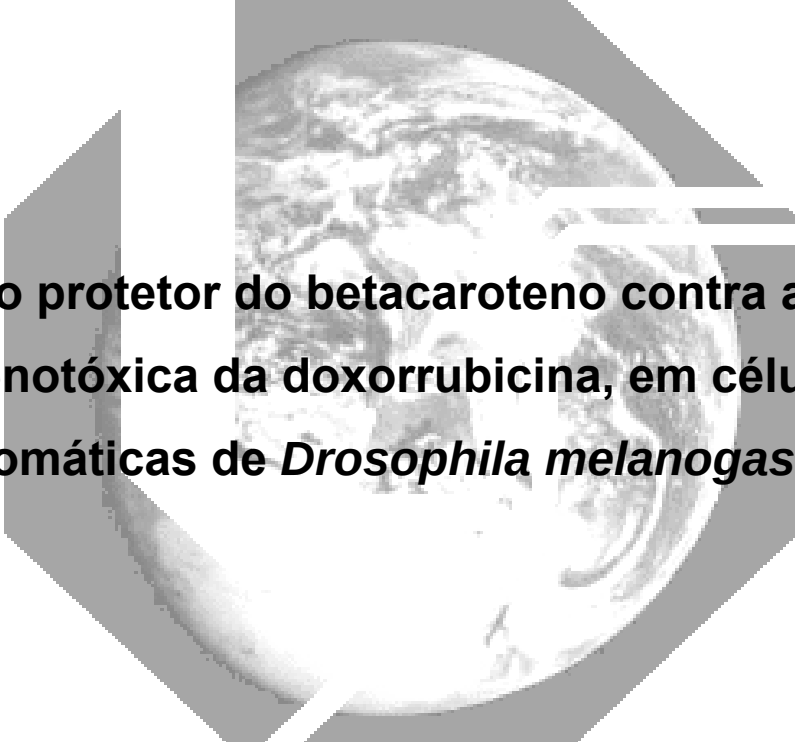


Universidade Federal de Uberlândia

Instituto de Genética e Bioquímica

Pós-Graduação em Genética e Bioquímica



**Efeito protetor do betacaroteno contra a ação
genotóxica da doxorrubicina, em células
somáticas de *Drosophila melanogaster***

Aluna: Cristina das Dores Dias

Orientador: Júlio César Nepomuceno

Uberlândia – MG

2008

Universidade Federal de Uberlândia

Instituto de Genética e Bioquímica

Pós-Graduação em Genética e Bioquímica

**Efeito protetor do betacaroteno contra a ação genotóxica
da doxorrubicina, em células somáticas de *Drosophila
melanogaster***

Aluna: Cristina das Dores Dias

Orientador: Prof. Dr. Júlio César Nepomuceno

**Dissertação apresentada à Universidade
Federal de Uberlândia como parte dos
requisitos para obtenção do Título de
Mestre em Genética e Bioquímica (Área
Genética)**

UBERLÂNDIA – MG

2008

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

D541e

Dias, Cristina das Dores, 1979-

Efeito protetor do betacaroteno contra a ação genotóxica da doxorubicina, em células somáticas de *Drosophila melanogaster* / Cristina das Dores Dias. - 2008.

51 f. : il.

Orientador: Júlio César Nepomuceno.

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

Inclui bibliografia.

1. 1. Vitaminas - Teses. 2. *Drosophila melanogaster* - Teses. 3. Doxorubicina - Teses. I. Nepomuceno, Júlio César. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.
4. III. Título.

CDU: 577.16

Universidade Federal de Uberlândia

Instituto de Genética e Bioquímica

Pós-Graduação em Genética e Bioquímica

**Efeito protetor do betacaroteno contra a ação genotóxica da
doxorubicina, em células somáticas de *Drosophila*
*melanogaster***

Aluna: Cristina das Dores Dias

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Dr. Júlio César Nepomuceno

**Examinadores: Dr. Mário Antônio Spanó
Dr (a). Elza Tiemi Sakamoto Hojo**

Data da defesa: 28/02/2008

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

Dr. Júlio César Nepomuceno

“Há verdadeiramente duas coisas diferentes: saber e crer que se sabe. A ciência consiste em saber; em crer que se sabe reside a ignorância.”

Hipócrates

À minha filha, **Maria Clara**, razão da minha vida e
esperança, através da qual aprendi a aprender

Agradecimentos Especiais

Ao meu pai, Vicente Dias Cardoso,
Minha mãe, Maria das Dores Dias
Meus irmãos, Ademir, Alcenir, Acir, Jaqueline, Kássia
Pela presença significativa em todos os momentos da minha vida

Ao meu namorado, Gabriel Arcanjo do Nascimento, por fazer parte da minha vida,
por todo seu amor, e por ser meu anjo lindo

À minha irmã e grande amiga, Kássia das Dores Dias, por tudo que ela
representa em minha vida

À minha grande amiga e companheira, de risos e tristezas, sempre me apoiando
e me dando força nos momentos mais difíceis, Bethânia Cristhine de Araújo

Ao Dodô, por sua sabedoria e ensinamentos, e por juntos à nossa filha estarmos
aprendendo e nos aperfeiçoando na constante luta pela evolução

Aos amigos, Janayne Tolentino, Antônio Joaquim de Souza e Elaine da Silva
Dutra, pela sincera amizade

Agradecimentos

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Júlio César Nepomuceno**, por sua sabedoria, compromisso e amizade, desde a minha graduação.

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

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

Aos colegas dos laboratórios do Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia, pelo companheirismo e pela colaboração no meu crescimento profissional.

Aos colegas do laboratório de Citogenética e Mutagênese do UNIPAM (Centro Universitário de Patos de Minas), pela amizade e conquistas obtidas juntos.

À minha irmã Prof. Dra. **Jaqueline Das Dores Dias Oliveira** e ao meu cunhado Prof. Dr. **Waldesse Pirajé de Oliveira Junior**, pelo estímulo e apoio contínuo.

O trabalho foi realizado no Laboratório de Mutagênese do Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia – Uberlândia – MG.

Recebemos o apoio financeiro dos seguintes órgãos

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

Sumário

	Página
Apresentação	01
Capítulo I	
1 Fundamentação Teórica	03
1.1 Radicais livres e sistema de defesa antioxidante	03
1.2 Ação quimiopreventiva do betacaroteno	06
1.3 Doxorubicina	07
1.4 Teste para detecção de Mutação e Recombinação Somática (Somatic Mutation And Recombination Test – SMART) em células somáticas de <i>Drosophila</i> <i>melanogaster</i>	09
2 Referências Bibliográficas	13
Capítulo II	
Resumo	21
Abstract	22
1 Introdução.....	23
2 Material e Métodos	25
2.1 Compostos químicos	25
2.2 Teste para detecção de Mutação e Recombinação Somática (Somatic Mutation And Recombination Test – SMART) em células somáticas de <i>Drosophila</i> <i>melanogaster</i>	25
2.2.1 Linhagens estoques	25
2.2.2 Cruzamento entre as linhagens mutantes	26
2.2.3 Procedimento para coleta de larvas e tratamento	26
2.2.4 Preparação e análise microscópica das asas	26
2.2.5 Análise estatística	27
3 Resultados e Discussão	28
4 Referências Bibliográficas	34

Lista de Tabelas

Página

Tabela 1.	Freqüências de manchas mutantes observadas nos descendentes trans-heterozigotos marcados de <i>Drosophila melanogaster</i> , do cruzamento padrão, tratados com betacaroteno em três diferentes doses	32
Tabela 2.	Freqüências de manchas mutantes observadas nos descendentes trans-heterozigotos marcados e heterozigotos balanceados de <i>D. melanogaster</i> , do cruzamento padrão, tratados com betacaroteno em três diferentes doses associadas a DXR (0,125mg/mL)	33

Lista de Figuras

Capítulo I

	Página
Figura 1. Fórmula estrutural do betacaroteno	07
Figura 2. Fórmula estrutural do quimioterápico doxorubicina	08
Figura 3. (A1) – Pêlos <i>multiple wing hairs</i> ; (A2) – Pêlos <i>flare</i> ³ ; (A3) – Pêlos normais	10
Figura 4. (A) Fenótipo das asas dos descendentes trans-heterozigotos (<i>mwh</i> + / + <i>flr</i> ³); (B) Fenótipo das asas dos descendentes heterozigotos balanceados (<i>mwh</i> + / <i>TM3, Bd</i> ⁶)	11

Lista de Abreviaturas

BC – Betacaroteno

BH – Heterozigoto balanceado

CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

DDT - *para-diclorodifeniltricloroetano*

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

DXR – Doxorubicina

ENU – N-etil-nitrosurea

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

flr – *Flare*

gr – Grama

H₂O₂ – Peróxido de Hidrogênio

HOCl – ácido hipocloroso

MH – Marcador trans-Heterozigoto

mL - Mililitro

mM – Milimolar

mwh – *multiple wing hairs*

NO – Óxido Nítrico

O₂ – Oxigênio

O₃ – Ozônio

OH – Radical Hidroxila

RNA – Ácido Ribonucleico

ROS – Espécies Reativas de Oxigênio

SMART – *Somatic Mutation And Recombination Test*

ST – Standard Cross

TM3 bd^s – *Third Multiple3 Beaded Serrate*

TNF α – Fator de Necrose Tumoral

UFU – Universidade Federal de Uberlândia

UI – Unidade Internacional

μ g – Micrograma

Apresentação

O betacaroteno (BC), um dos mais de 600 carotenóides existentes conhecidos na natureza, é o mais abundante e mais eficaz pró-vitamina A presente em nossos alimentos. Atualmente, vários estudos sugerem que além de uma fonte segura de vitamina A, o BC desempenha importantes papéis no organismo, atuando como um eficiente antioxidante que apóia os sistemas de defesa enzimáticos e minimiza os danos do estresse oxidativo. A atividade antioxidante do BC foi claramente demonstrada quando linfócitos humanos isolados e posteriormente suplementados com uma única alta dose de BC se mostraram resistentes a danos oxidativos *in vitro*.

