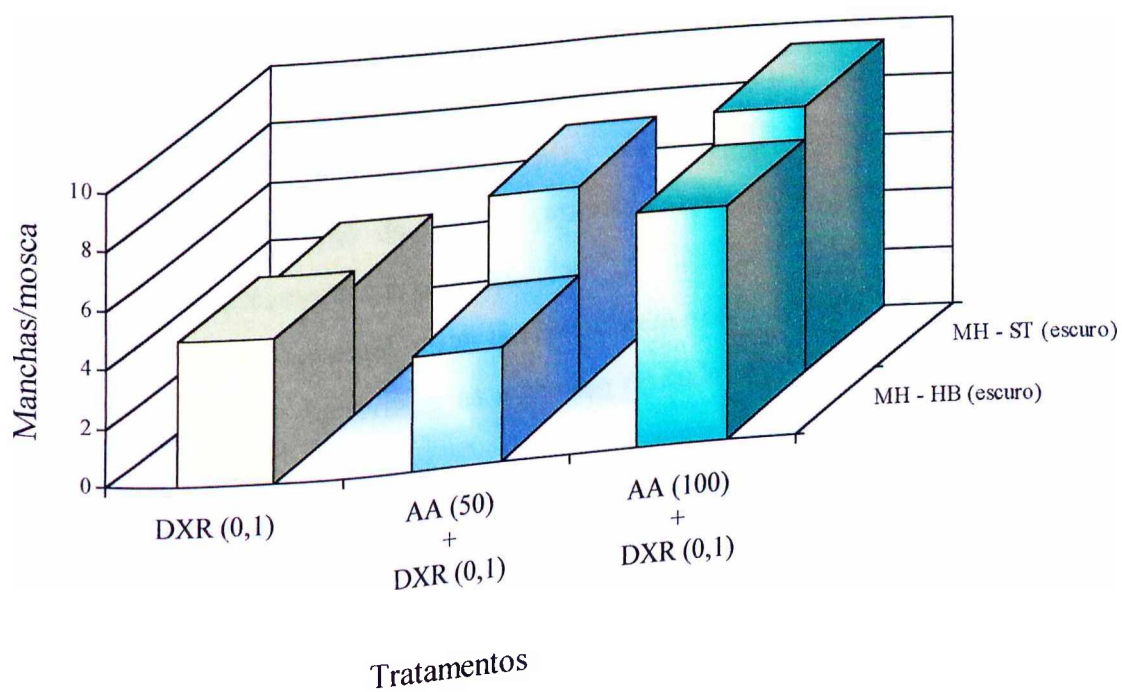


Figura 13. Frequências totais de manchas observadas em asas de *Drosophila melanogaster* dos descendentes MH dos cruzamentos padrão (ST) e de alta capacidade de bioativação (HB) tratados com doxorrubicina (doxina) (0,1 mg/ml), associada ou não com ácido ascórbico (50 e 100 mM), na ausência de luz. Experimento 2.

5. DISCUSSÃO

Este trabalho teve como objetivos verificar os efeitos moduladores do ácido ascórbico, quando associado ao cloridrato de doxorrubicina, em células somáticas de *Drosophila melanogaster*, tratadas na presença e ausência de luz.

Para tanto, foi empregado o teste para detecção de mutações e recombinações somáticas (Somatic Mutation And Recombination Test – SMART) em células de asas somáticas de *Drosophila melanogaster* que é um teste de curta duração considerado como um importante instrumento na detecção de agentes mutagênicos e antimutagênicos (Graf *et al.*, 1998).

O SMART de asa pode ser realizado por meio de dois cruzamentos: 1) padrão (Graf *et al.*, 1989); 2) de alta capacidade de ativação metabólica (Graf e van Schaick, 1992). Este utiliza fêmeas da linhagem Oregon R, construídas por Frölich e Würigler (1989), que contém cromossomos 1 e 2 do estoque Oregon R (R), resistente ao DDT, que exibe alto nível constitutivo de enzimas citocromo P-450. Assim sendo, esta linhagem é útil na detecção de agentes promutágenos, que necessitam de ativação metabólica, para expressarem sua genotoxicidade.

O objetivo de empregar estas duas linhagens, com capacidades diferentes de ativação metabólica, foi de verificar as respostas de cada agente testado, frente a cada linhagem.

5.1. Efeitos moduladores do ácido ascórbico quando associado ao cloridrato de doxorrubicina em células somáticas de *Drosophila melanogaster*, tratadas na presença de luz (Experimento 1).

Para a verificação dos efeitos moduladores do ácido ascórbico, quando associado ao cloridrato de doxorrubicina em células somáticas de *Drosophila melanogaster* tratadas na presença de luz, larvas obtidas dos cruzamentos padrão e de alta capacidade de bioativação foram tratadas em paralelo com AA (50 e 100 mM) (Fluka – Suíça) e

DXR (10 mg de doxorubicina HCl; 1,0 mg de metilparabeno e 50 mg de lactose [Adriblastina® - Pharmacia Ind. Com. Ltda.]).

Considerando-se o total de manchas mutantes observadas nas séries tratadas, podemos concluir que:

O AA (50 e 100 mM), quando empregado isoladamente, não possui efeitos genotóxicos nos descendentes MH de ambos cruzamentos.

A DXR (0,1 e 0,2 mg/ml) possui efeitos genotóxicos similares nos descendentes MH de ambos cruzamentos, o que nos permite concluir que a DXR é um agente genotóxico direto, que não necessita ser metabolizado para exercer seus efeitos genotóxicos. No entanto, as frequências de manchas mutantes observadas por asa são menores nos tratados com 0,2 mg/ml do que as observadas nos tratados com 0,1 mg/ml, indicando que a DXR, em doses elevadas, possui efeitos tóxicos que acarretam a morte celular.

Foi verificado, em ambos cruzamentos (ST e HB), que o AA (50 mM) exerceu efeito antigenotóxico contra os efeitos genotóxicos induzidos pela DXR (0,1 mg/ml), mas é incapaz de exercer efeitos antigenotóxicos estatisticamente significativo quando associado à DXR (0,2 mg/ml). O AA (100 mM) não apresentou efeitos antigenotóxicos quando associado tanto à DXR 0,1 como à 0,2 mg/ml. No entanto, contrariamente ao esperado, o AA 100 mM induziu um aumento estatisticamente significativo (fraco positivo) na frequência de manchas mutantes, quando associado à DXR 0,2 mg/ml.

Estes resultados estão de acordo com os resultados obtidos por Khan e Sinha (1994); Antunes (1997); Antunes e Takahashi (1998) e Konopacka *et al.* (1998), que serão discutidos posteriormente.

Como controle positivo foi utilizado o uretano (10 mM) que, na concentração utilizada, é um agente que possui efeitos comprovadamente genotóxicos no teste da mancha da asa de *Drosophila melanogaster*. Os resultados obtidos neste experimento estão de acordo com os encontrados na literatura, que mostram aumentos significativos nas frequências de manchas observadas nos descendentes dos cruzamentos HB e IHB, quando comparado com as frequências observadas nos descendentes do cruzamento ST, mostrando que a ativação metabólica do uretano depende de enzimas citocromo P-450 (Frölich e Würigler, 1990; Graf e van Schaik, 1992; Abraham, 1994; Spanó *et al.*, 1996; Nepomuceno, 1999).

Hübner *et al.* (1997) demonstraram em *Salmonella typhimurium*, em *Saccharomyces cerevisiae* e em células linfoblastóides TK6 humanas, que na ausência

de enzimas citocromo P-450 nenhum efeito genotóxico mediado pelo uretano foi observado em qualquer dos três sistemas teste.

As manchas mutantes observadas nas asas das moscas podem ser devidas a diferentes eventos genotóxicos: recombinação mitótica ou mutação (deleção, mutação de ponto, tipos específicos de translocações, etc.). A análise dos dois diferentes genótipos (um com cromossomos estruturalmente normais, e o outro com cromossomo balanceador com múltiplas inversões) permite calcular quantitativamente a frequência de recombinação do agente genotóxico testado (Graf *et al.*, 1998).

