

# **AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE GENOTÓXICA DO ICRF-187 ATRAVÉS DE TESTE SMART EM *Drosophila melanogaster* - ESTUDO PILOTO**

JULIANA VIEGAS DUARTE DE OLIVEIRA<sup>1</sup>, VANDERLEI FARIAS GUERREIRO JR<sup>2</sup>, HELOISA HELENA RODRIGUES DE ANDRADE<sup>3</sup>, MAURICIO LEHMANN<sup>4</sup>

## **RESUMO**

O presente trabalho procurou avaliar a toxicidade genética do medicamento Cardioxane® (ICRF-187) através do Teste para a detecção de Mutação e Recombinação (SMART) em células somáticas de *Drosophila melanogaster*. Dados preliminares, obtidos em um teste piloto, indicaram que: (i) a taxa de sobrevivência em cinco das sete concentrações utilizadas (5; 2,5; 1,25; 0,6; 0,3 mM) foi de 0% enquanto que nas concentrações de 0,01 e 0,005 mM este valor foi de 96 e 93%, respectivamente, e (ii) apenas na concentração de 0,01 mM o ICRF-187 mostrou-se capaz de induzir danos genéticos tanto no cruzamento padrão, quanto no cruzamento aprimorado, que apresenta altos níveis constitutivos de enzimas de metabolização. Estes resultados, ainda que preliminares, apontam para um risco associado ao uso deste medicamento em pacientes sob tratamento quimioterápico.

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

---

<sup>1</sup> Acadêmica do Curso de Biologia – Bolsista PROICT/ULBRA

<sup>2</sup> Acadêmico do Curso de Biologia – Bolsista PIBIC/CNPq

<sup>3</sup> Professora do Curso de Biologia/ULBRA

<sup>4</sup> Professor – Orientador do Curso de Engenharia Ambiental/ULBRA (mauriciol@ulbra.br)

## ABSTRACT

*The present study assesses the genetic toxicity of Cardioxane® (ICRF-187) using the Somatic Mutation and Recombination Test (SMART) in somatic cells of Drosophila melanogaster. By means of a pilot study the preliminary data showed that: (i) the survival rate in five of seven used concentrations (5; 2.5; 1.25; 0.6 and 0.3 mM) was 0% while in 0.01 and 0.05 mM concentrations this figure was 96 and 93%, respectively, and (ii) only at 0.01 mM concentration was ICRF-187 capable of inducing genetic damage in both standard and high-bioactivation crosses, which presents high constitutive levels of metabolizing enzymes. In spite of being preliminary results, these data indicate a risk associated with the use of this drug in patients under chemotherapeutic treatment.*

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

## INTRODUÇÃO

A utilização de agentes químicos para o tratamento do câncer vêm acompanhada de uma série de efeitos colaterais, resultando em um decréscimo significativo na qualidade de vida dos pacientes. Dentre estes efeitos secundários, a toxicidade relacionada a células não tumorais vem se destacando como um fator limitante no que se refere a intensidade das doses utilizadas que, por sua vez, contribui para a queda na efetividade do tratamento a algumas doenças (Griggs, 1998; Danesi et al., 2002).

Neste sentido, vários compostos vem sendo utilizados como agentes citoprotetores, que atuam em diversas vias, diminuindo a toxicidade de agentes antineoplásicos. Dentre estes destaca-se o ICRF-187 (dexrazoxano, Cardioxane®), droga da família das bisdioxidopiperazinas, administrada em combinação com a doxorubicina (DOX) com o objetivo de reduzir a incidência e a severidade de cardiomiopatias em pacientes submetidos a tratamento com esta droga (Weiss et al., 1999; Larsen et al., 2003).

A DOX pertence à família das antraciclina, que exercem sua atividade antitumoral princi-

palmente através da inibição da enzima topoisomerase II. Entretanto, podem também bloquear a ação das helicases nucleares, impedindo a separação das fitas de DNA, ao mesmo tempo em que - em função de serem quimicamente definidas como antraquinonas - geram, por reduções de um ou dois elétrons, compostos reativos que danificam macromoléculas e membranas lipídicas. A geração de radicais livres é a causa direta da alta citotoxicidade cardíaca atribuída a esta família de quimioterápicos (Hande, 1998; Hrdina et al., 2000; Danesi et al., 2002).