Numerosos estudos epidemiológicos têm mostrado uma relação inversa entre a ingestão de frutos e vegetais e o risco de câncer e doenças do coração. Foi verificado ainda, em seres humanos e animais que a suplementação com BC melhora a resposta imunológica. Contudo, os mecanismos pelos quais o BC exerce seus efeitos anti-câncer permanecem pouco entendidos. Modelos experimentais *in vitro* e *in vivo* têm atribuído o efeito protetor do BC mais a uma ação do próprio pigmento do que dos retinóides produzidos a partir de seu metabolismo endógeno.

Recentemente, estudos demonstraram o efeito do BC na regulação do óxido nítrico (NO) e na produção do fator de necrose tumoral (TNF) α e estimulação de apoptose no melanoma de células B16F-10 pela regulação dos genes bcl-2, p53 e caspase-3.

Por outro lado, contrariamente aos efeitos benéficos do BC, encontram-se relatos de estudos intervencionistas que sugerem uma possível ação pró-oxidante do BC, que vem contrastar com sua já conhecida ação antioxidante.

No entanto, já foi demonstrado em estudos que a ação do BC como pró-oxidante é dependente da tensão do oxigênio e da concentração do BC. Como na maioria dos tecidos biológicos, o nível de oxigênio é baixo, o BC adquire importância como antioxidante. Além disso, o BC pode atuar como pró-oxidante nas células para aumentar o nível intracelular de ROS que está envolvido na via de apoptose contribuindo portanto, para suas atividades anti-câncer.

Neste trabalho, procurou-se avaliar os efeitos protetores do BC contra a ação genotóxica da doxorubicina (DXR), em células somáticas de *Drosophila melanogaster* pelo Teste de Mutação e Recombinação Somática (SMART). O SMART, é um sistema teste que detecta um amplo espectro de eventos genotóxicos, e é usado, também, para detecção de agentes antigenotóxicos. O SMART foi desenvolvido para detectar a perda de heterozigose de genes que determinam a expressão de fenótipos detectáveis nas asas das moscas.

A análise dos efeitos do BC frente a DXR se faz necessária para um melhor entendimento das possibilidades e limitações da influência do BC na saúde humana.

Capítulo I

1 - Fundamentação Teórica

1.1 - Radicais Livres e sistema de defesa antioxidante

Um radical livre é definido como qualquer átomo, grupo de átomos ou molécula com um elétron não-pareado, ocupando uma órbita externa (Dröge, 2002). Os radicais livres mais importantes nos organismos vivos são os radicais hidroxil ($\text{OH}^\cdot$), ânion superóxido ($\text{O}_2^\cdot$), óxido nítrico (NO), alcóxil (ROH) e peróxil (ROOH) (Picada et al., 2003).

Existem ainda, compostos igualmente reativos, derivados de O_2 , que não possuem elétron não pareado na última camada e, por isso, não podem ser definidos como radicais livres. Dessa forma, é utilizado de maneira mais ampla o termo espécie reativa de oxigênio (ROS), que inclui o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ácido hipocloroso (HOCl) e ozônio (O_3) (Halliwell, 1994),

Os radicais livres, nas células, são gerados principalmente na cadeia respiratória mitocondrial (Barja, 2004). Estima-se que 2 a 5% do oxigênio, utilizado pela mitocôndria, é convertido em radicais livres (Urso e Clarkson, 2003). Isso ocorre porque uma pequena fração, porém significativa de O_2 consumido, pode sofrer “escape” da cadeia transportadora de elétrons e produzir ROS (Di Meo e Venditti, 2001). Como fontes exógenas de radicais livres têm-se as radiações gama e ultravioleta, os medicamentos, a dieta, o cigarro e os poluentes ambientais (Halliwell e Gutteridge, 1999).

A produção excessiva de ROS, maior do que a sua velocidade de remoção pelos sistemas de defesa antioxidante, promove um balanço a favor de ROS, favorecendo uma situação denominada estresse oxidativo (Halliwell, 1994; Dröge, 2002; Shami e Moreira, 2004). Este, por sua vez, pode conduzir a diversas formas de danos celulares com conseqüente alteração funcional e prejuízo das funções vitais (Shami e Moreira, 2004).

ROS estão relacionados com doenças neurodegenerativas (Barja, 2004), cataratas, diabetes, inflamações crônicas, doenças auto-imunes, isquemia, artrite reumatóide, doença intestinal inflamatória (Halliwell e Gutteridge, 1999).

Além disso, a interação de ROS com diferentes macromoléculas celulares, incluindo proteínas, lipídeos, DNA (Ácido Desoxirribonucléico) (Barja e Herrero, 2000) e RNA (Ácido Ribonucléico) pode gerar citotoxicidade, alergias, mutagênese e/ou carcinogênese, além do próprio processo de envelhecimento (Barja, 2004).

Os radicais livres, como o OH, que é o mais reativo na indução de lesões nas moléculas celulares (Anderson, 2000), geram modificações no DNA por uma variedade de mecanismos, tais como, modificações no açúcar desoxirribose e nas bases purinas e pirimidinas, quebras na fita dupla e cross-links no DNA-proteína (Dizdaroglu et al., 2002). Embora as células vivas tenham desenvolvido uma série de sistemas enzimáticos que reparam o DNA danificado, ainda existem defeitos no reparo que se acumulam nas células e levam às mudanças genéticas deletérias ao longo das divisões celulares (Chatgililoglu e O'Neill, 2001).

Os antioxidantes são responsáveis pela remoção dessas espécies derivadas do oxigênio, e são definidos como quaisquer substâncias que em concentrações relativamente baixas, comparadas aos substratos oxidáveis, retardam significativamente ou inibem a oxidação destes (Halliwell e Gutteridge, 1999; Handelman, 2001).

O sistema de defesa antioxidante é formado por compostos enzimáticos, que são produzidos no organismo, e não enzimáticos que estão presentes nos alimentos ingeridos (Montero, 1996). De acordo com Kong e Lillehei (1998) estes compostos agem nas três linhas de defesas orgânicas contra ROS: a primeira linha atua na prevenção, que se caracteriza pela proteção contra a formação das substâncias agressoras; a segunda, na interceptação dos radicais livres; e a terceira linha atua no reparo de lesões causadas pelos radicais livres.

Segundo Bianchi e Antunes (1999), em algumas situações podem ocorrer adaptações do organismo em resposta à geração desses radicais livres promovendo o aumento da síntese de enzimas antioxidantes, tais como a superóxido dismutase, a catalase e a glutathione peroxidase. Essas enzimas

reagem com os compostos oxidantes e protegem as células e os tecidos do estresse oxidativo (Traber, 1997). Pompella (1997) destaca a importância da inclusão de antioxidantes na dieta, auxiliando esses efeitos protetores dos antioxidantes endógenos.

No Brasil, o câncer é a terceira causa de morte (11,84% do total de óbitos) e a segunda por doença (27,63% do total) (Ministério da saúde, 1999; Ministério da saúde, 2000). Para o ano de 2006 estimou-se a ocorrência de 470 mil novos casos em todo o país (Ministério da Saúde, 2007).

A terapia do câncer emprega a radioterapia, a quimioterapia, a imunoterapia, a hormonioterapia e a cirurgia. Porém, a quimioterapia é a modalidade mais utilizada, pois 90% dos tumores podem ser tratados com antiláblicos (Andreoli et al., 1994; Bonassa, 1998), que na maioria das vezes interferem na síntese de DNA e RNA de proteínas ou no funcionamento adequado de moléculas pré-formadas (Skell, 1993). Estes quimioterápicos atuam nas células para impedir o crescimento de células cancerosas. Todavia, essas drogas não são seletivas, sendo tóxicas aos tecidos saudáveis, principalmente aqueles de rápida proliferação celular (Andreoli et al., 1994; Bonassa, 1998). Mas os efeitos terapêuticos e tóxicos dos quimioterápicos dependem do tempo de exposição, da concentração plasmática e da droga utilizada (Ministério da Saúde, 1999). Além disso, as células apresentam mecanismos de defesa que exercem um importante papel na proteção do organismo juntamente as terapias antineoplásicas contra tumores (Kong e Lillehei, 1998).

Durante a terapia anti-câncer ocorre a formação de ROS, necessária no controle e erradicação do tumor. Porém, existem complicações decorrentes deste fato como a cardiotoxicidade, toxicidade pulmonar, renal e hepática. Os únicos compostos capazes de inibir a formação de radicais livres são os antioxidantes, os quais impedem, através de sua própria redução, o dano oxidativo celular e minimizam a toxicidade causada pelos radicais livres (Kong e Lillehei, 1998).

Portanto, a terapia nutricional com antioxidantes, como as vitaminas A, C e E, concomitante à administração de drogas antineoplásicas minimizam os efeitos tóxicos produzidos por estas e interferem positivamente na resposta do

tratamento empregado, propiciando ao paciente oncológico maior tolerância e melhor qualidade de vida (Santos e Cruz, 2001).

1.2 – Ação quimiopreventiva do betacaroteno:

O BC (Figura 1) é a principal fonte de vitamina A para a maioria da população mundial (Peto et al., 1989). Muitas doenças, tais como, certas formas de câncer (Gandini et al, 2000 e Riboli e Norat, 2003) e doenças cardiovasculares (Bast, 2002 e Oliveira, 2007), além do próprio processo de envelhecimento (Ames et al., 1993), estão associadas com o estresse oxidativo (Bast, 2002) e têm como estratégia para prevenir seu desenvolvimento, os carotenóides, especialmente o BC (Lu et al., 2001). Isso porque o BC é um eficiente antioxidante, efetivo na neutralização de oxigênio singlete e na inibição da oxidação de compostos pelos peróxidos (Krinsky, 1991).