Assim sendo, com o objetivo de calcular as taxas de recombinação, após a análise completa dos descendentes MH, procedeu-se a análise dos descendentes BH, de ambos cruzamentos. Os resultados encontrados nos permitem concluir que o AA (50 mM) mostrou efeito anti-recombinogênico, quando associado à DXR (0,1 e 0,2 mg/ml), para ambos cruzamentos. No entanto, AA (100 mM) não apresentou efeito anti-recombinogênico quando associado à DXR (0,1 e 0,2 mg/ml); para ambos cruzamentos. Quando associado à DXR (0,2 mg/ml) o AA (100 mM) aumentou a frequência de recombinação em ambos cruzamentos.

Os resultados encontrados na análise dos descendentes BH nos permitem, ainda, concluir que, nas condições experimentais empregadas, apesar do AA possuir efeitos anti-recombinogênicos evidentes nas associações com AA (50 mM), os seus efeitos antimutagênicos, apesar de fracos e pouco perceptíveis, são também dependentes da dose empregada (com exceção para os tratados com AA 50 mM + DXR 0,2 mg/ml) (Figuras 7 e 9).

5.2. Efeitos moduladores do ácido ascórbico quando associado ao cloridrato de doxorubicina em células somáticas de *Drosophila melanogaster*, tratadas na presença e ausência de luz (Experimento 2)

Alguns trabalhos têm demonstrado que a DXR pode ser inativada quando submetida à luz visível. Assim sendo, a estabilidade da estrutura química da DXR, quando submetida à energia luminosa, foi monitorizada por meio do método HPLC, em plasma, urina e meio de cultura celular à temperatura ambiente. Os resultados indicaram

que a DXR foi muito instável em meio de cultura celular e na urina, quando exposta à luz, mas foi mais estável no plasma, quando submetida às mesmas condições. Em todos os casos, a diminuição na quantidade de DXR é grandemente dependente da intensidade de luz (Le Bot *et al.*, 1988).

Tem sido também descrito que a iluminação com luz visível, de meios de cultura contendo larvas de *Drosophila melanogaster*, pode reduzir a sobrevivência das mesmas. Por outro lado, a adição de antioxidantes ao meio de cultura, previne a mortalidade induzida pela luz. Assim, a ação dos antioxidantes sugere que os radicais livres são importantes na mortalidade induzida pela luz (Bruins *et al.*, 1997).

Diante de tais informações, este trabalho teve ainda como objetivos, verificar os efeitos moduladores do ácido ascórbico (agente antioxidante) quando associado ao cloridrato de doxorrubicina (gerador de radicais livres) em células somáticas de *Drosophila melanogaster*, tratadas na presença e ausência de luz.

Para tanto, larvas obtidas dos cruzamentos padrão e de alta capacidade de bioativação foram tratadas em paralelo, e em duplicata, com AA (50 e 100 mM) (Fluka - Suíça) e DXR (0,1 mg/ml) (Doxina, Eurofarma Lab.). Um lote foi mantido ao abrigo da luz, enquanto que o outro foi submetido a um ciclo de claro (12h) / escuro (12h), com luz visível emitida por lâmpada Osram.

O cloridrato de doxorrubicina, nas suas diferentes modalidades comerciais, é um agente quimioterápico administrado sob supervisão médica e, portanto, não comercializado em farmácias e drogarias. Assim sendo, as amostras utilizadas nesse trabalho foram obtidas no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia. Quando da realização do primeiro experimento, foi utilizado o cloridrato de doxorrubicina comercializado como adriblastina (Adriblastina® - 10 mg - Pharmacia Ind. Com. Ltda) que contém 10 mg de doxorrubicina HCl; 1,0 mg de metilparabeno e 50 mg de lactose.

No entanto, quando da realização do Experimento 2, foi utilizado o cloridrato de doxorrubicina comercializado como doxina (Doxina, Eurofarma Laboratórios Ltda.) que contém 10 mg de doxorrubicina.

Como controle positivo foi utilizado o próprio cloridrato de doxorrubicina, uma vez que, no Experimento 1, este apresentou frequências de manchas mutantes superiores às induzidas pelo controle positivo (uretano).

No Experimento 1, um dos objetivos era verificar a frequência de recombinação induzida pelo DXR e se o AA interferia nesta frequência. Assim sendo, foram analisados os descendentes MH e BH de ambos cruzamentos (ST e HB).

O Experimento 2 teve como objetivo apenas verificar a estabilidade do DXR, associado ou não ao AA, quando submetido à ação da energia luminosa, comparando-se as frequências de manchas mutantes encontradas em uma série exposta à luz, com as encontradas em uma série mantida ao abrigo da luz. Assim sendo, foram analisados apenas os descendentes MH de ambos cruzamentos.

5.2.1. Presença de luz (Experimento 2)

Considerando-se o total de manchas mutantes observadas nas séries tratadas, podemos concluir que:

O AA (50 e 100 mM), quando empregado isoladamente, não possui efeitos genotóxicos nos descendentes MH de ambos cruzamentos.

A frequência total de manchas mutantes induzidas pela DXR (0,1 mg/ml) foi ligeiramente superior nos descendentes MH do cruzamento HB (6,6 manchas por mosca), quando comparado com a frequência induzida nos descendentes ST (5,5 manchas por mosca). Apesar de ligeiramente superiores, esses resultados estão de acordo com os verificados no Experimento 1, no qual foram observadas frequências totais de manchas iguais a 4,05 e 4,20 manchas por asa nos cruzamentos ST e HB, respectivamente. Esses resultados confirmam que a DXR é um agente genotóxico direto, que não necessita ser metabolizado para exercer seus efeitos genotóxicos.

Foi verificado, no cruzamento ST, que as associações de AA (50 e 100 mM) + DXR (0,1 mg/ml) induziram frequências de manchas superiores à encontrada no tratado com DXR (0,1 mg/ml), proporcionalmente à concentração de AA, sendo que o aumento verificado na associação de AA (50 mM) + DXR (0,1 mg/ml) não foi estatisticamente significativo, enquanto que o aumento verificado na associação de AA (100 mM) + DXR (0,1 mg/ml) foi estatisticamente significativo, quando comparado com a frequência observada no tratado com DXR (0,1 mg/ml).

Esses resultados discordam do Experimento 1, no qual a associação de AA (50 mM) + DXR (0,1 mg/ml) apresentou uma diminuição na frequência total de manchas estatisticamente significativa, quando comparado com o tratado com DXR (0,1 mg/ml), enquanto que a diminuição verificada na associação de AA (100 mM) + DXR (0,1 mg/ml) foi estatisticamente não significativa, quando comparado com o tratado com DXR (0,1 mg/ml).

No cruzamento HB o AA (50 mM) exerceu efeito antigenotóxico contra os efeitos genotóxicos induzidos pela DXR (0,1 mg/ml). No entanto o AA (100 mM) é incapaz de exercer efeitos antigenotóxicos quando associado à DXR (0,1 mg/ml).

Esses resultados estão de acordo com os observados no Experimento 1.

5.2.2. Ausência de luz (Experimento 2)

Considerando-se o total de manchas mutantes observadas nas séries tratadas, podemos concluir que:

O AA (50 e 100 mM), quando empregado isoladamente, não possui efeitos genotóxicos nos descendentes MH de ambos cruzamentos.

A frequência total de manchas mutantes induzidas pela DXR (0,1 mg/ml) foi ligeiramente superior nos descendentes MH do cruzamento HB (4,95 manchas por mosca), quando comparado com a frequência induzida nos descendentes ST (4,45 manchas por mosca). Esses resultados estão de acordo com os verificados nos Experimentos 1 e 2 (presença de luz), nos quais foram observadas frequências totais de manchas por mosca iguais a 4,05 (Exp. 1 - claro - ST); 5,5 (Exp. 2 - claro - ST); 4,20 (Exp. 1 - claro - HB) e 6,6 (Exp. 2 - claro - HB). Esses resultados confirmam, mais uma vez, que a DXR é um agente genotóxico direto, que não necessita ser metabolizado para exercer seus efeitos genotóxicos, e a boa reprodutibilidade dos resultados obtidos no SMART.

