

Estudo da toxicidade genética relacionada ao tratamento combinado de doxorubicina e cardioxane em células somáticas de Drosophila melanogaster

SAMANTHA POSSENTI¹
RONALDO GAYESKI CAMPANA FILHO²
MAURICIO LEHMANN³

RESUMO

O presente trabalho procurou avaliar a toxicidade genética da combinação dos compostos dexrazoxano (DEX) e doxorubicina (DOX) através do Teste SMART em células somáticas de *Drosophila melanogaster*. Os dados obtidos indicaram que: (i) a DOX nas concentrações de 0,75 e 1,5 mM não foi capaz de induzir aumentos significativos na frequência de manchas quando comparada ao controle negativo (CN); (ii) o DEX nas três concentrações utilizadas (5; 10 e 20 mM), aumentou a frequência de lesões genéticas em relação ao CN; (iii) a combinação destes fármacos induziu o mesmo número de lesões que o tratamento isolado com DEX, indicando ausência de aditividade, sinergismo ou antagonismo; (iv) a frequência de lesões relacionadas à recombinação mitótica foi menor nos tratamentos combinados que nos tratamentos isolados.

Palavras-chave: ICRF-187, genotoxicidade, *Drosophila melanogaster*, recombinação, topoisomerase.

¹ Acadêmica do Curso de Biologia/ULBRA – Bolsista PROICT/ULBRA

² Acadêmico do Curso de Farmácia/ULBRA

³ Professor - Orientador do Curso de Engenharia Ambiental/

ULBRA e do Pós - Graduação em Genética e Toxicologia Aplicada e em Diagnóstico Genético e Molecular/ULBRA (mauriciol@ulbra.br)

ABSTRACT

The present study investigated the combined genotoxicity of dexrazoxane (DEX) and doxorubicin (DOX) using the Somatic Mutation and Recombination Test (SMART) in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. The data has revealed that: (i) DOX at 0.75 and 1.5 mM did not induce significant increase in the frequency of spots as compared to the negative control (CN); (ii) DEX increased the frequency of genetic damage in relation to CN at the three tested concentrations; (iii) the combined treatment with these compounds induced the same frequency of lesions observed for DEX series, showing the absence of additive, synergic or antagonic genotoxic effect; (iv) the frequency of recombinational events observed for combination drug series was lesser than that found for DEX series.

Key words: ICRF-187, genotoxicity, *Drosophila melanogaster*, recombination, topoisomerase.

INTRODUÇÃO

Dentre os quimioterápicos mais utilizados para o tratamento de neoplasias, as antraciclina aparecem como a família de compostos com o maior número de representantes em uso clínico, sendo utilizadas em uma grande variedade de tumores. A doxorubicina (DOX) é a antraciclina mais utilizada, administrada tanto para o tratamento de sarcomas, como de carcinomas, incluindo o de mama e o de pulmão. Entretanto, apesar de estar sendo usada há mais de 30 anos, a DOX apresenta como principais efeitos colaterais a cardiomiopatia crônica e a falha cardíaca congestiva, sendo estas dose-dependentes e irreversíveis (MINOTTI et al., 2004).

Com o objetivo de minimizar o efeito cardiotoxíco da DOX e demais antraciclina, o dexrazoxano (DEX) vem sendo utilizado como um agente quelante do ferro, que protege o paciente deste efeito colateral, permitindo o aumento das concentrações de administração das antraciclina sem interferir negativamente na atividade antitumoral destes compostos (HARVEY, CHAMPE & MYCEK, 1998).

Doxorrubicina

Levando em consideração a ampla gama de medicamentos que atuam como inibidores das enzimas topoisomerase I (topo I) e topoisomerase II (topo II), as antraciclina constituem o grupo de drogas com o maior número de representantes na terapia do câncer. Tal grupo é formado por sete compostos, dentre os quais destaca-se a doxorubicina, não apenas por ser uma das primeiras antraciclina descobertas, mas também, por apresentar um amplo espectro de atividade antitumoral (MINOTTI et al., 2004).

