

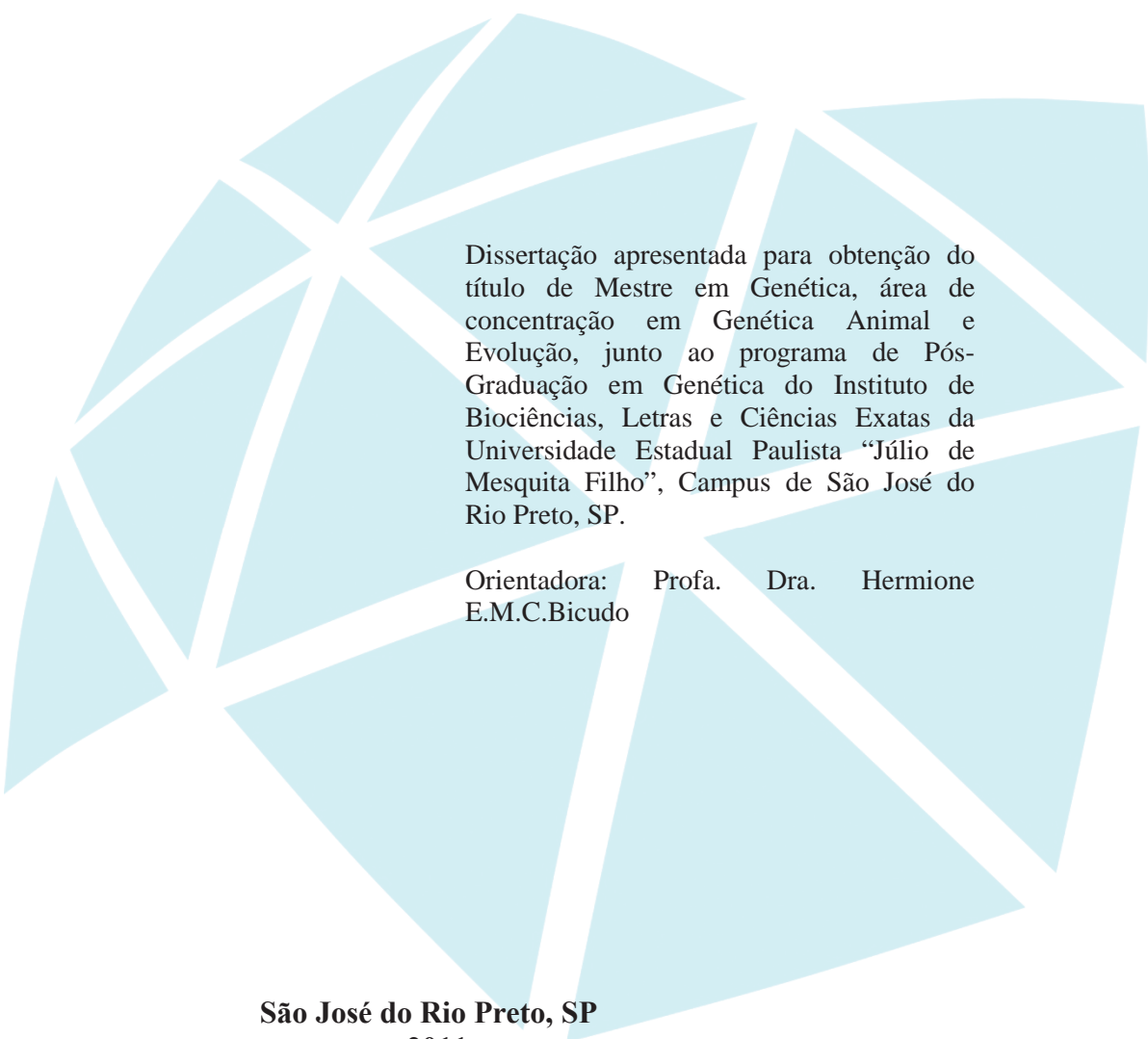
**VERONICA FERREIRA RANGEL**

Efeito da Hidroxiuréia, uma substância de uso médico,  
sobre parâmetros biológicos de *Drosophila*  
*melanogaster*

**Dissertação apresentada para  
obtenção do Título de Mestre  
em Genética.**

VERONICA FERREIRA RANGEL

**Efeito da Hidroxiuréia, uma substância de uso médico,  
sobre parâmetros biológicos de *Drosophila  
melanogaster***



Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Genética, área de concentração em Genética Animal e Evolução, junto ao programa de Pós-Graduação em Genética do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto, SP.

Orientadora: Profa. Dra. Hermione  
E.M.C.Bicudo

**São José do Rio Preto, SP  
2011**

Rangel, Veronica Ferreira.

Efeito da Hidroxiuréia, uma substância de uso médico, sobre parâmetros biológicos de *Drosophila melanogaster* / Veronica Ferreira Rangel. - São José do Rio Preto : [s.n.], 2011.

67 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Hermione Elly Melara de Campos Bicudo

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Genética. 2. *Drosophila melanogaster*. 3. Hidroxiuréia – Parâmetros biológicos. I. Hermione Elly Melara de Campos. II. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU - 575

**Veronica Ferreira Rangel**

**Efeito da Hidroxiuréia, uma substância de uso médico,  
sobre parâmetros biológicos de *Drosophila melanogaster***

COMISSÃO JULGADORA

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE

Titulares:

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Hermione E. M. C. Bicudo

(Presidente e Orientadora)

Prof. Dr. Otávio Ricci Júnior

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cláudia Regina Bonini Domingos

Suplentes:

Profa. Dra. Mary Massumi Itoyama

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Aparecida Marin Morales

São José do Rio Preto, 12/08/2011.

*“Aprenda como se você fosse viver para sempre.  
Viva como se você fosse morrer amanhã”.*

Mahatma Gandhi

*Dedico este trabalho aos meus pais Júnior e Rita, que sempre me estimularam a dar este grande passo. Com muita sabedoria, discernimento, bom senso e dedicação estiveram ao meu lado me encorajando nas horas difíceis e me aplaudindo nos momentos de glória. Obrigada por serem meus pais, fonte de inspiração, apoio e ensino diário.*

## AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho é fruto da colaboração direta ou indireta de muitas pessoas que conviveram comigo. Neste momento agradeço igualmente a todos que me acompanharam no decorrer destes anos marcados com lutas e conquistas, especialmente:

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Hermione Elly Melara de Campos Bicudo, minha sincera gratidão por seus ensinamentos, pela confiança em mim depositada, pela paciência, dedicação, incentivo, apoio e orientação, sempre de forma muito carinhosa, para que, juntas, pudéssemos concluir este trabalho.

Agradeço ao Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista do campus de São José do Rio Preto, São Paulo, pelo espaço fornecido.

Ao programa de Pós-Graduação em Genética do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista do campus de São José do Rio Preto, São Paulo, e à sua coordenadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lilian Madi Ravazzi pela oportunidade e incentivo, e ao corpo docente do mesmo, pelo apoio e pela importante contribuição para o meu aperfeiçoamento acadêmico-profissional.

Ao Departamento de Biologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista do campus de São José do Rio Preto, São Paulo, e aos seus funcionários pelos serviços prestados, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela confiança e apoio financeiro.

Aos membros da banca examinadora pela disponibilidade em avaliarem este trabalho, bem como o meu desempenho.

Ao Dr. Otávio Ricci Júnior, Diretor Administrativo do Hemocentro de São José do Rio Preto, São Paulo, pela colaboração em fornecer o medicamento utilizado neste trabalho.