Foi verificado, no cruzamento ST, que as associações de AA (50 e 100 mM) + DXR (0,1 mg/ml) induziram frequências de manchas superiores à encontrada no tratado com DXR (0,1 mg/ml), proporcionalmente à dose de AA, sendo que os aumentos

verificados foram estatisticamente significativos, quando comparado com a frequência observada no tratado com DXR (0,1 mg/ml).

Esses resultados concordam com os observados no Experimento 2 (presença de luz) que, por sua vez, discordam do Experimento 1 (presença de luz), no qual a associação de AA (50 mM) + DXR (0,1 mg/ml) apresentou uma diminuição na frequência total de manchas estatisticamente significativa, quando comparado com o tratado com DXR (0,1 mg/ml), enquanto que a diminuição verificada na associação de AA (100 mM) + DXR (0,1 mg/ml) foi estatisticamente não significativa, quando comparado com o tratado com DXR (0,1 mg/ml).

No cruzamento HB a associação de AA (50 mM) + DXR (0,1 mg/ml) apresentou uma diminuição na frequência total de manchas estatisticamente significativa, quando comparado com o tratado com DXR (0,1 mg/ml). No entanto, a associação de AA (100 mM) + DXR (0,1 mg/ml) apresentou um aumento na frequência total de manchas, estatisticamente significativo, quando comparado com o tratado com DXR (0,1 mg/ml).

Esses resultados estão de acordo com os observados nos Experimentos 1 e 2, na presença de luz.

Os efeitos protetores do AA (50 mM) contra os efeitos genotóxicos da DXR (0,1 mg/ml) observados no experimento 1 e ausentes no experimento 2 (claro e escuro) podem ser explicados, hipoteticamente, pelo fato de a DXR utilizada no experimento 1 ser a distribuída comercialmente sob o nome de adriplastina (Pharmacia Ind. Com. Ltda) que contém em sua composição 10 mg de doxorubicina HCl; 1,0 mg de metilparabeno e 50 mg de lactose, enquanto que a DXR utilizada no experimento 2 ser a distribuída comercialmente sob o nome de doxina (Eurofarma Laboratórios Ltda.), que contém em sua composição apenas os 10 mg de doxorubicina. Desta forma, os efeitos protetores encontrados no experimento 1 podem ser devidos à interação com o metilparabeno e/ou lactose, o que requer futuras investigações.

Quanto ao AA (50 mM) foi verificado, nos descendentes MH do cruzamento HB, que o mesmo possui efeitos antígeno-tóxicos quando associado à DXR (0,1 mg/ml), tanto na presença como na ausência de luz, enquanto que nos descendentes MH do cruzamento ST esses efeitos antígeno-tóxicos não são observados. Isto nos permite concluir que o AA necessita ser metabolizado por enzimas citocromo P-450 para exercer seus efeitos protetores.

5.3. Análise comparativa com dados da literatura

Tem sido demonstrado que o crescente consumo de vitaminas C (ácido ascórbico – AA) e E, tanto por meio do aumento no consumo de frutas e vegetais, assim como por meio de suplementação alimentar, pode reduzir a formação de compostos N-nitrosos, que é uma classe comum de agentes genotóxicos (Ferguson, 1994).

Algumas vitaminas (A, E e C) têm sido extensivamente estudadas nas últimas décadas e muitos efeitos benéficos foram demonstrados em testes com bactérias, plantas e células de mamíferos. Elas inibem a ação genotóxica de muitos mutágenos químicos, atuando de forma direta e/ou indireta no DNA (Cohen, 1987) (*apud* Nepomuceno, 1999).

O AA (10, 30 e 60 mg/Kg de peso corporal) foi efetivo na redução da frequência de micronúcleos induzidos pela ciclofosfamida, bleomicina e mitomicina C em células de medula óssea de camundongos (Vijayalaxmi e Venu, 1999).

O AA mostrou ser um efetivo agente antimutagênico contra cisplatina e menos efetivo contra bleomicina e doxorrubicina quando testado em *Salmonella*, porém não apresentou efeitos antimutagênicos quando associado à ciclofosfamida (Gentile *et al.*, 1998).

Por meio do teste da mancha da asa foi verificado que o AA não apresenta efeitos genotóxicos (Tripathy *et al.*, 1990), mas é capaz de proteger contra produtos de nitrosação do metil uréia em combinação com nitrito de sódio, *in vivo* (Graf *et al.*, 1998).

Tyrsina *et al.* (1994) estudaram o mecanismo de atividade antimutagênica do AA e seus derivados em *Salmonella typhimurium* TA100 e verificaram que, dentro dos limites das concentrações utilizadas, o AA e seus derivados têm propriedades pró-oxidantes.

Com o objetivo de determinar os possíveis mecanismos de ação responsáveis pela atividade antimutagênica do AA, Amara-Mokrane *et al.* (1996) fizeram pré-, co- e pós-tratamentos de linfócitos humanos com AA (10 nmol/ml), associados com tratamento com doxorrubicina (adriblastina). Estes autores verificaram que o AA foi efetivo na redução nos níveis de micronúcleos somente nos tratamentos simultâneos, quando o AA foi previamente incubado com DXR por 2h a 37° C antes de serem introduzidos nos meios de cultura. Os resultados obtidos sugerem que o AA possui

efeito desmutagênico. As concentrações que apresentaram efeitos desmutagênicos efetivos não apresentaram efeitos clastogênicos, aneugênicos, nem citotóxicos.

A DXR (1 mM) quando testada previamente por meio dos SMARTs de olho e de asa, foi classificada como forte mutágeno, sendo capaz de induzir todos os tipos de manchas (Clements *et al.*, 1984; Frei *et al.*, 1985; Clements e Vogel, 1988; Clements *et al.*, 1988, 1990).

Antunes (1997) e Antunes e Takahashi (1998) verificaram em células de medula óssea de ratos Wistar, que o AA, nas menores doses utilizadas (200 e 400 mg/Kg p. c.) reduziu de forma estatisticamente significativa a frequência de aberrações cromossômicas e o número de metáfases alteradas induzidas pela DXR, enquanto que a maior dose (800 mg/Kg p. c.) não alterou os parâmetros analisados. Quando testado em linfócitos do sangue periférico humano *in vitro*, o AA, nas menores concentrações (100 ou 200 µg/ml), não causou qualquer alteração nos parâmetros analisados. No entanto, concentrações elevadas (1.000 µg/ml) aumentaram o total de aberrações cromossômicas de forma estatisticamente significativa.

Khan e Sinha (1994) estudaram os efeitos moduladores de altas doses de AA sobre a genotoxicidade de três pesticidas (endosulfan, fosfamidom e mancozeb) por meio do teste do micronúcleo em camundongos Swiss albinos. O AA (20 mg/Kg/dia) que é o equivalente ao dobro do empregado na terapêutica humana, foi a dose mais efetiva como antimutagênica quando associada aos três pesticidas. A dose terapêutica (10 mg/Kg/dia) foi comparativamente menos eficiente, enquanto que o quádruplo (40 mg/Kg/dia) não apresentou qualquer efeito antimutagênico.

Konopacka *et al.* (1998) investigaram, em camundongos, o efeito modificador do pré-tratamento com vitamina C sobre a atividade clastogênica dos raios gama. A vitamina C, dependendo da concentração empregada (400 mg/Kg/dia) aumentou os efeitos da radiação, ou reduziu o número de eritrócitos policromáticos micronucleados (50-100 mg/Kg/dia).

Diante do acima exposto, os resultados obtidos nesse experimento estão de acordo com os dados encontrados na literatura especializada.