Por outro lado, efeitos contrários aos efeitos benéficos do BC tem sido descritos na literatura. A suplementação de BC sozinha ou em combinação com vitaminas A ou E nos indivíduos fumantes e nos trabalhadores com asbestos poderia aumentar a incidência de câncer e mortalidade (Omenn, 1996). Alguns estudos sugerem porém, que o efeito da suplementação de BC e o risco de cânceres relacionados ao tabaco podem depender dos hábitos dos indivíduos (Touvier, 2005).

Aidoo et al. (1995) demonstraram o papel do BC na quimioprevenção do câncer, quando verificaram a ação antígeno-tóxica do BC contra N-etil-nitrosurea (ENU), um carcinógeno de ação direta, que não requer ativação metabólica para produzir produtos reativos que se ligam ao DNA. De acordo com os autores, o BC reduziria a mutagenicidade pelo seqüestro de radicais livres e, conseqüentemente, a alquilação no DNA, pelas moléculas eletrofílicas de ENU.

De acordo com Muindi (1996), o BC é capaz de conferir proteção contra diversos tipos de tumores em animais. Camundongos irradiados com raios γ apresentaram diminuição significativa na freqüência de micronúcleos em eritrócitos policromáticos da medula óssea e em células epiteliais da bexiga, quando tratados com BC antes ou imediatamente depois da irradiação

(Konopacka et al., 1998). A ação radioprotetora do BC também foi verificada em linfócitos humanos expostos a raios γ (Konopacka e Rzeszowska-Wolny, 2001).

Oliveira et al. (2007) verificaram que a suplementação de BC tem efeito positivo tanto no controle quanto na prevenção da hipertensão arterial de ratos.

Muitos experimentos sugerem, portanto, que o consumo de altos níveis de frutas e vegetais ricos em carotenóides ou altos níveis de BC pode ajudar na prevenção de câncer e doenças do coração em seres humanos (Paolini et al., 2001).

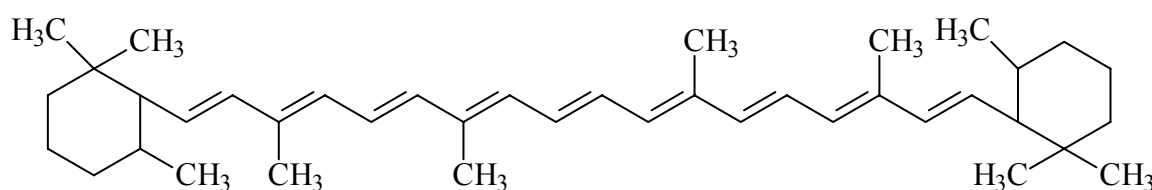


Figura 1. Fórmula estrutural do betacaroteno.

1.3 – Doxorrubicina:

A doxorrubicina (DXR) (Figura 2), é um antibiótico antraciclínico isolado de culturas do fungo *Streptomyces peucetius var. caesius* (Gillman et al., 1996), rapidamente metabolizado no fígado por redução carboxílica, produzindo um metabólito alcoólico, o adriamicinol (Robbers et al., 1997).

A DXR é um potente e eficaz agente quimioterápico no tratamento de várias formas de câncer, mas seu uso é limitado em função do desenvolvimento de toxicidade cardíaca (Tallaj et al. 2005). De acordo com o fabricante Pfizer Itália S.r.l. (Roma, Itália), as propriedades citotóxicas da doxorrubicina, sobre as células malignas e os seus efeitos tóxicos em vários organismos, parecem estar relacionados à intercalação dos seus anéis entre os pares de bases de nucleotídeos e à capacidade da doxorrubicina de se ligar à membrana celular lipídica. Assim sendo, a intercalação causa danos tanto à síntese de DNA quanto a membrana lipídica celular. A interação da doxorrubicina com a topoisomerase-II pode ainda, desencadear a quebra do DNA e gerar radicais de oxigênio livres altamente reativos e tóxicos.

A DXR apresenta ainda, alta afinidade pelo ferro inorgânico, Fe (III), podendo formar complexos DXR-Fe(III) em sistemas biológicos. Estudos realizados com *Salmonella* TA102 para avaliar os mecanismos oxidativos na mutagenicidade do complexo DXR-Fe(III) indicaram que esse complexo exerce mutagenicidade por meio dos radicais livres gerados, os quais causaram danos oxidativos ao DNA, e que o Fe(III) é um elemento requerido na mutagênese da DXR. O complexo DXR-Fe(III) pode reagir com o oxigênio para formar o radical superóxido. Esse radical pode transformar-se em H_2O_2 , que difunde mais livremente dentro das células do que o radical superóxido, uma vez próximo ao DNA produz o radical hidroxil. Na presença de seqüestradores de radicais livres e quelantes de ferro, a mutagenicidade, provocada por esse complexo, foi reduzida (Kostoryz e Yourtee, 2001).

Diferentes estudos demonstraram ainda, que a DXR induz mutações e recombinações somáticas em células de asas de *Drosophila melanogaster* (Fragiorge, 2007; Costa e Nepomuceno, 2006).

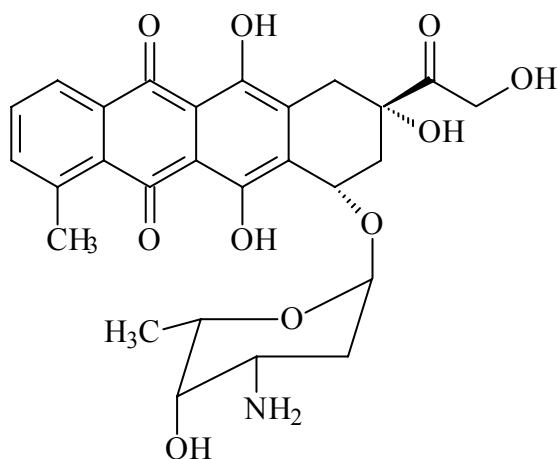


Figura 2. Fórmula estrutural do quimioterápico doxorubicina.

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

O SMART (Somatic Mutation And Recombination Test) de asa em *Drosophila melanogaster*, desenvolvido por Graf et al. (1984), é um sistema teste, somático, de curta duração para detecção de um amplo espectro de eventos genotóxicos e, vem sendo usado também para detecção de agentes antigenotóxicos. A *Drosophila melanogaster*, organismo eucarioto, é amplamente utilizada nos estudos de genotoxicidade e antigenotoxicidade *in vivo*, por possuir pequeno número de cromossomos; sistema enzimático semelhante ao dos mamíferos; tempo curto de geração; por produzir grande número de descendentes; além de que testes utilizando a *Drosophila* são rápidos, confiáveis e de baixo custo (Graf et al., 1984; Graf e Singer, 1992).

De acordo com Graf et al. (1984), o SMART foi desenvolvido para detectar a perda de heterozigose de genes que determinam a expressão de fenótipos detectáveis nas asas das moscas. Nele, as larvas trans-heterozigotas são expostas aos componentes testes por período de tempo variado (Graf et al., 1984; Guzmán-Rincón e Graf, 1995).

Para realização do teste foram utilizadas duas linhagens mutantes de *Drosophila melanogaster*:

1) Linhagem *multiple wing hairs* (*mwh*): os indivíduos desta linhagem possuem o gene marcador *mwh* no cromossomo 3 numa posição mais distal, e é caracterizado por expressar três ou mais pêlos por célula (Figura 3 - A). Por ser uma mutação viável, a linhagem é mantida em homozigose recessiva.

2) Linhagem *flare - 3* (*flr³*): os indivíduos desta linhagem possuem o gene marcador *flr³* localizado no cromossomo 3 numa posição mais proximal. A mutação desta linhagem se manifesta por um pêlo modificado na célula, semelhante a uma chama (Figura 3 – B). O gene marcador *flr³* é letal em homozigose, não se desenvolvendo até a fase adulta (Graf et al., 1984; Guzmán-Rincón e Graf, 1995). Por isto, foi desenvolvido um cromossomo balanceador *TM3, Bds* (*Third Multiple 3, beaded-serrate*), que mantém a heterozigose da

linhagem. É característica, deste balanceador, impedir a recombinação, ou seja, a troca de genes entre os cromossomos homólogos (Lindsley e Zimm, 1992).

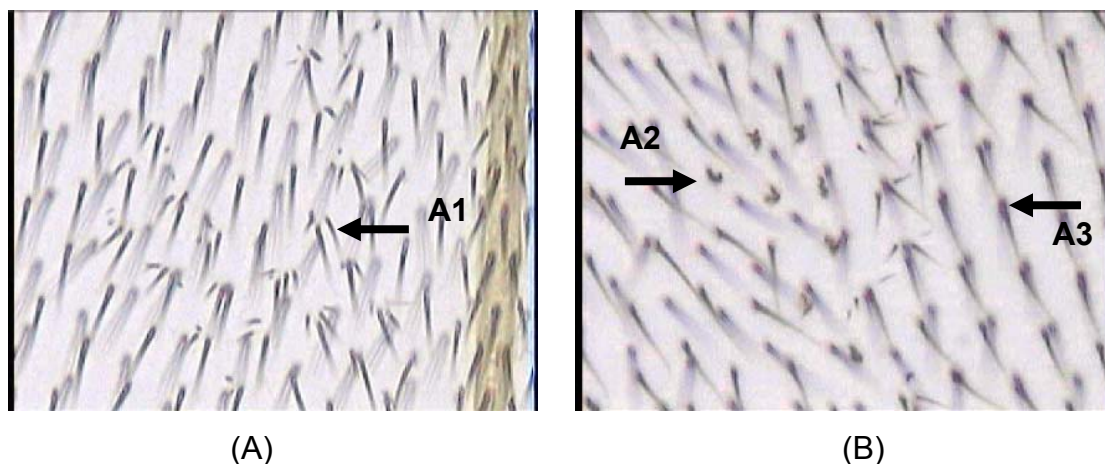


Figura 3. A1 – pêlos *multiple wing hairs*; A2 – pêlos *flare*; A3 – pêlos normais.