Ao Prof. Dr. Antônio José Manzato pela disponibilidade em contribuir nas análises estatísticas.

Ao colega do Laboratório de Vetores, André, pelo excelente convívio durante esse tempo e pela amizade. Em especial à minha amiga Thaís, do mesmo laboratório, que além de companheira teve uma imensa contribuição neste trabalho, me auxiliando sempre que precisei; sou grata por seus ensinamentos, apoio, incentivo e pelos momentos de descontração.

Ao Danilo Grunig Humberto Silva pela disponibilidade em me ajudar, nos vários momentos os quais precisei.

Agradeço a Deus, pela vida e por mais uma conquista.

Aos meus pais e ao meu irmão, pelo alicerce, incentivo, paciência, carinho, e, principalmente, por estarem presentes em todos os momentos da minha vida.

Ao meu companheiro Fillipe, pela presença constante, pela paciência, compreensão, incentivo, apoio e carinho, que foram necessários para me manter confiante.

Agradeço ao meu filho Arthur, por alimentar minhas energias e me fortalecer a cada dia que recebo o seu mais aconchegante abraço de saudade, em decorrência dos meus momentos de ausência.

Agradeço às minhas amigas-irmãs Ludmila, Monica e Nádia pelo carinho e compreensão, e por todos os momentos que fizeram parte de nossas vidas, ora alegres, ora não muito, mas o importante é que neles estivemos sempre juntas.

A todas as pessoas que contribuíram para a realização deste trabalho ao longo desse tempo.

**MEUS SINCEROS AGRADECIMENTOS!!!**



## RESUMO

A Hidroxiuréia (HU) é utilizada como medicamento em várias doenças humanas, incluindo anemia falciforme e câncer. Basicamente, na primeira, atua aumentando a porcentagem de hemoglobina fetal, o que diminui a gravidade do quadro clínico por inibir a polimerização da hemoglobina S e, no segundo, atua impedindo a síntese de DNA na fase S, desta forma bloqueando a divisão celular. Há preocupação com o tratamento longo com essa substância por causar efeitos colaterais, um dos quais se relaciona a problemas na fertilidade masculina. A *Drosophila*, devido a várias características, como ser o organismo com maior homologia com o homem quanto às doenças genéticas, por utilizar esses genes homólogos nos mesmos processos, mas de forma simplificada e por expressar os genes humanos em construções transgênicas, é hoje muito utilizada em estudos de doenças humanas e de respostas a fármacos, buscando esclarecer mecanismos de ação e conseqüências do uso. Neste trabalho, foram estudados, sob o efeito da HU em duas concentrações (0,1 e 0,25mg/ml de meio de cultura), no modelo biológico mencionado, as características taxa de oviposição, produtividade (número de descendentes), tempo de desenvolvimento, mortalidade, longevidade, tempo de pré-cópula, duração da cópula, presença de alterações morfológicas externas, morfologia do aparelho reprodutor masculino, modificações do peso das moscas, morfologia dos cromossomos politênicos e padrão de expressão das enzimas esterásicas. A produtividade foi analisada em seis gerações consecutivas, visando obter maior compreensão dos efeitos da HU. Cada característica analisada envolveu uma metodologia diferente, descrita no corpo do trabalho. A análise estatística foi baseada na aplicação da ANOVA, e nas comparações de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney. Em algumas características o efeito do tratamento mostrou-se dose-dependente. À vista dos números, a produtividade foi maior nos experimentos controle (C) das seis gerações e, entre os tratados, foi maior em HU0,1 do que em HU0,25, exceto na primeira geração. A análise estatística, porém, mostrou diferenças significantes apenas na geração F5, envolvendo as comparações entre C e cada um dos tratamentos. Não se observou também diferença significativa na produtividade entre fêmeas e machos. Quanto à taxa de oviposição, à vista dos números, foi maior no C e, em seqüência decrescente, nos tratados HU 0,1 e HU 0,25. Considerando a oviposição total, foram significantes as comparações entre C x 0,25 e entre HU 0,1 x HU 0,25, embora à vista dos números, o tratamento HU 0,1 tenha mostrado uma redução de 14% na oviposição quando

comparada com a do C. A comparação entre os grupos, quanto ao tempo de desenvolvimento mostrou, no primeiro de dois experimentos, algumas diferenças significantes, como por exemplo no intervalo pupa-adulto entre todas as comparações de grupos e no intervalo ovo-adulto, entre C x HU0,25 e entre HU0,1 x HU0,25. No segundo experimento houve diferenças significantes nas comparações entre C e HU 0,25 e entre os dois grupos tratados, sendo que estes mostraram um menor tempo de desenvolvimento em relação ao tratado HU0,25. Diferenças quanto à taxa de mortalidade foram exclusivamente significantes, nos intervalos ovo-larva e ovo-adulto, envolvendo as comparações entre C e HU 0,25 e entre as duas concentrações de tratamento, embora, à vista dos números haja também diferenças entre HU 0,1 e o C, e entre o C e HU 0,25 em todas as fases do desenvolvimento. Quanto à longevidade, os resultados foram significantes para todas as comparações, tanto em F3 como em F4, para fêmeas e machos, porém as diferenças foram variáveis, ora o controle sendo maior que os tratados, ora os tratados apresentando maior longevidade que o controle. Não foram constatadas alterações morfológicas externas em fêmeas ou machos e nem do aparelho reprodutor masculino que pudessem ser atribuídas ao uso da HU nas condições do presente trabalho. Pequenas alterações de peso foram mostradas pelas fêmeas tratadas, mas é preciso uma ampliação dos dados para melhor avaliação. Também não foram encontradas alterações da estrutura cromatínica dos cromossomos politênicos atribuíveis ao uso da HU. A comparação do padrão de esterases nos géis dos grupos controle e tratados sugeriu redução da expressão da banda  $\alpha$ -esterásica AChE, nos machos. De modo geral, os resultados obtidos no presente estudo mostraram que, para várias das características analisadas há uma perspectiva promissora de aprofundamento das informações com o uso de *Drosophila melanogaster* como modelo biológico.

**Palavras-chave:** hidroxíurea, produtividade, taxa de oviposição, taxa de mortalidade, longevidade, padrão de esterases, estrutura cromossômica, toxicidade medicamentosa.

