



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

**Avaliação do potencial mutagênico,
recombinogênico e carcinogênico do Orlistat em
células somáticas de *Drosophila melanogaster***

Aluna: Priscila Capelari Orsolin

UBERLÂNDIA
2011



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

**Avaliação do potencial mutagênico,
recombinogênico e carcinogênico do Orlistat em
células somáticas de *Drosophila melanogaster***

Aluna: Priscila Capelari Orsolin

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 de concentração: Genética).

UBERLÂNDIA
2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil

-
- O76a Orsolin, Priscila Capelari, 1986-
Avaliação do potencial mutagênico, recombino-
gênico e carcinogênico do Orlistat em células somáticas de *Drosophila melanogaster* [manuscrito] /
Priscila Capelari Orsolin- 2011.
75 f. : il.
- Orientador: Júlio César Nepomuceno.
Dissertação (mestrado)- Universidade Federal de Uberlândia.
Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.
Inclui bibliografia.
1. Mutagênese- Teses. 2. *Drosophila melanogaster*- Teses. I.
I. Nepomuceno, Júlio César. II. Universidade Federal de Uberlân-
dia. Programa de Pós- Graduação em Genética e Bioquímica. III.
Título.

CDU: 575.224.

Palavras-chave: Orlistat. SMART. Wts. Recombinogênico. *Drosophila melanogaster*.



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

**Avaliação do potencial mutagênico,
recombinogênico e carcinogênico do Orlistat em
células somáticas de *Drosophila melanogaster***

Aluna: Priscila Capelari Orsolin

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Prof. Dr. Júlio César Nepomuceno

Examinadores: Prof^a. Dr^a. Heloisa Helena Rodrigues de Andrade
Prof. Dr. Mário Antônio Spanó

Data da defesa: 26 / 07 / 2011

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

Prof. Dr. Júlio César Nepomuceno

“A razão da existência humana é ser uma força ativa. É, pois, necessário que cada dia seja para nós a criação de um resultado”.

(Rémy de Gourmont).

Dedico esse trabalho aos meus pais, **Vilson Orsolin e Janéte Capelari Orsolin**, pelo carinho, apoio, confiança e estímulo. A vocês, meu amor eterno e gratidão!

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Agradeço, primeiramente, a **Deus**, por me dar coragem e determinação para lutar pelos meus sonhos, perseverança para superar os obstáculos, por me guiar sempre pelos melhores caminhos e por me cercar de tantas pessoas maravilhosas.

Aos meus pais, **Vilson e Janéte**, pela dedicação em me proporcionar uma vida feliz, confortável e permeada de sucessos. Obrigada por fazerem de meus sonhos os sonhos de vocês, por acreditarem tanto em mim e me incentivarem a caminhar sempre, pelo carinho e amor... Sem vocês eu nada seria!

À minha irmã, **Silvana**, pelo seu incentivo, exemplo de determinação e dedicação. Obrigada por estar presente em todos os momentos de minha vida e por se fazer tão especial.

Ao meu namorado e amigo, **Fernando**, agradeço pelo apoio, companheirismo, compreensão pelos momentos de ausência e, sobretudo, pelo amor incondicional que me conforta e me dá forças para seguir em busca de meus sonhos. A sua alegria, presença e entusiasmo contribuíram muito para que eu chegasse até aqui.

Ao meu sobrinho e afilhado, **Pietro**, “meu príncipe” que chegou para trazer ainda mais alegria e luz à nossa família. Seus sorrisos e gestos tornam mais felizes os meus dias. A dindinha te ama muito!

Ao meu cunhado, **Douglas**, pela presença, apoio, amizade e incentivo constantes.

Aos **amigos** de velhos tempos, de tempos recentes e aos eternos, agradeço simplesmente por serem meus amigos e por compartilharem momentos importantes da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente ao meu orientador, **Prof. Dr. Júlio César Nepomuceno**, por sua excelente orientação, que não se restringiu somente a essa dissertação. Sua atenção, sabedoria e dedicação foram fundamentais para a realização deste trabalho. Obrigada por me acolher desde a Graduação e auxiliar de forma tão importante no meu crescimento profissional.

Aos membros da banca examinadora, **Prof^a. Dr^a. Heloisa Helena Rodrigues de Andrade** e **Prof. Dr. Mário Antônio Spanó**, pela disponibilidade para a leitura deste trabalho, bem como pelas relevantes sugestões.

Ao **Dr. Ulrich Graf** do Instituto de Toxicologia da Universidade de Zurich, Suíça, pelo fornecimento das linhagens mutantes de *Drosophila melanogaster*.

Aos **professores** do Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia, pelos valiosos ensinamentos e pela significativa contribuição em minha formação científica.

Aos **colegas de Mestrado**, agradeço pela convivência, pelas experiências trocadas, pelos trabalhos e momentos compartilhados. Sobretudo, a **Rosiane Gomes da Silva**, uma nova amiga que Deus colocou em meu caminho e que esteve comigo em todas as horas. Sem sua companhia e amizade esse período certamente teria sido bem mais difícil.

A **Todos do Laboratório de Citogenética e Mutagênese** do Centro Universitário de Patos de Minas, por fazerem com que o trabalho se realizasse em clima de companheirismo e amizade. Em especial, à **Nayane Moreira Machado**, por seu grande auxílio na condução da parte experimental deste trabalho e à **Bethânia Cristhine de Araújo**, pelo auxílio, incentivo e amizade de sempre. Tenho em você um grande exemplo!

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico** – CNPq, pelo apoio financeiro.

Enfim, agradeço a **todas as pessoas** que contribuíram de forma direta ou indireta para o êxito deste trabalho.

***Ter chegado até aqui não foi uma conquista minha,
foi uma vitória nossa!***

APOIO FINANCEIRO

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Citogenética e Mutagênese do Centro Universitário de Patos de Minas – UNIPAM – Patos de Minas, MG.

Recebemos o apoio financeiro dos seguintes órgãos e instituições:

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

LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BH	<i>Balancer Heterozygous</i> - Heterozigoto balanceado
CDK	Quinase dependente de ciclinas
CYP	Citocromo P450
DDT	Para-diclorodifeniltricloroetano
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DXR	Doxorrubicina
FAS	Ácido graxo sintetase
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
<i>Flr</i> ³	<i>Flare</i> – Pêlo mutante em forma de chama
HB	<i>High bioactivation cross</i> - Cruzamento de alta bioativação
IMC	Índice de massa corporal
LATS1	Supressor de tumor humano
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
mM	Milimolar
MMC	Mitomicina C
MH	<i>Marker Heterozygous</i> - heterozigoto marcado
mg	Miligrama
mL	Mililitro
<i>mwh</i>	<i>Multiple wing hairs</i> – Pêlos múltiplos
ORR	Oregon R (R)
RNA	Ácido ribonucléico
SMART	<i>Somatic Mutation and Recombination Test</i>
ST	<i>Standard Cross</i> - Cruzamento padrão
<i>TM3 Bd</i> ^s	<i>Third Multiple3 Beaded Serrate</i>
Wts	Warts - tumor epitelial

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Frequência de manchas mutantes observadas nos descendentes trans-heterozigotos (MH) de <i>Drosophila melanogaster</i> , do cruzamento padrão (ST), tratados com diferentes concentrações de orlistat (2,4; 4,8 e 9,6 mg/mL), controle positivo (DXR 0,125 mg/mL) e controle negativo (etanol 5%).....	52
Tabela 2 - Frequência de manchas mutantes observadas nos descendentes trans-heterozigotos (MH) e heterozigotos balanceados (HB) de <i>Drosophila melanogaster</i> , do cruzamento de alta bioativação metabólica (HB), tratados com diferentes concentrações de orlistat (2,4; 4,8 e 9,6 mg/mL), controle positivo (DXR 0,125 mg/mL) e controle negativo (etanol 5%).....	53
Tabela 3 - Frequência de manchas mutantes observadas nos descendentes trans-heterozigotos marcados (MH) de <i>Drosophila melanogaster</i> , do cruzamento padrão (ST) e cruzamento de alta bioativação (HB), tratados com diferentes concentrações de orlistat associadas à DXR (0,125 mg/mL).....	54
Tabela 4 - Frequência de clones de tumor observados em <i>Drosophila melanogaster</i> , heterozigota para o gene supressor de tumor <i>wt</i> s, pré-tratada com mitomicina C (6 horas) e posteriormente tratada com diferentes concentrações de orlistat.....	55

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fases da Carcinogênese. (A), Iniciação; (B), Promoção; (C), Progressão.....	05
Figura 2 - Esquema geral do mecanismo de oncogênese, pela ativação de proto-oncogenes, mutação ou perda de genes supressores tumorais, ativação de genes antiapoptóticos e inativação de genes pró-apoptóticos.....	08
Figura 3 - Estrutura química da Doxorubicina.....	09
Figura 4 - Estrutura química da Mitomicina C.....	12
Figura 5 - Fórmula Estrutural do orlistat.....	14
Figura 6 - Mecanismo de ação do orlistat.....	15
Figura 7 - Principais efeitos do orlistat no organismo.....	16
Figura 8 - Casal de <i>Drosophila melanogaster</i> . À esquerda o macho (menor e com o pente sexual, indicado pela seta) e à direita a fêmea.....	18
Figura 9 - Pêlos <i>mwh</i> e <i>flr³</i> - Fotomicrografia, microscópio óptico de luz (aumento de 400x). (A) Pêlos <i>multiple wing hairs</i> ; (B) Pêlos <i>flare</i>	20
Figura 10 - Fenótipo das asas dos descendentes de <i>D. melanogaster</i> . (A) trans-heterozigotos, MH; (B) heterozigotos balanceados, BH.....	22
Figura 11 - Tumores <i>wt</i> s. (A) Tumor na asa; (B) Tumor no corpo; (C) Tumor na perna.....	24

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO.....	01
-------------------	----

CAPÍTULO 1

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1.1 Alterações genéticas e câncer.....	04
1.2 Doxorubicina (DXR).....	08
1.3 Mitomicina C (MMC).....	11
1.4 Orlistat (Xenical).....	13
1.5 Teste para detecção de Mutação e Recombinação Somática (<i>Somatic Mutation and Recombination Test- SMART</i>) em células de <i>Drosophila melanogaster</i>	18
1.6 Teste para a detecção de clones de tumor epitelial (<i>wt</i> s) em <i>Drosophila melanogaster</i>	23
REFERÊNCIAS.....	25

CAPÍTULO 2

RESUMO.....	34
ABSTRACT.....	35
1 INTRODUÇÃO.....	36
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	38
2.1 Agentes químicos.....	38
2.2 Teste para a Detecção de Mutação e Recombinação Somática (SMART) em células de <i>Drosophila melanogaster</i>	38
2.2.1 Linhagens estoque, cruzamentos e tratamento.....	38
2.2.2 Preparação e análise microscópica das lâminas	39
2.2.3 Análise estatística.....	40
2.3 Teste para detecção de tumor epitelial em <i>Drosophila melanogaster</i>	40

2.3.1	<i>Linhagens estoque, cruzamentos e tratamento.....</i>	40
2.3.2	<i>Análise das moscas.....</i>	41
2.3.3	<i>Análise estatística.....</i>	41
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	51
	REFERÊNCIAS.....	56

APRESENTAÇÃO

Os crescentes problemas de saúde humana decorrentes da exposição a agentes químicos, físicos e biológicos (naturais ou sintéticos), presentes no ambiente, associados à indução de alterações genômicas, apontam para a necessidade da adoção de medidas de proteção para as futuras gerações. Nesse contexto, testes genéticos tornam-se bastante úteis para o rastreamento de agentes capazes de induzir danos ao DNA, bem como para a tomada de decisões no que tange a proteção e/ou redução desses efeitos.

O orlistat, princípio ativo do Xenical, é um agente antiobesidade que atua sobre as lipases do trato gastrointestinal, reduzindo a absorção de gorduras. Foi o primeiro medicamento utilizado no controle da obesidade que não atua em nível do sistema nervoso central, mas sim, em nível gastrointestinal, promovendo a inibição das lipases gástrica e pancreática, responsáveis pela degradação da gordura obtida através do alimento.

Estudos preliminares mostraram que a absorção deste medicamento é quase nula e, ao ser utilizado de forma concomitante com dietas hipocalóricas, reduz as concentrações de lipídeos plasmáticos e, conseqüentemente, o peso corpóreo. Contudo, pode causar efeitos adversos como diarreia ou incontinência fecal, esteatorreia, dores abdominais, flatulência e redução na absorção das vitaminas lipossolúveis (A, D, E e K).

O orlistat é um potente inibidor da enzima ácido graxo sintetase (FAS), cuja atividade favorece o crescimento e sobrevivência de células cancerosas. Por isso, estudos têm sido conduzidos com o intuito de elucidar o efeito deste medicamento sobre o câncer. Entretanto, embora alguns dados iniciais revelem um possível efeito inibitório do orlistat sobre certos tipos de tumores, não são conhecidos resultados em longo prazo, assim como não há informações sobre o seu efeito sobre o DNA.

Devido ao grande consumo do orlistat pela população mundial e a facilidade de aquisição, já que não há exigência de receita médica, é fundamental

que seja avaliada a ação mutagênica e/ou carcinogênica associada à sua utilização.

Diante do exposto, este trabalho foi desenvolvido com o objetivo principal de avaliar os possíveis efeitos mutagênicos, recombinogênicos e/ou carcinogênicos do orlistat nas concentrações de 2,4; 4,8 e 9,6 mg/mL, por meio do teste para detecção de mutação e recombinação somática (SMART) em asas de *Drosophila melanogaster* e do teste para a detecção de clones de tumor epitelial (*Wts*), também realizado em *D. melanogaster*.

O presente trabalho está estruturado do seguinte modo:

O Capítulo I traz a fundamentação teórica, abordando aspectos preliminares necessários para a compreensão do assunto. Inicia-se a temática com a discussão sobre os aspectos genéticos envolvidos com a gênese e progressão do câncer. Na sequência são relatados os mecanismos de ação de drogas comprovadamente mutagênicas: a doxorubicina e a mitomicina C, utilizadas como controles positivos na pesquisa. Posteriormente, discute-se o uso e ação do orlistat (xenical), inibidor de lipase bastante utilizado no tratamento da obesidade. E, finalmente, os testes para detecção de mutação e recombinação somática e para detecção de clones de tumor epitelial em *D. melanogaster* são elucidados.

O Capítulo II apresenta o manuscrito intitulado “Avaliação do potencial mutagênico, recombinogênico e carcinogênico do Orlistat em células somáticas de *Drosophila melanogaster*”, que deverá ser enviado para publicação no periódico “Journal of Biosciences”.

CAPÍTULO I

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1.1 Alterações genéticas e câncer

Ao longo de sua existência, as células humanas sofrem alterações sutis e progressivas na sequência de DNA, denominadas mutações, que podem estar associadas a erros de duplicação ou à exposição dessas células a uma série de agentes mutagênicos (OJOPI; DIAS NETO, 2004).

A mutação gênica é a principal fonte de mudança evolutiva (LOURO et al., 2002). Através dela surgem alelos novos em todos os organismos, alguns espontaneamente, outros como resultado da exposição à radiação e a substâncias químicas presentes no ambiente (GRIFFITHS et al., 2006). As mutações mais comuns consistem na substituição, deleção ou inserção de um ou vários nucleotídeos em uma molécula de DNA. Entretanto, independente do tipo de mutação, ela origina uma troca na informação contida no gene e leva à síntese de uma proteína diferente da esperada ou à ausência de síntese (HIB; ROBERTIS, 2006).

Muitas mutações passam despercebidas, uma vez que não implicam em mudanças detectáveis na atividade metabólica da célula ou do organismo ou, podem determinar a morte celular e, por isso, também não são detectáveis. Quando não é letal para a própria célula, a mutação pode propagar-se pelo corpo em crescimento (mutação somática) ou transmitir-se às gerações subsequentes (mutação germinativa) (RABELLO-GAY; RODRÍGUEZ; MONTELEONE NETO, 1991).

Como já relatado, as mutações podem ser espontâneas ou induzidas por agentes químicos, físicos ou biológicos, denominados agentes mutagênicos (LOURO et al., 2002; GRIFFITHS et al., 2006). Os agentes mutagênicos, responsáveis por alterações na sequência de bases do DNA, podem acelerar o aparecimento de mutações, contribuindo para o surgimento de quadros neoplásicos (RIBEIRO; MARQUES, 2003). Ao longo de uma série de divisões, uma destas mutações pode alterar a função de um gene crítico para o câncer, fornecer uma vantagem no crescimento e multiplicação da célula que sofreu a

mutação e, conseqüentemente, permitir a expansão do clone derivado desta célula (OJOPI; DIAS NETO, 2004).

Nesse contexto, pode-se afirmar que efeitos mutagênicos e carcinogênicos estão intrinsecamente associados. Pesquisas recentes revelam que alterações em regiões específicas do DNA estão intimamente relacionadas aos processos carcinogênicos (WEISBURGER, 2000), em que a conversão de células normais em células neoplásicas abrange as etapas de iniciação, promoção e progressão (KVITKO, 2003), como mostra a Figura 1.