Apesar de alguns resultados discordantes observados entre os Experimentos 1 e 2, pode-se claramente verificar a eficiência do SMART na detecção de efeitos genotóxicos e moduladores de agentes químicos, pela clareza na interpretação dos resultados encontrados, assim como na reprodutibilidade dos dados obtidos nos diferentes experimentos.

Sob as presentes condições experimentais, pode-se concluir que a eficiência do AA, na proteção das células de asas de *D. melanogaster*, contra mutações e recombinações somáticas induzidas pela DXR é dependente da dose utilizada e que a eficiência na proteção está diretamente ligada às condições de ativação metabólica por enzimas citocromo P-450, uma vez que as maiores proteções foram obtidas nos tratados com AA (50 mM) quando associado à DXR (0,1 mg/ml), independentemente da presença ou na ausência de luz.

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos, de acordo com as condições experimentais em que foi realizado este trabalho, nos permitem concluir que:

- a DXR (0,1 e 0,2 mg/ml), em suas diferentes apresentações comerciais (adriblastina e doxina) é um agente genotóxico direto, que induz frequências de manchas mutantes similares, independentemente do cruzamento utilizado (ST e HB) e da presença ou ausência de luz;
- a DXR, em doses elevadas (0,2 mg/ml), possui efeitos tóxicos que acarretam a morte celular;
- AA (50 e 100 mM) não apresenta efeitos genotóxicos em nenhum dos cruzamentos utilizados (ST e HB), tanto na presença como na ausência de luz;
- AA (50 mM), na presença de luz, exerce efeitos antígenotóxicos contra os efeitos genotóxicos induzidos pela DXR (adriblastina 0,1 mg/ml), em ambos cruzamentos (ST e HB);
- AA (50 mM), na presença de luz, não exerce efeitos antígenotóxicos, contra os efeitos genotóxicos da DXR (adriblastina 0,2 mg/ml), em ambos cruzamentos (ST e HB);
- AA (100 mM), na presença de luz, não exerce efeitos antígenotóxicos quando associado à DXR (0,1 e 0,2 mg/ml);
- AA (100 mM), na presença de luz, induz aumento na frequência de manchas mutantes, quando associado à DXR 0,2 mg/ml.

- os efeitos antigenotóxicos do AA, quando associado à DXR (adriblastina) são tanto anti-recombinogênicos quanto antimutagênicos, em ambos cruzamentos; de acordo com a dose empregada;
- nos descendentes do cruzamento ST (presença e ausência de luz), as associações de AA (50 e 100 mM) + DXR (doxina - 0,1 mg/ml) induzem frequências de manchas superiores às induzidas pela DXR (doxina - 0,1 mg/ml);
- nos descendentes do cruzamento HB (presença e ausência de luz), o AA (50 mM) exerce efeitos antigenotóxicos contra os efeitos genotóxicos induzidos pela DXR (0,1 mg/ml).
- nos descendentes do cruzamento HB (presença e ausência de luz), o AA (100 mM) não exerce efeitos antigenotóxicos contra os efeitos genotóxicos induzidos pela DXR (0,1 mg/ml);
- os efeitos protetores do AA (50 mM) contra os efeitos genotóxicos da DXR (0,1 mg/ml) observados no experimento 1 e ausentes no experimento 2 (claro e escuro) podem ser explicados, hipoteticamente, pelo fato de a DXR (adriblastina) conter metilparabeno e lactose, que podem interagir com o AA, fazendo com que o mesmo tenha efeito antigenotóxico nos descendentes do cruzamento ST;
- a eficiência do AA, na proteção das células de asas de *D. melanogaster*, contra mutações e recombinações somáticas induzidas pela DXR é dependente da dose utilizada e que a eficiência na proteção está diretamente ligada às condições de ativação metabólica por enzimas citocromo P-450.

7. RESUMO

Doxorrubicina (DXR), uma antraciclina, é um agente quimioterápico amplamente empregado como agente antineoplásico. Esta droga e seus metabólitos têm sido mostrados serem estáveis à temperatura ambiente, no escuro, por pelo menos 24 h, porém são instáveis quando expostos à luz. A eficácia clínica da DXR é comprometida devido à produção de radicais livres, o que acarreta toxicidade cardíaca. Os efeitos modulatórios da vitamina C (ácido ascórbico - AA), um sequestrador de radicais livres, contra a genotoxicidade direta da DXR, foram investigados por meio do teste para detecção de mutações e recombinações somáticas (Somatic Mutation And Recombination Test - SMART) *in vivo* em *Drosophila melanogaster*. Os seguintes cruzamentos foram empregados: 1) Cruzamento padrão (Standard cross - ST) no qual fêmeas *flr³/In (3LR) TM3, ri p^p sep l (3) 89 Aa bx^{34e} e Bd^S* foram cruzadas com machos *mwh/mwh*; 2) Alta capacidade de bioativação metabólica (High bioactivation cross - HB) no qual fêmeas *ORR; flr³/In (3LR) TM3, ri p^p sep l (3) 89 Aa bx^{34e} e Bd^S* foram cruzadas com machos *mwh/mwh*. Este último cruzamento é caracterizado por uma alta sensibilidade a promutágenos e procarcinógenos. Larvas resultantes destes dois cruzamentos foram tratadas simultaneamente, por aproximadamente 48 h, com DXR e AA, protegidas da luz e expostas à luz ambiente. Controles negativo e positivo foram incluídos nas duas séries de experimentos. As asas dos adultos emergentes foram analisadas quanto a ocorrência de diferentes tipos de manchas mutantes. Os resultados de dois estudos separados são apresentados: (1) Quando exposto à luz ambiente, o ácido ascórbico (50 e 100 mM) não apresentou efeitos genotóxicos, enquanto que a DXR (Adriamicina) (0,1 e 0,2 mg/ml de água destilada) foi clara e igualmente genotóxica em ambos cruzamentos. A adição de AA ao meio de cultura para drosófilas, contendo DXR, resultou em um efeito protetor inverso, pois a menor dose de 50 mM reduziu a frequência de manchas induzidas pela DXR, enquanto que a dose de 100 mM não teve efeito, ou aumentou a frequência de manchas de ambos cruzamentos. (2) Para determinar a estabilidade da DXR (Doxina), dois lotes de larvas, emergentes de ambos cruzamentos, foram tratados simultaneamente durante aproximadamente 48 h com DXR e AA, protegidos da luz e expostos à luz ambiente. A adição de AA ao meio de cultura para drosófilas, contendo DXR, aumentou as frequências de manchas, demonstrando um efeito dose-resposta na série ST, tanto para os expostos à luz, quanto para os

protegidos contra a luz ambiente. No entanto, foi verificado um efeito protetor inverso na série HB, pois a menor dose de 50 mM reduziu a frequência de manchas induzidas pela DXR, enquanto que a dose de 100 mM não teve efeito (quando exposta à luz), ou aumentou a frequência de manchas (quando protegida da luz). Estes resultados sugerem que uma proporção do AA adicionado pode interferir com radicais livres produzidos pela DXR e outros metabólitos reativos, os quais elevam as frequências de manchas.