## ABSTRACT

Hydroxyurea (HU) is used as a medicine in several human diseases, including sickle cell disease (SCD) and cancer. Basically, in the first, HU acts by increasing the percentage of fetal hemoglobin, thus decreasing the severity of the disease symptoms due to inhibition of the hemoglobin S polymerization. In the second mentioned disease, it acts by preventing DNA synthesis in S phase, thereby blocking cell division. There is some concern about side effects caused by the long-term treatment with HU. One of them relates to problems in male fertility. *Drosophila*, because of its characteristics, such as being the organism with the highest homologies with man as to genetic diseases, since it uses homologous genes in these processes in a simplified form, and also by expressing human genes in transgenic constructs, is now being widely used in studies of human diseases and responses to drugs, seeking for clarifying action mechanisms and consequences of their use. In this work, we studied, in *Drosophila* biological characteristics under the effect of HU in two concentrations (0.1 and 0.25 mg / ml of culture medium), including oviposition rate, productivity (number of offspring), time development, mortality, longevity, pre-mating and mating duration, presence of morphological changes in external morphology and in the male reproductive system, fly weight changes, polytene chromosome morphology and patterns of esterase enzymes. Productivity was analyzed in six consecutive generations. Each feature analyzed involved a different methodology, described in the body of the work. Statistical analysis was based on the application of ANOVA, and comparisons using the Kruskal-Wallis and Mann-Whitney tests. In some characteristics, the effect of treatment was dose-dependent. In the light of numbers, productivity was higher in control experiments (C) of six generations, and among the treated ones with HU 0.1, productivity was higher than in the treated with HU 0.25, except for the first generation. Statistical analysis, however, showed significant differences only in F5 generation, involving comparisons between C and each treatment. There was no significant difference in productivity between females and males. The oviposition rate, also in the light of numbers, was higher in C decreasing in the sequence HU 0.1 and HU 0.25. Considering the total oviposition rate, the comparisons were significant between in C x HU 0.25 and HU 0.1 x HU 0.25, although the HU 0.1 treatment has shown a 14% reduction in oviposition compared to C. To experiments on developmental time were performed. In the first experiment significant differences were observed, in the pupa-adult interval of all comparisons of groups and in the egg-adult in the comparisons C x HU 0.25 and HU 0.1 x HU 0.25. In the second experiment on developmental time there were significant differences in the comparisons between C and HU 0.25 and between the two treated groups; the longest development time was shown by HU 0.25 treatment. Differences in mortality were significant in the intervals egg-larva and egg-adult, involving comparisons between the C and HU 0.25 and between the two treatments; however in the light of numbers C x HU 0.1, in all comparisons developmental stages and C x HU 0.25, in the remaining comparisons stages. As for longevity, the results were significant for all comparisons in both F3 and F4, for females and males, but the differences were variable, sometimes the control being greater than the treatments and sometimes

occurring the opposite. No change in the external morphology of males and females flies and in the male reproductive system were observed in the conditions of this work. Small weight changes were shown by the treated groups, but an extension of the data is necessary for better evaluation. No changes were also found in the chromatin structure of polytene chromosomes attributable to the use of HU. The comparison of the pattern of esterases in the gels of treated and control groups indicated a reduced expression of the  $\alpha$ -esterase band AChE, in males. Overall, the present data showed that, for several of the characteristics analyzed there is a promising prospect of deepening information with the use of *Drosophila melanogaster* as biological model.

Keywords: Hydroxyurea, productivity, oviposition rate, mortality rate, longevity, standard of esterases, chromosomal structure, drug toxicity.

## SUMÁRIO

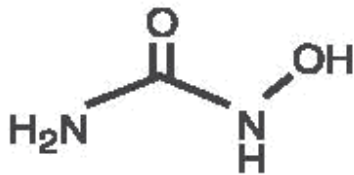
1. INTRODUÇÃO.....	13
1.1 - Caracterização química da Hidroxiuréia.....	13
1.2 - Uso da HU em medicina.....	13
1.3 - Metabolismo e ação da HU.....	14
1.4 - Efeitos colaterais .....	16
1.5 - Estudos citogenéticos e genéticos dos efeitos da HU.....	18
2. OBJETIVOS.....	23
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	24
3.1 – Espécie utilizada.....	24
3.2 – Meio de cultura.....	24
3.3 – Características analisadas.....	24
3.4 – Experimentos.....	25
3.4.1 – Taxa de oviposição.....	25
3.4.2 – Produtividade.....	25
3.4.3 – Tempo de desenvolvimento.....	26
3.4.4 – Mortalidade.....	26
3.4.5 – Longevidade.....	26
3.4.6 – Tempo de pré-cópula e cópula.....	26
3.4.7 – Análise da morfologia externa.....	27
3.4.8 – Análise do aparelho reprodutor masculino.....	27
3.4.9 – Peso das moscas.....	27
3.4.10 – Análise cromossômica.....	27
3.4.11 – Análise do padrão de esterases.....	28
3.4.12 – Análise estatística.....	28
4. RESULTADOS.....	29
4.1 - Taxa de oviposição.....	29
4.2 – Produtividade.....	32
4.3 - Tempo de desenvolvimento.....	32
4.4 – Mortalidade.....	40
4.5 – Longevidade.....	40
4.6 - Tempo de pré-cópula e cópula.....	44
4.7 - Análise da morfologia externa.....	44
4.8 - Análise do aparelho reprodutor masculino.....	44
4.9 - Peso das moscas.....	44
4.10 - Análise cromossômica.....	49
4.11 - Análise do padrão de esterases.....	49
5. DISCUSSÃO.....	53
6. CONCLUSÕES.....	58
7. REFERÊNCIAS.....	59

## 1. INTRODUÇÃO

A hidroxiuréia (HU) é um medicamento de grande importância clínica, que tem sido aplicado a várias doenças humanas, mas cuja utilização está ligada a efeitos colaterais graves que devem ser melhor conhecidos para monitoramento e, se possível, neutralização (FORTINI; BONINI, 2000; FORTINI *et al.*, 2000; GANDHI *et al.*, 2006).

### 1.1 - Caracterização química da Hidroxiuréia

A Hidroxiuréia ( $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}_2$ ), também conhecida como Hidroxicarbamida, ocorre sob a forma de um pó branco cristalino, sem sabor. Sua fórmula estrutural é:



É um composto solúvel em água que se espalha igualmente pelos fluidos do corpo (SABAN; BUJAK, 2009).

### 1.2 - Uso da HU em medicina

Segundo a literatura, desde 1960 a HU vem sendo aplicada, na medicina, para tratamento de várias doenças (KOVACIC, 2010). Entre elas incluem-se especialmente neoplasias, (abrangendo leucemia mielóide crônica - CML, policitemia vera, carcinoma de cabeça e pescoço, ovário e cervix e melanoma) (DONEHOWER, 1992; VOKES *et al.*, 2003; WONG *et al.*, 2006) e a anemia falciforme (SCD – Sickle Cell Disease) (HILLERY *et al.*, 2000; ULUG *et al.*, 2008). Destaca-se também seu uso como antivírus (LORI *et al.*, 1994).

O efeito antitumoral da HU deve-se a que ela inibe a redutase ribonucleotídica (RNR), enzima dependente do ferro, considerada crucial para conversão de ribonucleotídeos em desoxirribonucleotídeos. Conseqüentemente atua como um agente citotóxico específico da fase S do ciclo celular (TANG *et al.*, 2005; KOVACIC, 2010).

A inclusão do uso da HU no tratamento da SCD (CHARACHE *et al.*, 1995; BANDEIRA *et al.*, 2004; THORNBURG *et al.*, 2009) é considerada um “divisor de águas” no progresso do

tratamento (BERTHAUT et al, 2008). Ela modificou consideravelmente o prognóstico da doença, fazendo com que um número bem maior de pacientes atinja a idade reprodutiva, com uma qualidade de vida bastante melhorada devido à redução de complicações causadas pela doença (KOREN *et al*, 2008; STEINBERG *et al*, 2010).

No Brasil, a aplicação da HU no tratamento dessa doença tem sido preconizada pelo Ministério da Saúde que, recentemente, reiterou a validade de seu uso, orientando, detalhadamente o procedimento a ser seguido na sua utilização (Portaria SAS/MS nº 872, de 06 de novembro de 2002).