A partir destas linhagens foi realizado o cruzamento padrão (Standard cross – ST) no qual fêmeas virgens *flr*³ são cruzadas com machos *mwh* (Guzmán-Rincón e Graf, 1995).

A partir deste cruzamento foram obtidos como descendentes: 50% - Trans-Heterozigotos Marcados (MH - *mwh* +/+ *flr*³) que possuem asas fenotipicamente do tipo selvagem (Figura 4-A); e 50% - Heterozigotos Balanceados (BH - *mwh* +/TM3,*Bd*^S) que possuem asas fenotipicamente serrilhadas (Figura 4-B).

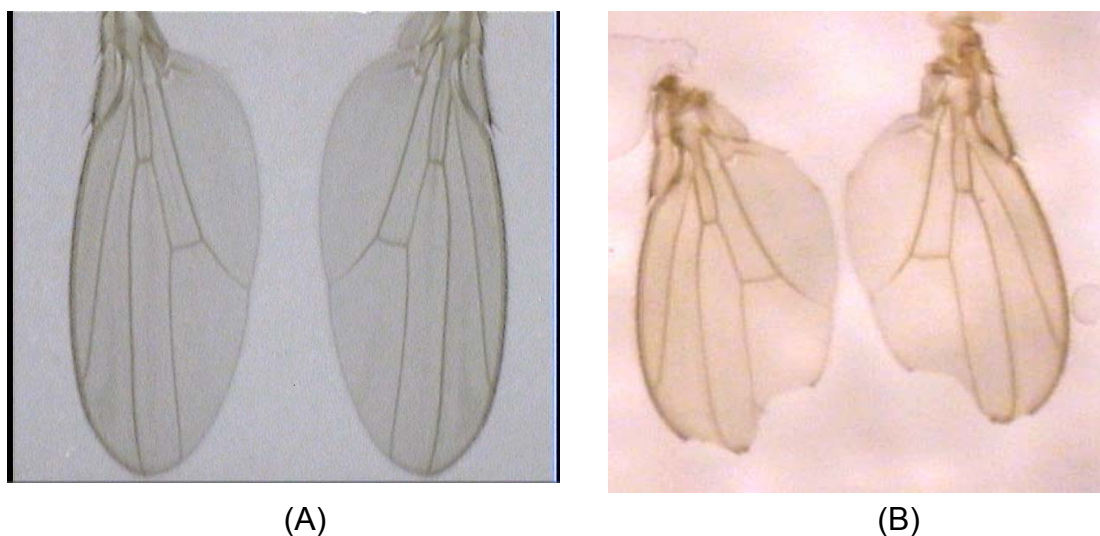


Figura 4. (A) Fenótipo das asas dos descendentes trans-heterozigotos (*mwh* +/+ *flr*³); (B) Fenótipo das asas dos descendentes heterozigotos balanceados (*mwh* +/- *TM3*, *Bd*⁵).

Nos descendentes MH é possível detectar a ocorrência de diferentes eventos genéticos, tais como mutação de ponto, aberrações cromossômicas, e recombinação mitótica. Enquanto que, nos descendentes BH são detectadas apenas mutação e deleção, devido ao fato de o balanceador *TM3* carregar múltiplas inversões, que impedem a recombinação mitótica (Guzmán-Rincón e Graf, 1995).

Os pêlos mutantes são classificados em manchas: simples, quando expressam somente um dos marcadores genéticos (*mwh* ou *flr*³) e, gêmeas, quando expressam os dois marcadores (*mwh* e *flr*³). As manchas ainda são classificadas quanto ao tamanho, podendo ser simples pequenas, quando possui um ou dois pêlos mutantes, ou simples grande, quando possuem mais de dois pêlos mutantes. Durante a análise foi registrada também, a posição da mancha, de acordo com o setor da asa, determinada pelas regiões A, B, C', C, D, D' e E (Graf et al., 1984).

Nos últimos anos, observou-se uma rápida progressão nos estudos referentes à ação do betacaroteno na quimioprevenção de câncer e doenças do coração. Esses avanços promovem um melhor entendimento das possibilidades e limitações da influência do betacaroteno na saúde humana. Estudos epidemiológicos e em modelos animais indicam que o betacaroteno pode exercer

seu efeito quimiopreventivo se ingerido em quantidades mais fisiológicas, conforme encontrado em uma dieta rica em frutas e vegetais. Sendo assim, este trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos protetores do betacaroteno contra a ação genotóxica da doxorubicina (DXR), em células somáticas de *Drosophila melanogaster*.

2 - Referências Bibliográficas:

AIDOO, A.; LYN-COOK, L. E.; LENSING, S.; BISHOP, M. E.; WAMER, W. In vivo antimutagenic activity of beta-carotene in rat spleen lymphocytes. **Carcinogenesis**, v. 16, n. 9, p. 2237-2241, 1995.

AMES, B. N.; SHIGENAGA, M.; HAGEN, T. M. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v. 90, p. 7915-7922, 1993.

ANDERSON, D. Antioxidant defences against reactive oxygen species causing genetic and other damage. **Mutat. Res.**, v. 350, n. 1, p. 103-108, 2000.

ANDREOLI, T. E.; BENNETT, J. C.; CARPENTER, C. C. J.; PLUM, F.; SMITH, L. H. **Cecil medicina interna básica**. 3ª ed. Guanabara Koogan, 1994.

BARJA, G.; HERRERO, A. Oxidative damage to mitochondrial DNA is inversely related to maximum life span in the heart and brain of mammals. **FASEB J.**, v. 14, p. 312-318, 2000.

BARJA, G. Free radicals and aging. Review. **Trends in neurosciences**, v. 27, p. 595-600, 2004.

BAST, A.; HAENEN, G. R. M. M. The toxicity of antioxidants and their metabolites. **Environ. Toxicol. Pharmacol.**, v. 11, p. 251-258, 2002.

BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L, M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Rev. Nutr.**, v. 12, n. 2, p. 123-130, 1999.

BONASSA, E. M. A. **Enfermagem em quimioterapia**. Atheneu, 1998.

CHATGILIALOGLU, C.; O'NEILL, P. Free radicals associated with DNA damage. **Exp. Geront.**, v. 36, p. 1459-1471, 2001.

COSTA, W. F.; NEPOMUCENO, J. C. Protective effects of a mixture of antioxidant vitamins and mineral on the genotoxicity of doxorubicin in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Environ. Mol. Mutagen.**, v. 47, n. 1, p. 18-24, 2006.

DI MEO, S.; VENDITTI, P. Mitochondria in exercise-induced oxidative stress. **Biol. Signals Recept.**, v. 10 p. 125-140, 2001.

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

DRÖGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiol. Rev.**, v. 82, p. 47-95, 2002.

FRAGIORGE, E. J.; SPANÓ, M. A.; ANTUNES, L. M. G. Modulatory effects of the antioxidant ascorbic acid on the direct genotoxicity of doxorubicin in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Genet. Mol. Biol.**, v. 30, n. 2, 2007.

GANDINI, S.; MERZENICH, H.; ROBERTSON, C.; BOYLE, P. Meta-analysis of studies on breast cancer risk and diet: the role of fruit and vege consumption and the intake of associated micronutrients. **Eur. J. Cancer**, v. 36, p. 636–646, 2000
HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants: a personal view. **Nutr. Res.**, v. 52, p. 253-265, 1994.

GILLMAN, A. G.; LIMBIRD, L. E.; HARDMAN, J. G. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Graw Hill, p. 909-943, 1996.

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

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

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

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. 3 ed. Oxford: Clarendon Press; 1999

HANDELMAN, G. J. The evolving role of carotenoids in human biochemistry. **Nutrition**, v. 17, p. 818-22, 2001.

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

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

KONOPACKA, M.; RZESZOWSKA-WOLNY, J. Antioxidant vitamins C, E and β - carotene reduce DNA damage before as well as after γ -ray irradiation of human lymphocytes in vitro. **Mutat. Res.**, v. 491, p. 1-7, 2001.

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

KRINSKY, N. I. Effects of carotenoids in cellular and animal systems. **Am. J. Clin. Nutr.**, vol. 53, p. 238s-246s, 1991.

LINDSLEY, D. L.; ZIMM, G. G. The genome of *Drosophila melanogaster*. **Academic. Press.**, p. 1133, 1992.

LU, Q. Y.; HUNG, J. C.; HEBER, D.; GO, V. L.; REUTER, V. E.; CORDON-CARDO, C.; SCHER, H. I.; MARSHALL, J. R.; ZHANG, Z. F. Inverse associations between plasma lycopene and other carotenoids and prostate cancer. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.**, v. 10, p. 749-756, 2001.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Instituto Nacional de Câncer**. Controle do câncer: uma proposta de integração ensino-serviço. Rio de Janeiro, 1999.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Instituto Nacional de Câncer**. Estimativa da incidência e mortalidade por câncer no Brasil 2000. Rio de Janeiro, 2000.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Instituto Nacional de Câncer**. Estimativa da incidência e mortalidade por câncer no Brasil, 2006. Rio de Janeiro, 2007.

MONTERO, M. Los radicales libres y las defensas antioxidantes: revisión. **Ann. Fac. Med.**, v. 57, n. 4, p. 278-281, 1996.

MUINDI, J. R. F. Retinoids in clinical cancer therapy. **Cancer Treat Res**, v. 87, p. 305-342, 1996.

OLIVEIRA, G. S.; FIQUEIREDO, A. S. P.; SANTOS, R. S.; VIANNA, L. M. Efeito da suplementação de beta-caroteno na pressão arterial de ratos. **Rev. Nutr.**, v. 20, n. 1, p. 39-45, 2007.

OMENN, G. S.; GOODMAN, G. E.; THORNQUIST, M. D.; BALMES, J.; CULLEN, M. R.; GLASS, A.; KEOGH, J. P.; MEYSKENS, F. L.; VALANIS, B.; WILLIAMS, J. H.; BARNHART, S.; HAMMAR, S. Effects of a combination of beta carotene and vitamin A on lung cancer and cardiovascular disease. **N. Engl. J. Med.**, v. 334, n. 18, p. 1150-1155, 1996.