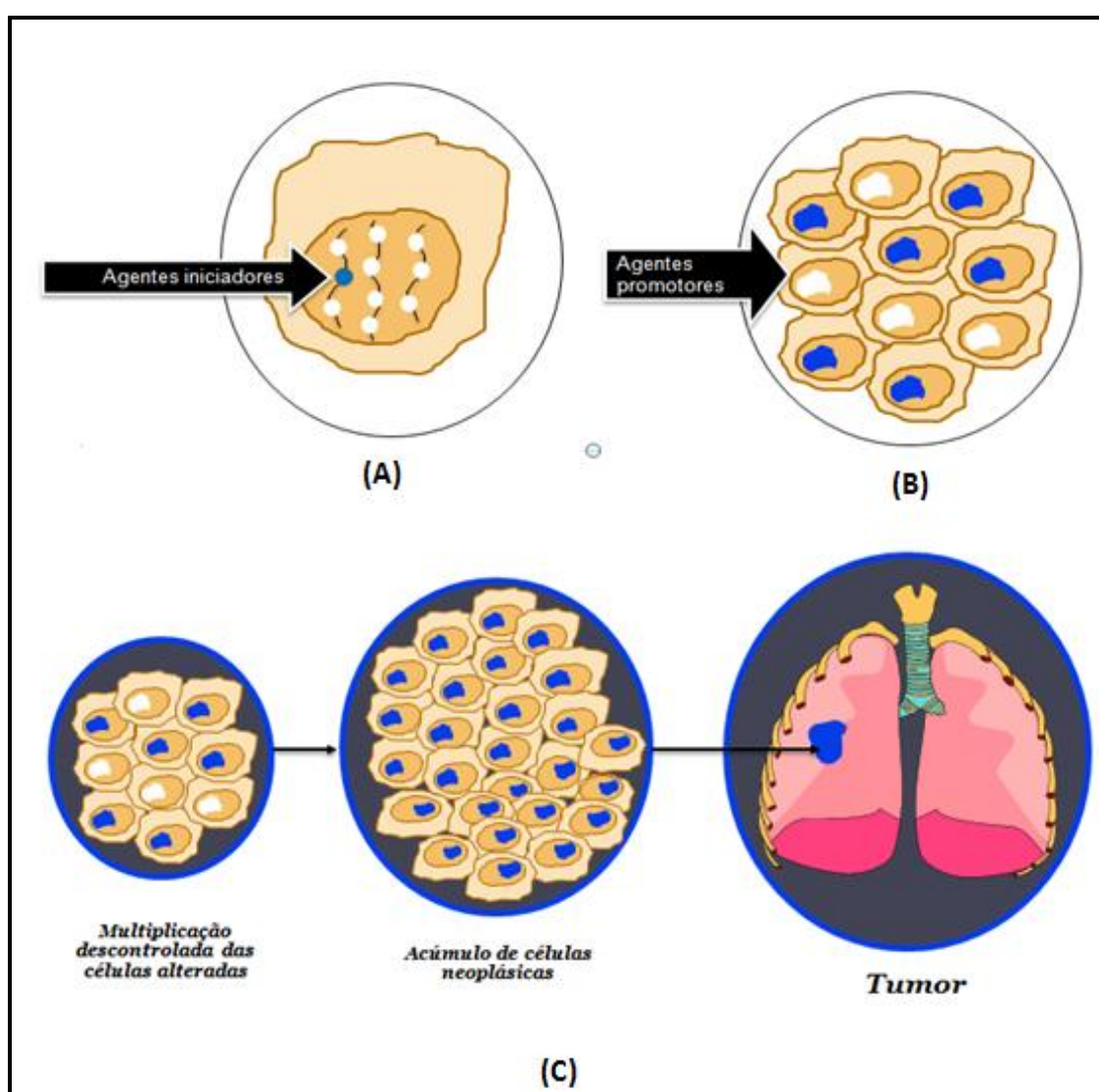


Figura 1- Fases da Carcinogênese. (A), Iniciação; (B), Promoção; (C), Progressão.

Fonte: Apresentação do Inca (2010).

Testes de mutagenicidade são frequentemente utilizados como indicadores para o câncer, uma vez que medem um evento inicial ou intermediário da tumorigênese. A mutação pode ser o estágio inicial pelo qual a maioria dos carcinógenos químicos inicia a formação do tumor (RIBEIRO; MARQUES, 2003). Assim, reconhece-se que a maioria dos agentes químicos tem ação mutagênica e, também, carcinogênica (ALBERTS et al., 2006).

Entretanto, considerando que existem diversos carcinógenos destituídos de atividade mutagênica, e que nem toda alteração no material genético é essencialmente uma mutação (ERDTMANN, 2003), sistemas testes foram desenvolvidos para avaliação de outro parâmetro de alteração genética - a recombinação mitótica - que também pode estar envolvida com a promoção do câncer mediada por agentes ambientais. Evidências recentes sugerem que a recombinação homóloga é um dos principais processos de alterações genéticas envolvidos com a gênese e progressão do câncer (ANDRADE; LEHMANN, 2003).

A recombinação ocorre durante o ciclo mitótico. Em células heterozigotas, esse processo, através da segregação de uma cromátide paternal e uma recombinante para o mesmo pólo, conduz à homozigose todos os genes localizados em posição distal ao ponto de permuta. Tal homozigose pode apresentar efeito carcinogênico pela redução da heterozigose constitucional de genes supressores de tumor. Desta forma, substâncias que induzem quebras no DNA ou que inibem sua replicação podem apresentar atividade carcinogênica, por estimularem a ocorrência de recombinação mitótica (ROSADA, 2009).

A carcinogênese química pode ser induzida por carcinógenos diretos ou indiretos. Parte considerável dos carcinógenos genotóxicos, que comprovadamente causam tumores em seres humanos é considerada pré-carcinógeno, isto é, são compostos instáveis em pH fisiológico e que, por isso, tornam-se incapazes de reagir com o DNA. Esses carcinógenos, para induzirem alterações no material genético, precisam ser biotransformados por enzimas como o citocromo P450 (CYP) (PINTO; FELZENSWALB, 2003).

Assim, substâncias biologicamente inativas podem ser introduzidas no organismo e convertidas em metabólitos ativos devido às alterações em sua estrutura. Entretanto, embora a finalidade da biotransformação dos xenobióticos

seja a detoxificação, nem sempre o metabólito é menos tóxico do que o próprio composto (GUECHEVA; HENRIQUES, 2003). O processo de biotransformação, especialmente a oxidação de substâncias pelo citocromo P450, pode gerar intermediários tóxicos, eletrofílicos, mutagênicos ou carcinogênicos (HODGSON; ROSE, 2007).

O câncer surge do acúmulo de mutações no DNA ao longo do tempo. As mais relevantes alterações associadas ao câncer ocorrem nos genes que controlam o processo de divisão celular, os proto-oncogenes, e nos genes supressores de tumor, resultando em crescimento descontrolado, característico de uma célula maligna (LOURO et al., 2002; PINTO; FELZENSWALB, 2003; GRIFFITHS et al., 2006). Além disso, há também o descontrole de genes envolvidos com o reparo de danos no DNA, os quais, quando inativos, podem elevar, expressivamente, a taxa de mutações nas células, acelerando o acúmulo de alterações relevantes para a tumorigênese (OJOPI; DIAS NETO, 2004).

Segundo Read e Donnai (2008), alguns genes supressores tumorais regulam diretamente a função dos proto-oncogenes (genes protetores-*gatekeepers*). Outros atuam de uma forma um pouco mais indireta, mantendo a integridade do genoma e corrigindo as mutações durante a divisão celular (genes de manutenção - *caretakers*). Genes apoptóticos e antiapoptóticos também são relevantes nesse processo. A inativação de um gene antiapoptótico permite um acúmulo excessivo de células, ao passo que a perda de função dos genes apoptóticos possui o mesmo efeito (Figura 2).

Uma característica importante comum a quase todas as células cancerosas é, portanto, a instabilidade genômica, causada por uma mutação herdada em genes que controlam a integridade do genoma ou mutações que são adquiridas em células somáticas durante o desenvolvimento do tumor. Estas alterações podem ocorrer em nível de nucleotídeos únicos, pequenos trechos de DNA, genes, componentes estruturais de cromossomos ou em nível de cromossomos completos (BALMAIN; GRAY; PONDER, 2003).

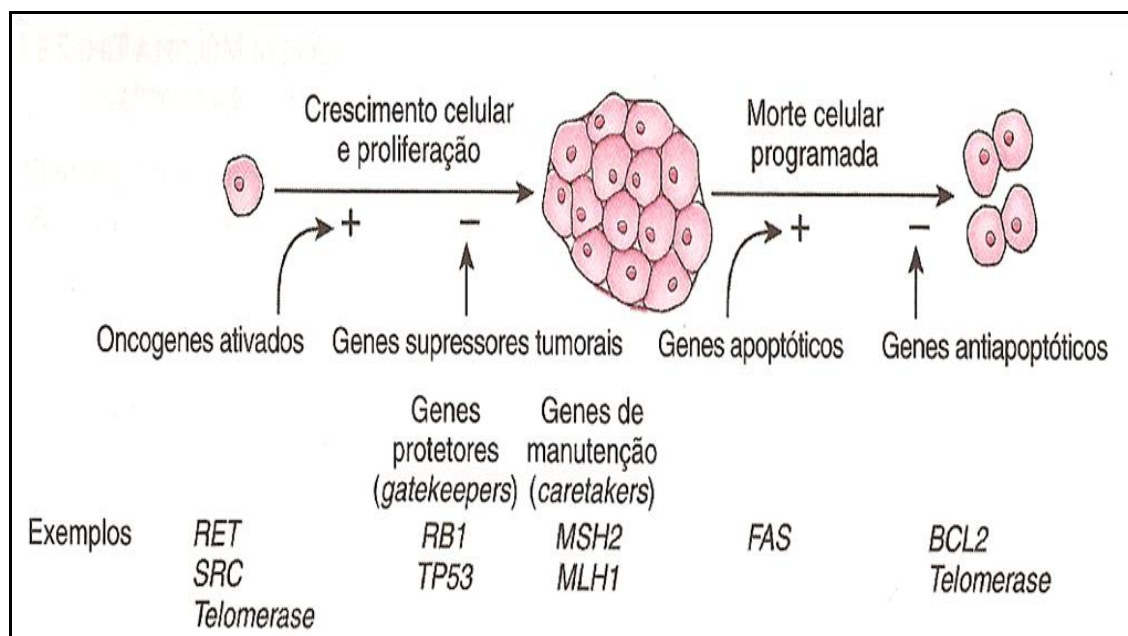


Figura 2- Esquema geral do mecanismo de oncogênese, pela ativação de proto-oncogenes, mutação ou perda de genes supressores tumorais, ativação de genes antiapoptóticos e inativação de genes pró-apoptóticos.

Fonte: Read; Donnai (2008).

As causas do câncer são diversas, incluindo fatores endógenos e exógenos. Ambos, entretanto, estão inter-relacionados. As causas exógenas associam-se ao meio ambiente e aos hábitos e costumes, incluindo fatores como alimentação, estilo de vida, tabagismo, exposição excessiva ao sol, entre outros. As causas endógenas, por sua vez, são, geralmente, pré-determinadas e estão ligadas à capacidade do organismo de se defender das agressões externas (LOURO et al., 2002; RIBEIRO; MARQUES, 2003).

1.2 Doxorrubicina (DXR)

A triagem de produtos antimicrobianos levou à descoberta de vários inibidores de crescimento, que se mostraram clinicamente úteis na quimioterapia do câncer (CHU; SARTORELLI, 2005). Dentre esses, estão os antibióticos

antraciclina, isolados por cepas de *Streptomyces peucetius* var. *caesius*, que caracterizam-se por elevada citotoxicidade (BITTENCOURT; BRUNSTEIN, 2004).

A doxorubicina, também conhecida como adriamicina, é um dos antineoplásicos pertencentes à classe das antraciclina de maior importância (CHU; SARTORELLI, 2005). Possui amplo espectro de atividade clínica contra neoplasias malignas hematológicas, bem como uma ampla variedade de tumores sólidos, como carcinomas de mama, endométrio, ovário, testículo, tireóide, estômago, fígado e pulmão (XU et al., 2001; MINOTTI et al., 2004; CHU; SARTORELLI, 2005; OLIVEIRA SÁ et al., 2009). Atua também em sarcomas de tecidos moles e em vários cânceres infantis. Contudo, sua aplicação é limitada em função de sua cardiotoxicidade (CHU; SARTORELLI, 2005).

Os antibióticos da classe das antraciclina possuem uma estrutura de anel tetracíclico fixada a um açúcar incomum, a daunosamina, unidos por ligações glicosídicas. Todos os agentes citotóxicos dessa classe possuem componentes quinona e hidroquinona em anéis adjacentes, que permitem a aquisição e perda de elétrons (HARDMAN; LIMBIRD; GILMAN, 2001). Quimicamente, a molécula de DXR consiste em um açúcar amino ligado a quatro anéis antraquinona cíclicos (XU et al., 2001), como pode ser observado na Figura 3.

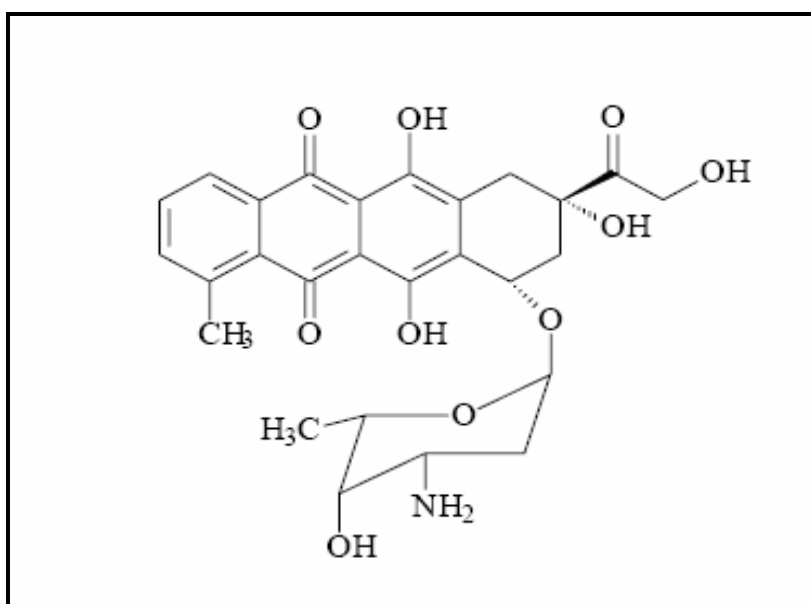


Figura 3- Estrutura química da Doxorubicina.

Fonte: Hardman; Limbird e Gilman (2001).

Todas as antraciclinas exercem suas atividades por meio de quatro mecanismos principais: (1) inibição da topoisomerase II; (2) ligação de alta afinidade com a molécula de DNA através da intercalação, com consequente bloqueio da síntese de DNA e RNA e ruptura das fitas de DNA; (3) ligação às membranas celulares, com alteração de sua fluidez e transporte de íons; (4) produção de radicais livres da semiquinona e radicais livres de oxigênio altamente reativos e tóxicos (CHU; SARTORELLI, 2005).

A doxorrubicina, portanto, possui diversos efeitos citotóxicos. Porém, sua principal ação associa-se a um efeito sobre a topoisomerase II, uma DNA girase de atividade intensa em células em proliferação (RANG et al., 2007). A DXR inibe a atividade da topoisomerase II, levando a quebras na cadeia de DNA (HARDMAN; LIMBIRD; GILMAN, 2001; BITTENCOURT; BRUNSTEIN, 2004).

Ao intercalar-se com a molécula de DNA, a DXR inibe a síntese de DNA e de RNA DNA-dependente (BRUNTON, 2006). É, portanto, reconhecido o papel genotóxico da DXR, bem como sua ação carcinogênica (HARDMAN; LIMBIRD; GILMAN, 2001; TRIPATHI, 2006). Sua ação máxima é exercida na fase S do ciclo celular, sendo, porém, a sua toxicidade habitualmente exibida na fase G₂ (SIKIC, 2005; TRIPATHI, 2006).

A DXR também se liga às membranas celulares, sendo capaz de modificar suas funções e atuar como agente aceitor ou doador de elétrons, gerando radicais livres que atuam como potentes agentes alquilantes, em tecidos normais e malignos. Além disso, a molécula reage com a citocromo P450 redutase, na presença de NADPH, para produzir ânions de radicais superóxidos, que podem gerar peróxido de hidrogênio e radicais hidroxila, altamente destrutivos para as células (HARDMAN; LIMBIRD; GILMAN, 2001). Esse tipo de interação sugere um mecanismo alternativo de citotoxicidade para as antraciclinas. Em particular, a cardiotoxicidade das antraciclinas pode resultar da produção de radicais livres de oxigênio (SIKIC, 2005).

A intrínseca ligação entre inibição de topoisomerasas, bloqueio da replicação do DNA e indução de quebras duplas, associadas ao fato de que este último evento representa um dos principais substratos para a ocorrência de

recombinação, colocam essa droga, também, como potente agente recombinogênico (LEHMANN, 2003).

A DXR é administrada por infusão intravenosa. O extravasamento no local da injeção pode causar necrose local (GRAHAME-SMITH; ARONSON, 2002). A dose recomendada é de 50 a 75mg/m², administrada na forma de infusão intravenosa rápida e única, repetida depois de 21 dias (HARDMAN; LIMBIRD; GILMAN, 2001). A dose total normalmente não deve ultrapassar 600mg/m², em decorrência dos efeitos adversos sobre o coração (GRAHAME-SMITH; ARONSON, 2002). As antraciclinas, de maneira geral, são metabolizadas no fígado, com redução e hidrólise dos substituintes dos anéis (CHU; SARTORELLI, 2005).