Atualmente, uma série de compostos denominados, genericamente, de inibidores de topoisomerase é usada no tratamento de diferentes tipos de câncer, ou encontra-se em fase de experimentação. Dentre estes, destacam-se dois grandes grupos, que foram diferenciados em função dos seus mecanismos de ação sobre as topoisomerases: compostos de classes I e II. Os primeiros atuam como estabilizadores dos complexos DNA-topoisomerase, impedindo a religação das fitas de DNA clivadas pela ação catalítica da topoisomerase - sendo também denominados como “venenos de

topoisomerase”, pois de certa forma transformam esta enzima em uma potente toxina celular. Os incluídos na classe II interferem com a atividade catalítica da enzima, sem promover a estabilização dos complexos clivados formados pelas topoisomerasas e o DNA - sendo também chamados de “inibidores catalíticos” de topoisomerase (HAJJI et al., 2005).

O principal mecanismo de ação da doxorubicina está envolvido no dano ao DNA mediante a inibição da topo II, que constitui um elemento essencial para o processo de duplicação do DNA. Tal inibição ocorre por ligação da doxorubicina à topo II, levando à estabilização do complexo topo II-DNA-DOX, impedindo a liberação da enzima e conseqüentemente a replicação do DNA. Desta forma, a DOX é classificada como um veneno de topo II. Outro mecanismo envolve a geração de radicais livres, os quais induzem danos oxidativos às células, levando-as à morte por apoptose. Estes danos resultam da formação de espécies reativas do oxigênio, como íons superóxido e peróxido de hidrogênio, os quais conduzem à chamada peroxidação lipídica. Tais compostos são gerados a partir dos metabólitos da doxorubicina *p*-quinona e *p*-hidroquinona, ambos mediados pelo sistema citocromo P450 redutase. Associada à transformação metabólica da DOX ocorre a liberação de ferro a partir de depósitos intracelulares, sendo capaz de formar complexos com este fármaco. Estes complexos, por sua vez, são capazes de converter o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em radicais hidroxila mais potentes ($\cdot OH$) (MIZUTANI et al., 2003; MINOTTI et al., 2004).

As razões que explicam a maior sensibilidade das células cardíacas à apoptose

induzida pela DOX estão no fato de que estas células apresentam baixo nível de catalase e também porque sofrem inativação da enzima GSH-peroxidase-1 dependente de selênio após a exposição a este composto (KALYANAMARAN et al., 2002). Além disso, alguns autores têm sugerido que este fármaco reduz a atividade e/ou os níveis de diversas enzimas antioxidantes, sendo esta também uma resposta comum às demais antraciclinas. Desta forma, a não eliminação do peróxido de hidrogênio desencadeia o processo de apoptose das células cardíacas, o que explica a cardiotoxicidade exercida pela DOX (SCHIMMEL et al., 2004).

Além dos mecanismos acima citados, a DOX pode exercer a sua atividade antitumoral: (i) por intercalação no DNA, levando à inibição da síntese de macromoléculas; (ii) ligação ao DNA e alquilação; (iii) pontes inter- e intracadeia de DNA; (iv) interferência no processo de separação da dupla fita de DNA e na atividade da helicase e (v) efeitos diretos sobre a membrana celular (MINOTTI et al., 2004).

Dexrazoxano

Um dos elementos chave no processo de indução de apoptose induzida pelas antraciclinas é o ferro; portanto, o uso de quelantes deste metal vem sendo testado e alguns compostos vem sendo utilizados clinicamente como adjuvantes ao tratamento com estes fármacos (SCHIMMEL et al., 2004). Entre os agentes que vem sendo amplamente utilizados para reduzir a cardiotoxicidade das antraciclinas, especialmente da DOX, está o dexrazoxano, comercialmente distribuído no Brasil com o nome fantasia de

Cardioxane. Este composto exerce o efeito quelante sobre o ferro através de seu metabólito, o ADR-925, análogo ao EDTA, que se liga tanto ao ferro livre quanto ao complexo ferro-DOX e, portanto, reduz a formação de espécies reativas de oxigênio (LARSEN, ESCARGUEIL & SKLADANOWSKI, 2003).

O efeito cardioprotetor exercido pelo DEX é observado tanto em adultos quanto em crianças, sem nenhuma redução na taxa de sobrevivência se comparado ao tratamento apenas com doxorubicina; pelo contrário, ocorre aumento da taxa de sobrevivência dos pacientes. Outras evidências indicam que o dexrazoxano não diminui a eficácia antitumoral exercida pelas antraciclinas e que o seu uso desde o início do tratamento, utilizando a DOX como quimioterápico, possibilita o aumento da dose do agente antitumoral por ciclo de tratamento, além de permitir o aumento do tempo de tratamento (POUILLART, 2004; SWAIN & VICI, 2004).