É possível, assim, afirmar com base na literatura, que apesar de efeitos colaterais, que serão descritos mais adiante, a HU é ainda o ponto alto no tratamento da SCD. Seu uso, que tem sido amplo em adultos, está em fase crescente na aplicação em crianças (ULUG et al., 2008; THORNBURG *et al*, 2009). Porém, permanece ainda em estudo quanto ao seu uso no tratamento de crianças de tenra idade, mas as pesquisas sugerem que pode ser igualmente efetiva, sendo ainda um redutor da síndrome torácica aguda gerada na infância pela doença. O Projeto Baby Hug, iniciado em 2.000, do qual participam atualmente 14 centros americanos, é um dos mais relevantes nesses estudos (MAGALHÃES, 2007; WARE et al., 2010). Assim, no caso da SCD, em que ainda não foi encontrada uma droga ou tratamento substituto que seja mais adequado, a HU permanece como essencial, apesar da busca contínua de outras soluções. As pesquisas com terapia gênica e reparo genético com células-tronco, encontram-se em desenvolvimento, e assim, permanecem ainda como possibilidades futuras de alternativa de cura. O transplante da medula óssea é considerado atualmente a única forma de cura, mas seu uso é limitado devido à falta de doadores saudáveis HLA-compatíveis (SINGH et al., 2010). Pesquisas buscam reduzir a toxicidade do processo para torná-lo viável nesses pacientes (KRISHAMURTI *et al*. 2008).

### **1.3 - Metabolismo e ação da HU**

Tanto em relação ao seu efeito anti-neoplásico como com relação a seu efeito na SCD (as duas aplicações mais amplas), e também como anti-retroviral, o mecanismo preciso de ação da HU ainda não está suficientemente conhecido.

A revisão de Kovacic (2010), relativa ao metabolismo e mecanismos de ação da HU, cita a formação de carbamoil nitroso como um intermediário que por sua vez sofre oxidação com formação subsequente de nitroxil e óxido nítrico. O carbamoil nitroso pode estar envolvido na

transferência de elétrons, na formação de espécies oxigenadas reativas (ROS) e no estresse oxidativo. Ainda de acordo com esse autor, a sinalização celular desempenha um papel significativo na ação biológica da HU. Carbamoil nitroso, nitroxil e complexos metálicos da HU (ferro III) são considerados os principais fatores nos seus efeitos fisiológicos.

As neoplasias geralmente têm origem em um descontrole do processo de divisão celular (TATSUOSHI; WONG, 2011). Como já mencionado, nestes casos, o efeito da HU parece decorrer de um bloqueio causado na síntese de DNA. A HU agiria como um inibidor da redutase ribonucleotídica sem interferir na síntese do ácido ribonucléico ou de proteínas. A ação sobre a redutase ribonucleotídica interfere na conversão de ribonucleotídeos em desoxirribonucleotídeos, impedindo a continuidade da divisão celular (YARBRO, 1992; SILVA *et al.*, 2006). Atualmente, o interesse está mais voltado ao derivado ácido hidroxâmico, o qual focaliza enzimas específicas envolvidas na progressão do câncer, como desacetilases histônicas, metaloproteinases da matriz e também a RNR, já mencionada (ALVINO *et al.*, 2007; SABAN; BUJAK, 2009).

A SCD é uma doença genética causada por uma mutação na cadeia  $\beta$ -globina da hemoglobina (SMITH *et al.*, 2009; FLANAGAN *et al.*, 2010). Nos seus portadores, há tendência da hemoglobina S (HbS) polimerizar-se sob condições de baixa tensão de oxigênio, o que leva à deformação das hemácias que assumem a forma de foice característica. Essas células falcizadas, que não são flexíveis, obstruem os pequenos vasos sanguíneos ocasionando dano tecidual, dor e anemia. Enfarte pulmonar e dano cardiovascular causam um índice elevado de mortalidade. Esses processos são supostamente desencadeados pela anormalidade da membrana dos eritrócitos, os quais expõem a fosfatidilserina, ligante da anexina V à camada externa da membrana citoplasmática. Como consequência ocorre uma ativação das células endoteliais vasculares que promovem a aderência dos leucócitos nas vênulas. Os leucócitos aderidos captam os eritrócitos falcizados e discóides causando a vaso-oclusão transitória que desencadeia os múltiplos sintomas da doença (JONG *et al.*, 2001; SHIMAUTI, 2011).

É importante observar que, embora todos os indivíduos com SCD tenham a mesma mutação no gene da  $\beta$ -globina, a severidade da doença mostra ampla variação. A concentração de hemoglobina fetal (HbF) é uma das principais causas dessa variabilidade. A HbF é produzida predominantemente durante a vida fetal, estando geralmente presente em concentrações baixas nos adultos (~1%) e sendo restrita a uma pequena população de glóbulos vermelhos chamados células F. HbF tem a capacidade de reduzir a tendência de HbS de polimerizar (ULUG *et al.*,



2008; ORKIN; HIGGS, 2010). No tratamento da anemia falciforme, a HU atua aumentando as concentrações de HbF, que podem diminuir a gravidade da doença pela mencionada capacidade de inibir a polimerização da HbS. O mecanismo preciso de ação não é conhecido, mas parece que a HU aumenta os níveis de óxido nítrico, causando a ativação da guanil-ciclase solúvel e, conseqüentemente, o aumento do GMP cíclico e a ativação da síntese da  $\gamma$ -globulina necessária para a hemoglobina fetal. Esse fenômeno é acompanhado da remoção rápida das células que produzem preferencialmente a HbS (COKIC *et al.*, 2003).

Outros efeitos estão ainda contribuindo para a eficácia terapêutica da HU na SCD, que incluem também o aumento dos níveis de hemoglobina total, o aumento do volume corpuscular médio dos glóbulos vermelhos, contagem reduzida de glóbulos brancos, reticulócitos e plaquetas, redução da desidratação intracelular das células vermelhas, aderência reduzida de glóbulos vermelhos ao endotélio e aumento da produção de óxido nítrico nas células endoteliais (ULUG *et al.*, 2008).

A HU apresenta ainda propriedades anti-retrovirais em doenças como a AIDS (FRANK *et al.* 2004). Na atuação antiretroviral, o mecanismo se baseia na redução da produção de desoxirribonucleotídeos, via inibição da redutase ribonucleotídica pela remoção dos radicais tirosil livres que estão envolvidos na redução dos nucleosídeos difosfatos (PLATT, 2008). A não disponibilidade de blocos de construção suficientes impede a produção de partículas virais funcionais (GAO *et al.*, 1993; LORI *et al.*, 1994).

#### **1.4 - Efeitos colaterais**

Os efeitos colaterais relacionados ao uso da HU são muito numerosos, podendo-se considerar os de curto e os de longo prazo. De acordo com Brawley *et al.* (2008) os de curto prazo são dose-dependentes e intrínsecos ao seu efeito terapêutico, incluindo leucopenia (redução da contagem de leucócitos), trombocitopenia (redução da contagem de plaquetas), anemia (redução da contagem de eritrócitos) e redução da contagem de reticulócitos. Em conseqüência pode causar redução da resistência facilitando a ocorrência de infecções, devido ao decréscimo do número de glóbulos brancos e sangramento (causada pela redução da produção de plaquetas). Pode também levar a um aumento da taxa de ácido úrico no sangue, e outros, como náuseas, vômito e diarreia. A pele também mostra efeitos colaterais na terapia a longo termo, manifestando a dermatopatia, incluindo também a alopecia, a produção de suor excessivo e o

aparecimento de mucosite, inclusive no aparelho digestório (WEINLICH *et al.*, 1998; YOUNG *et al.*, 2000).