PAOLINI, M.; ANELLI, A.; POZZETTI, L.; SPETLOVA, D.; PEROCCO, P.; VALGIMIGLI, L.; Gian Franco PEDULLI, G. F.; CANTELLI-FORTI, G. Induction of cytochrome P450 enzymes and over-generation of oxygen radicals in beta-carotene supplemented rat. **Carcinogenesis**, v. 22, n. 9, p. 1483-1495, 2001.

PETO, R.; DOLL, R.; BUCKEY, Y. D.; SPORN, M. D. Can dietary beta-carotene materially reduce human cancer rate? **Nature**, v. 290, p. 201-208, 1989.

PFIZER Itália S.r.L. ADRIBLASTINA® RD.: pó liofilizado, 2006. Bula de remédio.

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

POMPELLA, A. Biochemistry and histochemistry of oxidant stress and lipid peroxidation. **Int. J. Vitamin and Nutr. Res.**, v. 67, n. 5, p. 289-297, 1997.

RIBOLI, E.; NORAT, T. Epidemiologic evidence of the protective effect of fruit and vegetables on cancer risk. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 78, p. 559–569, 2003.

ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TULER, V. E. **Farmacognosia e Farmacobiotechnologia**. Editora Premier, São Paulo, p. 372.

SANTOS, H. S.; CRUZ, W. M. S. A terapia nutricional com vitaminas antioxidantes e o tratamento quimioterápico oncológico. **Rev. Bras. Cancerologia**, v. 47, n. 3, p. 303-308, 2001.

SHAMI, N. J. I. E.; MOREIRA, E. A. M. Licopeno como agente antioxidante. **Rev. Nutr.**, v. 17, n. 2, p. 227-236, 2004.

SKEEL, R.T. **Manual de quimioterapia**. 3a ed. Medsi, 1993.

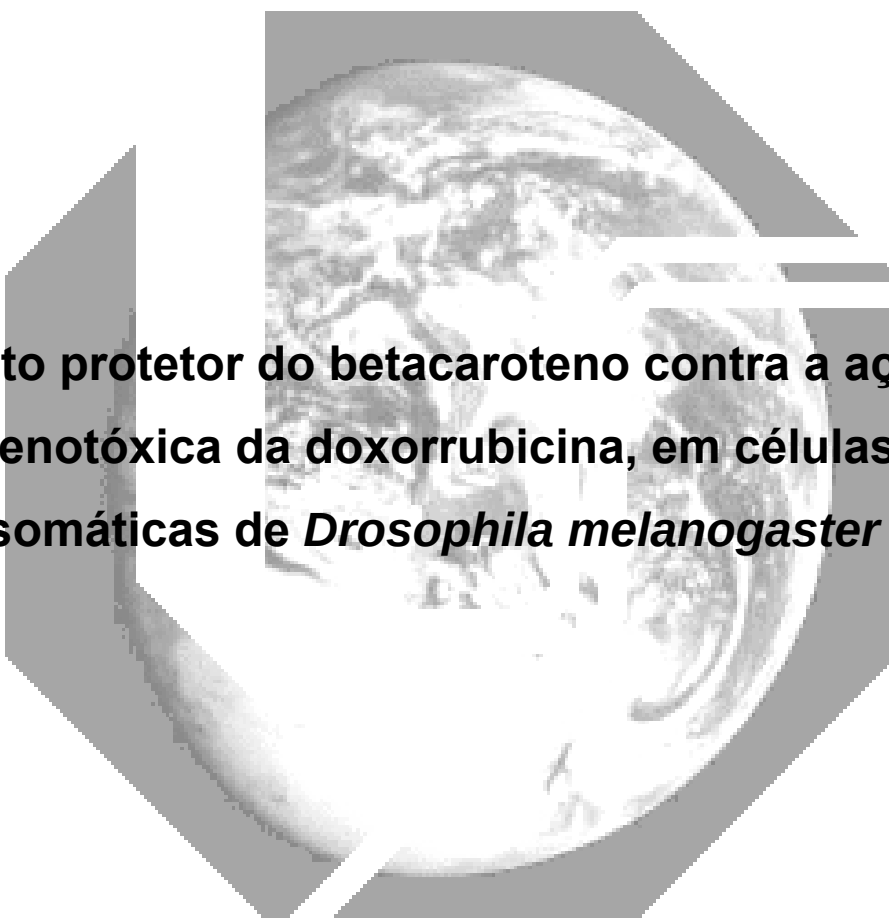
TALLAJ, J. A.; FRANCO, V.; RAYBURN, B. K.; PINDERSKI, L.; BENZA, R.L.; PAMBOUKIAN, S.; FOLEY, B.; BOURGE, R. C. Response of Doxorubicin-induced Cardiomyopathy to the Current Management Strategy of Heart Failure. **The Journal of Heart and Lung Transplantation**, v.24, n. 12, p. 2196-2201, 2005.

TOUVIER, M.; KESSE, E.; CLAVEL-CHAPELON, F.; BOUTRON-RUAULT, M-C. DUAL. Association of β -carotene with risk of tobacco-related cancers in a cohort of French women. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 97, n. 18, p. 1338-1344, 2005.

TRABER, M. G. Cellular and molecular mechanisms of oxidants and antioxidants. **Miner. Electrolyte Metab.**, v. 23, n. 3, p. 135-139, 1997.

URSO, M. L.; CLARKSON, P. M. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. **Toxicology**, v. 189, p. 41-54, 2003.

Capítulo II



**Efeito protetor do betacaroteno contra a ação
genotóxica da doxorubicina, em células
somáticas de *Drosophila melanogaster***

**Protective effects of β -carotene against genotoxic action
of doxorubicin in somatic cells of *Drosophila*
*melanogaster***

Sumário

Capítulo II

	Página
Resumo	21
Abstract	22
1 Introdução	23
2 Material e Métodos	25
2.1 Compostos químicos	25
2.2 Teste para detecção de Mutação e Recombinação Somática (Somatic Mutation And Recombination Test – SMART) em células somáticas de <i>Drosophila melanogaster</i>	25
2.2.1 Linhagens estoques	25
2.2.2 Cruzamento entre as linhagens mutantes	26
2.2.3 Procedimento para coleta de larvas e tratamento	26
2.2.4 Preparação e análise microscópica das asas	26
2.2.5 Análise estatística	27
3 Resultados e Discussão	28
4 Referências Bibliográficas	34

Resumo

O betacaroteno (BC), pró-vitamina A, é um eficiente antioxidante, efetivo na neutralização de espécies reativas de oxigênio, que estão relacionadas a sérios danos causados ao DNA, lipídios e proteínas. Por isso, observa-se a progressão nos estudos referentes à ação do BC na quimioprevenção de câncer e doenças do coração. Esses avanços promovem um melhor entendimento das possibilidades e limitações da influência do BC na saúde humana. Sendo assim, este trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos protetores do BC em três diferentes doses (1, 2 e 4mg/mL) contra a ação genotóxica da doxorubicina, DXR (0,125 mg/mL), pelo teste para detecção de manchas na asa de *Drosophila melanogaster* (Somatic Mutation And Recombination Test – SMART). Os resultados obtidos nos indivíduos, descendentes do cruzamento padrão, tratados com as diferentes doses de BC, demonstraram que não houve aumento, estatisticamente significativo, nas frequências de manchas mutantes. No entanto, houve uma redução estatisticamente significativa, no número total de manchas, quando o BC foi associado a DXR. Dessa forma, conclui-se que, nestas condições experimentais, o BC não é genotóxico e possui efeito protetor contra a ação recombinogênica do quimioterápico DXR

UNITERMO: *Drosophila melanogaster*, genotoxicidade, quimioprevenção, betacaroteno

Abstract

The pro-vitamin A β -carotene (BC) is an efficient antioxidant, effective in the neutralization of reactive species of oxygen, which are related to serious damages caused to DNA, lipids and proteins. Because of that, we noticed a progression in studies that refer to the BC action in the chemoprevention of cancer and heart diseases. These advances have led to a better understanding of possibilities and influences of BC in human health. This way, the present work aimed at evaluating the protective effects of BC in three different doses (1, 2 and 4 mg/mL) against genotoxic action of doxorubicin DXR (0,125 mg/mL) by the test of spot detection in the flies of *Drosophila melanogaster* (Somatic Mutation and Recombination Test – SMART). The results obtained in descendant from pattern crossing, treated with the three different doses of BC, demonstrated that there was no statistically significant increase in the frequency of mutant spots. However, there was a statistically significant decrease in the total number of spots, when BC was associated to DXR. This way we concluded that, in these experimental conditions, BC is not genotoxic and it has a protective effect against recombinagenic action of the chemotherapeutic DXR.

Key words: *Drosophila melanogaster*, genotoxicity, chemoprevention, β -carotene

1. Introdução

O betacaroteno (BC), principal fonte de vitamina A para a maioria da população mundial (Peto et al., 1989), é efetivo na neutralização de oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) e na inibição da oxidação de compostos pelos peróxidos (Krinsky, 1991). Seus efeitos, porém, são modificados sob certas condições e concentrações. Zhang e Omaye (2001) demonstraram que os efeitos antioxidantes e pró-oxidantes do BC são dependentes da tensão do oxigênio e da concentração do BC. Como na maioria dos tecidos biológicos, o nível de oxigênio é baixo, o BC, como os demais carotenóides adquirem importância como antioxidantes (Burri, 1997).

Essa propriedade do BC de agir como um eficiente antioxidante, tem um importante papel na diminuição da incidência de câncer (Gandini et al, 2000 e Riboli e Norat, 2003), doenças cardiovasculares (Bast, 2002 e Oliveira, 2007), e envelhecimento (Ames et al., 1993), além de agir como um regulador imunológico (Burri, 1997).