Na verdade este efeito citotóxico do DEX vem sendo atribuído a sua capacidade de inibir a enzima topoisomerase II. Porém, ao contrário da DOX, este composto atua como um inibidor catalítico da enzima. O sítio de ação do dexrazoxano engloba várias regiões na extremidade N-terminal e no domínio central da topo II, o que sugere que múltiplas mutações nestas regiões conferem resistência celular a esta droga. Seu mecanismo de ação consiste na estabilização não-covalente do complexo DNA-topo II. A formação de um novo complexo DNA-topo II-DEX requer a presença de ATP e leva à inibição da atividade da enzima (LARSEN, ESCARGUEIL & SKLADANOWSKI, 2003).

MATERIAL E MÉTODOS

Agentes Antineoplásicos

O medicamento Cardioxane® - (cloridrato de dexrazoxano) foi obtido da Chiron Pharmaceuticals, Dinamarca, enquanto a Adriblastina® (cloridrato de doxorubicina) foi adquirido da Pharmacia & Upjohn Ltda., Brasil.

As diferentes concentrações foram preparadas, à hora do tratamento, por dissolução em solução de lactato de sódio 0,167M.

Teste para Detecção de Mutações e Recombinação Somática (SMART)

O teste SMART de asa baseia-se na identificação de pêlos com fenótipos mutantes que representam a expressão fenotípica da ocorrência de lesões em nível de DNA. Tais alterações são primordialmente induzidas nas células dos discos imaginários que, por inúmeras divisões mitóticas, darão origem às asas dos adultos com seus pêlos ou tricomas. Os tricomas mutantes organizam-se em manchas, com fenótipos característicos, que indicam a ocorrência de eventos genéticos relacionados com mutações pontuais, aberrações cromossômicas e rearranjos estruturais devidos à recombinação mitótica.

Linhagens Utilizadas

Foram utilizadas 2 linhagens de *D. melanogaster*, denominadas como *flr³* e *mwh*. Tais linhagens são portadoras de genes marcadores específicos, localizados no braço esquerdo do

cromossomo 3, que permitem monitorar eventos relacionados com mutação gênica, aberrações cromossômicas e recombinação mitótica - cujas características genóticas encontram-se representadas abaixo (GRAF et al., 1989):

- flr^3 - $flr^3/ln(3LR)TM3,ri p^b sep l(3)89Aa$
 bx^{34e} e Bd^S
- mwh - mwh/mwh

Para maiores esclarecimentos a respeito dos marcadores genéticos acima apresentados ver LINDSLEY & ZIMM (1992).

Cruzamentos

Foi utilizado o cruzamento padrão - envolvendo fêmeas virgens da linhagem flr^3 e machos mwh . As larvas oriundas deste cruzamento apresentam níveis basais de atividade enzimática (GRAF et al., 1989).

A partir deste cruzamento, foram obtidas larvas com duas constituições genóticas, no que se refere aos genes marcadores: (i) larvas mwh $+/+ flr^3$ - trans-heterozigotas para os marcadores recessivos mwh e flr^3 ; (ii) larvas mwh $+/TM3, Bd^S$ - heterozigotas para o cromossomo balanceador $TM3$. O marcador Bd^S , presente nos indivíduos heterozigotos $TM3$, determina um padrão de recorte nas asas dos adultos - o que permite diferenciá-los dos imagos trans-heterozigotos, que apresentam asas com formato normal.

Tratamentos

Os cruzamentos foram realizados em massa (80 fêmeas: 40 machos), durante 3 dias, em vidros contendo meio de cultura padrão. Após este

período, os casais foram transferidos para tubos de 1/8 L contendo meio de ovoposição, onde permaneceram por 8 horas, sendo em seguida descartados. Passadas 72 ± 4 horas do início do período de ovoposição, foram coletadas larvas de 3º estágio, por flotação em água corrente. Estas larvas foram, então, colocadas em frascos de 1/36 L (aproximadamente 50 por tubo) contendo 1,5 g de meio sintético, onde foram acrescentados 5 mL das soluções de tratamento. As larvas permaneceram em tratamento por aproximadamente 48 horas (tratamento crônico), isto é, até atingirem o estágio de pupa. Através deste procedimento experimental, as células dos discos imaginais, que irão originar as asas dos adultos, ficaram expostas às diferentes soluções por 5 a 6 ciclos de divisão mitótica - o que corresponde a 95% de todas as divisões celulares, que ocorrem desde o desenvolvimento do embrião até o início da pupação (FREI & WÜRGLER, 1988).