Ao mesmo tempo em que atua como um agente cardioprotetor em função de sua atividade quelante sobre o oxigênio, o ICRF-187 também é capaz de inibir a topoisomerase II, atuando como um inibidor catalítico da enzima. Neste processo, ao contrário da DOX, que atua como um veneno de topoisomerase - estabilizando o complexo clivado formado entre o DNA, a enzima e a droga - o ICRF-187 age em uma etapa específica do ciclo catalítico da enzima, onde esta permanece ligada ao DNA após a re-ligação da dupla fita (Larsen et al., 2003).

Com o objetivo de avaliar a atividade genotóxica do ICRF-187 este trabalho utilizou o

Teste para a detecção de Mutação e Recombinação em células somáticas de *Drosophila melanogaster* (SMART), que permite a detecção simultânea de eventos do tipo mutação pontual e cromossômica, assim como de recombinação mitótica. Além disso, por se tratar de um ensaio piloto, avaliou-se também a toxicidade imposta por esta droga ao organismo experimental utilizado.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Droga

O medicamento Cardioxane® - ICRF-187 (dexrazoxano, CAS no. 24584-09-6) foi obtido da Chiron Pharmaceuticals, Dinamarca.

As diferentes concentrações da droga (5; 2,5; 1,25; 0,6; 0,3; 0,01 e 0,005 mM) foram preparadas, à hora do tratamento, por dissolução em solução de lactato de sódio 0,167M.

### Teste para Detecção de Mutação 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 imaginais 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 (Graf et al., 1984; 1989).

### Linhagens Utilizadas

Foram utilizadas 3 linhagens de *D. melanogaster*, denominadas como *flr<sup>3</sup>*, *ORR;flr<sup>3</sup>* 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 genotípicas encontram-se representadas abaixo (Graf et al., 1984; 1989):

· *flr<sup>3</sup>* - *flr<sup>3</sup>/In(3LR)TM3,ri p<sup>p</sup> sep I(3)89Aa bx<sup>34e</sup>* e *Bd<sup>S</sup>*

· *ORR;flr<sup>3</sup>* - *ORR/ORR;flr<sup>3</sup>/In(3LR)TM3,ri p<sup>p</sup> sep I(3)89Aa bx<sup>34e</sup>* e *Bd<sup>S</sup>*

· *mwh* - *mwh/mwh*

Para maiores esclarecimentos a respeito dos marcadores genéticos acima apresentados ver Lindsley & Zimm (1992); Graf & van Schaik (1992).

### Cruzamentos

Foram utilizados dois tipos de cruzamentos:

- **Cruzamento padrão** - envolvendo fêmeas virgens da linhagem *flr<sup>3</sup>* e machos *mwh*. As lar-

vas oriundas deste cruzamento apresentam níveis basais de atividade enzimática.

- **Cruzamento aprimorado** – onde fêmeas ORR; flr<sup>3</sup> são cruzadas com machos mwh. A linhagem ORR apresenta alto nível constitutivo de enzimas do tipo citocromo P(CYP)6A2, permitindo a detecção de pró-mutagênicos dependentes de ativação via citocromo P-450 (Graf et al., 1989; Graf & Van Schaik, 1992).

## 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 et al., 1992).

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%.

## Toxicidade

Para a avaliação da toxicidade, 100 larvas foram colocadas em tratamento em cada um dos frascos utilizados para as sete diferentes concentrações além do controle negativo. Após o período de metamorfose, os indivíduos adultos nascidos foram contados e a taxa de sobrevivência foi calculada.

## Análise Microscópica

Para cada tratamento, foram analisadas as asas dos adultos trans-heterozigotos para os marcadores recessivos mwh e flr<sup>3</sup> 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 flr<sup>3</sup>, quando somente um dos marcadores se expressar;

**(ii) gêmeas** quando ambos os fenótipos mutantes - pêlos múltiplos (mwh) e com a base alargada (flr<sup>3</sup>) - estiverem presentes.

Manchas simples com uma ou duas células mutantes são designadas como pequenas e as demais como grandes (Graf et al., 1984; 1989).

## 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  $flr^{3+}$  ou  $mwh^+$  ;

(ii) deleção de um fragmento cromossômico contendo os marcadores selvagens  $mwh^+$  ou  $flr^{3+}$  ;

(iii) conversão gênica nos genes  $mwh^+$  ou  $flr^{3+}$ .