8. ABSTRACT

Doxorubicin (DXR), an anthracycline, is a chemotherapeutic agent employed worldwide as antineoplastic agent. The drug and its metabolites have been shown to be stable at room temperature in the dark for at least 24 hours, but unstable when exposed to light. Clinical efficacy of doxorubicin is compromised due to free radical generation leading to cardiac toxicity. The modulatory effect of the free radical scavenger vitamin C (ascorbic acid – AA) on the direct genotoxicity of DXR was assessed using the *in vivo* Somatic Mutation And Recombination Test (SMART) on *Drosophila melanogaster*. The following crosses were used: 1) Standard cross (ST) in which $flr^3 / In(3LR) TM3, ri p^p sep 1 (3) 89 Aa bx^{34e} e Bd^S$ females were mated with mwh / mwh males; 2) High bioactivation cross (HB) in which $ORR; flr^3 / In(3LR) TM3, ri p^p sep 1 (3) 89 Aa bx^{34e} e Bd^S$ females were mated with mwh / mwh males. The latter cross is characterized by a high sensitivity to promutagens and procarcinogens. The resulting larvae from these two crosses were treated simultaneously during approximately 48 hours with DXR and AA. Concurrent negative and positive controls were included for the two sets of experiments. The wings from the emergent adults were analyzed according to the occurrence of different types of mutant spots. Results of two separate studies are presented: (1) When exposed to room light, ascorbic acid (50 and 100 mM) had no genotoxic effects, while DXR (Adriamycin) (0.1 and 0.2 mg / ml distilled water) was clearly and equally genotoxic in both crosses. The addition of AA to DXR cultures resulted in an inverse protective effect as the low dose of 50 mM reduced the frequency of spots induced by DXR. On the other hand, a dose of 100 mM had no effect or increased spot frequencies in either cross. (2) To determine the stability of doxorubicin (Doxin), two batches of larvae [(i) protected from light exposure; (ii) exposed to room light] emerging from both crosses were treated simultaneously during approximately 48 hours with DXR and AA. The addition of AA (100 mM) to DXR cultures increased spot frequencies demonstrating a dose-response effect in the ST series, for both protected and exposed to room light; while an inverse protective effect at the low dose of 50 mM reduced the frequency of spots induced by DXR.

In the HB series a dose of AA 100 mM had no effect on spot frequencies when larvae were exposed to light. On the other hand, AA 100 mM increased spot frequencies when larvae were protected from light. These results suggest that a

proportion of the added AA may interfere with DXR induced free radicals and other reactive metabolites which elevate spot frequencies.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHAM, S.K. (1994). Antigenotoxicity of coffee in the *Drosophila* assay for somatic mutation and recombination. *Mutagenesis* 9(4): 383-86.
- ABRAHAM, S.K.; SINGH, S.P. and KESAVAN, P.C. (1998). *In vivo* antigenotoxic effects of dietary agents and beverages co-administered with urethane: assessment of the role of glutathione S-transferase activity. *Mutat Res* 413: 103-110.
- ADLER, I.D.; SCHRIEVER-SCHWEMMER, G. and KLIESCH, V. (1994). Clastogenicity of trophosphamide in somatic and germinal cells of mice. *Mutat Res* 307: 237-43.
- ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K. and WATSON, J.D. (1997). *Molecular Biology of the Cell*. Edited by Gavin Borden. Londres - England, pp 1255-94.
- ALSNER, J.; SORENSEN, H.V.; SCHMIDT, V.K.; SORENSEN, B.S. and WESTERGAARD, O. (1996). Topoisomerase II-mediated DNA cleavage: evidence for distinct regions of enzyme-DNA contacts. *J Mol Biol* 259(3): 317-24.
- AMARA-MOKRANE, Y.A.; LEHUCHER-MICHEL, M.P.; BALANSARD, G.; DUMÉNIL, G. and BOTTA, A. (1996). Protective effects of α -hederin, chlorophyllin and ascorbic acid towards the induction of micronucleic by doxorubicin in cultured human lymphocytes. *Mutagenesis* 11: 161-7.
- AMES, B.N. (1983). Dietary carcinogens and anticarcinogens. Oxygen radicals and degenerative diseases. *Science* 221(4617): 1256-64.
- ANDERSON, R.D.; VEIGL, M.L.; BAXTER, J. and SEDWICK, D. (1993). Excision repair reduces doxorubicin-induced genotoxicity. *Mutat Res* 294: 215-22. (apud 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. pp 01-97).

- 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. pp 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: 137-43.
- ANTUNES, L.M.G.; ARAÚJO, M.C.P.; DARIN, J.D'.C. and BIANCHI, M. de L. (2000). Effects of the antioxidants curcumin and vitamin C on cisplatin-induced clastogenesis in Wistar rat bone marrow cells. *Mutat Res* 465(1-2): 131-7.
- BADR, F.M.; EL-HABIT, O.H.; HAMDY, M. and HASSAN, G.A. (1998). The mutagenic versus protective role of vitamin A on the induction of chromosomal aberration in human lymphocyte cultures. *Mutat Res* 414(1-3): 157-63.
- BARRS, A.J. (1980). Biotransformation of xenobiotics in *Drosophila melanogaster* and its relevance for mutagenicity testing. *Drug Metab Ver* 11: 191-221.
- BEAN, C.I. ; ARMSTRONG, M.J. and GALLOWAY, S.M. (1992). Effect of sampling time on chromosomal aberration yield for 7 chemicals in Chinese hamster ovary cells. *Mutat Res* 265: 31-44. (*apud* 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. pp 01-97).
- BERLIN, V. and HASELTINE, W.A. (1981). Reduction of adriamycin to a semiquinone-free radical by NADPH cytochrome P-450 reductase produces DNA cleavage in a reaction mediated by molecular oxygen. *J Biol Chem* 256(10): 4747-56. (*apud* 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. pp 01-97).

- BINASCHI, M.; CAPRANICO, G.; DAL BO, L. and ZUNINO, F. (1997). Relationship between lethal effects and topoisomerase II-mediated double-stranded DNA breaks produced by anthracyclines with different sequence specificity. *Mol Pharmacol* 51(6): 1053-9.
- BODLEY, A.; LIU, L.F.; ISRAEL, M.; SESHADRI, R.; KOSEKI, Y.; GIULIANI, F.C.; KIRSCHENBAUM, S.; SILBER, R. and POTMESIL, M. (1989). DNA topoisomerase II-mediated interaction of doxorubicin and daunorubicin congeners with DNA. *Cancer Res* 49: 5969-78. (apud 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. pp 01-97).
- BORDE, V. and DUGUET, M. (1996). *In vivo* topoisomerase II cleavage sites in the ribosomal DNA of *Physarum polycephalum*. *Biochemistry* 35(18): 5787-95.
- BORDE, V. and DUGUET, M. (1998). The mapping of DNA topoisomerase sites *in vivo*: a tool to enlight the functions of topoisomerases. *Biochimie* 80(3): 223-33.
- BOUCHER, R.; LIVINGSTON, G.K. and QUE HEE, S.S. (1993) *In vitro* micronucleus bioassay of human peripheral lymphocytes for adriamycin in the presence of cyclophosphamide. *Environ Mol Mutagen* 21: 372-82. (apud 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. pp 01-97).
- BRONZETTI, G.; DELLA CROCE, C.; ARETINI, P. and FIORIO, R. (1996). Antimutagenesis and anticancer effects. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 15: 59-64.
- BRUINS, B.G.; SCHARLOO, W. and THORIG, G.E. (1997). Light-induced vitamin deficiency in *Drosophila melanogaster*. *Arch Insect Biochem Physiol* 36(1): 51-67.
- CAPRANICO, G.; BINASCHI, M.; BORGNETTO, M.E.; ZUNINO, F. and PALUMBO, M. (1997). A protein-mediated mechanism for the DNA sequence-specific action of topoisomerase II poisons. *Trends Pharmacol Sci* 18(9): 323-9.