As toxicidades mais importantes causadas pela DXR afetam o coração e a medula óssea (SIKIC, 2005). A princípio os efeitos manifestam-se através de arritmias e hipotensão reversíveis e, mais tardiamente, através de insuficiência cardíaca congestiva (relacionada com a dose total administrada). Outros efeitos adversos consistem na depressão da medula óssea, alopecia, estomatite, vômitos e lesão tecidual local (TRIPATHI, 2006).

1.3 Mitomicina C (MMC)

As mitomicinas são quinonas com atividade antibiótica e antitumoral, de uso clínico reconhecido, produzidas por culturas de alguns tipos de fungos. A mitomicina C (MMC) é a mais conhecida do grupo, sendo utilizada na quimioterapia de alguns tipos de tumores sólidos (SILVA; FERREIRA; SOUZA, 2003).

A MMC é um antibiótico natural e citotóxico derivado de *Streptomyces caespitosus*, que suprime a proliferação de células de crescimento rápido através da inibição da síntese de DNA secundária à alquilação (ESCARIÃO et al., 2008). Apresenta-se sob a forma de cristais azul-violeta, possui peso molecular de 334 e é solúvel em água e solventes orgânicos. Sua molécula é formada por três grupos

reconhecidamente carcinostáticos: um anel de aziridina, o grupo quinona e o grupo octano (RIBEIRO et al., 2003), como mostra a Figura 4.

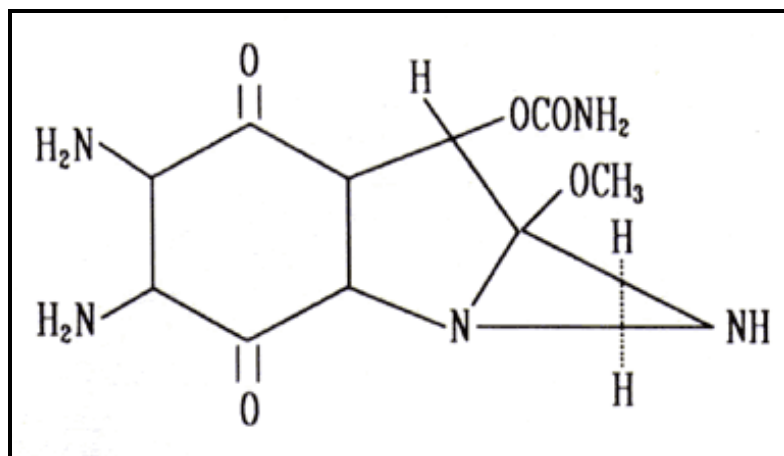


Figura 4- Estrutura química da Mitomicina C.

Fonte: < http://intranet.matematicas.uady.mx/portal/leamos_ciencia>

A MMC é ativada intracelularmente através da ação de redutases que formam um agente alquilante bifuncional ou trifuncional, estabelecendo ligações cruzadas com o DNA, fator esse que inibe a sua síntese e, em menor grau, a síntese de RNA. Desse modo, a MMC inibe a divisão celular, a síntese protéica e a proliferação de fibroblastos, agindo também sobre o processo de cicatrização (KOROLKOVAS; FRANÇA, 2008). Seu mecanismo de ação mimetiza a radiação ionizante com uma ação que se prolonga após a interrupção do tratamento (SILVA; FERREIRA; SOUZA, 2003).

Além desses efeitos, os metabólitos que alquilam o DNA, através de ligações cruzadas, favorecem também a produção de superóxidos, que promovem danos de caráter oxidativo ao DNA (ALMEIDA et al., 2005; CHU; SARTORELLI, 2005). Diversos trabalhos têm evidenciado que a ativação redutiva da MMC resulta na formação de intermediários reativos capazes de se ligar ao DNA por meio de ligações cruzadas entre duas fitas complementares. Considera-se que a ativação biológica da MMC ocorre após redução monoeletrônica, com a formação de um ânion radical, ou redução bieletrônica, com a formação da hidroquinona (OLIVEIRA; ALVES, 2002).

A mitomicina é um pró-fármaco, que deve ser modificado dentro da célula antes que atue como um agente alquilante. Exige enzimas intracelulares específicas para gerar seus intermediários ativos, que também são afetados pelo nível de pH no local. Isso provavelmente explica sua seletividade para certos tumores sólidos e sua capacidade de inibir o crescimento de células fibroblásticas. O primeiro uso em humanos para inibir a proliferação de fibroblastos foi em oftalmologia, em 1988, onde foi demonstrado que reduz significativamente a taxa de recorrência do pterígio. Desde então, tem sido muito utilizada (SENDERS, 2004).

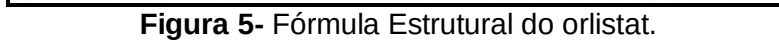
As células tronco tumorais hipóxicas de tumores sólidos encontram-se em um ambiente favorável a reações redutoras e, por isso, são mais sensíveis às ações citotóxicas da mitomicina do que as células normais e as células tumorais oxigenadas (CHU; SARTORELLI, 2005).

A MMC é utilizada como agente quimioterápico no tratamento de vários tumores humanos, em aplicações endovenosas, para tratamento de corioepitelioma, sarcoma de células reticulares, seminoma e tumores epiteliais, além de tumores da cavidade bucal, pulmões, intestino, pâncreas e estômago (BRADNER, 2001; ABBAS et al., 2002; RIBEIRO et al., 2003). Vários trabalhos na literatura confirmam a eficácia desse agente como inibidor do crescimento tumoral, pela sua ação direta sobre o DNA. Contudo, seu uso tem sido limitado em razão dos efeitos colaterais, tais como mielossupressão, fibrose do tecido pulmonar, danos gastrintestinais e renais (OLIVEIRA; ALVES, 2002; RANG et al., 2007).

Estudos anteriores têm mostrado que a MMC induz, também, aberrações cromossômicas, mutações dominantes letais e de danos ao DNA de espermatogônias (NAKAGAWA; MORI, 2003).

1.4 Orlistat (Xenical)

O orlistat (Figura 5), medicamento comercializado pela Companhia Farmacêutica Roche como Xenical, é o análogo semissintético mais estável e



Fonte: <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Orlistat_Structural_Formulae.png>.

atualmente, figura como a única droga dessa categoria (inibidor de lipase)

amilase e fosfolipase (AL-SUWAILEM et al., 2006). Devido à mínima absorção, o orlistat não possui efeitos sistêmicos (BRAY, 2009; KAZMI et al., 2009).

O orlistat liga-se de maneira irreversível no sítio ativo das lipases, enzimas que catalisam a remoção hidrolítica dos ácidos graxos presentes nos triglicérides, produzindo ácidos graxos livres e monoglicérides, através de ligação covalente (Figura 6). O fármaco reage de forma específica com um resíduo de serina da lipase pancreática (BALLINGER; PEIKIN, 2002; SILVA et al., 2002).

Ao se ligar ao sítio ativo da lipase, o orlistat forma um complexo estável que induz uma mudança conformacional na enzima, expondo o seu sítio ativo catalítico. Esta operação leva a acilação de um grupo hidroxila na carga de resíduos de serina no sítio ativo da enzima, tornando-o inativo. A lipase inativada é incapaz de hidrolisar gorduras em ácidos graxos e monoglicerídeos (HADVARY et al., 1988 *apud* AL-SUWAILEM et al., 2006). Sendo assim, cerca de um terço dos triglicérides ingeridos permanecem não digeridos e não são absorvidos pelo intestino delgado, atravessando o trato gastrointestinal, sendo eliminados juntamente com as fezes (MANCINI; HALPERN, 2002).

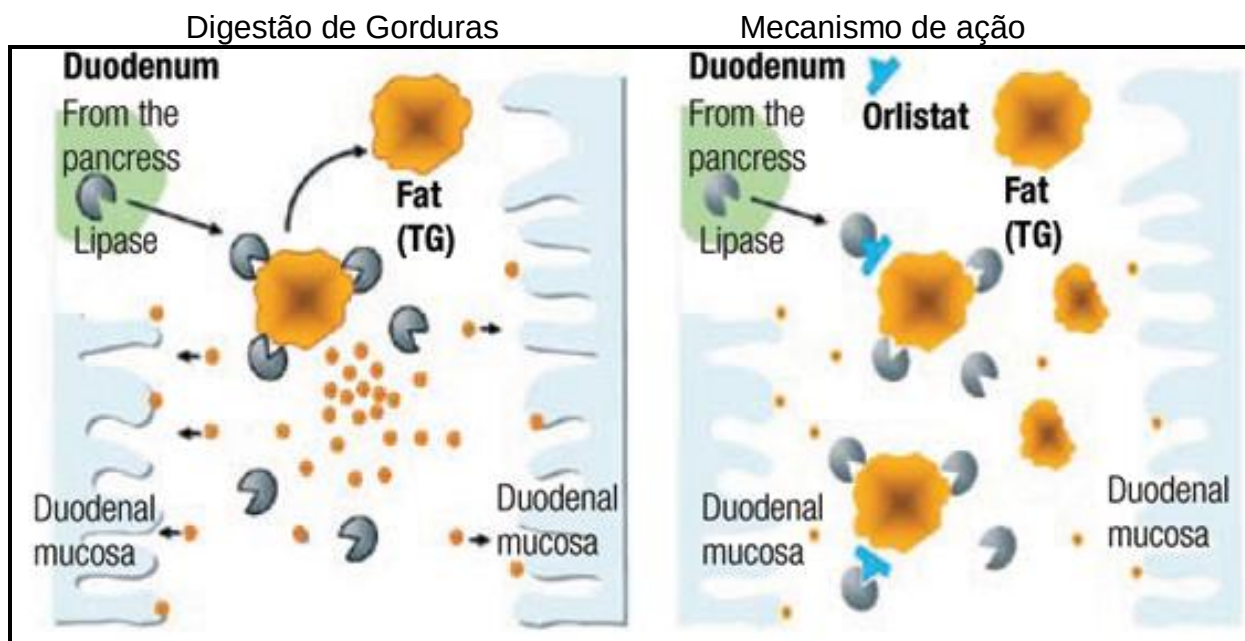


Figura 6- Mecanismo de ação do orlistat.

Fonte: Coutinho (2009).

O orlistat não possui efeito sobre circuitos neuronais reguladores do apetite (MANCINI; HALPERN, 2002). Sua ação resume-se, basicamente, ao bloqueio da digestão dos triglicérides dietéticos ingeridos, sendo a perda de peso geralmente dependente da dose administrada. Os demais efeitos da droga associam-se principalmente à redução do colesterol total, colesterol LDL e da concentração plasmática de insulina, auxiliando no controle dos fatores de risco cardiovasculares (FORTES et al., 2006; RISCHELSEN et al., 2007).

Segundo Coutinho (2009), a redução observada em triglicérides e nos níveis de colesterol em doentes tratados com orlistat é mais de 10% superior ao esperado para a perda de peso por si só. A Figura 7 mostra resumidamente os principais efeitos do orlistat no organismo.

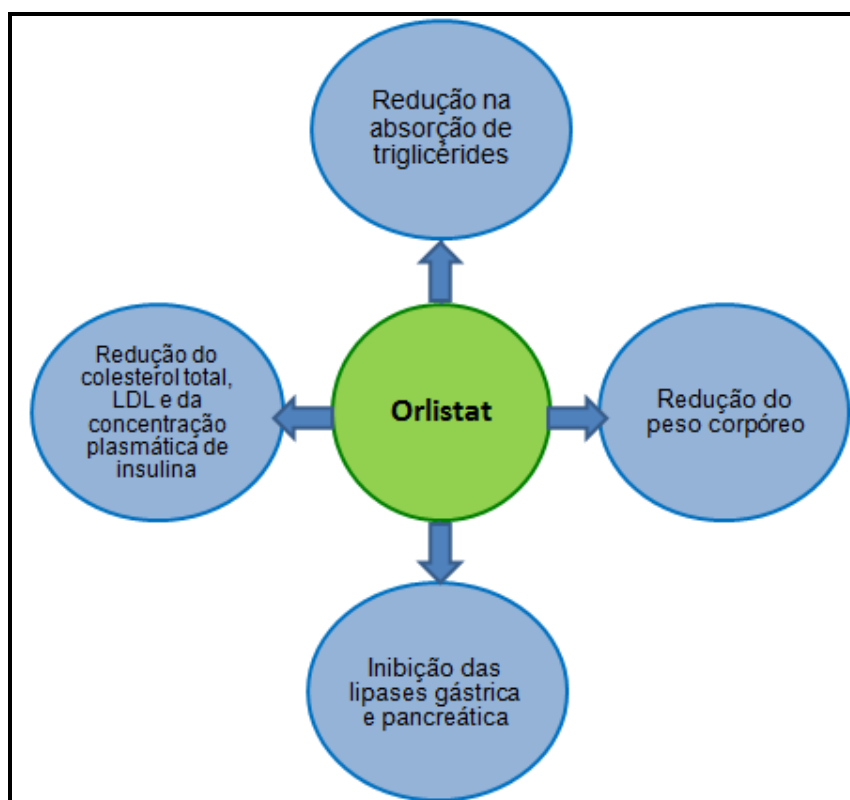


Figura 7- Principais efeitos do orlistat no organismo.

Fonte: Adaptado de Fortes et al. (2006).

Baseado em dados obtidos em animais, é provável que o metabolismo de orlistat ocorra principalmente na parede gastrointestinal. Dois metabólitos foram identificados em concentrações plasmáticas mínimas: M1 e M3. O

metabólito M1 é um produto da hidrólise do anel beta-lactâmico do orlistat e o M3 resulta da clivagem da cadeia lateral da N-formil leucina (BALLINGER; PEIKIN, 2002; SILVA et al., 2002).

A dose recomendada de orlistat é de 360 mg/dia dividida em três doses diárias de 120 mg (MANCINI; HALPERN, 2002; BRAY, 2009). Durante o uso é necessário realizar um aconselhamento dietético, já que a droga deve ser utilizada juntamente com dieta hipoenergética, com controle na ingestão de lipídios (máximo de 25-30% de gordura) (FORTES et al., 2006).

Dentre os principais efeitos adversos associados ao uso do orlistat destacam-se a esteatorréia, urgência fecal, aumento no número de evacuações por dia, incontinência fecal, flatulência, flatos com descarga oleosa, náusea, vômitos e dores abdominais. O uso do orlistat também se associa à redução dos níveis séricos de vitaminas lipossolúveis (A, D, E e K), decorrentes da esteatorréia (associada ao próprio mecanismo de ação dessa droga) e, além disso, caso a ingestão de gordura seja exacerbada, podem ocorrer diarreias e incontinência fecal, também interferindo na absorção de vitaminas lipossolúveis. Nesses casos é necessária uma recomendação dietética e/ou uma suplementação medicamentosa suficiente para retornar esses valores à normalidade (GALVÃO; KOHLMANN Jr., 2002; KIORTISIS et al. 2005; FORTES et al., 2006; COUTINHO, 2009).

Interesse científico tem sido gerado pela caracterização do orlistat como inibidor do crescimento de alguns tumores, como o de próstata e mama. Tem sido demonstrado que essa droga apresenta propriedades antiproliferativa e antitumoral para células de câncer de próstata e mama em virtude da sua capacidade de bloquear a atividade da enzima ácido graxo sintetase (FAS) (MENENDEZ; VELLON; LUPU, 2005). Segundo Kridel et al. (2004) em virtude da sua capacidade de inibir a síntese de ácidos graxos, o orlistat paralisa a proliferação das células tumorais, induzido a apoptose e inibindo o crescimento tumoral.

Pesquisas sobre os inibidores farmacológicos da FAS sugerem que essa enzima pode representar uma ponte de ligação molecular entre a obesidade e o câncer (MENENDEZ; VELLON; LUPU, 2005).

1.5 Teste para detecção de Mutação e Recombinação Somática (*Somatic Mutation and Recombination Test- SMART*) em células de *Drosophila melanogaster*

A *Drosophila melanogaster*, popularmente conhecida como mosca das frutas (Figura 8), é um organismo eucarioto largamente utilizado pelos pesquisadores por ser de fácil manutenção em laboratório, ter um ciclo reprodutivo curto (10-12 dias a 25°C), fornecer um grande número de indivíduos por progênie, possuir baixo número de cromossomos e apresentar reações metabólicas semelhantes às dos mamíferos (GRAF et al., 1984). Além dessas características, fornece informações sobre mutações, ecologia e comportamento (FONSECA; PEREIRA, 2004).



Figura 8- Casal de *Drosophila melanogaster*. À esquerda o macho (menor e com o pente sexual, indicado pela seta) e à direita a fêmea.

Fonte: <arrogantscientist.wordpress.com>.

Testes bem definidos para verificação da mutagenicidade/ antimutagenicidade de agentes físicos e químicos são desenvolvidos em *D. melanogaster*, os quais são capazes de medir um amplo espectro de danos genéticos induzidos em células germinativas, assim como em células somáticas.

Dentre esses testes destaca-se o SMART (*Somatic Mutation and Recombination Test*), desenvolvido por Graf et al. (1984).