A ação quimiopreventiva do BC é demonstrada principalmente no início do processo carcinogênico, ou nos estágios iniciais da sua promoção, inibindo a formação de lesões pré-neoplásicas em ambos modelos experimentais *in vitro* e *in vivo* (Moreno et al., 1995; He et al., 1997; Gradelet, 1997). O BC pode estimular apoptose em células B16F (melanoma) (Guruvayoorappan e Kuttan, 2007) e em linhagem celular MCF-7 (Cui et al, 2007).

Segundo El-Habit (2000) os efeitos genoprotetores do BC são independentes da natureza das genotoxinas e, os mecanismos envolvidos na modulação da atividade e genotoxicidade de ROS por BC podem ser de natureza similar.

De acordo com Kong e Lillehei (1998), os antioxidantes agem nas três linhas de defesas orgânicas contra as espécies reativas de oxigênio (ROS): a primeira linha atua na prevenção, que se caracteriza pela proteção contra a formação das substâncias agressoras; a segunda, na interceptação dos radicais livres; e a terceira linha atua no reparo de lesões causadas pelos radicais livres. É necessário, portanto, a inclusão de antioxidantes na dieta (Pompella, 1997),

sendo de expressiva importância, ainda, no tratamento de pacientes com câncer (Santos e Cruz, 2001).

A droga antineoplásica doxorrubicina (DXR) é um potente e eficaz agente quimioterápico no tratamento de várias formas de câncer, mas seu uso é limitado pelo desenvolvimento de toxicidade cardíaca (Tallaj et al, 2005). A DXR apresenta ainda, efeitos genotóxicos, teratogênicos e a capacidade de intercalarse à molécula de DNA, gerando radicais livres (Pfizer Itália S.r.l). A geração de radicais livres atua diretamente no núcleo celular, e com isso, inviabiliza o processo de divisão celular, logo esse mecanismo citotóxico parece ser o principal efeito antitumoral da DXR (Keizer et al., 1990). Em *Drosophila melanogaster*, a DXR foi avaliada pelo SMART, onde foi verificada a indução do aparecimento de mutações e recombinações somáticas (Frölich e Würigler, 1990; Costa e Nepomuceno, 2006). Fragiorgue (2007) demonstrou nos seus estudos que DXR induziu recombinação mitótica nas células somáticas de *Drosophila* e que 50mM de ácido ascórbico protege contra a genotoxicidade da DXR, enquanto que as frequências de 100mM de ácido ascórbico realçou as frequências de manchas induzidas por DXR.

O SMART (Somatic Mutation And Recombination Test) de asa em *D. melanogaster*, desenvolvido por Graf et al. (1984), detecta um amplo espectro de eventos genotóxicos, e é usado, também, para detecção de agentes antigenotóxicos. Este teste baseia-se no fato de que durante o início do desenvolvimento embrionário da *D. melanogaster*, grupos de células (disco imaginal), proliferam mitoticamente durante o desenvolvimento larval e se diferenciam, durante a metamorfose, em estruturas do corpo da mosca adulta. Desse modo, se ocorrer alterações em uma dessas células do disco imaginal, estas alterações estarão presentes em todas as células descendentes e formarão clones de células mutantes, caracterizados como manchas de pêlos mutantes na asa da mosca adulta (Guzmán-Rincón e Graf, 1995).

A progressão de estudos referentes à ação do BC na quimioprevenção de câncer e doenças do coração promovem um melhor entendimento das possibilidades e limitações da influência do BC na saúde humana. Estudos epidemiológicos e em modelos animais indicam que o BC pode exercer seu efeito quimiopreventivo se ingerido em quantidades mais fisiológicas, conforme

encontrado em uma dieta rica em frutas e vegetais. Sendo assim, este trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos protetores do BC contra a ação genotóxica da doxorubicina (DXR), em células somáticas de *Drosophila melanogaster*.

2. Material e Métodos

2.1 – Compostos químicos:

Betacaroteno, lote nº 04020136, fabricado pelo laboratório Pharma Nostra Comercial Ltda, São Paulo, Brasil.

Cloridrato de doxorubicina (DXR), conhecido comercialmente como Doxolem, lote nº 80344, fabricado por Eurofarma Laboratórios Ltda e distribuído pela Zodiac Produtos Farmacêuticos S/A, São Paulo, Brasil.

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

2.2.1 - Linhagens estoques:

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

1. *multiple wing hairs* (*mwh*), com constituição genética: *mwh jv*.
2. *Flare - 3* (*flr*³), com constituição genética *flr*³/ *In(3LR)TM3, ri p^D sep I(3)89Aa bx^{34e} e Bd^S*.

Os estoques de *Drosophila melanogaster* foram mantidos em frascos de ¼ de litro contendo meio de cultura (820 mL de água, 25g de fermento (*Saccharomyces cerevisiae*) 11 g de ágar, 156g de banana, 1 g de nipagin), à temperatura de 25 °C e à umidade relativa do ar de 67%.

2.2.2 - Cruzamento entre as linhagens mutantes:

Cruzamento padrão (ST- Standard Cross):

- Fêmeas virgens *flr³/ In(3LR)TM3, ri p⁰ sep I(3)89Aa bx^{34e} e Bd^s* cruzadas com machos *mwh/mwh* (Guzmán-Rincón e Graf, 1995).

2.2.3 – Procedimento para coleta de larvas e tratamento:

A ovoposição foi realizada 48 horas após o início dos cruzamentos por um período de 8 horas, em frascos contendo uma base sólida de ágar (4% de ágar em água) e uma camada de fermento biológico (*S. cerevisiae*) suplementado com açúcar. Após 72 +/- 4 horas, as larvas do 3º estágio foram lavadas com água corrente e coletadas com auxílio de uma peneira de malha fina.

Grupos de aproximadamente 100 larvas foram transferidos para frascos de vidro de 25 mL contendo 1,5 g de meio alternativo (purê de batatas) e BC (1; 2 ou 4mg/mL) associados ou não com DXR (0,125mg/mL). Para controle positivo foi utilizada a DXR (0,125mg/mL) e, para controle negativo, água destilada estéril. Pelo fato dos possíveis compostos serem fotossensíveis todos os frascos do tratamento foram envolvidos com papel alumínio.

2.2.4 - Preparação e análise microscópica das asas:

Após a eclosão, os indivíduos adultos foram coletados e conservados em um recipiente contendo etanol 70%. As asas das moscas foram destacadas sob microscópio estereoscópico, utilizando-se um par de pinças entomológicas, depois foram embebidas em 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 distendidas aos pares sobre uma lâmina seca. A lâmina foi colocada por aproximadamente uma hora sobre uma placa aquecida (60 °C) e, posteriormente, sobre as asas adicionou-se uma lamínula, e sobre esta, adicionou-se um peso de

aproximadamente 400g para a eliminação de possíveis espaços preenchidos por ar. A lâmina foi então colocada por mais uma hora sobre a placa aquecida (60°C).

A análise das asas foi realizada em microscópio óptico (objetiva 40x). Foram registrados o número e os tipos de manchas encontradas (simples ou gêmeas), o tamanho das mesmas, e a posição em que se encontram na asa.

Ao final da análise, foram comparadas as frequências de mutações encontradas nas moscas tratadas com BC com as encontradas no controle positivo e negativo, respectivamente.

2.2.5 - Análise estatística:

A análise estatística dos experimentos, para a verificação de uma possível ação genotóxica do BC foi realizada por meio do teste descrito por Frei e Würgler (1988). Para a análise estatística de antigenotoxicidade, as frequências de cada tipo de mancha por mosca, foram comparadas aos pares (controle negativo versus BC; agente genotóxico isoladamente versus BC + agente genotóxico), usando o teste *U* de Mann, Whitney e Wilcoxon (Frei e Würgler, 1995). As porcentagens de inibição do BC foram calculadas, utilizando-se as frequências de clones 10^5 células, corrigidas pelo controle (DXR – DXR associada ao BC/DXR) x 100 (Abraham, 1994).

3. Resultados e Discussão

Numerosos estudos têm mostrado que o risco de câncer está inversamente correlacionado com BC, mas o mecanismo para o efeito inibidor do BC permanece pouco entendido. O presente estudo investigou os efeitos protetores do BC contra a ação genotóxica da DXR em células somáticas de *D. melanogaster*. As doses 1, 2 e 4mg/mL de BC, foram utilizadas em quantidades mais fisiológicas, conforme descrito na literatura (Burri, 1997; Silva e Naves, 2001).

As Tabelas 1 e 2 mostram as freqüências de manchas mutantes: simples pequenas, simples grandes e gêmeas, assim como o total de manchas em asas de *Drosophila melanogaster*. As Tabelas informam ainda a quantidade de clones (10^5) observada e corrigida pelo controle. Foram analisadas aproximadamente 24.400 células em cada asa de *D. melanogaster*.

A Tabela 1 apresenta os resultados obtidos na análise dos descendentes trans-heterozigotos marcados (MH), do cruzamento padrão (ST), tratados com diferentes concentrações de BC (1, 2 ou 4mg/mL) e os controles positivo (DXR-0,125mg/mL) e negativo (água destilada estéril). Os dados mostram que não houve aumento estatisticamente significativo ($\alpha = 0,05$) nas freqüências de manchas induzidas pelo BC, quando comparadas com o controle negativo, em todas as classes de manchas. Nossos resultados estão de acordo com Konopacka e Rzsowska-Wolny (2001) que verificaram a ausência de genotoxicidade do BC quando adicionado (1-5 μ g/mL) antes ou imediatamente após a exposição de linfócitos humanos a raios γ .

Os resultados obtidos na análise dos descendentes trans-heterozigotos marcados (MH) e heterozigotos balanceados (BH), do cruzamento padrão (ST) tratados com DXR associado a 1, 2 ou 4mg/mL de BC estão representados na Tabela 2.