Todos os adultos, que nasceram 10-12 dias após a postura dos ovos, foram conservados em etanol 70%. As culturas de *D. melanogaster* permaneceram à temperatura de 25°C e à umidade de 60-70%.

Análise Microscópica

Para cada tratamento, foram analisadas as asas dos adultos trans-heterozigotos para os marcadores recessivos mwh e flr^3 (mwh/flr^3) e heterozigotos para o cromossomo $TM3$ ($mwh/TM3$) em microscópio óptico com aumento de 400x. Foram avaliados os compartimentos distais das asas e determinadas as seções e o número de células mutadas. A análise dos tricomas, presentes nas superfícies dorsal e ventral das asas, permitiu a identificação de manchas de pêlos

mutantes classificadas como: **(i) simples** *mwh* ou *flr³*, quando somente um dos marcadores se expressar; **(ii) gêmeas** quando ambos os fenótipos mutantes - pêlos múltiplos (*mwh*) e com a base alargada (*flr³*) - estiverem presentes.

Manchas simples com uma ou duas células mutantes são designadas como pequenas e as demais como grandes.

Bases Genéticas

O tipo de mancha mutante observado nas asas dos adultos trans-heterozigotos permite a caracterização de eventos genotóxicos distintos. Desta forma, manchas simples - com os fenótipos de pêlos múltiplos ou pêlos com a base alargada - podem originar-se por: **(i)** alteração no conteúdo informacional dos genes selvagens *flr³⁺* ou *mwh⁺*; **(ii)** deleção de um fragmento cromossômico contendo os marcadores selvagens *mwh⁺* ou *flr³⁺*; **(iii)** conversão gênica nos genes *mwh⁺* ou *flr³⁺*.

Além disso, a ocorrência de recombinação simples entre os locos *mwh* e *flr³* leva ao aparecimento de manchas simples com o fenótipo pêlos múltiplos, enquanto que uma recombinação simples entre *flr³* e o centrômero seguida de uma recombinação simples entre *flr³* e *mwh* origina pêlos com a base alargada.

Os imagos heterozigotos para o cromossomo balanceador *TM3* expressam apenas manchas simples do tipo *mwh* - uma vez que estes indivíduos são homozigotos para o gene selvagem *flr³*. Adicionalmente, o cromossomo *TM3* apresenta múltiplas inversões, o que inviabiliza a manutenção de células que tenham sofrido recombinação mitótica. Como consequência, as moscas portadoras deste genótipo expressam so-

mente eventos relacionados com mutação pontual e/ou cromossômica.

Análise Estatística

Foi utilizado o teste de qui-quadrado para proporções, modificado conforme FREI & WÜRGLER (1988). Primeiramente, o número de danos encontrados nos tratamentos com as drogas isoladas e em combinação foi comparado com aqueles obtidos no controle negativo. Além disso, os resultados obtidos nos tratamentos combinados foram comparados com os respectivos tratamentos isolados de cada composto.

RESULTADOS

As frequências de danos genéticos induzidos nos diferentes tratamentos estão indicadas na Tabela 1. Os resultados referentes ao tratamento com os fármacos aplicados de forma isolada aos indivíduos trans-heterozigotos, demonstrou que apenas o DEX foi capaz de induzir aumentos significativos na frequência total de manchas quando comparado ao controle negativo. Além disso, este fármaco foi capaz de aumentar o índice de danos de forma dose-dependente. Já a DOX nas duas concentrações utilizadas não apresentou atividade genotóxica.

Os dados referentes a combinação dos fármacos DEX e DOX demonstrou que houve diferença significativa em relação ao controle negativo em 3 das combinações utilizadas, sendo que a combinação DOX 0,75 + DEX 5 mM foi a única a apresentar resultados inconclusivos. Adicionalmente, as comparações efetuadas com o intuito de verificar a diferença entre os tratamentos isolados e suas respecti-

vas combinações demonstrou que houve aumento significativo na frequência total de manchas nos tratamentos combinados apenas em relação ao tratamento único com DOX. A única exceção foi encontrada na combinação DOX 1,5 + DEX 10 mM.