O teste SMART em asas de *D. melanogaster* fundamenta-se na premissa de que alterações genéticas provocadas em células que estão se dividindo por mitose induzem o aparecimento de manchas mutantes, que originam a perda de heterozigose em células heterozigotas para genes marcadores recessivos. A análise dos possíveis danos induzidos é realizada através da observação de grupos de células (clones mutantes), na superfície das asas de moscas adultas, que expressam fenotipicamente os genes marcadores *mwh* ou *flr*³ responsáveis por alterações na forma dos pêlos (GRAF et al., 1984; GUZMÁN-RINCÓN; GRAF, 1995).

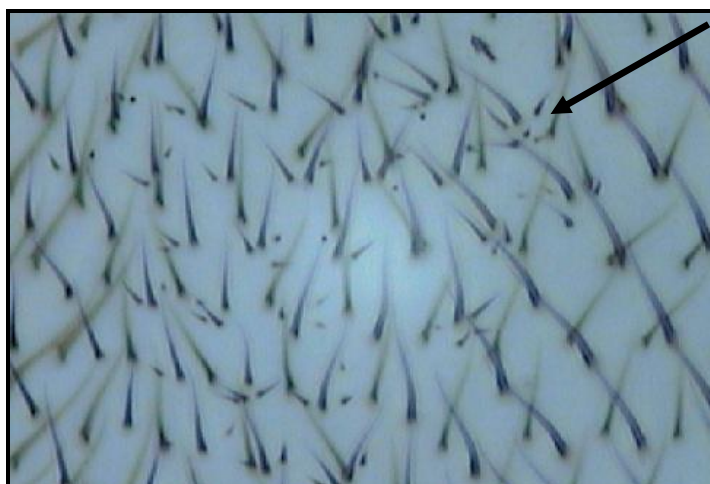
O SMART detecta diferentes tipos de manchas mutantes que podem ser resultantes de eventos como mutação, deleção ou recombinação mitótica, além do fato de ser um teste rápido, sensível e de menor custo (GRAF et al., 1984; VOGEL, 1987).

No teste para detecção de mutação e recombinação somática em células de *D. melanogaster* são utilizadas três linhagens:

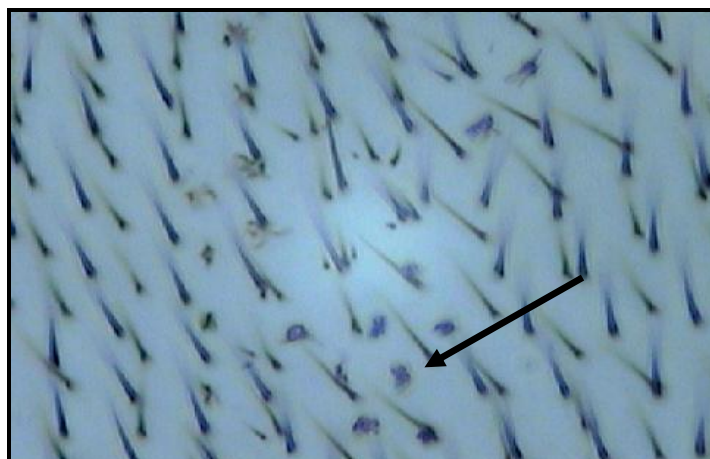
- *Linhagem multiple wing hairs (mwh/mwh)*: os indivíduos dessa linhagem possuem o gene marcador *mwh* no cromossomo 3 (3-0,3) em uma posição distal. Na presença desse alelo mutante as células da asa de *D. melanogaster*, que normalmente caracterizam-se por apresentar um único pêlo, apresentarão dois ou mais pêlos por célula (Figura 9, A). Por ser uma mutação viável, a linhagem estoque é mantida em homozigose recessiva.

- *Linhagem flare 3 (flr*³*)*: os indivíduos dessa linhagem possuem o gene marcador *flr*³ localizado no cromossomo 3 (3-38,8) em uma posição mais proximal em relação ao centrômero. O fenótipo provocado por esse alelo mutante é um pêlo mal formado que se assemelha a uma chama (Figura 9, B). O gene marcador *flr*³ é letal em homozigose, não se desenvolvendo até a fase adulta. Devido à letalidade, esse alelo é mantido na linhagem estoque na presença de um balanceador cromossômico (*TM3, Bd*^S), que se caracteriza por múltiplas inversões (GRAF et al., 1984).

- *Linhagem ORR (Oregon R, flare³)*: os indivíduos pertencentes a essa linhagem possuem a mesma constituição genética dos indivíduos que pertencem à linhagem *flare³*, porém, diferem por apresentar os cromossomos 1 e 2 provenientes da linhagem Oregon R resistente ao DDT, com alta expressividade das enzimas citocromo P450 (GRAF; VAN SCHAIK, 1992). Essa linhagem de *D. melanogaster* foi criada com o objetivo de aumentar o desempenho do SMART de asas no caso da ativação de pró-mutágenos dependentes de ativação via citocromo P450 (ANDRADE; LEHMANN, 2003).



(A)



(B)

Figura 9- Pelos *mwh* e *flr³*- Fotomicrografia, microscópio óptico de luz (aumento de 400x). (A) Pêlos *multiple wing hairs*; (B) Pêlos *flare*.

Dois cruzamentos são utilizados para a realização do SMART:

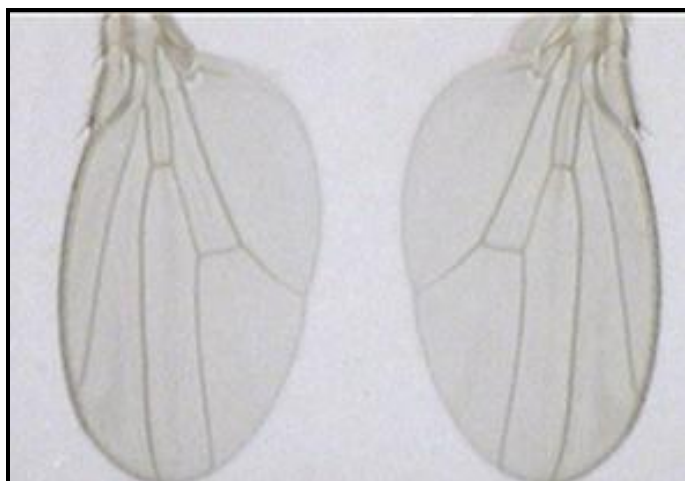
(1) Cruzamento Padrão (ST- *Standard Cross*): fêmeas virgens *flr³/ln(3LR)TM3, ri pp sep l(3)89Aa bx^{34e}* e *Bd^s* cruzadas com machos *mwh/mwh* (GRAF et al., 1989).

(2) Cruzamento de Alta Capacidade de Bioativação (HB - *High Bioactivation Cross*): fêmeas virgens *ORR/ORR; flr³/ln(3LR)TM3,ri p⁰sep l(3)89Aa bx^{34e}* e *Bd^s* cruzadas com machos *mwh/mwh* (GRAF; VAN SCHAIK, 1992).

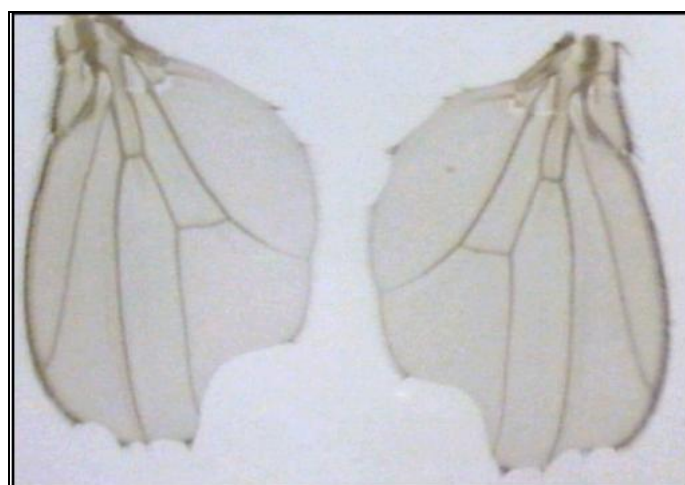
O cruzamento ST é útil na detecção de agentes genotóxicos diretos, ao passo que o cruzamento HB (que utiliza a linhagem *ORR*) é empregado na detecção de agentes genotóxicos indiretos (pró-mutágenos), que necessitam de ativação pelo citocromo P450.

Desses cruzamentos são obtidos dois tipos de descendentes: trans heterozigotos (MH) e heterozigotos balanceados (BH). Os MH (*mwh+/+flr³*) apresentam cromossomos estruturalmente normais, sendo as asas fenotipicamente caracterizadas por borda lisa, enquanto que os BH (*mwh+/+ TM3, Bd^s*) apresentam um cromossomo balanceador, com múltiplas inversões, (*TM3, Bd^s*), caracterizando-se fenotipicamente pela presença de asas com borda serrilhada (GUZMÁN-RINCÓN; GRAF, 1995), como mostra a Figura 10.

Nos adultos emergentes MH são detectados diferentes efeitos genéticos, tais como mutações de ponto, deleções e recombinação mitótica. Esses eventos levam à formação de manchas simples (*mwh* ou *flr³*) ou gêmeas (*mwh* e *flr³*) nas asas de *D. melanogaster*. As manchas simples podem ocorrer em decorrência de eventos mutacionais e/ou recombinogênicos, ao passo que as manchas gêmeas refletem apenas eventos recombinogênicos. Nos adultos emergentes da progênie BH, devido à presença do balanceador *TM3/Bd^s*, é inviabilizada a ocorrência de eventos recombinogênicos e, por isso, apenas eventos mutacionais levam à formação de manchas mutantes nesses descendentes (GRAF et al., 1984).



(A)



(B)

Figura 10- Fenótipo das asas dos descendentes de *D. melanogaster*. (A) trans-heterozigotos, MH; (B) heterozigotos balanceados, BH.

O Teste para a Detecção de Mutação e Recombinação Somática, nos últimos anos, tem sido bastante utilizado e tem se mostrado muito eficiente, tanto na análise de mutagenicidade, como na identificação de antimutagenicidade de agentes químicos, físicos e biológicos (COSTA; NEPOMUCENO; 2006; FRAGIOREGE et al., 2007; CASTRO et al., 2008; DIAS et al., 2009; DUTRA et al., 2009).

1.6 Teste para a detecção de clones de tumor epitelial (*wt*s) em *Drosophila melanogaster*

A conservação evolutiva de genes supressores de tumor entre *Drosophila* e mamíferos tem estimulado estudos relacionados à indução e desenvolvimento de tumores em *Drosophila*, estudos estes que podem contribuir diretamente para o entendimento de cânceres em seres humanos (POTTER; TURENCHALK; XU, 2000). Em adição, numerosos proto-oncogenes e supressores de tumores de mamíferos possuem homologia com genes presentes nesse organismo teste (EEKEN et al., 2002). Dentre eles, destaca-se o *wt*s.

O gene *wt*s (também referido como *lats*) foi identificado por sua habilidade como um supressor de tumor em *Drosophila* (NISCHIIYAMA et al., 1999). A deleção desse gene leva a formação de clones de células que são circulares e consideravelmente invasivas, chamadas literalmente de verrugas (*Warts*), que se desenvolvem por todo o corpo da mosca (JUSTICE et al., 1995).

Nas larvas de *Drosophila* os discos imaginais são formados por uma única camada de células, que durante a metamorfose se desenvolve nas estruturas da mosca adulta. As células desse disco possuem o controle do ciclo celular bastante similar ao de células somáticas em mamíferos. A progressão do ciclo celular é controlada por ciclinas (tipos A, B, D e E) e quinases (CDK1, CDK2, CDK4 e CDK6, principalmente) (EEKEN et al., 2002).

Em todas as células eucariotas o ciclo celular é controlado pela ativação e inativação sucessiva de diferentes complexos ciclina-CDKs. As ciclinas recebem esse nome porque no curso de cada ciclo celular alternam um período de síntese crescente, seguido por outro de rápida degradação. Essas ciclinas são ativadoras de enzimas quinases dependentes de ciclinas (CDKs), que têm característica constitutiva. Ao interagir com as ciclinas, as CDKs fosforilam e ativam as moléculas responsáveis pela divisão celular (HIB; ROBERTIS, 2006).

Um homólogo mamífero de verrugas, chamado LATS1, foi isolado e estudado extensivamente (NISCHIIYAMA et al., 1999; TAO et al., 1999; KAMIKUBO et al., 2003). A introdução de LATS1 humano em verrugas mutantes

de *Drosophila* poderia impedir a formação de tumores, apoiando seu desenvolvimento normal, o que demonstra que as funções destes genes são conservadas entre moscas e seres humanos (KAMIKUBO et al., 2003). A proteína codificada por esse gene em *Drosophila* possui um domínio catalítico serina/treonina quinase muito similar ao de humanos (IIDA et al., 2004). Esse domínio é importante na progressão do ciclo celular, especificamente na mitose. O LATS1 constitui um autêntico homólogo de verrugas de *Drosophila* e apresenta funções cruciais na regulação do crescimento celular (NISHIYAMA et al., 1999).

Os tumores na linhagem *wts* podem aparecer praticamente em todo o corpo da mosca: cabeça, olhos, corpo (tórax e abdome), pernas, asas e halteres, como pode ser observado na Figura 11.

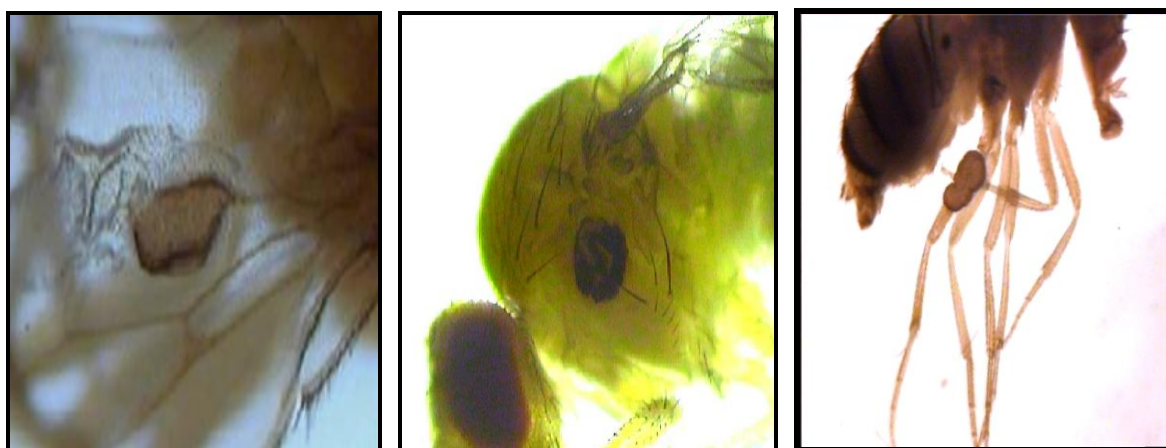


Figura 11- Tumores *wts*. (A)- Tumor na asa; (B) Tumor no corpo; (C) Tumor na perna.

O marcador *wts* é uma mutação recessiva letal em homozigose nos zigotos. Devido à letalidade, esse alelo é mantido na linhagem estoque com a presença de um balanceador cromossômico (*TM3*). Por meio do cruzamento entre linhagens *wts/TM3* com *multiple wing hairs (mwh/mhw)* são obtidas larvas heterozigotas (*wts/+*). A perda da heterozigose nas células do disco imaginal da *Drosophila* ocasiona a formação de clones homozigotos (viável em conjuntos de células isoladas) da larva, que se manifestam como tumores na mosca adulta (SIDOROV et al., 2001).

REFERÊNCIAS

ABBAS, T.; OLIVIER, M.; LOPEZ, J.; HOUSER, S.; XIAO, G.; KUMAR, G. S.; TOMASZ, M.; BARGONETTI, J. Differential activation of p53 by the various adducts of mitomycin C. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 43, p. 40513–40519, 2002.

ALBERTS, B. ; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J. D. **Fundamentos da biologia celular**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2006.

ALMEIDA, V. L. de.; LEITAO, A.; REINA, L. C. B.; MONTANARI, C. A.; DONNICI, C. L. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 118-129, 2005.

AL-SUWAILEM, A. K.; AL-TAMIMI, A.S., AL-OMAR M. A.; AL-SUHIBANI, M. S. Safety and mechanism of action of orlistat (tetrahydrolipstatin) as the first local antiobesity drug. **Journal of Applied Sciences Research**, v. 2, n. 4, p. 205-208, 2006.

ANDRADE, H. H. R. de; LEHMANN, M. **Teste para detecção de mutação e recombinação somática em *Drosophila melanogaster***. In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. Mutagênese ambiental. Canoas: Ulbra, 2003. Cap.11. p.281-307.

BALLINGER, A.; PEIKIN, S.R. Orlistat: its current status as an anti-obesity drug. **European Journal of Pharmacology**, n. 440, p. 109– 117, 2002.

BALMAIN, A.; GRAY, J.; PONDER, B. The genetics of genomics of cancer. **Nature Genetics supplement**, v. 33, p. 238-244, 2003.

BITTENCOURT, H. N. S.; BRUNSTEIN, C. G. **Fármacos antineoplásicos**. In: FUCHS, F.D.; WANNMACHER, L.; FERREIRA, M.B. Farmacologia clínica: fundamentos da terapêutica racional. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. Cap.42. p. 512-531.

BRADNER, W. T. Mitomycin C: a clinical update. **Cancer Treatment Reviews**, v. 27, n. 1, p. 35-50, feb. 2001.

BRAY, G. A. Medications for Obesity: mechanisms and applications. **Clinics In Chest Medicine**, v. 30, p. 525–538, 2009.