Além disso, a ocorrência de recombinação simples entre os locos  $mwh$  e  $flr^3$  leva ao aparecimento de manchas simples com o fenótipo pêlos múltiplos, enquanto que uma recombinação simples entre  $flr^3$  e o centrômero seguida de uma recombinação simples entre  $flr^3$  e  $mwh$  origina pêlos com a base alargada (Graf et al., 1984; 1989).

## Análise Estatística

Foi utilizado o teste de binomial condicional (Teste de Kastenbaum e Bowman), modificado conforme Frei & Würzler (1988). Para tanto, o número de danos encontrados nos tratamentos com a droga foi comparado com aqueles obtidos no controle negativo (Andrade & Lehmann, 2003).

## RESULTADOS

### Toxicidade

A porcentagem de moscas adultas nascidas após o tratamento com sete diferentes concentrações de ICRF-187 (5; 2,5; 1,25; 0,6; 0,3; 0,01 e 0,005 mM) foi calculado em função do número de moscas adultas nascidas após o tratamento das larvas de 3º estágio. Verificou-se que nas cinco concentrações mais altas, que variaram de 5 até 0,3 mM, nenhuma mosca adulta foi obtida. Por outro lado, os valores encontrados nas duas últimas concentrações utilizadas - 0,01 e 0,005 mM – mostram uma taxa de sobrevivência de 96 e 93%, respectivamente. Este parâmetro também foi avaliado para o controle negativo (lactato de sódio 0,167M) onde a taxa de sobrevivência foi de 96%.

### Genotoxicidade

Considerando o fato de que em apenas duas das concentrações testadas pode-se obter indivíduos adultos, a análise da genotoxicidade ficou restrita a estas concentrações. Portanto, a frequência de danos genéticos induzidas pelo ICRF-187 nas concentrações de 0,01 e 0,005 mM nos dois diferentes cruzamentos (padrão e aprimorado) estão indicados na Tabela 1.

No cruzamento padrão os resultados obtidos indicam que na concentração de 0,01 mM o ICRF-187 foi capaz de induzir aumento significativos na frequência de manchas simples

pequenas e grandes, assim como no total de manchas, quando comparado ao controle negativo. Nesta mesma concentração, no que se refere às manchas gêmeas, assim como para a concentração de 0,005 mM para todas as manchas analisadas, observou-se resultados inconclusivos.

Da mesma forma, para o cruzamento aprimorado foi possível verificar um aumento estatisticamente significativo para o total de manchas e para as manchas simples grandes apenas na concentração de 0,01 mM, enquanto na concentração de 0,005 mM, em todos os parâmetros analisados, obteve-se resultados negativos ou inconclusivos.

**Tabela 1** - Frequência manchas mutantes obtidas nos cruzamentos padrão e aprimorado após a exposição crônica de larvas de 3º estágio a duas diferentes concentrações de ICRF-187.

Cruzamento e Concentração (mM)	No. de moscas (N)	Manchas por indivíduo ( no. de manchas ) diag. estatístico <sup>a</sup>			
		Manchas simples pequenas (1-2 células) <sup>b</sup> m=2	Manchas simples grandes (>2 células) <sup>b</sup> m=5	Manchas gêmeas m=2	Total de manchas m=5
<i>Padrão</i>					
Controle negativo <sup>c</sup>	26	0,54 (14)	0,08 (02)	0,04 (01)	0,65 (17)
0,005	30	0,80 (24) i	0,13 (04) i	0,10 (03) i	1,03 (31) i
0,01	20	1,05 (21) +	0,40 (08) +	0,25 (05) i	1,70 (34) +
<i>Aprimorado</i>					
Controle negativo <sup>c</sup>	40	1,10 (44)	0,18 (07)	0,13 (05)	1,40 (56)
0,005	47	1,36 (64) -	0,21 (10) i	0,13 (06) i	1,70 (80) -
0,01	40	1,48 (59) -	0,43 (17) +	0,18 (07) i	2,08 (83) +

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

<sup>b</sup>Incluindo manchas simples *flr*<sup>3</sup> raras.