A comparação dos resultados obtidos nas moscas *mwh/flr³* com aqueles verificados nos indivíduos *mwh/TM3*, permite determinar o percentual de

contribuição da recombinação mitótica para o total de danos genéticos induzidos. Assim, pode-se verificar que enquanto os tratamentos com DEX, nas três diferentes concentrações utilizadas, induziu preferencialmente danos recombinogênicos (71 a 100%) os tratamentos combinados apresentaram uma redução do percentual de recombinação (40 a 74%), e portanto, um aumento de danos do tipo mutação gênica e/ou cromossômica.

Tabela 1 - Frequência de manchas mutantes obtidas no cruzamento padrão após a exposição crônica de larvas de 3^o estágio a diferentes concentrações de dexrazoxano, de doxorubicina e da combinação destes dois fármacos.

Genótipo e Concentração (µM)	No. de moscas (N)	Manchas por indivíduo (no. de manchas) diag. estatístico ^a									Recombinação (%)				
		Manchas simples pequenas (1-2 células) ^b			Manchas simples grandes (>2 células) ^b			Manchas gêmeas				Total de manchas			
		m=2			m=5			m=2				m=5			
		d	e	f	d	e	f	d	e	f	d	e	f		
<i>mwh/flr³</i>															
Controle negativo ^c	20	0,60 (12)			0,10 (02)			0,05 (01)			0,75 (15)				
DOX 0,75	10	0,40 (04)	-		0,00 (00)	i		0,00 (00)	i		0,40 (04)	-			
DOX 1,5	10	1,10 (11)	i		0,20 (02)	i		0,00 (00)	i		1,30 (13)	i			
DEX 5,0	20	1,50 (30)	+		0,15 (03)	i		0,05 (01)	i		1,70 (34)	+			100
DEX 10	20	1,75 (35)	+		0,40 (08)	i		0,15 (03)	i		2,30 (46)	+			71
DEX 20	10	3,00 (30)	+		1,20 (12)	+		0,50 (05)	+		4,70 (47)	+			100
DOX 0,75 + DEX 5	10	1,00 (10)	i	i	-	0,10 (01)	i	i	i	0,10 (01)	i	i	i	1,20 (12)	i + -
DOX 0,75 + DEX 10	10	2,00 (20)	+	+	-	0,40 (04)	i	i	i	0,20 (02)	i	i	i	2,60 (26)	+ + -
DOX 1,5 + DEX 10	10	1,60 (16)	+	+	-	0,40 (04)	i	i	i	0,00 (00)	i	i	i	2,00 (20)	+ i -
DOX 1,5 + DEX 20	10	2,40 (24)	+	+	-	1,10 (11)	+	+	-	0,50 (05)	+	+	i	4,00 (40)	+ + -
<i>mwh/TM3</i>															
Controle negativo ^c	20	0,35 (07)			0,00 (00)					^g	0,35 (07)				
DEX 5,0	10	0,10 (01)	-		0,00 (00)	i					0,10 (01)	-			
DEX 10	10	0,70 (07)	i		0,10 (01)	i					0,80 (08)	i			
DEX 20	10	1,00 (10)	+		0,10 (01)	i					1,10 (11)	+			
DOX 0,75 + DEX 10	10	1,10 (11)	+	i	i	0,10 (01)	i	i	i		1,20 (12)	+	i	i	
DOX 1,5 + DEX 10	10	1,10 (11)	+	+	i	0,00 (00)	i	i	i		1,10 (11)	+	+	i	
DOX 1,5 + DEX 20	10	1,10 (11)	+	i	-	0,00 (00)	i	i	i		1,10 (11)	+	+	i	

^aDiagnóstico estatístico de acordo com FREI & WÜRGLER (1988): +, positivo; -, negativo; i, inconclusivo. *m*, fator de multiplicação para a avaliação de resultados significativamente negativos. Níveis de significância $\alpha = \beta = 0,05$. ^bIncluindo manchas simples *flr³* raras. ^cLactato de sódio 0,167M. ^dDiagnóstico estatístico em comparação ao controle negativo. ^eDiagnóstico estatístico em comparação ao tratamento com a respectiva concentração de DOX. ^fDiagnóstico estatístico em comparação ao tratamento com a respectiva concentração de DEX. ^gApenas manchas simples *mwh* podem ser observadas nos indivíduos heterozigotos *mwh/TM3*, já que o cromossomo balanceador *TM3* não contém o gene mutante *flr³*.