BRUNTON, L. L. **Goodman & Gilman**: as bases farmacológicas da terapêutica. 11. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2006.

CASTRO, A. J. S.; GRISÓLIA, C. K. ; ARAÚJO, B. C.; DIAS, C. D.; DUTRA, E. S.; NEPOMUCENO, J. C. Recombinogenic effects of the aqueous extract of pulp from pequi fruit (*Caryocar brasiliense Camb*) on somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Genetics and Molecular Research**, v. 7, p. 1375-1383, 2008.

CHU, E.; SARTORELLI, A. C. **Quimioterapia do câncer**. In: KATZUNG, B. G. Farmacologia básica e clínica. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. Cap. 55. p.751-777.

COSTA, W. F.; NEPOMUCENO, J. C. Protective effects of a mixture of antioxidant vitamins and minerals on the genotoxicity of doxorubicin in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 47, p.18-24, 2006.

COUTINHO, W. The first decade of sibutramine and orlistat: a reappraisal of their expanding roles in the treatment of obesity and associated conditions. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 53, n. 2, p. 262-270, 2009.

DIAS, C. D.; ARAÚJO, B. C.; DUTRA, E. S.; NEPOMUCENO, J. C. Protective effects of β -carotene against the genotoxicity of doxorubicin in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Genetics and Molecular Research**, v. 8, n. 4, p.1367-1375, 2009.

DUTRA, E. S.; CASTRO, A. J. S.; DIAS, C. D.; NEPOMUCENO, J. C. Effect of organic tomato (*Lycopersicon esculentum*) extract on the genotoxicity of doxorubicin in the *Drosophila* wing spot test (SMART). **Genetics and Molecular Biology**, v. 32, p. 134-152, 2009.

EEKEN, J. C. J.; KLINK, I.; VEEN, B. L. V; FERRO, W. Induction of epithelial tumors in *Drosophila melanogaster* heterozygous for the tumor supressor gene wts. **Enviromental and Molecular Mutagenesis**, v. 40, p. 277-282, 2002.

ERDTMANN, B. **A genotoxicidade nossa de cada dia**. In: SILVA, J. de; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J. A. P. (Orgs.). Genética toxicológica. Porto Alegre: Alcance, 2003. Cap. 1. p.23-48.

ESCARIÃO, A. C. S. L.; NAGASAKI, T.; ZHAO, J.; BRAUNSTEIN, R. Effects of mitomycin C on infiltration of polymorphonuclear leukocytes after epithelial scrape injury in the mouse córnea. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 7, n. 6, p. 822-826, 2008.

FONSECA, C.A; PEREIRA, D. G. Aplicação da genética toxicológica em planta com atividade medicinal. **Informa**, v. 16, n. 7-8, 2004.

FORTES, R. C.; GUIMARÃES, N. G.; HAACK, A.; TORRES, A. A. L.; CARVALHO, K. M. B. Orlistat e sibutramina: bons coadjuvantes para perda e manutenção de peso? **Revista Brasileira de Nutrição Clínica**, v. 21, n. 3, p. 244-51, 2006.

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*. **Genetics and Molecular Biology**, v. 30, p. 449-455, 2007.

GALVÃO, R.; KOHLMANN Jr., O. Hipertensão arterial no paciente obeso. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v. 9, n. 3, p. 262-267, jun./jul. 2002.

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*. **Environmental Mutagenesis**, v. 6, p.153-188, 1984.

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

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

GRAHAME-SMITH, D. G.; ARONSON, J. K. **Tratado de farmacologia clínica e farmacoterapia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 617p.

GRIFFITHS, A. J.; WESSLER, S. R.; LEWONTIN, R. C.; GELBART, W.; SUZUKI, D. T.; MILLER, J. H. **Introdução a genética**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

GUECHEVA, T. K.; HENRIQUES, J. A. P. **Metabolismo de xenobióticos: citocromo P-450**. In: SILVA, J. de; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J. A. P. (Orgs.). *Genética toxicológica*. Porto Alegre: Alcançe, 2003. Cap.11. p.223-247.

GUZMÁN-RICÓN, J.; GRAF, U. *Drosophila melanogaster* somatic mutation and recombination test as a biomonitor. In: BUTTERWORTH F. M. et al. (eds). *Biomonitoring and biomarkers as indicators of environmental changes*. **Plenum Press**, New York, p.169-181, 1995.

HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E.; GILMAN, A. G. **Goodman & Gilman's- the pharmacological basis of therapeutics**. 10. ed. New York: McGraw-Hill, 2001. 2148p.

HIB, J.; ROBERTIS, E. M. F. **Bases da biologia celular e molecular**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

HODGSON, E.; ROSE, R. L. The importance of cytochrome P450 2B6 in the human metabolism of environmental chemicals. **Pharmacology e Therapeutics**, v.113, p. 420-428, 2007.

IIDA, S. I.; HIROTA, T.; MORISAKI, T.; MARUMOTO, T.; HARA, T.; KUNINAKA, S.; HONDA, S.; KOSAI, K. I.; KAWASUJ, M.; PALLAS, D. C.; SAYA, H. Tumor suppressor WARTS ensures genomic integrity by regulating both mitotic progression and G1 tetraploidy checkpoint function. **Oncogene**, v. 23, p. 5266–5274, 2004.

JUSTICE, R. W.; ZILIAN, O.; WOODS, D. F.; NOLL, M.; BRYANT, P. J. The *Drosophila* tumor suppressor gene *warts* encodes a homolog o-f human myotonic

dystrophy kinase and is required for the control of cell shape and proliferation. **Genes & Development**, v. 9, p. 534-546, 1995.

KAMIKUBO, Y.; KONDO, A. T.; UCHIYAMA, T.; HORI, T. Inhibition of cell growth by conditional expression of kpm, a human homologue of *Drosophila* warts/lats Tumor Suppressor. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 20, p. 17609-17614, 2003.

KAZMI, S. A. J.; KHAN, M.; MASHORI, G. R.; SALEEM, A.; AKHTAR, N.; JAHANGEER, A. Influence of sibutramine, orlistat and ispaghula in reducing body weight and total body fat content in obese individuals. **Journal of Ayub Medical College Abbottabad**, v. 21, n. 2, p. 45-48, 2009.

KIORTISIS, D. N.; FILIPPATOS, T. D.; ELISAF, M. S. The effects of orlistat on metabolic parameters and other cardiovascular risk factors. **Diabetes & Metabolism**, v. 31, p.15-22, 2005.

KOROLKOVAS, A.; FRANÇA, F. F. A. C. **Dicionário terapêutico Guanabara**. 15. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

KRIDEL, S. J.; AXELROD, F.; ROZENKRANTZ, N.; SMITH, J. W. Orlistat is a novel inhibitor of fatty acid synthase with antitumor activity. **Cancer Research**, v. 64, p. 207-2075, 2004.

KVITKO, K. **A carcinogênese e seus agentes**. In: SILVA, J. de; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J. A. P. (Orgs.). *Genética toxicológica*. Porto Alegre: Alcance, 2003. Cap. 15. p.325-339.

LEHMANN, M. **Toxicidade genética das antraciclinas**: associação entre estrutura química e ação inibitória sobre a topoisomerase II. 2003. 103p. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular, Faculdade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2003.

LOURO, I. D.; LLERENA Jr., J. C.; MELO, M. S. V.; ASHTON-PROLLA, P.; FROES, N. C. **Genética molecular do câncer**. 2. ed. São Paulo: MSG Produção Editorial, 2002.

MANCINI, M. C.; HALPERN, A. Tratamento farmacológico da obesidade. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 46, n. 5, p. 497-513, 2002.

MENENDEZ, J. A.; VELLON, L.; LUPU, R. Antitumoral actions of the anti-obesity drug orlistat (Xenical) in breast cancer cells: blockade of cell cycle progression, promotion of apoptotic cell death and PEA3-mediated transcriptional repression of Her2/neu (erb B-2) oncogene. **Annals of Oncology**, v. 16, p.1253–1267, 2005.

MINOTTI, G.; MENNA, P.; SALVATORELLI, E.; CAIRO, G.; GIANNI, L. Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. **Pharmacological Reviews**, v. 56, p.185–229, 2004.

NAKAGAWA, S.; MORI, C. Detection of mitomycin C-induced testicular toxicity by micronucleus assay in mice. **Reproductive Medicine and Biology**, v. 2, p. 69–73, 2003.

NISHIYAMA, Y.; HIROTA, T.; MORISAKI, T.; HARA, T.; MARUMOTO, T.; IADA, S.; MAKINO, K.; YAMAMOTO, H.; HIRAOKA, T.; KITAMURA, N.; SAYA, H. A human homolog of *Drosophila* warts supressor, h-warts, localized to mitotic apparatus and specifically phosphorylated during mitosis. **Febs Letters**, v. 459, p. 159-165, 1999.

OJOPI, E. P. B.; DIAS NETO, E. **Genômica e oncologia**. In: MIR, L. (Org.). Genômica. São Paulo: Atheneu, 2004. Cap 19. P. 364-385.

OLIVEIRA, R. B. de; ALVES, R. J. Agentes antineoplásicos biorredutíveis: uma nova alternativa para o tratamento de tumores sólidos. **Química Nova**, v. 25, n. 6, p. 976-984, 2002.

OLIVEIRA SÁ, M. P. B. de; GOMES, R. A. F.; SILVA, N. P. C.; OLIVEIRA SÁ, M. V. B. de; CALADO FILHO, I. Cardiotoxicidade e quimioterapia. **Revista Brasileira de Clínica Médica**, v. 7, p. 326-330, 2009.

PINTO, L. F. R.; FELZENSWALB, I. **Genética do câncer humano**. In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. Mutagênese ambiental. Canoas: Ulbra, 2003. Cap.2. p.29-48.

POTTER, C. J.; TURENCHALK, G. S.; XU, T. *Drosophila* in cancer research, an expanding role. **Trends in Genetics**, v. 16, p. 33-39, 2000.

RABELLO-GAY, M. N.; RODRIGUES, M. A. L. R.; MONTELEONE NETO, R. Mutagênese, teratogênese e carcinogênese: métodos e critérios de avaliação. **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, p. 107-112, 1991.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J. **Farmacologia**. 6. ed. São Paulo: Elsevier, 2007. 829p.

READ, A.; DONNAI, D. **Genética clínica**: uma nova abordagem. Porto Alegre: Artmed, 2008. 425p.

RIBEIRO, F. de A. Q.; BORGES, J. de P.; ZACCHI, F. F. S.; GUARALDO, L. O comportamento clínico e histológico da pele do rato submetida ao uso tópico e injetável de Mitomicina C. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 69, n. 2, p. 151-158, 2003.

RIBEIRO, L. R.; MARQUES, E. K. **A importância da mutagênese ambiental na carcinogênese humana**. In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. Mutagênese ambiental. Canoas: Ulbra, 2003. Cap.1. p.21-27.

RICHELSEN, B.; TONSTAD, S.; ROSSNER, S.; TOUBRO, S.; NISKANEN, L.; MADSBAD, S.; MUSTAJOKI, P.; RISSANEN, A. Effect of orlistat on weight Regain and cardiovascular risk factors following a very-low-energy diet in abdominally obese patients. **Diabetes Care**, v. 7, n. 1, p. 27-32, 2007.

ROSADA, C. T. M. **Genotoxicidade dos antineoplásicos cisplatina (cisdiaminodicloroplatina, cis-DDP) e citosina-arabinosídeo (Ara-C), e do óleo essencial de *Eucalyptus globulus* através do ciclo parassexual em *Aspergillus nidulans***. 49f. 2009. Tese (Biologia Celular e Molecular) da Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2009.

SENDERS, C. W. Use of mitomycin C in the pediatric airway. **Current Opinion in Otolaryngology & Head and Neck Surgery**, v. 12, p. 473–475, 2004.

SIDOROV, R. A; UGNIVENKO, E. G.; KHOVANOVA, E. M.; BELITSKY, G. A. Induction of tumor clones in *Drosophila melanogaster* *wts/+* heterozygotes with chemical carcinogenes. **Mutation Research**, v. 498, p. 181-191, 2001.

SIKIC, B. L. **Fármacos antineoplásicos**. In: CRAIG, C. R.; STITZEL, R. E. Farmacologia moderna com aplicações clínicas. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. Cap.56. p. 601-618.

SILVA, A. N. da; CARDOSO, R.; CERÉSER, K. M. M.; MASCARENHAS, M. A. Estudo químico-farmacêutico e aspectos bioquímicos do orlistat no controle da obesidade. **Revista Brasileira de Medicina**, São Paulo, v. 59, p. 26-38, 2002.

SILVA, M. N. da; FERREIRA, V. F.; SOUZA, M. C. B. V. de. Um panorama atual da química e da farmacologia de naftoquinonas, com ênfase na beta-lapachona e derivados. **Química Nova**, v. 26, n. 3, p. 407-416, 2003.

TAO, W.; ZHANG, S.; TURENCHALK, G. S.; STEWART, R. A.; St. JOHN, M. A. R.; CHEN, W.; XU T. Human homologue of the *Drosophila melanogaster* lats tumor suppressor modulates CDC2 activity. **Nature Genetics**, v. 21, p. 177-181, 1999.

TRIPATHI, K. D. **Farmacologia médica**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. 774p.

ULLRICH, A.; ERDMANN, J.; MARGRAF, J.; SCHUSDZIARRA, V. Impact of carbohydrate and fat intake on weight-reducing efficacy of orlistat. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 17, p. 1007–1013, 2003.

VOGEL, E. W. Evaluation of potential mammalian genotoxins using *Drosophila*: the need for a change in test strategy. **Mutagenesis**, v. 2, p. 161-171, 1987.

XU, M. F.; TANG, P. I.; QIAN, Z. M.; ASHRAF, M. Effects by doxorubicin on the myocardium are mediated by oxygen free radicals. **Life Sciences**, v. 68, p.889–901, 2001.

WEISBURGUER, J. H. Eat to live, not live to eat. **Nutrition**, London, v. 16, p.767-773, 2000.

CAPÍTULO II

**Avaliação do potencial mutagênico,
recombinogênico e carcinogênico do Orlistat
em células somáticas de *Drosophila
melanogaster***

RESUMO

O orlistat é o primeiro composto de uma nova classe farmacológica que limita a absorção de gorduras ao promover a inibição das lipases gástrica e pancreática. Ele não possui efeitos sobre circuitos neuronais reguladores do apetite e sua ação resume-se ao bloqueio da digestão dos triglicérides dietéticos. Pesquisas recentes sugerem que o orlistat paralisa o crescimento de alguns tumores por inibir a ação da enzima ácido graxo sintetase, cuja atividade favorece a sobrevivência de células cancerosas. Entretanto, não são conhecidos resultados em longo prazo e pouco se sabe sobre possíveis efeitos genotóxicos/mutagênicos associados ao seu uso. Sendo assim, o presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de avaliar o potencial mutagênico, recombino gênico e carcinogênico do orlistat através do teste para detecção de mutação e recombinação somática (SMART) e do teste para a detecção de clones de tumor epitelial (*wts*), ambos realizados em *Drosophila melanogaster*. Na avaliação por meio do SMART foram tratadas cronicamente larvas descendentes dos cruzamentos padrão (ST) e de alta bioativação (HB) com três concentrações de orlistat (2,4; 4,8 e 9,6 mg/mL) isoladamente e em associação com a DXR (0,125 mg/mL). Os resultados demonstraram efeito recombino gênico do orlistat em todas as concentrações testadas no cruzamento HB e em nenhuma concentração no cruzamento ST. No teste *wts*, realizado com descendentes do cruzamento de fêmeas virgens *wts/TM3* com machos *mwh/mwh*, as larvas foram tratadas com as três concentrações citadas de orlistat isoladamente e em associação com a mitomicina C (0,1 mM). Os resultados mostraram que o orlistat não possui potencial carcinogênico e também não reduz os tumores induzidos pela mitomicina C. Portanto, nas presentes condições experimentais, o orlistat apresentou efeito recombino gênico, associado à presença aumentada de enzimas do citocromo P450, porém não foi capaz de induzir, nem inibir a ocorrência de tumores em *D. melanogaster*.

Palavras-chave: Orlistat. SMART. *Wts*. Recombino gênico. *Drosophila melanogaster*.

ABSTRACT

Orlistat is the first compound of a new pharmacological class which limits dietary fat absorption by inhibiting gastric and pancreatic lipases. It does not affect the neuronal circuits regulating appetite, and its action consists basically of obstructing digestion of dietary triglycerides. Recent researches suggest that orlistat stops the growth of some tumors because it inhibits the action of fatty acid synthase enzyme, whose activity favors the survival of cancer cells. However, research concerning the long-term use of this drug is unknown, and there are doubts as to possible genotóxico/mutagenic effects from its use. Thus, this study was carried out with the aim of evaluating the mutagenic, recombinogenic and carcinogenic potential of orlistat by means of a test for somatic mutation and recombination test (SMART) and test for epithelial tumor detection (wts), both in *Drosophila melanogaster*. When analyzed by means of SMART, larvae descending from crosses standard and high bioactivation were chronically treated with three concentrations of orlistat (2.4, 4.8 and 9.6 mg/mL) alone and in combination with DXR (0.125 mg/mL). The results demonstrated recombinogenic effect of orlistat at all concentrations tested in the HB cross and no concentration at the ST cross. In the wts test, conducted with offspring of crosses between virgin females wts/TM3 with males *mwh/mwh*, larvae were treated with three concentrations of orlistat quoted separately and in combination with mitomycin C (0.1 mM). The results showed that orlistat has no carcinogenic potential, nor reduce tumors induced by mitomycin C. Therefore, in these experimental conditions, orlistat had recombinogenic effects, coupled with the increased presence of cytochrome P450, but was not able to induce or inhibit the occurrence of tumors in *D. melanogaster*.