Os dados mostram o efeito genotóxico do quimioterápico doxorrubicina (DXR), que apresentou um aumento estatisticamente significativo ($\alpha = 0,05$) nas freqüências de manchas mutantes, em todas as classes de manchas, quando comparadas ao controle negativo. Este aumento nas freqüências de manchas mutantes, nos descendentes do cruzamento ST, evidencia que a DXR não

necessita de ativação metabólica para exercer seus efeitos, sendo, portanto, um agente genotóxico direto.

O aparecimento de manchas gêmeas indica a atividade recombinogênica do quimioterápico DXR. A relação entre o aumento das freqüências de manchas gêmeas e o aumento da atividade recombinogênica foi confirmada pela análise dos descendentes BH. Visto que, nos descendentes BH são detectadas apenas mutação e deleção, pois o balanceador TM3 inibe a recombinação (Graf et al., 1984). No entanto, houve uma redução dose dependente, no número de manchas gêmeas, nos descendentes MH, na associação do BC com a DXR, devido a uma ação antirecombinogênica do BC. Essa atividade antirecombinogênica do BC foi verificada pela análise dos descendentes BH, que apresentaram uma diminuição significativa no número total de manchas mutantes. Resultados da ação recombinogênica da DXR, em células somáticas de *D. melanogaster*, foram encontrados em Rodriguez-Arnaiz et al. (2004), Costa e Nepomuceno (2006) e Fragiorge (2007). Costa e Nepomuceno (2006) verificaram, também, a ação antirecombinogênica, de um complexo de vitaminas antioxidantes, incluindo o BC, contra a ação recombinogênica da DXR.

Na Tabela 2 verifica-se ainda, que na associação das diferentes doses de BC com DXR houve uma redução estatisticamente significativa, em relação ao controle DXR, em todas as classes de manchas dos indivíduos MH e nas freqüências de manchas simples grandes e no total de manchas dos indivíduos BH. Não houve uma redução estatisticamente significativa de manchas simples pequenas nas três doses testadas de BC associadas a DXR nos descendentes BH. Nos descendentes MH a redução na freqüência de manchas do BC, quando associado a DXR, foi de 78,5% para 1mg/mL; 89,16% para 2mg/mL e 95,25% para 4mg/mL. Para os descendentes BH a redução na associação foi 91% para 1mg/mL; 95,6% para 2mg/mL e 113,27% para 4mg/mL.

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

As porcentagens de mutação e recombinação observadas nos indivíduos MH e BH do cruzamento padrão, tratados com DXR (0,125mg/mL) foram as seguintes: o controle DXR apresentou 6% de mutação e 94% de recombinação. Na associação de BC nas doses 1, 2 e 4mg/mL com DXR, ocorreu 87,10%, 78,7% e 70,7% de eventos recombinacionais, respectivamente. O aumento da concentração de BC na associação reduziu o efeito recombinogênico do quimioterápico DXR.

Eicker et al. (2003) também observaram, pela técnica de PCR, redução de mutagenicidade no DNA mitocondrial associado ao fotoenvelhecimento induzido, quando as células foram co-incubadas com BC nas concentrações de 0,5mM ou superiores. A ingestão de BC pode ainda, reduzir a ocorrência de efeitos adversos na terapia por radiação e diminuir a recorrência local de câncer (Meyer et al., 2007).

Os mecanismos pelos quais o BC inibiu a genotoxicidade da DXR não foram analisados diretamente. Contudo, em função da DXR gerar radicais livres e produzir danos ao DNA (Keizer et al., 1990), é possível sugerir alguns mecanismos de proteção do BC contra a genotoxicidade da DXR.

Como foi realizado o co-tratamento do BC com a DXR, pode-se propor a ação desmutagênica do BC. A ação desmutagênica é caracterizada pela inativação química ou enzimática do agente genotóxico, inibindo ativação metabólica de pró-mutágenos ou seqüestrando moléculas reativas (Kada et al., 1982). Assim, é possível que o BC tenha inativado a DXR, ou seus produtos metabólicos, que são os radicais livres gerados na transformação deste agente genotóxico. Resultados similares, dessa ação desmutagênica, foram verificados por Trekli et al. (2003) em estudos com células humanas. Nesse estudo o BC, em condições apropriadas, atuou como um poderoso antioxidante. Este mecanismo da ação desmutagênica, de um complexo de vitaminas antioxidantes (B, C e betacaroteno), contra a genotoxicidade da DXR em *D. melanogaster* foi proposto, também, por Costa e Nepomuceno (2006).

Uma outra explicação para a redução de manchas mutantes, nos tratamentos associados com BC e DXR, pode ser pela ativação da via de apoptose. Um amplo alcance de concentrações de carotenóides tem sido reportado exercendo seus efeitos antiproliferativos e apoptóticos *in vitro*. O BC no

estudo realizado por Prasad et al. (2006), inibiu a proliferação celular de maneira dose dependente das células leucêmicas Molt 4 e foi efetivo na indução de apoptose na concentração de 50 μ M.

De acordo com Cui et al. (2007), o BC pode atuar como pró-oxidante para aumentar os níveis intracelulares de ROS, que participa da via de apoptose, e assim, inibir o crescimento tumoral das células. Palozza et al. (2001) observaram uma ligação entre mudanças no potencial redox intracelular e crescimento celular por BC em diferentes células tumorais. Estudos recentes (Guruvayoorappan e Kuttan, 2007) sugerem que o BC pode regular a produção de óxido nítrico (NO), um potente vasodilatador, e, também, o fator de necrose tumoral (TNF α), mediador central na propagação do tumor, além de estimular apoptose nas células B16F-10, de melanoma, pela regulação dos genes bcl-2. Os autores mostram que o BC é capaz de induzir a ativação dos genes p-53, essencial na prevenção de câncer e apoptose e induzir, também, a caspase-3, protease específica da apoptose. Palozza et al. (2002), em seus estudos discutem, inclusive, a possibilidade de um potencial quimiopreventivo ou quimioterapêutico para o BC no câncer de cólon. Portanto, a indução da via de apoptose e morte celular, na presença do BC, levaria a uma redução no número de células mutantes induzidas pela DXR.

O organismo humano está sujeito ao estresse oxidativo causado por ROS provenientes do meio ambiente ou geradas pelo próprio organismo, e a ação dessas espécies oxidantes sobre o DNA é responsável por mutação ou mesmo oncogênese. Contudo, o organismo é protegido por micro ou macromoléculas de origem endógena ou obtidas diretamente da dieta (Barreiros et al., 2006).

Dessa forma, pode-se concluir com base nos resultados e nas condições experimentais mencionadas neste estudo, que o BC nas doses utilizadas, não é mutagênica, e exerce um efeito protetor contra a ação recombinogênica do quimioterápico DXR (0,125 mg/mL), utilizando como organismo teste a *Drosophila melanogaster*.

Tabela 1. Frequências de manchas mutantes observadas nos descendentes trans-heterozigotos marcados de *Drosophila melanogaster*, do cruzamento padrão, tratados com betacaroteno (BC) em três diferentes doses

Tratamentos	N. de Indiv. (N)	Manchas por indivíduo (no. de manchas) diag. estatístico ^a								Total manchas mwh ^c (n)	
		MSP		MSG		MG		TM			
		(1-2 céls) ^b		(>2 céls) ^b							
		m = 2		m = 5		m = 5		m = 2			
<i>mwh/flr</i> ³											
Contr. Neg.	40	0,60	(24)	0,03	(01)	0,03	(01)	0,65	(26)		26
BC 1 mg/mL	50	0,78	(39) i	0,10	(05) i	0,00	(00) i	0,88	(44) i		44
BC 2 mg/mL	50	0,50	(25) -	0,08	(04) i	0,04	(02) i	0,62	(31) -		31
BC 4 mg/mL	50	0,50	(25) -	0,02	(01) i	0,04	(02) i	0,56	(28) -		28
DXR 0,125 mg/mL	20	4,20	(84) +	5,70	(114) +	8,30	(166) +	18,20	(364) +		350

^aDiagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würzler (1988): +, positivo; -, negativo; i, inconclusivo. *m*, fator de multiplicação para a avaliação de resultados significativamente negativos. Níveis de significância $\alpha = \beta = 0,05$.

^bIncluindo manchas simples *flr*³ raras.

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

Tabela 2. Frequências de manchas mutantes observadas nos descendentes trans-heterozigotos marcados e heterozigotos balanceados de *D. melanogaster*, do cruzamento padrão, tratados com betacaroteno (BC) em três diferentes doses associadas à DXR (0,125mg/mL)

Tratamentos	N. de	Manchas por indivíduo (no. de manchas) diag. estatístico ^a										Total	Média das	Frequência de clones		
	Indiv.	MSP		MSG		MG		TM		manchas	classes de tam.	(10 ⁵ células) ^f				
	(N)	(1-2 céls) ^b		(>2 céls) ^b								Observada	Corrigida pelo	Inibição ^h %		
									mwh ^c	clones mwh ^{c,d}	n/NC				controle	
										(n)	(î)					
<i>mwh/flr³</i>																
Contr. Neg.	40	0,60	(24)	0,03	(1)	0,03	(1)	0,65	(26)	26	1,69	1,33				
DXR 0,125 mg/mL	20	4,20	(84) +	5,70	(114) +	8,30	(166) +	18,20	(364) +	350	3,51 {3,58}	35,86	{34,53}			
BC 1mg/mL + DXR	40	1,70	(68) *	1,13	(45) *	1,53	(61) *	4,35	(174) *	171	3,02 {3,26}	8,76	{7,43}	78,5		
BC 2mg/mL + DXR	40	1,23	(49) *	0,63	(25) *	0,65	(26) *	2,50	(100) *	99	2,81 {3,21}	5,07	{3,74}	89,16		
BC 4mg/mL + DXR	40	1,03	(41) *	0,23	(9) *	0,23	(9) *	1,48	(59) *	58	2,05 {2,34}	2,97	{1,64}	95,25		
<i>mwh/TM3</i>																
Contr. Neg.	40	0,50	(20)	0,00	(0)	g		0,50	(20)	20	1,45	1,02				
DXR 0,125 mg/mL	40	0,65	(26) ns	0,38	(15) +			1,03	(41) +	42	2,40 {3,27}	2,15	{1,13}			
BC 1mg/mL + DXR	40	0,45	(18) ns	0,10	(4) *			0,55	(22) *	22	1,86 {6,00}	1,13	{0,10}	91		
BC 2mg/mL + DXR	40	0,53	(21) ns	0,00	(0) *			0,53	(21) *	21	1,29 -{2,00}	1,08	{0,05}	95,6		
BC 4mg/mL + DXR	40	0,40	(16) ns	0,03	(1) *			0,43	(17) *	17	1,29 {2,33}	0,87	-{0,15}	113,27		

^aDiagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würzler (1995). Teste *U* Mann-Whitney; níveis de significância: +, positivo, $P \leq 0,05$, quando comparado com o controle negativo;

*, $P \leq 0,05$, quando comparado somente com a DXR; ns, não significativo.