<sup>c</sup>Lactato de sódio 0,167M

## 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 do ICRF-187.

Antes de abordar a questão da genotoxicidade é preciso salientar dois pontos importantes com

relação a esta droga: 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 (Weiss et al., 1999; Hrdina et al., 2000; Larsen et al., 2003). De fato, estas duas propriedades exercidas pelo ICRF-187 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 (Weiss et al., 1999; Larsen et al., 2003). Soma-se a isto o fato de que outros inibidores de topo II, incluindo as drogas contra as quais o ICRF-187 exerce sua atividade cardioprotetora, serem descritos na literatura como potentes genotoxinas (Gentile et al., 1998; El-Mahdy Sayed Othman, 2000; Jagetia & Nayak, 2000; Mackay et al., 2000; Mackay & Phelps, 2001; Villani et al., 2001; Blasiak et al., 2002a,b; Brumfield & Mackay, 2002; González-Cid et al., 2002; Nebel et al., 2002; Snyder & Gillies, 2002; Lehmann et al., 2003; Lehmann et al., no prelo). Desta forma, o estudo da toxicidade genética do ICRF-87 torna-se de grande importância, principalmente com relação a qualidade de vida dos pacientes submetidos a quimioterapia.

No que se refere aos dados de toxicidade fica bastante evidente a alta taxa de mortalidade mostrada pela droga em estudo. Estes valores são comparáveis aqueles obtidos com drogas como a aclarrubicina (ACLA), também inibidora catalítica da topo II (Lehmann et al., no prelo). De fato, ambas atuam por bloquear esta enzima, impedindo a sua ligação (ACLA) ou o seu desligamento (ICRF-187) no DNA. Desta forma, por exercer um papel essencial na manutenção de processos vitais para as células, o bloqueio da enzima leva à morte celular (Larsen et al., 2003).

A análise dos resultados obtidos no Teste SMART, nas duas concentrações onde o índice de mortalidade foi reduzido – 0,01 e 0,005 mM, mostrou que apenas na dose de 0,01 mM o ICRF-

187 foi capaz de aumentar de forma estatisticamente significativa as lesões induzidas no DNA em ambos os cruzamentos utilizados (Tabela 1). Visto que o cruzamento aprimorado utiliza a linhagem ORR;flr<sup>3</sup>, com altos níveis constitutivos de enzimas de metabolização do tipo P(CYP)6A2, estes resultados sugerem que a atividade genotóxica desta droga independe de ativação metabólica, ou ainda, que a quantidade basal de metabolização presente nas linhagens do cruzamento padrão são suficientes para metabolizar o composto em estudo. Visto que a frequência de manchas mutantes observada no cruzamento aprimorado foi superior à encontrada no cruzamento padrão, pode-se considerar esta segunda possibilidade como a mais provável.

No que se refere aos dados da literatura referentes a atividade genotóxica do ICRF-187, 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 (Whittaker et al., 2001; Wang & Eastmond, 2002). Entretanto, deve-se ressaltar a ausência de trabalhos que visam a detecção de eventos do tipo recombinação mitótica, visto que este parâmetro genético vem sendo amplamente discutido na literatura como sendo responsável por eventos relacionados com a gênese de muitas doenças humanas, entre elas o câncer (Bishop & Schiestl, 2001; 2003). Neste sentido, ainda que inconclusivos, os resultados referentes a indução de manchas gêmeas não nos dá nenhum indicativo de uma possível atividade recombinogênica deste composto. Porém é preciso que se faça uma avaliação mais ampla para que se possa chegar a um diagnóstico definitivo com relação a este parâmetro genético.