O uso de HU tem também apresentado efeitos teratogênicos, mutagênicos e carcinogênicos. Em pacientes que têm recebido HU em tratamento longo, para tratamento de distúrbio mieloproliferativo, como a policitemia vera e a trombocitemia, tem sido reportada a ocorrência de uma leucemia secundária. Não é conclusivo, porém, se esse efeito é secundário ao uso da HU ou é associado à doença latente do paciente (SEKI *et al.*, 2003). Câncer de pele também tem sido descrito em pacientes que recebem HU em longo prazo (BEST; PETIT, 1998).

Até que sejam realizados estudos suficientes, apenas marcadores indiretos de dano no DNA podem ser avaliados (FRIEDRISH, 2008). Por exemplo, não há estudos convencionais longos para avaliar o potencial carcinogênico da HU. No entanto, a administração intraperitoneal de 125-250 mg/Kg três vezes por semana durante seis meses, em fêmeas de camundongos, aumentou a incidência de tumores mamários quando comparadas ao controle (Hydroxyurea Official FDA information).

Efeitos clastogênicos foram detectados, *in vitro*, em células de hamster e linfoblastos humanos e, *in vivo*, pelo teste Sister Chromatid Exchanges (SCE) em roedores, e de micronúcleos em camundongos. A HU causa também a transformação de células embrionárias de camundongos em fenótipos tumorigênicos (BACHETTI; WHITMORE, 2008).

A genotoxicidade dessa substância tem sido constatada por efeitos mutagênicos observados *in vitro*, utilizando-se bactérias, fungos, protozoários e células de mamíferos. Hanft *et al.* (2000) analisaram a mutagenicidade da HU em crianças em dois testes realizados *in vitro*, tendo encontrado, em ambos, um leve aumento em eventos VDJ (relacionados com a recombinação ilegítima entre os genes  $V\gamma$  e  $J\beta$ ) em indivíduos tratados.

A reprodução também é afetada pelo uso da HU. Vários trabalhos têm relatado a redução da fertilidade em animais e humanos do sexo masculino sob seu efeito. De acordo com Brawley *et al.* (2008) um possível efeito de curto prazo é a redução da produção de espermatozoides que pode ser temporária e reversível. Os resultados têm sido detectados tanto em indivíduos submetidos a tratamento para SCD como para câncer, sendo que no caso da SCD admite-se que a HU apenas amplia o efeito da própria doença, na alteração da fertilidade (BERTHAUT *et al.*, 2008).

Alguns autores mostraram que a HU altera várias características relacionadas aos espermatozóides, incluindo redução na sua contagem, já mencionada, e sua mobilidade. Evenson e Jost (2009) analisaram, em camundongo, o efeito da HU nas células testiculares e na diferenciação da cromatina dos espermatozóides. Dependendo da concentração utilizada ocorreu uma redução do peso testicular de 50% (500 mg/Kg de HU em 29 dias de tratamento). Os autores observaram também alteração morfológica da cabeça do espermatozóide. Tratamentos de longa duração em meninos mostraram que, quando adultos, tornaram-se portadores de oligospermia (em tratamentos por 8 e 9 anos) ou azoospermia (em tratamentos por 12 e 15 anos) (LUKUSA; VERMYLEN, 2008). A HU pode afetar ainda a morfologia dos espermatozóides. A cessação do tratamento, em dois de três casos estudados em que se detectou a azoospermia, resultou em recuperação da espermatogênese, mas a morfologia e a mobilidade dos espermatozóides permaneceram prejudicadas (GRIGG, 2007).

Segundo Brawley *et al.* (2008), a longo prazo, os efeitos potenciais da HU podem incluir também defeitos congênitos na progênie dos indivíduos tratados e atrasos de crescimento em crianças que recebem a droga. Estes danos em consequência de tratamentos de longo prazo podem ser permanentes e irreversíveis, mas ainda não estão devidamente comprovados. A preocupação decorre de que defeitos congênitos foram produzidos em animais experimentais. Ratas grávidas e camundongos que receberam HU em doses muito elevadas tiveram um maior número de filhos com defeitos congênitos. No entanto, o número de defeitos de nascimento entre filhos de mulheres que receberam HU durante a gravidez não parece ter sido aumentado. Os efeitos em longo prazo da HU em crianças expostas à droga no útero são desconhecidas. No entanto, devido a preocupações sobre o potencial da HU para causar defeitos de nascimento, o medicamento não é geralmente prescrito para mulheres grávidas, supondo-se que a gravidez, nessas condições, pode causar dano ou a morte do feto.

### **1.5 - Estudos citogenéticos e genéticos dos efeitos da HU**

Alguns estudos têm abordado o efeito do uso da HU utilizando técnicas citogenéticas. Entre eles inclui-se a observação, em camundongos, que a HU altera a estrutura da cromatina na espermatogênese (LEFFAC, 1988; EVENSON; JOST, 2009). No inseto *Bradysia hygida*, a HU causou inibição do desenvolvimento de todos os pufes de DNA nos cromossomos salivares (SAUAIA *et al.*, 1971).

Na literatura foram encontrados dois trabalhos voltados à citogenética, sob efeito da HU, em *Drosophila*. Um deles, de Banga *et al.*, (1986), em que os autores analisaram o efeito da HU em alguns mutantes desse organismo, tendo verificado a presença de um alto número de aberrações cromossômicas em alguns dos mutantes, considerados mais sensíveis. Outro, de Sorsa e Sorsa (1970), mostrou alterações na cromatina dos cromossomos politênicos das glândulas salivares.

A capacidade da HU para detectar lesões produzidas por agentes alquilantes foi verificada pela técnica *comet assay* (gel eletroforese de células individuais). Speit e Schutz (2008) verificaram, em tratamento *in vitro*, que há um aumento significativo da migração do DNA, acompanhado por fortes distúrbios do ciclo celular, efeitos citotóxicos caracterizados por índice mitótico reduzido e aumento da frequência de células com aberrações cromossômicas.

Essa substância mostrou também que seu uso amplia a sensibilidade da técnica de micronúcleo na resposta a certas genotoxinas (GÜERCI *et al.*, 2009).

Resultados de Friedrish (2008) apresentaram níveis significativamente maiores de danos ao DNA, em indivíduos tratados com HU quando comparados ao grupo controle. A dose de HU utilizada e o índice médio de danos foram positivamente correlacionados. Ao comparar a distribuição nas quatro classes de danos estabelecidas em pacientes e controles, observou-se que a diferença é causada por um aumento predominante do número de células na classe 1, o que reflete um aumento homogeneamente distribuído no número de células ligeiramente danificadas (que caracteriza essa classe), em vez de um número reduzido de células altamente danificadas.

O número de estudos genéticos e de regulação gênica no uso da HU tem apresentado um crescimento acentuado nos últimos cinco anos. Por meio desses estudos tem-se observado uma alta complexidade dos processos genéticos na resposta celular ao uso da HU.

No que se refere à síntese aumentada da HbF, que é a resposta-chave no tratamento da SCD pela HU, a regulação de sua expressão depende da presença de elementos que atuam em *cis* em relação ao complexo da  $\beta$ -globina e de elementos que atuam em *trans*, isto é, proteínas reguladoras, especialmente fatores de transcrição que ativam genes específicos. Entre essas proteínas incluem-se CATA-1, GATA-2 e NF- E2 que se expressam principalmente na linhagem eritróide (DUARTE, 2002).