DISCUSSÃO

Por tratar-se de um estudo piloto, os resultados aqui apresentados não são definitivos e, portanto, fornecem apenas alguns indicativos sobre a toxicidade genética da combinação dos fármacos estudados.

Antes de abordar a questão da genotoxicidade é preciso salientar dois pontos importantes com relação ao fármaco DEX: o primeiro está relacionado com a sua atividade protetora contra a cardiotoxicidade induzida pelas antraciclinas, especialmente a doxorubicina, e o segundo, envolve a sua capacidade inibitória sobre a enzima topo

II. De fato, estas duas propriedades exercidas pelo DEX não apresentam uma relação direta quando se trata de alvo celular da droga. Enquanto a atividade cardioprotetora está diretamente relacionada com o potencial quelante deste composto sobre o ferro, a inibição da enzima topo II ocorre através da estabilização do complexo formado entre a enzima e o DNA, caracterizando-a como inibidora catalítica de topo II (LARSEN, ESCARGUEIL & SKLADANOWSKI, 2003). Soma-se a isto o fato de que outros inibidores de topo II, incluindo as drogas contra as quais o DEX exerce sua atividade cardioprotetora, serem descritos na literatura como potentes genotoxinas (SNYDER & GILLIES, 2002; LEHMANN et al., 2003; LEHMANN et al., 2004). Desta forma, o estudo da toxicidade genética da combinação DEX e DOX torna-se de grande importância, principalmente no que se refere a qualidade de vida dos pacientes submetidos à quimioterapia.

Um dos aspectos que contribuiu para a impossibilidade de maiores comparações entre as diferentes concentrações utilizadas, está na ausência de genotoxicidade observada nas duas concentrações de DOX utilizadas neste trabalho. A escolha de concentrações baixas deste fármaco deveu-se a tentativa mantermos a mesma diferença de concentração utilizada nos tratamentos em humanos, ou seja, concentrações de DEX de 10 a 20 vezes maiores que as de DOX. Ao estabelecermos como dose máxima tolerada pelas larvas de *D. melanogaster* 20 mM, tivemos que reduzir as doses de DOX normalmente utilizadas no teste SMART.

Apesar de ter sido menos extensivamente estudado em relação ao seu potencial genotóxico, o DEX vem sendo também caracterizado como um agente capaz de induzir lesões no DNA. Estudos realizados *in vitro* através

do teste de micronúcleos e em células L5178Y de linfomas de camundongos, demonstraram que esta droga foi capaz de induzir quebras e perdas cromossômicas, assim como mutações gênicas (WANG & EASTMOND, 2002). Nosso grupo de trabalho, vêm estudando este fármaco através do teste SMART de asas, e os resultados confirmam os dados aqui apresentados (LEHMANN et al., 2003).

Ainda que tenhamos analisado um pequeno número de indivíduos, o que explica, em parte, os resultados inconclusivos encontrados, a comparação das freqüências de manchas induzidas pelos tratamentos combinados com aquelas encontradas nos tratamentos isolados, indica a ausência de efeito aditivo, sinérgico ou antagônico da combinação de ambas. Na verdade, os resultados apontam para a manutenção das lesões induzidas pelo DEX, fato que pode facilmente ser explicado em função da ausência de genotoxicidade da DOX nas concentrações utilizadas. Em outro estudo realizado em nosso laboratório, procuramos avaliar a atividade genotóxica de DEX com outro fármaco da família das antraciclina, a daunorrubicina (DNR), através do teste de micronúcleos em medula óssea de camundongos. Os resultados apontaram também para a ausência de interação entre os fármacos no que se refere à indução de lesões genéticas. De fato, nas concentrações mais altas utilizadas a combinação de DEX e DNR levou a um aumento de citotoxicidade e, portanto, a uma redução na atividade genotóxica em função da diminuição de células com lesões (CAMPANA FILHO, 2005).