## CONCLUSÃO

Os dados obtidos a partir deste estudo piloto indicam uma possível atividade genotóxica associada ao ICRF-187, ainda que restrita a apenas uma concentração. Desta forma, pretende-se através da continuidade deste trabalho ampliar o número de concentrações a serem avaliadas e quantificar a atividade genotóxica deste composto em termos de recombinação mitótica, comparado-a às mutações de origem gênica e cromossômica.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRADE, H.H.R.; LEHMANN, M. Teste para detecção de mutação e recombinação somática (SMART) em *Drosophila melanogaster*. In: RIBEIRO, L.R.; SALVADORI, D.M.F., MARQUES, E. K. (Orgs.). **Mutagênese ambiental**. Canoas, 2003. 356p.
- BISHOP, A.J.R.; SCHIESTL, R.H. Homologous recombination as a mechanism of carcinogenesis. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1471, p.M109-M121, 2001.
- BISHOP, A.J.R.; SCHIESTL, R.H. Role of homologous recombination in carcinogenesis. **Experimental and Molecular Pathology**, v.74, p.94-105, 2003.
- BLASIAK, J.; GLOC, E.; WARSZAWSKI, M. A comparison of the *in vitro* genotoxicity of anticancer drugs idarubicin and mitoxantrone. **Acta Biochimica Polonica**, v.49, p.145-155, 2002.
- BLASIAK, J. et al. Genotoxicity of idarubicin and its modulation by vitamins C and E and amifostine. **Chemico-Biological Interactions**, v.140, p.1-18, 2002.
- BRUMFIELD, J.M.; MACKAY, W.J. Mutagenic activity of idarubicin and epirubicin in the bacterium *Salmonella typhimurium*. **Texas Journal of Science**, v.54, p.249-260, 2002.
- DANESI, R. et al. Pharmacokinetic-pharmacodynamic relationships of the anthracycline anticancer drugs. **Clinical Pharmacokinetics**, v.41, p.431-444, 2002.
- EL-MAHDY SAYED OTHMAN, O. Cytogenetic effect of the anticancer drug epirubicin on Chinese hamster cell line *in vitro*. **Mutation Research**, v.468, p.109-115, 2000.
- 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, 1988.
- FREI, H. et al. Structure/activity relationships of the genotoxic potencies of sixteen pyrrolizidine alkaloids assayed for the induction of somatic mutation and recombination in wing cells of *Drosophila melanogaster*. **Chemico-Biological Interactions**, v.83, p.1-22, 1992.
- GENTILE, J.M. et al. Effect of selected antimutagens on the genotoxicity of antitumour agents. **Mutation Research**, v.402, p.289-298, 1998.
- GONZÁLEZ-CID, M. et al. Correlation between chromosome damage and apoptosis induced by fludarabine and idarubicin in normal human lymphocytes. **Toxicology**, v.171, p.215-222, 2002.
- 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.
- GRAF, U. et al. Thirty compounds tested in the *Drosophila* wing spot test. **Mutation Research**, v.222, p.359-373, 1989.
- GRAF, U. et al. Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. **Mutation Research**, v.271, p.59-67, 1984.
- GRIGGS, J. J. Reducing the toxicity of anticancer therapy: new strategies. **Leukemia Research**, v.1001, p.S27-S33, 1998.
- HANDE, K. R. Clinical applications of anticancer drugs targeted to topoisomerase II. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1400, p.173-184, 1998.
- HRDINA R. et al. Anthracycline-induced cardiotoxicity. **Acta Medica (Hradec Kralove)**, v.43, p.75-82, 2000.
- JAGETIA, G. C.; NAYAK, V. Effect of doxorubicin on cell survival and micronuclei formation in HeLa cells exposed to different doses of gamma-radiation. **Strahlentherapie und Onkologie**, v.176, p.422-428, 2000.
- LARSEN, A. K.; ESCARGUEIL, A. E.; SKLADANOWSKI, A. Catalytic topoisomerase II inhibitors in cancer therapy. **Pharmacology and Therapeutics**, v.99, p.167-181, 2003.
- LEHMANN, M. 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.
- LEHMANN, M. et al. Activity of topoisomerase inhibitors daunorubicin, idarubicin and aclarubicin in the *Drosophila* somatic mutation and recombination test. **Environmental and Molecular Mutagenesis** (no prelo).
- LINDSLEY, D.L.; ZIMM, G.G. (Eds.). **The Genome of *Drosophila melanogaster***. New York: Academic Press, 1992. 1133p.
- MACKAY, W.J.; PHELPS, L.A. The induction of GC to AT transition mutations with adriamycin in the bacterium *Salmonella typhimurium*. **Texas Journal of Science**, v.53, p.239-246, 2001.
- MACKAY, W.J. et al. The mutagenic effects of anthracyclines in the bacterium *Salmonella typhimurium*: induction of transition mutations with daunomycin. **Texas Journal of Science**, v.52, p.223-229, 2000.
- MONNERET, C. Recent developments in the field of antitumour anthracyclines. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.36, p.483-493, 2001.
- NEBEL, M.C.; LARRIPA, I.; GONZÁLEZ-CID, M. Differential antigenotoxic and cytoprotective effect of amifostine in idarubicin-treated mice. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v.39, p.3-9, 2002.
- 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.
- VILLANI, P. et al. Antimutagenic effects of alphahederin in vitro. **Annales de Biologie**

**Clinique**, Paris, v.59, p.285-289, 2001.

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.348-56, 2002.

WEISS G.; LOYEVSKY M.; GORDEUK V.R. Dexrazoxane (ICRF-187). **General Pharmacology**, v.32, p.155-158, 1999.

WHITTAKER, P. et al. Genotoxicity of iron chelators in L5178Y mouse lymphoma cells. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v.38, p.347-356, 2001.