- CAPRANICO, G. and BINASCHI, M. (1998). DNA sequence selectivity of topoisomerases and topoisomerase poisons. *Biochim Biophys Acta* 1400 (1-3): 185-94.
- CLEMENTS, J.; PHILLIPS, M. and TODD, N. (1984). Mutagenicity of adriamycin in *Drosophila melanogaster*. *Mutat Res* 135(3): 175-9.
- CLEMENTS, J. and VOGEL, E.W. (1988). Somatic recombination and mutation assays in *Drosophila*: a comparison of the response of two different strains to four mutagens. *Mutat Res* 209(1-2): 1-5.
- CLEMENTS, J.; HOWE, D.; PHILLIPS, M. and TODD, N.K. (1988). The *Drosophila* wing test: a comparison of the sensitivity of different strains. *Mutat Res* 203(2): 117-23.
- CLEMENTS, J.; HOWE, D.; LOWRY, A. and PHILLIPS, M. (1990). The effects of a range of anti-cancer drugs in the white-ivory somatic mutation test in *Drosophila*. *Mutat Res* 228(2): 171-6.
- COHEN, L. (1987). Diet and Cancer. *Scien Amer* 257:42-50.
- CORRALES, E.A.L.S. (1997). Verificação dos efeitos genotóxicos dos agentes antineoplásicos citrato de tamoxifen e paclitaxel. Dissertação apresentada à Universidade Federal de Uberlândia, para a obtenção do grau de Mestre. pp 01-84.
- CUMMINGS, J.; WILLMOTT, N.; HOEY, B.M.; MARLEY, E.S. and SMITH, J.F. (1992). The consequences of doxorubicin quinone reduction *in vivo* in tumor tissue. *Biochem Pharmacol* 44: 2165-74. (apud 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. pp 01-97).
- DAPKUS, D. and MERREL, D.J. (1977). Chromosomal analysis of DDT-resistance in a long-term selected population of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 87: 685-97. (apud CORRALES, E.A.L.S. (1997). Verificação dos efeitos genotóxicos dos

- agentes antineoplásicos citrato de tamoxifen e paclitaxel. Dissertação apresentada à Universidade Federal de Uberlândia, para a obtenção do grau de Mestre. pp 01-84).
- DOROSHOW, J.H. and DAVIES, K.J. (1986). Redox cycling of anthracyclines by cardiac mitochondria. II. Formation of superoxide anion, hydrogen peroxide, and hydroxyl radical. *J Biol Chem* 261(7): 3068-74.
- DREWINKO, B. and GOTTLIEB, J.A. (1973). Survival kinetics of cultured human lymphoma cells exposed to adriamycin. *Cancer Res* 33: 1141-45. (apud 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. pp 01-97).
- DULOUT, F.N.; LARRAMENDY, M.L. and OLIVERO, O.A. (1981). Effect of caffeine on the frequency of chromosome aberrations induced *in vivo* by triethylenemelamine (TEM) and adriamycin (ADR) in mice. *Mutat Res* 82: 295-304. (apud 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. pp 01-97).
- EDENHARDER, A.; WOLF-WANDELBURG, M.; DECKER, M. and PLATT, K.L. (1999). Antimutagenic effects and possible mechanisms of action of vitamins and related compounds against genotoxic heterocyclic amines from cooked food. *Mutat Res* 444(1): 235-48.
- FERGUSON, L.R. (1994). Antimutagens as cancer chemopreventive agents in the diet. *Mutat Res* 307(1): 395-410.
- FERGUSON, L.R. and BAGULEY, B.C. (1994). Topoisomerase II enzymes e mutagenicity. *Environ Mol Mutagen* 24: 245-61.
- FERGUSON, L.R. and PEARSON, A.E. (1996). The clinical use of mutagenic anticancer drugs. *Mutat Res* 355(1-2): 1-12.

- 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(3): 158-66.
- 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.
- FREI, H. and WÜRGLER, F.E. (1995). Optimal experimental design and sample size for the statistical evaluation of data from Somatic Mutation And Recombination Test (SMART) in *Drosophila*. *Mutat Res* 341: 235-47.
- 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): 315-25.
- FRÖLICH, A. and WÜRGLER, F.E. (1989). New tester strains with improved bioactivation capacity for the *Drosophila* wing-spot test. *Mutat Res* 216: 179-87.
- (apud CORRALES, E.A.L.S. (1997). Verificação dos efeitos genotóxicos dos agentes antineoplásicos citrato de tamoxifen e paclitaxel. Dissertação apresentada à Universidade Federal de Uberlândia, para a obtenção do grau de Mestre. pp 01-84).
- FRÖLICH, A. and WURGLER, F.E. (1990). Genotoxicity of ethyl carbamate in the *Drosophila* wing spot test: Dependence on genotype-controlled metabolic capacity. *Mutat Res* 244: 201-8.
- FUJITA, K.; SHIMPO, K.; YAMADA, K.; SAT, T.; NIIMI, H.; SHAMOTO, M.; NAGATSU, I.; TAKEUCHI, T. and UMEZAWA, H. (1982). Reduction of adriamycin toxicity by ascorbate in mice and guinea pigs. *Cancer Res* 42: 309-16.
- (apud 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. pp 01-97).
- GAMA-SOSA, M.A.; SLAGEL, V.A.; TREWYN, R.W.; OXENHANDLER, R.; KUO, K.C.; GEHRKE, C.W. and EHRLICH, M. (1983). The 5-methylcytosine content of DNA from human tumors. *Nucleic Acids Res* 11: 6883-94.

- GARCÍA-BELLIDO, A. and DAPENA, J. (1974). Induction, detection and characterization of cell differentiation mutants in *Drosophila*. *Mol gen Genet* 128: 117-30. (apud CORRALES, E.A.L.S. (1997). Verificação dos efeitos genotóxicos dos agentes antineoplásicos citrato de tamoxifen e paclitaxel. Dissertação apresentada à Universidade Federal de Uberlândia, para a obtenção do grau de Mestre. pp 01-84).
- GEBHART, E.; WAGNER, H.; GRZIWOK, K. and BEHNSEN, H. (1985). The action of anticlastogenic in human lymphocytes cultures and their modification by rat-liver S9 mix. II. Studies with vitamins C and E. *Mutat Res* 149: 83-94. (apud 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. pp 01-97).
- GENTILE, J.M.; RAHIMI, S.; ZWIESLER, J.; GENTILE, G.J. and FERGUSON, L.R. (1998). Effect of selected antimutagens on the genotoxicity of antitumor agents. *Mutat Res* 402(1-2): 289-98.
- GOLDENBERG, G.J.; WANG, H. and BLAIR, G.W. (1986). Resistance to adriamycin: relationship of cytotoxicity to drug uptake and DNA single and double-strand breakage in cloned cell lines of adriamycin-sensitive and resistant P338 leukemia. *Cancer Res* 46: 2978-83. (apud 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. pp 01-97).
- GONZALGO, M.L. and JONES, P.A. (1997). Mutagenic and epigenetic effects of DNA methylation. *Mutat Res* 386: 107-18.
- 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: 153-88. (apud CORRALES, E.A.L.S. (1997). Verificação dos efeitos genotóxicos dos agentes antineoplásicos citrato de

- tamoxifen e paclitaxel. Dissertação apresentada à Universidade Federal de Uberlândia, para a obtenção do grau de Mestre. pp 01-84).
- 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* 222: 359-73.
- GRAF, U.; HALL, C. B. and VAN SCHAIK, N. (1990). On the use of excision repair defective cells in the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environ Mol Mutagen* 16(4): 225-37.
- 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): 203-9
- GUANO, F.; POURQUIER, P.; TINELLI, S.; BINASCHI, M.; BIGIONI, M.; ANIMATI, F.; MANZINI, S.; ZUNINO, F.; KOHLHAGEN, G.; POMMIER, Y. and CAPRANICO, G. (1999). Topoisomerase poisoning activity of novel disaccharide anthracyclines. *Mol Pharmacol* 56(1): 77-84.
- 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. (apud CORRALES, E.A.L.S. (1997). Verificação dos efeitos genotóxicos dos agentes antineoplásicos citrato de tamoxifen e paclitaxel. Dissertação apresentada à Universidade Federal de Uberlândia, para a obtenção do grau de Mestre. pp 01-84).
- 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 169-81. (apud CORRALES, E.A.L.S. (1997). Verificação dos efeitos genotóxicos dos agentes antineoplásicos citrato de tamoxifen e paclitaxel. Dissertação apresentada à Universidade Federal de Uberlândia, para a obtenção do grau de Mestre. pp 01-84).