Keywords: Orlistat. SMART. Wts. Recombinogenic. *Drosophila melanogaster*.

1 INTRODUÇÃO

O orlistat (Xenical) é o análogo semissintético mais estável e parcialmente hidrolisado da lipstatina, produzida pelo *Streptomyces toxytricini* (Mancini e Halpern, 2002; Menendez et al., 2005; Al- Suwailem et al., 2006). Juntamente com a sibutramina, representam os únicos medicamentos aprovados pela FDA (*Food and Drug Administration*) para tratamento da obesidade em longo prazo (Fortes et al., 2006).

O orlistat é um potente e específico inibidor das lipases gástrica e pancreática que atua na região do lúmen intestinal, com absorção mínima (Ullrich et al., 2003; Bray, 2009; Coutinho, 2009; Kazmi et al., 2009). Ao se ligar ao sítio ativo da lipase, o orlistat forma um complexo estável que induz uma mudança conformacional na enzima, expondo e tornando inativo o seu sítio ativo catalítico. A lipase inativada é incapaz de hidrolisar gorduras em ácidos graxos e monoglicerídeos. Assim, a gordura atravessa o trato gastrointestinal e é eliminada de forma inalterada nas fezes (Mancini e Halpern, 2002; Al- Suwailem et al., 2006). O déficit calórico resultante da não absorção de triglicérides pode ter um impacto positivo no controle do peso corporal (Ballinger e Peikin, 2002; Coutinho, 2009).

Essa droga não possui efeito sobre circuitos neuronais reguladores do apetite (Mancini e Halpern, 2002). Sua ação resume-se ao bloqueio da digestão dos triglicérides dietéticos. Os demais efeitos do orlistat relacionam-se principalmente à redução do colesterol total, colesterol LDL e da concentração plasmática de insulina, auxiliando no controle dos fatores de risco cardiovasculares (Fortes et al., 2006; Rischelsen et al., 2007).

Pesquisas recentes apontam o orlistat como potente inibidor do crescimento de alguns tumores. Tem-se demonstrado que ele apresenta propriedades antiproliferativa e antitumoral para células do câncer de próstata e mama em virtude da sua capacidade de bloquear a atividade da enzima ácido graxo sintetase (FAS) (Menendez et al., 2005). Ao inibir a síntese de ácidos graxos, o orlistat paralisa a proliferação das células tumorais, induzido a apoptose e inibindo o crescimento de tumores (Kridel et al., 2004). Contudo, não são

conhecidos resultados de estudos em longo prazo com essa droga e pouco se sabe sobre possíveis efeitos genotóxicos associados ao seu uso.

A genética toxicológica constitui uma importante área da ciência que estuda as propriedades genotóxicas/mutagênicas de agentes (químicos, físicos e biológicos) aos quais os organismos estão expostos, utilizando diversos ensaios para avaliar os danos que estes podem vir a causar ao DNA, na presença ou ausência de sistemas de metabolização (Fonseca e Pereira 2004). Dentre esses ensaios destaca-se o SMART (*Somatic Mutation and Recombination Test*), desenvolvido por Graf et al. (1984).

O teste SMART em asas *Drosophila melanogaster* é capaz de detectar um espectro amplo de anormalidades genéticas, tais como mutação, deleção e recombinação (Graf et al., 1984). Neste teste são utilizadas moscas portadoras de genes marcadores *mwh* e *flr*³, sendo que as alterações são detectadas pela perda da heterozigose desses genes. Durante o desenvolvimento embrionário da *D. melanogaster* as células do disco imaginal se proliferam mitoticamente para formar o corpo da mosca adulta. Alterações genéticas em umas dessas células levam à formação de células mutantes que são detectadas como manchas de pêlos mutantes nas asas da mosca adulta (Guzmán-Rincón e Graf, 1995).

Da mesma forma que são conhecidos testes empregados na avaliação da mutagenicidade de agentes químicos, naturais ou sintéticos, são também conhecidos testes aplicados na avaliação do potencial carcinogênico desses agentes, dentre os quais pode-se destacar o teste para a detecção de clones de tumor epitelial (*wts*), também realizado em *D. melanogaster*.

A conservação evolutiva de genes supressores de tumor entre *Drosophila* e mamíferos tem estimulado estudos na indução e no desenvolvimento de tumores em *Drosophila*, estudos estes que podem contribuir para o entendimento do câncer em seres humanos (Potter et al., 2000; Eeken et al., 2002). O gene *wts* foi identificado baseado na sua habilidade para ação como um supressor de tumor em *Drosophila* (Nischiyama et al., 1999). A deleção desse gene leva a formação de clones de células que são circulares e consideravelmente invasivas, chamadas literalmente de verrugas, que se desenvolvem por todo o corpo da mosca (Justice et al., 1995).

O consumo crescente do orlistat pela população mundial aliado a facilidade de aquisição dessa droga, já que seu uso não exige receita médica, levanta a preocupação em se avaliar possíveis efeitos mutagênicos e/ou carcinogênicos associados à sua utilização. Diante do exposto, o presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de avaliar o potencial mutagênico, recombinogênico e carcinogênico do orlistat por meio do teste SMART e do teste Wts, ambos realizados em *D. melanogaster*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Agentes químicos

Xenical® (Orlistat), lote nº B2106/02, produzido pela Roche® Produtos Farmacêuticos S.A., Rio de Janeiro, Brasil. Para o tratamento foram preparadas três diferentes concentrações desse produto (2,4; 4,8 e 9,6mg/mL).

Cloridrato de Doxorubicina (DXR), popularmente conhecido como Doxolen, lote nº 83520, fabricado por Eurofarma Laboratórios e distribuído pela Zodiac Produtos Farmacêuticos S.A., São Paulo, Brasil. Cada frasco contém 10mg de DXR liofilizado. Possui peso molecular de 580,0 e fórmula molecular $C_{27}H_{29}NO_{11}.HCl$. Foi utilizado no tratamento na concentração de 0,125 mg/mL.

Mitocin® (Mitomicina C), pó liofilizado para solução injetável, lote nº 9H48931, fabricado por Kyowa Hakko Kirin, Japão e importado por Bristol-Myers Squibb Farmacêutica, São Paulo, Brasil. Cada frasco-ampola contém 5 mg de mitomicina. No tratamento foi utilizada na concentração 0,1 mM.

2.2. Teste para a Detecção de Mutação e Recombinação Somática (SMART) em células somáticas de *Drosophila melanogaster*

2.2.1 Linhagens estoque, cruzamentos e tratamento

Para realização desse teste foram utilizadas três linhagens mutantes de *D. melanogaster*: *mwh*, *flr*³ e *ORR*, portadoras dos marcadores genéticos

multiple wing hairs (*mwh*, 3-0,3) e *flare-3* (*flr*³, 3-38,8). Essas linhagens são mantidas em estoque em frascos de ¼ de litro contendo meio de cultura para *D. melanogaster* [820 mL de água, 25g de fermento (*Saccharomyces cerevisiae*), 11g de ágar, 156g de banana e 1g de nipagin] à temperatura de 25° C e 60% de umidade.

Foram realizados dois tipos de cruzamentos: (1) Cruzamento Padrão (ST - *Standard Cross*), no qual fêmeas virgens *flr*³/*ln*(3 LR)*TM3*, *ri pp sep I*(3)89Aa *bx*^{34e} e *Bd*^s foram cruzadas com machos *mwh/mwh* (Graf et al., 1989); e (2) Cruzamento de Alta Capacidade de Bioativação (HB - *High Bioactivation Cross*), no qual fêmeas virgens *ORR / ORR*; *flr*³/*ln*(3 LR)*TM3*, *ri p*^p *sep I*(3)89Aa *bx*^{34e} e *Bd*^s foram cruzadas com machos *mwh/mwh* (Graf e Van Schaik, 1992).

A coleta dos ovos dos descendentes dos cruzamentos ST e HB ocorreu durante um período de 8 horas, em frascos contendo uma base sólida de ágar (3% de ágar em água) e uma camada de fermento biológico suplementado com sacarose. Após 72 ± 4 horas as larvas foram lavadas com água osmose reversa e coletadas com o auxílio de uma peneira de malha fina.

As larvas coletadas foram colocadas em frascos de vidro contendo 1,5g de meio de purê de batatas instantâneo (marca HIKARI®). Em cada frasco foram adicionados 5 mL de orlistat em diferentes concentrações (2,4; 4,8 e 9,6 mg/mL), diluídas em etanol 5%, isoladamente e em associação com a DXR (0,125mg/mL). Para controle positivo utilizou-se a doxorrubicina (DXR 0,125 mg/mL) e, para o controle negativo, o etanol 5%.

Larvas de 3º estágio foram submetidas a um tratamento crônico, por um período de aproximadamente 48 horas, quando estas sobem às paredes dos frascos, passando para o estágio de pupa.

2.2.2 Preparação e análise microscópica das lâminas

Os adultos emergentes de ambos os cruzamentos (ST e HB), portadores dos genótipos trans heterozigotos – MH (*mwh*+/*flr*³) e heterozigotos balanceados – BH (*mwh*+/*TM3*,*Bd*^s) foram coletados e conservados em etanol 70%. As asas das moscas preservadas foram destacadas sob microscópio

estereoscópico, com o auxílio de pinças entomológicas e estendidas aos pares sobre lâminas codificadas. Para fixação das asas utilizou-se solução de Faure (30g de goma arábica, 20 mL de glicerol, 50g de hidrato de cloral e 50 mL de água destilada). Depois de montadas, as lâminas permaneceram por um período de 1 hora em uma placa aquecedora (60°C).

Para análise microscópica das asas foi utilizado microscópio óptico de luz (aumento de 40x), onde foram registrados o número, o tipo de mancha (simples ou gêmeas) e a posição onde as manchas foram encontradas.

2.2.3 Análise estatística

A avaliação do efeito mutagênico/recombinogênico do Orlistat foi realizada por meio do teste Binominal Condicional de Kastenbaum e Bowman descrito por Frei e Würigler (1988). O teste não paramétrico *U* de Mann, Whitney e Wilcoxon foi utilizado para excluir resultados falsos positivos. Para a análise estatística de antimutagenicidade, as frequências de cada tipo de mancha por mosca, foram comparadas aos pares, usando o teste *U* (Frei e Würigler, 1995), ao nível de significância $\alpha=0,05$.

2.3 Teste para detecção de tumor epitelial em *Drosophila melanogaster*

2.3.1 Linhagens estoque, cruzamento e tratamento

Duas linhagens mutantes de *D. melanogaster* foram empregadas na realização desse teste: 1) Linhagem *wts*, portadora do marcador genético warts (*wts*, 3-100) e 2) Linhagem *multiple wing hairs* (*mwh*, 3-0,3) que possui o gene marcador *mwh* no cromossomo 3 numa posição mais distal. Na presença desse alelo mutante as células da asa, que normalmente caracterizam-se por apresentar um único pêlo, apresentarão três ou mais pêlos por célula. Por ser uma mutação viável, a linhagem estoque é mantida em homozigose recessiva.

Os estoques contendo essas linhagens também são mantidos em frascos de ¼ de litro contendo meio de cultura para *D. melanogaster*, à temperatura de 25°C e 60% de umidade.

Para realização do experimento foi efetuado o cruzamento entre fêmeas virgens *wt*/TM3 *Sb*¹ com machos *mwh*/*mwh*. A coleta de ovos dos descendentes do cruzamento ocorreu durante um período de 8 horas. Após 48 ± 4 horas as larvas foram lavadas, com água osmose reversa, e coletadas com o auxílio de uma peneira de malha fina.

Larvas de 3º estágio foram submetidas a um tratamento crônico, por um período de, aproximadamente, 48 horas. Estas larvas foram colocadas em frascos de vidro contendo 1,5g de purê de batatas e 5mL de Orlistat nas diferentes concentrações testadas (2,4; 4,8 e 9,6 mg/mL), controle positivo e controle negativo. Para controle positivo utilizou-se a Mitomicina C (0.1 mM) e, para controle negativo, o etanol 5%. As larvas expostas a Mitomicina C, em associação ou não, foram pré-tratadas, por um período de 6 horas.

2.3.2 Análise das moscas

Os indivíduos adultos foram transferidos para recipientes contendo etanol 70%, e, posteriormente, analisados machos e fêmeas com genótipo (*wt* +/+ *mwh*), que possuem pêlos fenotipicamente selvagens (longos e finos) quanto à presença de tumor.

As moscas foram observadas com o auxílio de lupa estereoscópica e pinças entomológicas. A localização e o número de tumores encontrados foram registrados em um diagrama padrão do corpo da mosca (olho, cabeça, asa, corpo, perna, halteres).

2.3.3 Análise estatística

A identificação do potencial carcinogênico do orlistat foi realizada por meio do teste *U*, não-paramétrico, de Mann, Whitney e Wilcoxon, utilizando o nível de significância $\alpha=0,05$.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O orlistat foi escolhido para avaliação no presente estudo devido ao fato de ser um fármaco de uso relativamente recente no tratamento da obesidade, com mecanismo de ação diferenciado dos demais. Entretanto, apesar de bastante utilizado, a segurança de seu uso em longo prazo ainda é desconhecida. Poucos relatos são encontrados na literatura sobre possíveis efeitos genotóxicos (mutagênicos, clastogênicos e/ou recombinogênicos) associados ao seu uso. Além disso, a venda do orlistat, em alguns países, é liberada sem a apresentação de receita médica, o que contribui para exacerbação de seu consumo. Tais fatores aumentam a preocupação em relação aos possíveis danos ao organismo advindos de seu uso.

Para avaliação da mutagenicidade/recombinogenicidade desse composto foi utilizado o teste SMART, realizado em asas de *D. melanogaster*. O SMART é um teste caracterizado pela sua rapidez, quando comparado a outros testes *in vivo*, baixo custo, fácil execução e possibilidade de detecção de amplos espectros de alterações genéticas. Ele permite detectar agentes mutagênicos de ação direta (através da análise dos descendentes do cruzamento padrão- ST), bem como agentes de ação indireta (através da análise dos descendentes do cruzamento de alta bioativação metabólica –HB, que possuem altos níveis de citocromo P450) (Graf e Van Schaik, 1992). Trata-se de um teste altamente confiável e reproduzível, que permite quantificar efeitos recombinogênicos e mutagênicos de diferentes compostos e misturas (Spanó et al., 2001).

A Tabela 1 mostra as frequências de manchas mutantes: simples pequenas (MSP), simples grandes (MSG), gêmeas (MG) e o total de manchas (TM) nos descendentes trans-heterozigotos marcados (MH) do cruzamento padrão (ST), tratados isoladamente com orlistat nas concentrações de 2,4; 4,8 e 9,6 mg/mL, controle positivo (DXR 0,125 mg/mL) e controle negativo (etanol 5%).

Como pode ser observado, em nenhuma das três concentrações testadas de orlistat ocorreu aumento estatisticamente significativo no número total de manchas, quando comparado com a frequência de manchas observadas no

controle negativo. Por isso, os descendentes heterozigotos balanceados (BH) não foram analisados.

Na Tabela 2 são apresentadas as frequências de manchas mutantes observadas nos descendentes trans-heterozigotos marcados (MH) e heterozigotos balanceados (BH), do cruzamento de alta bioativação metabólica (HB) tratados com orlistat nas três concentrações testadas (2,4; 4,8 e 9,6 mg/mL), controle positivo (DXR 0,125 mg/mL) e controle negativo (etanol 5%).

Os resultados mostram aumentos, estatisticamente significativos, para a categoria manchas simples pequenas e no total de manchas mutantes nas três concentrações testadas de orlistat. Tais resultados revelam que o orlistat, nessas três concentrações, possui efeito genotóxico indireto e, por isso, sugere-se que enzimas do citocromo P450 interferem na genotoxicidade desse composto em *D. melanogaster*.

Citocromos são um conjunto de enzimas importantes na metabolização de vários fitoquímicos e são capazes de ativar pró-mutágenos em mutágenos (Sun et al., 2000). Novotna et al. (2010) verificaram que o orlistat pode atuar como indutor da CYP3A4 em hepatócitos humanos, através da ativação do receptor nuclear (PXR). A CYP3A4 é a isoenzima do citocromo P450 mais abundante no fígado e intestino delgado; ela atua no metabolismo oxidativo de cerca de 50% de todos os fármacos disponíveis no mercado (Granvil et al., 2003).

Porém, vários estudos animais revelam que a absorção e metabolização do orlistat ocorrem de forma mínima, sendo ele extensivamente excretado de forma inalterada nas fezes (Silva et al., 2002; Al-Suwailem et al., 2006; Kazmi et al., 2009). Em circunstâncias normais, devido ao extenso metabolismo de primeira passagem e ao alto *clearance* sistêmico mediado pelo CYP3A4 no intestino e no fígado, baixas concentrações plasmáticas de orlistat são atingidas. Essa droga é metabolizada principalmente pela parede gastrointestinal (metabolismo pré-sistêmico), resultando em dois metabólitos majoritários denominados M1 e M3, detectados em concentrações plasmáticas mínimas, sendo considerados farmacologicamente inativos (Silva et al., 2002). Esperava-se, portanto, que a biotransformação não afetasse diretamente a genotoxicidade do orlistat.