Moreira *et al.* (2008), com o objetivo de obter informações sobre os mecanismos moleculares responsáveis pela indução, mediada pela HU, da transcrição para produção da

globina fetal compararam a expressão gênica em reticulócitos de pacientes SCA com e sem tratamento com essa substância. Foi verificado que o tratamento alterou a expressão de genes, incluindo *SUDS<sub>3</sub>*, *F<sub>2</sub>D<sub>5</sub>* e *PHC<sub>3</sub>* que podem estar associados à regulação da expressão da globina. O primeiro desses genes produz uma subunidade de um complexo correpressor dependente da desacetilase histônica, com propriedades de modificação da cromatina, cujo desenovelamento é necessário para que ocorra a transcrição. O segundo é um membro de uma família gênica (*frizzled*) que codifica proteínas transmembrana que são receptores de proteínas de sinalização. Segundo os autores, tanto mudanças na estrutura cromatínica como nas vias de sinalização são processos que, sabidamente, afetam a regulação da síntese de globina. O terceiro gene é membro do grupo Polycomb, necessário para manter os genes homeóticos em estado silencioso, no desenvolvimento de *Drosophila* e mamíferos. Membros dessa família protéica foram também associados com a regulação da expressão da globina, em decorrência de modificações cromatínicas. Tanto a expressão desse gene como do gene *HBA* mostraram uma redução da expressão no grupo tratado pela HU. Os autores consideram que as modificações observadas, da expressão gênica, podem ter um papel importante no aumento da hemoglobina F, em pacientes tratados. Consideram também que o gene *PCH<sub>3</sub>* pode ser um alvo potencial para novas terapias em SCA e outras doenças globínicas.

Em outro trabalho, Bradner *et al.* (2010), usando uma estratégia que integra genética química, enzimológica e RNA de interferência, identificaram função correpressora para as desacetilases histônicas HDAC1 e HDAC2, na regulação dos loci para  $\gamma$  e  $\epsilon$ -globinas. Verificaram também que inibidores de alta potência desses alvos regulam a produção aumentada da hemoglobina fetal *in vitro* e em humanos. Assim, segundo os autores, o desenvolvimento de moléculas específicas para HDAC1 ou HDAC2 pode gerar uma terapia efetiva e bem tolerada para portadores de SCA. Inibidores de HDAC, que já são usados clinicamente para outras doenças, são candidatos mais imediatos para o uso, sozinhos ou em associação com HU.

Huang *et al.* (2009) analisaram, em câncer de cólon humano, o efeito da HU nos perfis de associação aos promotores de dois fatores de transcrição altamente relacionados entre si – p53 e p73, o primeiro dos quais é conhecido como supressor de tumor. Ambos são ativados por estresse genotóxico para regular um conjunto de respostas celulares. Estudos também têm sugerido que ambos ativam independentemente o programa celular apoptótico em resposta a drogas citotóxicas. Também segundo resultados anteriores, o tratamento com HU aumenta a expressão

de p53 e p73 na linhagem celular HCTI 16-3, produzida a partir de câncer de cólon humano. O trabalho dos autores comparou a atividade de ligação ao promotor dos dois fatores de transcrição, antes e depois do estresse genotóxico induzido pela HU. Os resultados de Huang, por sua vez, mostraram que depois do tratamento com HU os promotores a que se ligava p53 ainda eram ligados por p73, mas p73 passou a associar-se com promotores adicionais que não se ligaram com p53. Os autores verificaram ainda que HU induz a ligação de p73 (mas não de p53) ao promotor do gene *MLH3* (que é uma proteína de reparo) e induz aumento da transcrição desse gene.

Estudo de Matmati *et al.* (2009) forneceu informações sobre a regulação do ciclo celular em resposta ao estresse gerado pelo agente tóxico HU. Os autores observaram que células mutantes de *Saccharomyces cerevisiae* nas quais falta o inositol fosfolipase C (*gene ISC1*) mostram susceptibilidade a agentes genotóxicos, como a HU. Nessas células ocorre um bloqueio G<sub>2</sub>/M no tratamento com HU. Essa resposta é revelada pela fosforilação aumentada da quinase dependente de ciclina (Cdc 28p) que é um regulador essencial do ciclo celular em *S. cerevisiae*. Durante as diferentes fases do ciclo celular, a Cdc 28p associa-se com diferentes ciclinas. A atividade quinase é requerida para o início da duplicação do DNA e transcrição G<sub>2</sub>/M. O estudo revelou assim que a Isc1p é necessária para a progressão do ciclo celular e protege as células do efeito genotóxico da HU. Os resultados mostraram que células sem Isc1p apresentam níveis mais altos de Cdc 28-Tyr-19 seguindo tratamento com HU. A fosforilação da tirosina 19 de Cdc resulta na inibição de sua atividade e conseqüentemente na incapacidade de cruzar o ponto de checagem G<sub>2</sub>/M. Na ausência de Isc1p e presença de HU, ocorre o bloqueio G<sub>2</sub>/M devido à ativação do ponto de checagem G<sub>2</sub>/M dependente de Swe1/Cdc28.

Outro estudo, de Sassi *et al.* (2009), mostrou que a HU não é um substrato dos citocromos (CYP 450) e da p-glicoproteína, na concentração utilizada. Segundo os autores, esses resultados indicam que a HU não deve causar interações com os substratos daquelas enzimas. Os citocromos são enzimas que atuam na detoxificação de substâncias exógenas, especialmente inseticidas. (BERGÉ *et al.*, 1998; AMENYA *et al.*, 2008; ZHU *et al.*, 2010).

Em conclusão, os dados moleculares ainda são insuficientes para o conhecimento adequado aos mecanismos de ação da HU. Só a evolução dos estudos laboratoriais poderá modificar esse quadro permitindo o controle da SCA de forma mais segura.

No trabalho de Dubacq *et. al* (2006) foi analisada a resposta transcricional a essa substância, pelo uso de microarrays de DNA contendo todas as seqüências codificadoras de levedura. Os resultados mostraram a ativação específica dos regulons Yap (redox- response) e Aft (mobilização do ferro).

Outro estudo abordou os efeitos da HU na indução de apoptose, em cérebro de feto de camundongo (WOO *et al.*, 2005). Foram detectados níveis significativamente elevados do RNA mensageiro dos genes relacionados à apoptose (*fas*, *fasL* e *bax*) e dos genes relacionados ao ciclo celular (*mdm2* e *p21*). Ainda de acordo com esses autores, a apoptose induzida pela HU no cérebro fetal deve ser mediada pela proteína p53, já mencionada.

p53 é uma fosfoproteína codificada pelo gene supressor de tumor *Tp53* e é componente de uma das vias responsáveis pelo controle da apoptose e do ciclo celular. Quando ocorre algum dano à estrutura do DNA, observa-se um acúmulo da proteína p53 na célula que irá, em última instância, efetuar o reparo no DNA lesado. Caso estas alterações sejam muito amplas e não possam ser reparadas, a proteína p53 irá enviar sinais para outras proteínas pró-apoptóticas que irão induzir essas células à morte (WOO *et al.* 2005; HO, *et al.*, 2006).

Foi constatado também o efeito da HU no aumento dos níveis protéicos da sintetase do óxido nítrico endotelial (eNOS), causada pela inibição da atividade proteassômica, isto é, da atividade de desdobramento das proteínas, necessário ao metabolismo celular normal. A HU aumenta a produção do óxido nítrico nas células endoteliais por meio da fosforilação do eNOS (COKIC *et al.*, 2007).