- GUYONNET, D.; BELLOIR, C.; SUSCHETET, M.; SIESS M.H. and LE BON (2000). Liver subcellular fractions from rats treated by organosulfur compounds from *Allium* modulate mutagen activation. *Mutat Res* 466(1): 17-26.
- HAJARIZADEH, H.; LEBREDO, L.; BARRIE, R. and WOLTERING, E.A. (1994). Protective effect of doxorubicin in vitamin C or dimethyl sulfoxide against skin ulceration in the pig. *Ann Surg Oncol* 1(5): 411-4.
- HÄLLSTRÖM, I.; BLANCK, A. and ATUMA, S. (1984). Genetic variation in cytochrome P-450 and xenobiotic metabolism in *Drosophila melanogaster*. *Biochem Pharmacol* 33: 13-20.
- HÄLLSTRÖM, I. and BLANCK, A. (1985). Genetic regulation of the cytochrome P-450 system in *Drosophila melanogaster*. I. Chromosomal determination of some cytochrome P-450-dependent reactions. *Chem Biol Interact* 56: 157-71. (apud
- CORRALES, E.A.L.S. (1997). Verificação dos efeitos genotóxicos dos agentes antineoplásicos citrato de tamoxifen e paclitaxel. Dissertação apresentada à Universidade Federal de Uberlândia, para a obtenção do grau de Mestre. pp 01-84).
- HARTMAN, P.E. and SHANKEL, D.M. (1990). Antimutagens and anticarcinogens: a survey of putative interceptor molecules. *Environ Mol Mutagen* 15: 145-82.
- HAYNIE, J.L. and BRYANT, P.J. (1977). The effects of X-rays on the proliferation dynamics of cells in the imaginal wing disc of *Drosophila melanogaster*. *Wilh Roux Arch Develop Biol* 183: 85 - 100.
- HELBIG, R.; GERLAND, E. and SPEIT, G. (1994). The molecular nature of mutations induced by adriamycin at the hprt locus on V79 cells. *Mutagenesis* 9: 113-16. (apud
- 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. pp 01-97).
- HÜBNER, P.; GROUX, P.M.; WEIBEL, B.; SENGSTAG, C.; HORLBECK, J.; LEONG-MORGENTHALER, P. and LÜTHY, J. (1997). Genotoxicity of ethyl carbamate (urethane) in *Salmonella*, yeast and human lymphoblastoid cells. *Mutat Res* 390: 11-19.

- JONES, P.A. (1986). DNA methylation and cancer. *Cancer Res* 46: 461-6.
- KADA, T.; INOUE, T. and MANIKI, M. (1982). Environmental desmutagens and antimutagens. *Environmental Mutagenesis and Plant Biology*. Edited by E.J. Kleokonsky. Praeger, N.Y., pp 113-52.
- KEITH, R.E. (1989). Vitamins in sport and exercise. In: *Nutrition in exercise and sport*, Edited by HICKSON J.F. and WOLINSKY, I.; CRC Press, Boca Raton, pp 233- 54. (apud 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. pp 01-97).
- KHAN, P.K. and SINHA, S.P. (1994). Impact of higher doses of vitamin C in modulating pesticide genotoxicity. *Teratog Carcinog Mutagen* 14(4): 175-81.
- KINGMA, P.S.; CORBETT, A.H.; BURCHAM, P.C.; MARNETT, L.J. and OSHEROFF, N. (1995). Abasic sites stimulate double-stranded DNA cleavage mediated by topoisomerase II. DNA lesions as endogenous topoisomerase II poisons. *J Biol Chem* 270(37): 21441-4.
- KINGMA, P.S. and OSHEROFF, N. (1997a). Apurinic sites are position-specific topoisomerase II poisons. *J Biol Chem* 272(2): 1148-55.
- KINGMA, P.S.; GREIDER, C.A. and OSHEROFF, N. (1997b). Spontaneous DNA lesions poison human topoisomerase II alpha and stimulate cleavage proximal to leukemic 11q23 chromosomal breakpoints. *Biochemistry* 36(20): 5934-9.
- KINGMA, P.S. and OSHEROFF, N. (1998). The response of eukaryotic topoisomerases to DNA damage. *Biochim Biophys Acta* 1400(1-3): 223-32.
- KONOPACKA, M.; WIDEL, M. and RZESZOWSKA-WOLNY, J. (1998). Modifying effect of vitamins C, E and beta-carotene against gamma-ray-induced DNA damage in mouse cells. *Mutat Res* 417: 85-94.

- 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: 133-40. (*apud* 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. pp 01-97).
- LE BOT, M.A.; RICHE, C.; GUEDES, Y.; KERNALEGUEN, D.; SIMON, S.; BEGUE, J.M. and BERTHOU, F. (1988). Study of doxorubicin photodegradation in plasma, urine and cell cultura medium by HPLC. *Biomed Chromatogr* 2: 242-4.
- LEE, M. P.; SANDER, M. and HSIEH, T. (1989). Nuclease protection by *Drosophila* DNA topoisomerase II cleavage sites. *J Biol Chem* 264 (36): 21779-87.
- LETEURTRE, F.; KOHLHAGEN, G.; FESEN, M.R.; TANIZAWA, A.; KOHN, K.W. and POMMIER, Y. (1994). Effects of DNA methylation on topoisomerase I and II cleavage activities. *J Biol Chem* 269(11): 7893-900.
- LINDER, M.C. (1991). Nutrition and metabolism of vitamins. In: *Nutritional biochemistry and metabolism with clinical applications*, Ed. LINDER, M.C., Elsevier, pp 143-189. (*apud* 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. pp 01-97).
- LINDSLEY, D.L. and ZIMM, G.G. (1992). (Eds.) The genome of *Drosophila melanogaster*, Academic Press, San Diego CA, USA, p. 1133. (*apud* CORRALES, E.A.L.S. (1997). Verificação dos efeitos genotóxicos dos agentes antineoplásicos citrato de tamoxifen e paclitaxel. Dissertação apresentada à Universidade Federal de Uberlândia, para a obtenção do grau de Mestre. pp 01-84).
- LIVIERO, L. and VON BORSTEL, R.C. (1996). The 4th International Conference on Mechanisms of Antimutagenesis and Anticarcinogenesis: a summary. *Mutat Res* 350: 287-93. (*apud* 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. pp 01-97).

LOWN, J.W. (1993). Anthracycline and anthraquinone anticancer agents: corrent status and recent developments. *Pharmacol Ther* 60: 185-214.

MACHLIN, L.J. (1992). Introduction. *Ann N Y Acad Sci* 669: 1-6. (apud 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. pp 01-97).

MIASSOD, R.; RAZIN, S.V. and HANCOCK, R. (1997). Distribution of topoisomerase II-mediated cleavage sites and relation to structural and functional landmarks in 830 kb of *Drosophila* DNA. *Nucleic Acids Res* 25(11): 2041-46.

MIMNAUGH, E.G.; TRUSH, M.A.; BHATNAGAR, M. and GRAM, T.E. (1985). Enhancement of reactive oxygen-dependent mitochondrial membrane lipid peroxidation by the anticancer drug adriamycin. *Biochem Pharmacol* 34(6): 847-56.

NAKAZAWA, H.; ANDREWS, P.A.; CALLERY, P.S. and BACHUR, N.R. (1985). Superoxide radical reactions with anthracycline antibiotics. *Biochem Pharmacol* 34(4): 481-90.

NEPOMUCENO, J.C. (1999). Efeito protetor da *Moringa oleifera* contra mutações e recombinações somáticas induzidas pelo uretano e mitomicina-C em *Drosophila melanogaster*. Tese apresentada à Faculdade de Ciências da Saúde, da Universidade de Brasília (Brasília - DF), para a obtenção do grau de Doutor. pp 01-109.