Acredita-se, porém, que a *Drosophila* tenha apresentado maior sensibilidade ao composto e, por isso, nesse organismo, o efeito genotóxico do orlistat estaria relacionado a essa biotransformação. Tal sensibilidade pode estar associada a dois fatores principais: 1) a exposição do orlistat nesse organismo teste é diferenciada da exposição humana e de outros grupos de animais, visto que, além da ingestão, há o contato cutâneo com o fármaco; 2) as características distintas das membranas biológicas da *Drosophila* em relação a outros grupos de animais poderiam interferir na absorção e consequente biotransformação desse fármaco.

Os eucariotos, de maneira geral, possuem esteróis como componentes de membrana, sendo estes essenciais para a organização e a função da membrana celular. Nos eucariotos superiores o colesterol é o esterol mais representativo. Eucariotos inferiores, como leveduras e a *Drosophila*, por sua vez, possuem o ergosterol como seu principal componente esterol. O efeito do ergosterol na organização e dinâmica das membranas não é muito claro, mas sabe-se que a *Drosophila* mantém um baixo nível de esteróis em comparação com eucariotos superiores (Shrivastava e Chattopadhyay, 2007).

Estudos *in vitro* e *in vivo* têm mostrado que as características das membranas podem modificar a absorção de drogas. Segundo Souza et al. (2007), a permeabilidade da membrana pode levar a um aumento da difusão do fármaco, resultando em maior taxa de absorção. Tal fator contribui para prever sua biodisponibilidade.

Diante dos resultados positivos para genotoxicidade do orlistat nas três concentrações testadas, procedeu-se a análise dos descendentes BH tratados com essas concentrações, com o propósito de calcular a porcentagem de eventos recombinogênicos e mutagênicos.

Para os descendentes do cruzamento HB tratados com DXR foi verificada uma taxa de 20,7% de mutação e 79,3% de recombinação. Os descendentes tratados com orlistat nas concentrações de 2,4; 4,8 e 9,6 mg/mL apresentaram, respectivamente, 65,5%, 72,5% e 68,7% dos clones mutantes devidos a recombinação. Verifica-se, portanto, o efeito recombinogênico do orlistat após a biotransformação metabólica.

Nos adultos emergentes da progênie BH, devido à presença do balanceador *TM3/Bd⁶*, é inviabilizada a ocorrência de eventos recombinogênicos e, por isso, apenas eventos mutacionais levam à formação de manchas mutantes nesses descendentes (Graf et al., 1984).

Dados encontrados na literatura, em pesquisas realizadas com outros organismos teste, sugerem que o orlistat não é mutagênico. Lopes e Vicentini (2002), em trabalho desenvolvido com o objetivo de avaliar a mutagenicidade do Xenical (Orlistat), utilizaram como sistema teste as células da medula óssea de ratos Wistar (*Rattus norvegicus*), tratados *in vivo* através de gavagem. Nesse estudo foi verificada a ausência de efeito mutagênico em três concentrações de orlistat: 0,2; 0,4 e 0,6 mg/mL. Deve-se considerar, entretanto, que as doses utilizadas na pesquisa citada foram consideravelmente inferiores às utilizadas no presente estudo.

Além disso, é importante ressaltar que a maior parte dos bioensaios utilizados para avaliar a genotoxicidade de compostos e misturas limita-se a detecção dos efeitos mutagênicos, porém, nem toda alteração no material genético é, essencialmente uma mutação; evidências recentes sugerem que a recombinação homóloga é um dos principais processos de alterações genéticas (Andrade e Lehmann, 2003; Erdtmann, 2003). A recombinação homóloga consiste em um mecanismo errante de reparo no DNA que pode levar a perda de heterozigose ou rearranjos genéticos, sendo crucial na gênese de inúmeras doenças genéticas, como o câncer (Sinigaglia et al., 2004). O teste SMART destaca-se, nesse contexto, por permitir, além da avaliação de eventos mutacionais, a avaliação de eventos recombinacionais, como ficou demonstrado no presente estudo.

Os mecanismos pelos quais o orlistat induz danos ao DNA não foram avaliados diretamente nesta pesquisa. Acredita-se, porém, que possam estar, de alguma forma, associados à geração de radicais livres. Segundo Barros (2006), o acúmulo de gordura intra-luminal do colón, decorrente da ação do orlistat, intensifica a formação de espécies reativas de oxigênio nas fezes. O principal dano causado por esses oxiradicais é a capacidade de estimular a peroxidação lipídica. Isso ocorre quando a produção excessiva de radical hidroxil nas

proximidades das membranas capacita o ataque de ácidos graxos na membrana fosfolipídica, produzindo hidroperóxidos lipídicos. O acúmulo desses agentes gera um dano oxidativo capaz de inativar a membrana, podendo culminar com a morte celular. Além disso, os hidroperóxidos lipídicos podem, também, decompor-se, fornecendo uma variedade de produtos citotóxicos.

Também não pode ser descartada a possibilidade de redução da defesa antioxidante, decorrente da reduzida absorção de vitaminas lipossolúveis. Ao reduzir a absorção de gorduras da dieta, o orlistat pode simultaneamente ter efeitos importantes sobre a absorção de vitaminas lipossolúveis, especialmente vitaminas antioxidantes como A e E (Ozcelick et al., 2005; Fortes et al., 2006). É extensivamente reconhecido o papel dessas vitaminas na prevenção de danos genéticos, já que elas impedem que ocorram aumentos das lesões ao DNA decorrentes do aparecimento de espécies reativas de oxigênio (Nepomuceno, 2005). Portanto, na ausência das vitaminas antioxidantes o organismo torna-se mais vulnerável à ocorrência de danos oxidativos ao DNA.

Os resultados obtidos no presente trabalho revelam, ainda, um aumento, estatisticamente significativo, nas frequências de manchas simples pequenas, manchas simples grandes, manchas gêmeas e total de manchas, nos descendentes MH, tanto do cruzamento ST quanto do HB, tratados com DXR (0,125 mg/mL). Este aumento nas frequências de manchas mutantes reforça os inúmeros relatos de genotoxicidade deste composto, sendo seu principal efeito a recombinação, verificada nos descendentes da linhagem BH. Esta forte atividade recombinogênica da DXR em células somáticas de *D. melanogaster* já havia sido descrita por Lehmann et al. (2003), Costa e Nepomuceno (2006), Fragiorgie et al. (2007), Castro et al. (2008) e Dutra et al. (2009).

Os resultados obtidos através da análise dos descendentes trans-heterozigotos marcados (MH) dos cruzamentos ST e HB co-tratados com doxorrubicina (0,125 mg/mL) e diferentes concentrações de orlistat (2,4; 4,8 e 9,6 mg/mL), estão representados na Tabela 3. Para a análise estatística, os resultados observados nos descendentes tratados com orlistat (nas diferentes concentrações) em associação com DXR foram comparados com os resultados

obtidos com os descendentes tratados somente com o controle positivo (DXR 0,125 mg/mL).

Nos descendentes provenientes do cruzamento ST foram verificadas reduções, estatisticamente significativas, na frequência total de manchas mutantes somente na concentração de 2,4 mg/mL de orlistat em associação com a DXR.

Nos descendentes provenientes do cruzamento HB verificou-se uma redução, estatisticamente significativa, nas frequências de manchas simples grandes, manchas gêmeas e nos totais de manchas mutantes, nas três concentrações testadas de orlistat (2,4; 4,8 e 9,6 mg/mL) associadas à DXR. Para a categoria de manchas simples pequenas, nos descendentes do cruzamento HB, não houve diferença estatisticamente significativa, entre os indivíduos co-tratados com orlistat e DXR, em todas as concentrações, quando comparados ao controle positivo.

Com o intuito de identificar o efeito do orlistat em etapas que antecedem a indução de danos genéticos, utilizamos o sistema de co-tratamento, visando à obtenção de dados relacionados à ação moduladora sobre o agente genotóxico (no caso a doxorrubicina). Pode-se supor, com base nos resultados obtidos na presente pesquisa, que o orlistat seria capaz de modular a atividade genotóxica da doxorrubicina, reduzindo seus efeitos através de algum tipo de interação direta de grupos ativos desses dois agentes. Essa é uma possibilidade, contudo, que não pode ser explicada com exatidão, visto que através da presente pesquisa não é possível identificar como ocorre essa interação. Além disso, a inexistência de trabalhos experimentais voltados para a obtenção de dados concernentes ao tratamento concomitante de orlistat e doxorrubicina não fornece embasamento para explicação detalhada dos resultados obtidos.

Esses resultados apontam que o papel do orlistat como inibidor de danos genéticos é dependente de mecanismos que antecedem a indução de danos ao DNA. Ou seja, mesmo sendo um agente genotóxico, ele atua como agente modulador em um sistema de co-tratamento, sendo capaz de alterar a genotoxicidade da doxorrubicina, o que resulta na redução de manchas mutantes aqui observada.

Efeito similar foi obtido por Sinigaglia et al. (2004), ao avaliar o comportamento da vanilina (VA) em relação à genotoxicidade de quatro agentes químicos em dois protocolos de administração (pré-tratamento e co-tratamento). Os autores identificaram que a VA, após a instalação de danos genéticos (sistema de pré-tratamento), potencializa a recombinação homóloga de agentes genotóxicos, ao passo que, em sistemas que precedem a indução de lesões (co-tratamento com agentes genotóxicos), ela apresenta efeito protetor.

Para verificar se as alterações no DNA, induzidas pelo orlistat não era apenas no sentido da atividade recombinogênica, mas, também, no sentido induzir a formação de tumores, foi realizado o teste para detecção de clones de tumor epitelial (*wt*s) em *Drosophila melanogaster*.

As células do disco imaginal de *Drosophila* têm o ciclo celular muito semelhante ao das células de mamíferos. Um dos genes envolvidos na regulação do controle do ciclo celular em *Drosophila* é o *wt*s, homólogo do gene LATS1, um supressor tumoral humano (Eeken et al., 2001).

O marcador *wt*s é uma mutação recessiva letal em homozigose nos zigotos. Devido à letalidade, esse o alelo é mantido na linhagem estoque com a presença de um balanceador cromossômico (*TM3*). Por meio do cruzamento entre linhagens *wt*s/*TM3* com *mwh/mhw* são obtidas larvas heterozigotas (*wt*s/+). A perda da heterozigose nas células do disco imaginal da *Drosophila* ocasiona a formação de clones homozigotos (viável em conjuntos de células isoladas) da larva, que se manifestam como tumores na mosca adulta (Sidorov et al., 2001).

A Tabela 4 mostra a frequência de tumores encontrados nos diferentes segmentos do corpo de *D. melanogaster* tratadas com as três concentrações testadas de orlistat (2,4; 4,8 e 9,6 mg/mL) isoladamente e em associação com a Mitomicina C, controle negativo (etanol 5%) e controle positivo (MMC 0,1 mM).

Os resultados revelam que não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre as frequências de tumores encontrados nas três concentrações testadas de orlistat (isoladamente) e o controle negativo, o que evidencia a ausência de potencial carcinogênico do orlistat.

Ao avaliar as associações de orlistat com a MMC verifica-se, igualmente, que não houve diferença significativa entre as frequências de tumores

encontrados nas três concentrações de orlistat associadas à MMC e as frequências encontradas nos indivíduos tratados somente com MMC. Conclui-se, portanto, que o orlistat não reduz o aparecimento de tumores induzidos pela MMC em *D. melanogaster* e, portanto, também não possui efeito anticarcinogênico.

É pertinente ressaltar que nas larvas tratadas com a associação (Orlistat + MMC) foi realizado um sistema de pré-tratamento com a MMC. O orlistat foi, portanto, utilizado após o tratamento com a MMC para verificar se este seria capaz de inibir os tumores já induzidos pelo controle positivo. Na verdade, a MMC foi o agente escolhido para a realização da presente pesquisa, porém os resultados obtidos refletem a atuação do orlistat em relação à inibição do tumor de maneira geral, independente do mecanismo de ação e do agente indutor de tumor utilizado.

Os resultados significativos para a frequência de tumor nos indivíduos tratados isoladamente com MMC confirmam que este fármaco induziu o aparecimento de tumores em *D. melanogaster*, o que valida o teste, bem como os resultados obtidos.

Apesar do resultado do presente estudo apontar para a ausência de efeito anticarcinogênico do orlistat, pesquisas recentes sugerem que esse fármaco atua como um potente inibidor do crescimento dos tumores, sobretudo de próstata e mama. Essa atividade antiproliferativa estaria associada à capacidade do orlistat de bloquear a atividade da enzima ácido graxo sintetase (FAS).

Kridel et al. (2004) verificaram que o orlistat é um potente inibidor do domínio tioesterase da FAS, uma enzima fortemente ligada à progressão de tumores. Em decorrência de sua capacidade de inibir a síntese de ácidos graxos, o orlistat paralisa a proliferação das células tumorais, induz essas células a apoptose, inibindo o crescimento tumoral em camundongos nude.

Menendez et al. (2005) avaliaram a ação antitumoral do orlistat em células de câncer de mama e verificaram efeito similar. O orlistat induziu, de maneira dose-dependente, alterações significativas na distribuição das populações de células cancerígenas; ele foi capaz de bloquear a progressão do ciclo celular e promover a morte celular por apoptose.

Browne et al. (2006) também verificaram que o orlistat é citotóxico para células tumorais. Os autores concluíram que essa droga, ao inibir a FAS das células endoteliais e bloquear a síntese de ácidos graxos, impede a proliferação das células endoteliais e, conseqüentemente, inibe a angiogênese.

Deve-se considerar, entretanto, que existem vários genes envolvidos com a gênese e progressão do câncer e, o fato de os resultados da presente pesquisa apontarem para ausência de efeito anticarcinogênico do orlistat em relação ao gene *wt5* (supressor de tumor), isso não significa que esse efeito possa ser generalizado para os demais genes envolvidos no processo.

Além disso, é pertinente ressaltar que os descendentes analisados no teste *wt5* possuem níveis basais de citocromo P450 e os resultados positivos para a recombinogenicidade do orlistat (no teste SMART) ocorreram nos descendentes do cruzamento HB, que possuem níveis elevados de citocromo P450. Portanto, podemos supor que os resultados aqui encontrados teriam sido diferentes caso os descendentes observados na linhagem *wt5* apresentassem altos níveis de CYP.

Além disso, embora tenha sido bem relatado na literatura o fato de o orlistat atuar como um potente inibidor da FAS em alguns tipos de tecidos, resultando na morte de várias células tumorais, existem outros fatores decorrentes do mecanismo de ação do orlistat que podem atuar como potencializadores do processo de carcinogênese em outros tecidos. É o que ocorre no caso do câncer colorretal (Barros, 2006).

Barros (2006) verificou que o aumento no teor de gordura na luz cólon distal, decorrente da ação do orlistat, pode intensificar a formação de focos de criptas aberrantes (precursores de lesões que desenvolvem câncer colo retal), aumentando a proliferação celular epitelial na mucosa colônica. Tal ação seria mediada pelo aumento na formação de radicais livres derivados de oxigênio, associado ao acúmulo de gordura nas fezes.

Esses resultados, portanto, sugerem que o orlistat pode apresentar papel duplo na carcinogênese. Sendo assim, novas pesquisas devem ser conduzidas com o intuito de ampliar a compreensão acerca dos efeitos do orlistat e do aumento de gordura fecal associado ao seu mecanismo de ação, para garantir o uso seguro do orlistat pelos seres humanos.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Podemos concluir que nas condições experimentais e concentrações testadas no presente estudo, o orlistat possui efeito recombinogênico em células somáticas de *Drosophila melanogaster* e esse efeito está associado à biotransformação pelas enzimas do citocromo P450. Além disso, quando associado à doxorrubicina (em sistema de co-tratamento), ele é capaz de modular a ação desse agente, reduzindo o número de manchas mutantes. Porém, o orlistat não possui potencial carcinogênico e, também, não é capaz de reduzir tumores induzidos pela mitomicina C em *D. melanogaster*.

Tabela 1- Frequência de manchas mutantes observadas nos descendentes trans-heterozigotos (MH) de *Drosophila melanogaster*, do cruzamento padrão (ST), tratados com diferentes concentrações de orlistat (2,4; 4,8 e 9,6 mg/mL), controle positivo (DXR 0,125 mg/mL) e controle negativo (etanol 5%).

Tratamentos	N. de indivíduos (<i>N</i>)	Manchas por indivíduo (N°. de manchas) diagnóstico estatístico ^a				Total Mancha s mwh ^c (<i>n</i>)	Média das classes de tam. Clones mhw ^{c,d} (<i>i</i>)	Frequência de indução de manchas (por 10 ⁵ células por divisão) ^e	
		MSP (1-2 céls) ^b <i>m</i> =2	MSG (>2 céls) ^b <i>m</i> =5	MG <i>m</i> =5	TM <i>m</i> =2			Observado	Corrigido pelo controle
<i>mwh/flr</i> ³									
Etanol 5%	60	0,57 (34)	0,03 (2)	0,02 (1)	0,62 (37)	36	1,42	1,23	
DXR (0,125mg/mL)	60	0,93 (56) +	0,27 (16) +	0,35 (21) +	1,55 (93) +	91	2,57 {3,33}	3,11	{1,88}
Orlistat 2,4 mg/mL	50	0,84 (42) i	0,06 (3) i	0,02 (1) i	0,92 (46) + * <i>U</i>	44	1,55 {1,82}	1,80	{0,57}
Orlistat 4,8 mg/mL	60	0,58 (35) -	0,05 (3) i	0,00 (0) i	0,63 (38) -	38	1,39 {1,00}	1,30	{0,07}
Orlistat 9,6 mg/mL	50	0,72 (36) -	0,06 (3) i	0,04 (2) i	0,82 (41) -	41	1,59 {2,05}	1,68	{0,20}

m = fator de multiplicação para resultados significativamente negativos. Níveis de significância $\alpha=0,05$

^a Diagnóstico estatístico de acordo com Frei e Wurgler (1988): (+) positivo (em relação ao controle negativo); (-) negativo; (i) inconclusivo.