Por outro lado, ao calcularmos a taxa de recombinação mitótica verificamos que a combinação dos fármacos levou a uma diminuição na freqüência deste parâmetro, aumentando a

indução de lesões do tipo mutação gênica e/ou cromossômica. Para que se possa avaliar de forma conclusiva a atividade genotóxica da combinação dos fármacos estudados, será necessário aumentar o número amostral, visto que os resultados obtidos até o momento podem estar refletindo flutuações ao acaso dos valores.

CONCLUSÃO

Os dados obtidos a partir deste estudo piloto confirmam a atividade genotóxica do DEX, e indicam, até o momento ausência de aditividade, sinergismo ou antagonismo entre estes compostos no que se refere à suas atividades genotóxicas. Desta forma, faz-se necessário aumentar o número de indivíduos a serem analisados e executar experimentos adicionais com o objetivo de aumentar a concentração da DOX e, desta forma, poder inferir com maior clareza os possíveis efeitos genotóxicos da combinação destes fármacos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CAMPANA FILHO, R. G. **Estudo da atividade genotóxica do tratamento associado de dextrazoxano e daunorrubicina em camundongos**. Canoas: ULBRA, 2005. 48p. Trabalho apresentado como conclusão do Curso de Farmácia, Universidade Luterana do Brasil, 2005.

FREI, H.; WÜRGLER, F. E. Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative or inconclusive result. **Mutation Research**, v.203, p.97-308, 1998.

GRAF, U. et al. Thirty compounds tested in the *Drosophila* wing spot test. **Mutation Research**, v.222, p.359-373, 1989.

HAJJI, N. et al. Induction of genotoxic and cytotoxic damage by aclarubicin, a dual topoisomerase inhibitor. **Mutation Research**, v.583, p.26-35, 2005.

HARVEY, R. A.; CHAMPE, P. C.; MYCEK, M. J. **Farmacologia Ilustrada**. 2.ed. Porto Alegre: ArtMed, 1998. 482 p.

LARSEN, A.K.; ESCARGUEIL, A. E.; SKLADANOWSKI, A. Catalytic topoisomerase II inhibitors in cancer therapy. **Pharmacology & Therapeutics**, p.167-181, 2003.

KALYANARAMAN, B. et al. Doxorubicin-induced apoptosis: implications in cardiotoxicity. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v.234, p.119-124, 2002.

LEHMANN, L. et al. Activity of topoisomerase inhibitors daunorubicin, idarubicin, and aclarubicin in the *Drosophila* somatic mutation and recombination test. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v.43, p.250-257, 2004.

LEHMANN, L. et al. Doxorubicin and two of its analogues are preferential inducers of homologous recombination compared with mutational events in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Mutation Research**, v.539, p.167-175, 2003.

LINDSLEY, D. L.; ZIMM, G. G. **The Genome of *Drosophila melanogaster***. New York: Academic Press, 1992.

MINOTTI, G. et al. Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic

developments in antitumor activity and cardiotoxicity. **Pharmacological Reviews**, v.56, p.185-229, 2004.

MIZUTANI, R. et al. Distinct mechanisms of site-specific oxidative DNA damage by doxorubicin in the presence of copper (II) and NADPH-cytochrome P450 reductase. **Cancer Science**, v.94, p.686-691, 2003.

POUILLART, P. Evaluating the role of dexrazoxane as a cardioprotectant in cancer patients receiving anthracyclines. **Cancer Treatment Reviews**, v.30, p.643-650, 2004.

SCHIMMEL, K. J. M. et al. Cardiotoxicity of cytotoxic drugs. **Cancer Treatment Reviews**, v.30, p.181-191, 2004.

SNYDER, R. D.; GILLIES, P. J. Evaluation of the clastogenic, DNA intercalative, and topoisomerase II-interactive properties of bioflavonoids in Chinese hamster V79 cells. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v.40, p.266-276, 2002.

SWAIN, S. M.; VICI, P. The current and future role of dexrazoxane as a cardioprotectant in anthracycline treatment: expert panel review. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v.130, p.1-7, 2004.

WANG, L.; EASTMOND, D. A. Catalytic inhibitors of topoisomerase II are DNA-damaging agents: induction of chromosomal damage by merbarone and ICRF-187. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v.39, p.348-356, 2002.