De modo geral observa-se, portanto, que os resultados disponíveis na literatura sugerem ou mostram que a HU atua sobre o funcionamento e a regulação do funcionamento gênicos, afetando o ciclo celular, a renovação das proteínas celulares e, no nível cromossômico, causando alterações da cromatina e aberrações cromossômicas. No nível do organismo afeta várias funções como a reprodução e a digestão e ainda causa doenças secundárias como o câncer. A tudo isto, porém se contrapõe o fato de ser praticamente o único medicamento disponível atualmente para tratamento da SCD, doença na qual atua de modo a prover melhor qualidade de vida e maior sobrevida. Isto mostra que os efeitos da HU devem continuar sendo analisados porque poderão eventualmente produzir informações que auxiliem o controle dos processos colaterais nocivos que afetam seu uso. Tem havido a procura de outros agentes farmacológicos que revertam a passagem da globulina gama para a beta, mas ainda sem o devido sucesso (SINGH *et al.*, 2010).

No presente trabalho pretendeu-se analisar os efeitos da HU em um organismo-modelo mais simples, mas reconhecido atualmente como bastante eficiente para estudo de problemas ligados a doenças humanas, a *Drosophila melanogaster* (WOLFGANG *et al.* 2005; WOLF *et al.*, 2006; APIDIAMAKIS; RHAME, 2011). Pretendeu-se, também, relacionar, tanto quanto possível, os efeitos causados pela HU na *Drosophila* com os efeitos colaterais causados pela mesma substância no ser humano.

## 2. OBJETIVOS

**Objetivo geral:** O objetivo do presente trabalho foi analisar os efeitos da Hidroxiuréia, utilizando *Drosophila melanogaster* como modelo. Esse organismo, com mais de cem anos de uso em pesquisas, especialmente nas áreas de genética e evolução, recentemente vem sendo utilizado em estudos de doenças humanas com muito sucesso. As razões para esse emprego são várias, incluindo não só a facilidade de manutenção e manipulação em laboratório e o conhecimento acumulado em tantos anos de estudo do organismo, mas também a alta homologia genética entre esse organismo e o homem no que se refere ao número de genes envolvidos em doenças. Em um conjunto de 289 genes humanos que atuam em doenças como câncer, doenças neurológicas e do sistema imune, 177 são muito semelhantes a genes da *Drosophila melanogaster*. Em entrevista concedida por Hoskins, publicada na Research News, esse pesquisador, da Universidade de Berkeley – USA, afirmou que a bioquímica subjacente de *Drosophila* e humanos é remarcadamente semelhante e que, portanto, a *Drosophila* pode fornecer informações para entender as doenças humanas causadas por genes defeituosos. Paralelamente, a maior simplicidade dos mecanismos de ação e regulação gênica e sua capacidade de responder a fármacos de forma similar ao homem são também pontos altos nas vantagens de seu uso (PREUSS, 2000).

Tendo em vista que os especialistas que utilizam a HU queixam-se especialmente da dificuldade em acompanhar o efeito no tempo e nas gerações subsequentes dos pacientes (o que restringe o conhecimento) e sendo isto possível realizar na *Drosophila*, estabelecemos os seguintes objetivos específicos:

- Analisar sob efeito da HU

1. a produtividade (número de descendentes) em gerações subsequentes,
2. a longevidade,



3. os parâmetros oviposição, mortalidade e tempo de desenvolvimento,
4. os tempos de pré-cópula e cópula,
5. a morfologia externa e os órgãos reprodutores masculinos,
6. a variação de peso
7. o padrão de esterases,
8. a estrutura cromatínica dos cromossomos politênicos das glândulas salivares.

Entendemos que os resultados desses estudos podem nortear abordagens direcionadas a respostas específicas mais profundas.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 - Espécie utilizada**

Foi utilizada a mosca *Drosophila melanogaster*, coletada em São José do Rio Preto (Lat. - 20° 49' 11", Long. + 49° 22' 46" = + 3h 17m 31s, Alt. 489) e mantida em estoque há aproximadamente três anos, no Departamento de Biologia do IBILCE - UNESP. O estoque foi iniciado a partir de cruzamento massal, com número superior a 10 casais e é mantida no laboratório em câmara de temperatura constante, a  $\pm 20$  °C.

#### **3.2 - Meio de cultura**

O meio de cultura para manutenção do estoque e dos experimentos foi preparado com banana, Agar-agar e fermento (*Saccharomyces cerevisiae*). Nos frascos de um quarto de litro foram colocados, aproximadamente, 40 mL de meio de cultura e nos tubos para cruzamento, 4ml. No meio de cultura dos experimentos tratados foi acrescentada a substância Hidroxiuréia (HU) em duas concentrações escolhidas com base em testes preliminares: 0,1 e 0,25mg/ml de meio. A HU foi diluída diretamente em meio de cultura morno.

#### **3.3 - Características analisadas**

Foram analisados a taxa de oviposição, a produtividade, o tempo de desenvolvimento, a mortalidade, a longevidade, os tempos de pré-cópula e cópula, a morfologia externa de fêmeas e machos, a morfologia dos órgãos reprodutores masculinos, o peso das moscas, a presença de alterações da estrutura dos cromossomos politênicos e alterações do padrão de enzimas esterásicas, sob o efeito da HU.

### 3.4 - Experimentos

Os procedimentos utilizados para análise das características mencionadas são descritos a seguir:

#### 3.4.1 - Taxa de Oviposição

Foram feitos cruzamentos de vinte casais virgens, com cinco dias de idade, da geração F4 de cada grupo (controle e tratados HU0,1 e HU0,25). Após 24 horas, as fêmeas foram separadas dos machos e colocadas, uma a uma, dentro de garrafas onde foi introduzida uma colher de sobremesa contendo meio de cultura de Agar-agar e açúcar ( 100ml de água, 0,5g de Agar-agar e 2,5g de açúcar). Foram preparadas colheres com este meio e com o meio contendo HU, nas duas concentrações. Sobre o meio, na colher, foi colocado fermento (*Saccharomyces cerevisiae*) em suspensão para ativar a oviposição. A cada 24 horas de exposição às moscas, as colheres contendo os ovos eram substituídas por novas e os ovos eram contados. As trocas de colheres foram realizadas até que cessasse a oviposição.

#### 3.4.2 - Produtividade

A produtividade foi estudada em seis gerações consecutivas. O número de gerações foi estabelecido em função da disponibilidade de tempo para desenvolvimento do projeto.

Dois tipos de experimentos foram utilizados para estudo deste parâmetro: cruzamentos por casal, na primeira geração e cruzamentos massais nas demais. Em ambos os casos as moscas eram virgens, com idade de cinco dias. Os cruzamentos por casal foram feitos em tubos de vidro, sendo 50 casais para cada tipo de experimento, com três réplicas e três transferências para tubos contendo meio de cultura novo, em intervalos de quatro dias. Esse esquema foi também utilizado nos cruzamentos massais, iniciados com 15 casais.

Em cada geração os descendentes foram contados e computados diariamente, aproximadamente às mesmas horas, separadamente por sexo, desde o primeiro até o último nascido.

### ***3.4.3 - Tempo de desenvolvimento***

Foram realizados dois experimentos para análise desta característica. No primeiro, 240 ovos foram distribuídos em oito garrafas (trinta ovos em cada) contendo os mesmos meios de cultura dos frascos em que eram mantidas as moscas que os produziram. Foram computados os tempos de desenvolvimento ovo-larva, larva-pupa e pupa-adulto.

No segundo experimento, foram utilizados 200 ovos obtidos, basicamente, no mesmo esquema do primeiro. Neste experimento foi computado apenas o tempo de desenvolvimento ovo-adulto.