**U*: Resultado não significativo de acordo com o Teste *U* de Mann, Whitney e Wilcoxon. Exclui falsos positivos.

^b Incluindo mancha simples *flr*³ raras

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

Tabela 2- Frequência de manchas mutantes observadas nos descendentes trans-heterozigotos (MH) e heterozigotos balanceados (HB) de *Drosophila melanogaster*, do cruzamento de alta bioativação metabólica (HB), tratados com diferentes concentrações de orlistat (2,4; 4,8 e 9,6 mg/mL), controle positivo (DXR 0,125 mg/mL) e controle negativo (etanol 5%).

Tratamentos	N. de indivíduos (N)	Manchas por indivíduo (N ^o . de manchas) diagnóstico estatístico ^a				Total Manchas mwh ^c (n)	Média das classes de tam. Clones <i>mhw</i> ^{c,d} (i)	Frequência de indução de manchas (por 10 ⁵ células por divisão) ^e	
		MSP (1-2 céls) ^b <i>m</i> =2	MSG (>2 céls) ^b <i>m</i> =5	MG <i>m</i> =5	TM <i>m</i> =2			Observado	Corrigido pelo controle
<i>mwh/flr</i> ³									
Etanol 5%	60	1,12 (67)	0,13 (08)	0,03 (02)	1,28 (77)	77	1,84	2,63	
DXR (0,125mg/mL)	60	2,15 (129) +	0,72 (43) +	0,40 (24) +	3,27 (196) +	188	2,38 {2,76}	6,42	{3,79}
Orlistat 2,4 mg/mL	60	1,80 (108) +	0,07 (04) -	0,02 (01) i	1,88 (113) f+	113	1,39 {0,42}	3,86	{1,23}
Orlistat 4,8 mg/mL	60	1,87 (112) +	0,10 (06) i	0,03 (02) i	2,00 (120) +	120	1,56 {1,05}	4,10	{1,47}
Orlistat 9,6 mg/mL	60	1,83 (110) +	0,08 (05) -	0,00 (00) i	1,92 (115) f+	115	1,47 {0,71}	3,93	{1,30}
<i>Mwh/ TM3</i>									
Etanol 5%	20	0,40 (8)	0,00 (0)		0,40 (8)	8	1,38	0,88	
DXR (0,125mg/mL)	20	0,65 (13)	0,00 (0) i		0,65 (13)	13	1,38 {1,40}	1,33	{0,51}
Orlistat 2,4 mg/mL	20	0,65 (13) +	0,00 (0) i		0,65 (13) +	13	1,15 {0,80}	1,33	{0,51}
Orlistat 4,8 mg/mL	20	0,55 (12) i	0,00 (0) i		0,55 (12) i	12	1,27 {1,00}	1,13	{0,31}
Orlistat 9,6 mg/mL	20	0,60 (11) i	0,00 (0) i		0,60 (11) i	11	1,17 {0,75}	1,23	{0,41}

m = fator de multiplicação para resultados significativamente negativos. Níveis de significância α=0,05

^a Diagnóstico estatístico de acordo com Frei e Wurgler (1988): (+) positivo (em relação ao controle negativo); (f+) fraco positivo; (-) negativo; (i) inconclusivo.

^b Incluindo mancha simples *flr3* raras

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

Tabela 3- Frequência de manchas mutantes observadas nos descendentes trans-heterozigotos marcados (MH) de *Drosophila melanogaster*, do cruzamento padrão (ST) e cruzamento de alta bioativação (HB), tratados com diferentes concentrações de orlistat associadas à DXR (0,125 mg/mL).

Genótipos e concentrações mg/mL	Número de indivíduos (N)	Manchas por indivíduo (número de manchas) diagnóstico estatístico ^a				Total de Manchas mwh ^c (n)
		MSP	MSG	MG	TM	
		(1-2 céls) ^b m=2	(>2 céls) ^b m=5	 m=5	 m=2	
Cruzamento ST						
<i>mwh/flr³</i>						
Etanol 5%	60	0,57 (34)	0,03 (02)	0,02 (01)	0,62 (37)	36
DXR (0.125 mg/mL)	60	0,93 (56) +	0,27 (16) +	0,35 (21) +	1,55 (93) +	91
Orlistat 2,4 mg/mL+ DXR	60	1,07 (64) -	0,05 (03) +	0,03 (02) +	1,15 (69) f+	69
Orlistat 4,8 mg/mL+ DXR	60	0,98 (59) -	0,13 (08) i	0,07 (04) +	1,18 (71) -	70
Orlistat 9,6 mg/MI+ DXR	60	1,28 (77) f+	0,13 (08) i	0,12 (07) +	1,53 (92) -	89
Cruzamento HB						
<i>mwh/flr³</i>						
Etanol 5%	60	1,12 (67)	0,13 (08)	0,03 (02)	1,28 (77)	77
DXR (0.125 mg/mL)	60	2,15 (129) +	0,72 (43) +	0,40 (24) +	3,27 (196) +	188
Orlistat 2,4 mg/mL+ DXR	50	2,17 (130) -	0,28 (17) +	0,03 (02) +	2,48 (149) f+	147
Orlistat 4,8 mg/mL+ DXR	60	2,03 (122) -	0, 28 (17) +	0,05 (03) +	2,37 (142) f+	139
Orlistat 9,6 mg/mL+ DXR	50	1,82 (109) -	0,23 (14) +	0,03 (02) +	2,08 (125) f+	125

m = fator de multiplicação para resultados significativamente negativos. Níveis de significância $\alpha=0,05$

^a Diagnóstico estatístico de acordo com Frei e Wurgler (1988): (+) positivo (em relação ao controle negativo); (-) negativo; (i) inconclusivo.

^b Incluindo mancha simples *flr3* raras

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

Tabela 4- Frequência de clones de tumor observados em *Drosophila melanogaster*, heterozigota para o gene supressor de tumor *wt*s, pré-tratada com mitomicina C (6 horas) e posteriormente tratada com diferentes concentrações de orlistat.

Tratamentos		Número de moscas analisadas	Número de tumores analisados							Frequência (Nº de tumores/ mosca)
Orlistat (mg/mL)	MMC (mM)		Olho	Cabeça	Asa	Corpo	Perna	Halter	Total	
0	0	200	0	10	11	7	17	1	46	0,23
0	0,1	200	15	89	261	223	121	14	723	3,62*
2,4	0	200	1	14	13	13	14	2	57	0,29 ns*
4,8	0	200	1	6	19	12	19	1	58	0,29 ns*
9,6	0	200	0	6	19	11	14	1	51	0,25 ns*
2,4	0,1	200	11	74	270	201	178	12	746	3,73 ns**
4,8	0,1	200	19	86	277	185	164	17	748	3,74 ns**
9,6	0,1	200	34	93	264	194	153	19	757	3,78 ns**

Diagnóstico estatístico de acordo com o Teste de Mann-Whitney Teste. Nível de significância $P \leq 0,05$

* Valor considerado diferente do controle negativo ($P \leq 0,05$).

** Valor considerado diferente do controle positivo (MMC 0,1 mM) ($P \leq 0,05$).

ns*, valores considerados não significativos, quando comparados com o controle negativo.

ns**, valores considerados não significativos, quando comparados com o controle positivo.

MMC, mitomicina C.

REFERÊNCIAS

- Al-Suwailem A K, Al-Tamimi A S, Al-Omar M A and Al-Suhibani M S 2006 Safety and mechanism of action of orlistat (tetrahydrolipstatin) as the first local antiobesity drug; *J. Appl. Sci. Res.* **2** 205-208.
- Andrade H H R, Lehmann M 2003. Teste para detecção de mutação e recombinação somática em *Drosophila melanogaster*; In: *Mutagenese ambiental* (Eds) Ribeiro L R, Salvadori D M F and Marques E K (Canoas: Ulbra), pp 281-307
- Ballinger A and Peikin S R 2002 Orlistat: its current status as an anti-obesity drug; *Eur. J. Pharmacol.* **440** 109– 117
- Barros L T C 2006 Efeitos do uso do orlistat na proliferação celular da mucosa colônica e na formação de focos de criptas aberrantes induzidos por dimetilhidrazina em rato, Mestrado Dissertação, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.
- Bray G A 2009 Medications for obesity: mechanisms and applications; *Clin. Chest. Med.* **30** 525–538.
- Browne C, Hindmarsh E J and Smith J W 2006 Inhibition of endothelial cell proliferation and angiogenesis by orlistat, a fatty acid synthase inhibitor; *Faseb J.* **20** 2027-2035
- Castro A J S, Grisólia C K, Araújo B C, Dias C D, Dutra E S and Nepomuceno, J C 2008 Recombinogenic effects of the aqueous extract of pulp from pequi fruit (*Caryocar brasiliense* Camb) on somatic cells of *Drosophila melanogaster*; *Genet. Mol. Biol.* **7** 1375-1383.
- Costa W F and Nepomuceno J C 2006 Protective effects of a mixture of antioxidant vitamins and mineral on the genotoxicity of doxorubicin in somatic cells of *Drosophila melanogaster*; *Environ. Mol. Mutagen.* **47** 18-24
- Coutinho W 2009 The first decade of sibutramine and orlistat: a reappraisal of their expanding roles in the treatment of obesity and associated conditions; *Arq. Bras. Endocrinol. Meta.* **53** 262-270

Dutra E S, Castro J C, Dias C D and Nepomuceno J C 2009 Effect of organic tomato (*Lycopersicon esculentum*) extract on the genotoxicity of doxorubicin in the *Drosophila* wing spot test (SMART); *Genet. Mol. Biol.* **32** 134-152.

Eeken J C J, Klink I, Veen B L V and Ferro W 2002 Induction of epithelial tumors in *Drosophila melanogaster* heterozygous for the tumor suppressor gene *wts*; *Environ. Mol. Mutagen.* **40** 277-282

Erdtmann B 2003 A genotoxicidade nossa de cada dia; In: *Genética toxicológica* (Eds) Silva J, Eedtmann B and Henriques J A P (Porto Alegre: Alcance), pp 23-48

Fonseca C A and Pereira D G 2004 Aplicação da genética toxicológica em planta com atividade medicinal; *Informa* **16** 7-8

Fortes R C, Guimarães N G, Haack A, Torres A A and Carvalho K M B 2006 Orlistat e sibutramina: bons coadjuvantes para perda e manutenção de peso?; *Rev. Bras. Nutr. Clin.* **21** 244-251

Fragiorge E J, Spanó M A and Antunes L M G 2007 Modulatory effects of the antioxidant ascorbic acid on the direct genotoxicity of doxorubicin in somatic cells of *Drosophila melanogaster*; *Genet. Mol. Biol.* **30** 449-455

Frei H and Würgler F E 1988 Statistical methods to decide whater mutagenicity test data from *Drosophila* assay indicate a positive, negative or inconclusive result; *Mutation 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*; *Mutation Res.* **334** 247-258

Graf U, Würgler F E, Katz A J, Frei H, Juon H, Hall C B and Kale P G 1984 Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*; *Environ. Mutagen.* **6** 153-188

Graf U, Frei, H, Kägi A, Katz A J and Würgler F E 1989 Thirty compounds tested in the *Drosophila* wing spot test; *Mutation Res.* **222** 359-373

Graf U and Van Schaik N 1992 Improved high bioactivation cross for the wing somatic and recombination test in *Drosophila melanogaster*; *Mutation Res.* **271** 59-67

Granvil C P, Yu A M, Elizondo G, Akiyama T E, Cheung C, Feigenbaum L, Kraus K W and Gonzales F J 2001 Expression of the human *CYP3A4* gene in the small intestine of transgenic mice: in vitro metabolism and pharmacokinetics of midazolam; *Cancer Lett.* **167** 99-104

Guzmán-Ricon J and Graf U 1995 *Biomonitoring and biomarkers as indicators of environmental change* (New York: Plenum Press), pp 169-181

Justice R W, Zilian O, Woods D F, Noll M and Bryant P J 1995 The *Drosophila* tumor suppressor gene *warts* encodes a homolog of human myotonic dystrophy kinase and is required for the control of cell shape and proliferation; *Genes Dev.* **9** 534-546.

Kazmi S A J, Khan M, Mashori G R, Saleem A, Akhtar N and Jahangeer A 2009 Influence of Sibutramine, Orlistat and Ispaghula in reducing body weight and total body fat content in obese individuals; *J. Ayub. Med. Coll. Abbottabad* **21** 45-48

Kridel S J, Axelrod F, Rozenkrantz N and Smith J W 2004 Orlistat is a novel inhibitor of fatty acid synthase with antitumor activity; *Cancer Res.* **64** 207-2075

Lehmann M, Franco A, Vilar K S P, Reguly M L and Andrade H H R 2003 Doxorubicin and two of its analogues are preferential inducers of homologous recombination compared with mutational events in somatic cells of *Drosophila melanogaster*; *Mutation Res.* **539** 167-175

Lopes E F and Vicentini V E P 2002 Avaliação da mutagenicidade do Xenical (Orlistat) utilizando-se células da medula óssea de ratos Wistar, em tratamento agudo, via gavagem XI *Encontro de Iniciação Científica da Universidade Estadual de Maringá*.

Mancini M C and Halpern A 2002 Tratamento farmacológico da obesidade; *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.* **46** 497-513

Menendez J A, Vellon L and Lupu R 2005 Antitumoral actions of the anti-obesity drug orlistat (Xenical) in breast cancer cells: blockade of cell cycle progression, promotion

of apoptotic cell death and PEA3-mediated transcriptional repression of Her2/neu (erb B-2) oncogene; *Ann. Oncol.* **16** 1253–1267

Nepomuceno J C 2005 Diet and cancer: antioxidant vitamins; *Bioscience Journal* **2** 141-146.

Nishiyama Y, Hirota T, Morisaki T, Hara T, Marumoto T, Iada S, Makino K, Yamamoto H, Hiraoka T, Kitamura N and Saya H 1999 A human homolog of *Drosophila* warts suppressor warts, localized to mitotic apparatus and specifically phosphorylated during mitosis; *Febs Letters* **459** 159-165

Novotna A, Dorcakova A, Vrzal R, Maurel P, Pavek P and Zdenek D 2010 Investigation of orlistat effects on PXR activation and CYP3A4 expression in primary human hepatocytes and human intestinal LS174T cells; *Eur. J. Pharm. Sci.* **41** 276–280

Ozcelick O, Ozkan Y, Karakatas F and Kelestimur H 2005 Exercise training as an adjunct to orlistat therapy reduces oxidative stress in obese subjects; *Tohoku J. Exp. Med.* **206** 313-318

Potter C J, Turenchalk G S and Xu T 2000 *Drosophila* in cancer research, an expanding role; *Trends Genet.* **16** 33-39

Richelsen B, Tonstad S, Rossner S, Toubro S, Niskanen L, Madsbad S, Mustajoki P and Rissanen A 2007 Effect of orlistat on weight regain and cardiovascular risk factors following a very-low-energy diet in abdominally obese patients; *Diabetes Care* **7** 27-32

Shrivastava S and Chattopadhyay A 2007 Influence of cholesterol and ergosterol on membrane dynamics using different fluorescent reporter probes; *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **356** 705-710

Sidorov R A, Ugnivenko E G, Khovanova E M and Belitsky G A 2001 Induction of tumor clones in *Drosophila melanogaster* wts/+ heterozygotes with chemical carcinogenes; *Mutation Res.* **498** 181-191

Silva A N, Cardoso R, Ceréser K M M and Mascarenhas M A 2002 Estudo químico-farmacêutico e aspectos bioquímicos do orlistat no controle da obesidade; *Rev. Bras. Med.* **59** 26-38

Sinigaglia M, Reguly M L, Andrade H H R 2004 Effect of vanillin on toxicant-induced mutation and mitotic recombination in proliferating somatic cells of *Drosophila melanogaster*; *Environ. Mol. Mutagen.* **44** 394-400

Souza J, Freitas Z M F and Storpiotis S 2007 Modelos *in vitro* para determinação da absorção de fármacos e previsão da relação dissolução/absorção; *Rev. Bras. Cienc. Farm.* **43** 515-527

Spanó M A, Frei H, Wurgler F E and Graf U 2001 Recombinagenic activity of four compounds in the Standard and high bioactivation crosses of *Drosophila melanogaster* in the wing spot test; *Mutagenesis* **16** 385-394.

Sun M, Sakakibara H, Ashida H, Danno G and Kanazawa K 2000 Cytochrome P4501A1-Inhibitory action of antimutagenic anthraquinones in medicinal plants and the structure –activity relationship; *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **64** 1373-1378.

Ullrich A, Erdmann J, Margraf J and Schusdziarra V 2003 Impact of carbohydrate and fat intake on weight-reducing efficacy of orlistat; *Aliment. Pharmacol. Ther.* **17** 1007–1013.