PÉREZ-CHIESA, Y.; SOTO, A.N.; FIGUEROA, A.; COLON, J.L. and HOYO, J.M. (1994). Inhibitory effect of chlorophyllin on the genotoxicity of adriamycin in *Drosophila melanogaster*. *Rev Int Contam Ambient* 10 (Suplemento 1): 23. (apud 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. pp 01-97).
- PHILLIPS, D.R.; WHITE, R.J. and CULLINAN, J.E. (1989). DNA sequence specific adducts of adriamycin and mitomycin C. *FEBS Lett* 246: 233-40. (*apud* ANTUNES, L.M.G. (1997). Efeito protetor das vitaminas C e E sobre os danos cromossômicos induzidos pelo antitumoral doxorrubicina 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. pp 01-97).
- PRESTON, G. M. and WHITE, B. A. (1990). Effects of the DNA topoisomerase II inhibitor, VM26, on transcriptional initiation *in vitro*. *Life Sci* 46(18): 1309-18.
- PRESTON, R.J. (1995). Genetic injury, in: J.E. Craighead (ed.) Pathology of Environmental and Occupational Disease, St. Louis, Mosby-Year Book Inc. (*apud* CORRALES, E.A.L.S. (1997). Verificação dos efeitos genotóxicos dos agentes antineoplásicos citrato de tamoxifen e paclitaxel. Dissertação apresentada à Universidade Federal de Uberlândia, para a obtenção do grau de Mestre. pp 01-84).
- RABELLO-GAY, M.N. (1991). Teste de metalases da medula óssea. In: Rabello-Gay, M.N.; Rodrigues, M.A.R. e Monteleone-Neto, R. (eds.): *Mutagênese, Teratogênese e Carcinogênese. Métodos e Critérios de Avaliação*. Ribeirão Preto, SP, Brasil: Sociedade Brasileira de Genética / Revista Brasileira de Genética. pp 77-82.
- RALPH, R.K.; JUDD, W.; POMMIER, Y. and KOHN, K.W. (1994). DNA topoisomerases. In Neidle, S. and Waring, M. (eds), *Molecular Aspects of Anticancer Drug-DNA Interactions*, Macmillan, London, vol. 2, pp 1-95.
- RISLEY, M.S. and PHORENEC, G.M. (1991). Micronucleic and chromosome aberrations in *Xenopus laevis* spermatocytes and spermatids to adriamycin and colcemid. *Mutat Res* 247: 29-38. (*apud* ANTUNES, L.M.G. (1997). Efeito protetor das vitaminas C e E sobre os danos cromossômicos induzidos pelo antitumoral doxorrubicina 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. pp 01-97).

- ROSS, W.E.; ZWELLING, L.A. and KOHN, K.W. (1979). Relationship between cytotoxicity and DNA strand breakage produced by adriamycin and other intercalating agents. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 5: 1221-24. (apud 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. pp 01-97).
- ROSSELLI, F.; ZACCARO, L.; VENTURI, M. and ROSSI, A.M. (1990). Persistence of drug-induced chromosome aberrations in peripheral blood lymphocytes of the rat. *Mutat Res* 232: 107-14. (apud 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. pp 01-97).
- SHAMBERGER, R.J. (1984). Genetic toxicology of ascorbic acid. *Mutat Res* 133: 135-59. (apud 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. pp 01-97).
- SHANKEL, D.M. and CLARKE, C.H. (1990). Specificity of antimutagens against chemical mutagens in microbial systems. *Basic Life Sci* 52: 457-60.
- SIES, H. and STAHL, W. (1995). Vitamins E and C, β -carotene, and other carotenoids as antioxidants. *Am J Clin Nut* 62 (suppl): 1315S-21S. (apud 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. pp 01-97).
- SINHA, B.K.; KATKI, A.G.; BATIST, G.; COWAN, K.H. and MYERS, C.E. (1987). Differential formation of hydroxyl radicals by adriamycin in sensitive and resistant MCF-7 human breast tumor cells: implications for the mechanism of action. *Biochemistry* 26: 3776-81. (apud 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. pp 01-97).

SOLOVYAN, V.T. and ANDREYEV, I.O. (1995). Structural domains of plant nuclear DNA as a constitutive component of the topoisomerase II/DNA complex. *Acta Biochim Pol* 42(2): 201-4.

SPANÓ, M.A.; ANDRADE, H.H.R. de; ANDRADE, V.M. and MOMINO, W. (1996). Inter-laboratory calibration for the somatic mutation and recombination test (SMART) in *Drosophila melanogaster*. *Brazilian Journal of Genetics* - 19(3) (suppl.): 180.

STICH, H.F.; WEI, L. and WHITING, R.F. (1979). Enhancement of the chromosome-damaging action of ascorbate by transition metals. *Cancer Res* 39: 4145-51. (apud 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. pp 01-97).

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 Commum* 2(3): 163-71.

TRIPATHY, N.K.; WÜGLER, F.E. and FREI, H. (1990). Genetic toxicity of six carcinogens and six non-carcinogens in the *Drosophila* wing spot test. *Mutat Res* 242(3): 169-80.

TYRSINA, E.G.; ROSSIKHINA, O.G.; ABILEV, S.K. and TYRSIN, Y. (1994). Inhibition of the bacterial mutagenicity of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine by ascorbic acid and ascorbyl palmitate. *Mutat Res* 321 (1-2): 81-7.

UDVARDY, A.; SCHEDL, P.; SANDER, M. and HSIEH, T. S. (1986). Topoisomerase II cleavage in chromatin. *J Mol Biol* 191(2): 231-46.

- USHAKOVA, T.; MELKONYAN, H.; NIKONOVA, L.; MUNDRIK, N.; GOGVADZE, V.; ZHUKOVA, A.; GAZIEV, A.J. and BRADBURY, R. (1996). The effect of dietary supplements on gene expression in mice tissues. *Free Radic Biol Med* 20: 279-84. (apud 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. pp 01-97).
- VIG, B.K. (1971). Chromosome aberrations induced in human leukocytes by the antileukemic antibiotic adriamycin. *Cancer Res* 31: 28-32. (apud 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. pp 01-97).
- VIJAYALAXMI, K.K. and VENU, R. (1999). *In vivo* anticlastogenic effects of L-ascorbic acid in mice. *Mutat Res* 438: 47-51.
- VILLEPONTEAU, B. (1989). Characterization of a topoisomerase-like activity at specific hypersensitive sites in the *Drosophila* histone gene cluster. *Biochem Biophys Res Commun* 162(1): 232-7.
- WATERS, M.D.; STACK, H.F.; JACKSON, M.A.; BROCKMAN, H.E. and DE FLORA, S. (1996). Activity profiles of antimutagens: *in vitro* and *in vivo* data. *Mutat Res* 350: 109-29.
- WÜRGLER, F.E. and VOGEL, E.W. (1986). *In vivo* mutagenicity testing using cells of *Drosophila melanogaster*. In De Serres, F.J. (ed.), *Chemical Mutagens, Principles and Methods for their Detection*. Plenum Press, New York, vol. 10. pp 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): 275-90.

- XUE, K.X.; WU, J.Z.; MA, G.J.; YUAN, S. and QIN, H.L. (1998). Comparative studies on genotoxicity and antigenotoxicity of natural and synthetic beta-carotene stereoisomers. *Mutat Res* 418: 73-8.
- YOON, H.J.; CHOI, I.Y.; KANG, M.R.; KIM, S.S.; MULLER, M.T.; SPITZNER, J.R. and CHUNG, I.K. (1998). DNA topoisomerase II cleavage of telomeres in vitro and in vivo. *Biochim Biophys Acta* 1395(1): 110-20.
- YOUNG, R.C.; OZOLS, R.F. and MYERS, C.E. (1981). The anthracycline antineoplastic drugs. *New Engl J Med* 305: 139-53. (*apud* 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. pp 01-97).
- 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. (*apud* 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. pp 01-97).
- ZUNINO, F.; DI MARCO, A.; ZACCARA, A. and GAMBETTA, R.A. (1980). The interaction of daunorubicin and doxorubicin with DNA and chromatin. *Biochem Biophys Acta* 607: 206-14. (*apud* 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. pp 01-97).
- ZUNINO, F. and CAPRANICO, G. (1990). DNA topoisomerase II as the primary target of anti-tumor anthracyclines. *Anticancer Drug Des* 5(4): 307-17.