^bIncluindo manchas simples *flr³* raras.

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

^dNúmeros entre chaves são as frequências de indução corrigidas em relação a incidência espontânea estimada do controle negativo.

^e $C = 48.000$, isto é, número aproximado de células examinadas por indivíduo.

^fCalculado de acordo com Frei et al. (1992).

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

^hCalculado de acordo com Abraham (1994): (DXR – DXR associado ao betacaroteno/ DXR) X 100

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAM, S. K. Antigenotoxicity of coffee in the *Drosophila* assay for somatic mutation and recombination. **Mutagenesis**, v. 9, n. 4, p. 383-386, 1994.

AMES, B. N.; SHIGENAGA, M.; HAGEN, T. M. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v. 90, p. 7915-7922, 1993.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.

BAST, A.; HAENEN, G. R. M. M. The toxicity of antioxidants and their metabolites. **Environ. Toxicol. Pharmacol.**, v. 11, p. 251-258, 2002.

BURRI, B. J. Beta-carotene and human health: a review of current research. **Nutr. Res.**, v. 17, n. 3, p. 547-580, 1997.

COSTA, W. F.; NEPOMUCENO, J. C. Protective effects of a mixture of antioxidant vitamins and mineral on the genotoxicity of doxorubicin in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Environ. Mol. Mutagen.**, v. 47, n. 1, p. 18-24, 2006.

CUI, Y.; LU, Z.; BAI, L.; SHI, Z.; ZHAO, W. e.; ZHAO, B. β -carotene induces apoptosis and up-regulates peroxisome proliferator-activated receptor γ expression and reactive oxygen species production in MCF-7 cancer cells. **European J. Cancer**, v. 43, n. 17, p. 2590-2601, 2007.

EICKER, J.; KÜRTEN, V.; WILD, S.; RISS, G.; GORALCZYK, R.; KRUTMANN, J.; BERNEBURG, M. Betacarotene supplementation protects from photoaging-associated mitochondrial DNA mutation. **Photochem. Photobiol. Sci.**, v. 2, n. 6, p. 655-659, 2003.

EL-HABIT, O. H. M.; SAADA, H. N.; AZAB, K. S.; ABDEL-RAHMAN, M.; EL-MALAH, D. F. The modifying effect of b-carotene on gamma radiation-induced elevation of oxidative reactions and genotoxicity in male rats. **Mutat. Res.**, v. 466, p. 179–186, 2000.

FRAGIORGE, E. J.; SPANÓ, M. A.; ANTUNES, L. M. G. Modulatory effects of the antioxidant ascorbic acid on the direct genotoxicity of doxorubicin in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Genet. Mol. Biol.**, v. 30, n. 2, 2007.

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

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

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

GANDINI, S.; MERZENICH, H.; ROBERTSON, C.; BOYLE, P. Meta-analysis of studies on breast cancer risk and diet: the role of fruit and vegetable consumption and the intake of associated micronutrients. **Eur. J. Cancer**, v. 36, p. 636–646, 2000.

GRADELET, S.; ASTORG, P.; LE-BON, A. M.; BERGES, R.; SUSCHELET, M. Modulation of aflatoxin B1 carcinogenicity, genotoxicity and metabolism in rat liver by dietary carotenoids: evidence for a protective effect of CYP1A inducers. **Cancer Lett.**, v. 114, p. 221-223, 1997.

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

GURUVAYOORAPPAN, C.; KUTTAN, G. B-carotene down-regulates inducible nitric oxide synthase gene expression and induces apoptosis by suppressing bcl-2 expression and activating caspase-3 and p53 genes in B16F-10 melanoma cells.

Nutr. Res., v. 27, n. 6, p. 336-342, 2007.

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

HE, Y.; ROOT, M. M.; PARKER, R. S.; CAMPBELL. Effects of carotenoid-rich food extracts on the development of preneoplastic lesions in rat liver and on in vivo and in vitro antioxidant status. **Nutr. Cancer**, v. 27, p. 238-244, 1997.

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

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

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

KONOPACKA, M.; RZESZOWSKA-WOLNY, J. Antioxidant vitamins C, E and β - carotene reduce DNA damage before as well as after γ -ray irradiation of human lymphocytes in vitro. **Mutat. Res.**, v. 491, p. 1-7, 2001.

KRINSKY, N. I. Effects of carotenoids in cellular and animal systems. **Am. J. Clin. Nutr.**, vol. 53, p. 238s-246s, 1991.

MEYER, F.; BAIRATI, I.; JOBIN, E.; GÉLINAS, M.; FORTIN, A.; NABID, A.; TÊTU, B. Acute adverse effects of radiation therapy and local recurrence in relation to dietary and plasma beta carotene and alpha tocopherol in head and neck cancer patients. **Nutr. Cancer**, v. 59, n. 1, p. 29-35, 2007.

MORENO, F. S.; WU, T. S.; PENTEADO, M. C. V.; RIZZI, M. B. S. L.; JORDÃO Jr., A. A.; ALMEIDA-MURADIAN, L. B.; DAGLI, M. L. Z. A comparison of b-carotene and vitamin A effects on a hepatocarcinogenesis model. **Int. J. Vitam. Nutr. Res.**, v. 65, p. 87-94, 1995.

OLIVEIRA, G. S.; FIQUEIREDO, A. S. P.; SANTOS, R. S.; VIANNA, L. M. Efeito da suplementação de beta-caroteno na pressão arterial de ratos. **Rev. Nutr.**, v. 20, n. 1, p. 39-45, 2007.

PALOZZA, P.; CALVIELLO, G.; SERINI, S.; MAGGIANO, N.; LANZA, P.; RANELLETTI, F. O.; BARTOLI, G. M. Carotene at high concentrations induces apoptosis by enhancing oxy-radical production in human adenocarcinoma cells. **Free Rad. Biol. Med.**, v. 30, p. 1000–1007, 2001.

PALOZZA, P.; SERINI, S.; MAGGIANO, N.; ANGELINI, M.; BONINSEGNA, A.; DI NICUOLO, F.; RANELLETTI, F. O.; CALVIELLO, G. Induction of cell cycle arrest and apoptosis in human colon adenocarcinoma celllines by b-carotene through down-regulation of cyclin A and Bcl-2 family proteins. **Carcinogenesis**, v. 23, p. 11–18, 2002.

PETO, R.; DOLL, R.; BUCKEY, Y. D.; SPORN, M. D. Can dietary beta-carotene materially reduce human cancer rate? **Nature**, v. 290, p. 201-208, 1989.

PFIZER Itália S.r.L. ADRIBLASTINA® RD.: pó liofilizado, 2006. Bula de remédio.

POMPELLA, A. Biochemistry and histochemistry of oxidant stress and lipid peroxidation. **Int. J. Vitamin and Nutr. Res.**, v. 67, n. 5, p. 289-297, 1997.

PRASAD, V.; CHANDELE, A.; JAGTAP, J. C.; KUMAR P., S.; SHASTRY, P. ROS-triggered caspase 2 activation and feedback amplification loop in β -carotene-induced apoptosis. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 41, p. 431–442, 2006.

RIBOLI, E.; NORAT, T. Epidemiologic evidence of the protective effect of fruit and vegetables on cancer risk. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 78, p. 559–569, 2003.

RODRIGUEZ–ARNAIZ, R.; SORTIBRAN, A. C.; TELLEZ, G. O. Detection of mitotic recombination and sex chromosome loss induced by adriamycin, chlorambucil, demecolcine, paclitaxel and vinblastine in somatic cells of *Drosophila melanogaster* in vivo. **Mutagenesis.**, v. 19, n. 2, p. 121-127, 2004.

SANTOS, H. S.; CRUZ, W. M. S. A terapia nutricional com vitaminas antioxidantes e o tratamento quimioterápico oncológico. **Rev. Bras. Cancerologia.**, v. 47, n. 3, p. 303-308, 2001.

SILVA, C. R. M.; NAVES, M. M. V. Suplementação de vitaminas na prevenção de câncer. **Rev. Nutr.**, v. 14, n. 2, p. 135-143, 2001.

TALLAJ, J. A.; FRANCO, V.; RAYBURN, B. K.; PINDERSKI, L.; BENZA, R.L.; PAMBOUKIAN, S.; FOLEY, B.; BOURGE. R. C. Response of Doxorubicin-induced Cardiomyopathy to the Current Management Strategy of Heart Failure. **The Journal of Heart and Lung Transplantation**, v.24, n. 12, p. 2196-2201, 2005.

TREKLI, M. C.; RISS, G.; GORALCZYK, R.; TYRREL, R. M. Beta-carotene suppresses UVA-induced HO-1 gene expression in cultured FEK4. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 34, n. 4, p. 456-464, 2003.

ZHANG, P.; OMAJE, S. T. Antioxidant and prooxidant roles for beta-carotene, alpha-tocopherol and ascorbic acid in human lung cells. **Toxicol In Vitro**, v. 15, n. 1, p. 13-24, 2001.