### ***3.4.4 - Mortalidade***

A mortalidade foi analisada nas fases ovo-larva, larva-pupa, pupa-adulto e ovo-adulto, computando-se o número de indivíduos reduzido ao longo do desenvolvimento.

### ***3.4.5 - Longevidade***

A análise da longevidade foi realizada com moscas virgens, das gerações F3 e F4 do experimento de produtividade. As moscas de mesma idade foram separadas por sexo e colocadas em tubos contendo meio de cultura controle e tratado. No total foram analisadas 120 moscas para cada experimento, distribuídas em quatro tubos com 15 machos e quatro tubos com 15 fêmeas. As moscas mortas foram computadas diariamente até a última.

### ***3.4.6 - Tempo de Cópula e Pré-cópula***

Foram montados, em tubos vazios, quatro tipos de experimentos, com casais individuais de cinco dias de idade, da seguinte forma: machos controle com fêmeas controle, machos tratados com fêmeas tratadas, machos controle com fêmeas tratadas e machos tratados com fêmeas controle. Apenas moscas do tratamento HU0,25 foram analisadas. Os casais foram observados em dois períodos, com duração de uma hora, sendo o primeiro na parte da manhã, às 10:00h e 24°C e o segundo, na parte da tarde, às 15:00h e 26°C. Para cada tipo de experimento foram analisados 10 casais em cada período.

### ***3.4.7 - Análise da morfologia externa***

Foram analisadas, quanto à morfologia externa, 50 fêmeas e 50 machos por grupo (controle e tratado com HU0,25), da quarta geração.

### ***3.4.8 - Análise do aparelho reprodutor masculino***

Foi analisado o aparelho reprodutor de 15 machos controle e 15 machos tratados com HU0,25, da quarta geração, para a observação de possíveis alterações morfológicas. Em especial analisou-se a morfologia aparente do par de testículos, órgão tubular espiralado onde são produzidos os espermatozoides e o par de glândulas acessórias ou paragônias cujo conteúdo, juntamente com o acasalamento, estimula o processo de ovulação (HEINFETZ *et al.*, 2000). Foi também observada a existência de movimentação da cauda dos espermatozoides.

### ***3.4.9 - Peso das moscas***

Grupos de 15 moscas, separadas por sexo, dos experimentos controle e tratados com as duas concentrações de HU, de sete dias de idade, da segunda à sexta geração, foram pesados em balança de precisão.

### ***3.4.10 - Análise cromossômica***

Na análise dos cromossomos politênicos foram utilizadas três técnicas. A primeira consistiu na análise das glândulas salivares extraídas dos experimentos controle e tratados das gerações 5<sup>a</sup> e 6<sup>a</sup>, na segunda, as larvas foram colocadas em solução contendo HU e, na terceira, as glândulas salivares foram dissecadas e tratadas diretamente. A técnica de preparo das lâminas consistiu na dissecação das glândulas salivares em solução de Demerec (Demerec, 1945), transferência para lâminas contendo uma gota deorceína lacto- acética a 2%, onde permaneceram 10 minutos, substituindo-se aorceína lacto - acética por uma gota de solução aquosa de ácido láctico a 50% e esmagamento sob lamínula 15 minutos depois. As lamínulas foram vedadas com esmalte de unhas incolor para evitar a evaporação. Os cromossomos foram analisados em microscópio Zeiss Axio A1 SCOPE utilizando o programa de análise de imagem Axio Vision LE versão 4.8.

### ***3.4.11 - Análise do padrão de esterases***

Para a preparação das amostras visando à análise eletroforética foram utilizados machos e fêmeas virgens, de sete a dez dias de idade, individualmente, dos experimentos controle e tratados. As moscas foram mantidas em freezer até a preparação, por sete dias. A análise do padrão de esterases foi realizada nas gerações F3 a F6, com os seguintes números de moscas: F3 e F4 = 20 fêmeas e 20 machos de cada grupo (controle, HU0,1 e HU0,25); F5 e F6 = 10 fêmeas e 10 machos controle e 20 fêmeas e 20 machos HU0,1 e HU0,25. As moscas foram homogeneizadas a 0 °C, em 25 µl de solução-tampão (0,1 M Tris plus 10% de glicerol, pH 8,8), para obtenção das amostras.

O padrão de produção de esterases foi analisado em géis de poliacrilamida utilizando um gel de separação a 12% e um de empilhamento a 4%. As amostras (10µl) foram submetidas à eletroforese por 4,0 h a 25 ° C, usando uma tensão constante de 200 V e 0,1 M de Tris-glicina (pH 8,3) como eletrólito de corrida.

Para identificação das esterases, após a eletroforese os géis foram imersos por 45 min em 50 ml de fosfato de sódio 0,1 M (pH 6,2), à temperatura ambiente (25 ° C) e em seguida submetidos a uma reação de coloração no escuro (1 h) com uma solução contendo 20 mg de  $\alpha$  - e 15 mg de  $\beta$ -naphthil acetatos dissolvidos em 1 mL de acetona (utilizados como substrato) e 60 mg de Fast Blue RR e 5 ml de n-propanol dissolvidos em 50 mL de solução tampão de fosfato de sódio. Os géis foram descoloridos por 24 h, em uma solução contendo 250 mL de álcool etílico, 100 mL de ácido acético e 650 mL de água destilada e, em seguida, secos à temperatura ambiente, seguindo a técnica de Ceron et al. (1992).

Após esse tratamento, se o  $\alpha$ -naphthil acetato for preferencialmente hidrolisado, as bandas nos géis tornam-se escuras e são denominadas  $\alpha$ -esterases. Quando o  $\beta$ -naphthil acetato é preferencialmente hidrolisado, as bandas mostram coloração vermelha e são chamadas  $\beta$ -esterases. As proteínas que hidrolisam igualmente ambos,  $\alpha$  e  $\beta$ -naphthil acetatos, coram-se de magenta e são nomeadas  $\alpha,\beta$ -esterases.

### ***3.4.12 - Análise estatística***

A análise estatística envolveu basicamente o uso da ANOVA (Análise de Variância) e dos testes não-paramétricos de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney.

## 4. RESULTADOS

Os resultados obtidos no estudo dos diferentes parâmetros estão descritos a seguir.

### 4.1 - Taxa de Oviposição

Os ovos ovipositados nos meios de cultura controle e tratados foram computados até que cessasse a oviposição, ocorrida no décimo dia. Foram obtidos 991, 851 e 446 ovos, respectivamente para os grupos controle, HU0,1 e HU 0,25, e, na mesma sequência dos grupos, com médias e desvio padrão (dp) de 110 (77,9), 94,6 (37,8) e 49,6 (22,3) (Tabela 1). A Figura 1 ilustra o comportamento de oviposição das moscas ao longo do tempo.

Devido à variação dos valores, foram feitas comparações diárias entre os grupos pelo teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis. Nos casos em que o teste foi significativo foram feitas comparações das medianas, duas a duas, com aplicação do teste Mann-Whitney. A aplicação destes testes mostrou que foram significantes as diferenças observadas nas comparações dos três grupos nos dias 2 ( H= 5,27; P= 0,049), 3 ( H= 8,42; P= 0,015) e 4 ( H= 11,54; P= 0,003). Os desdobramentos das comparações das medianas, duas a duas, mostraram que, nos três dias a oviposição do grupo controle foi significativamente maior do que a do grupo HU0,25, enquanto nos tratamentos entre si e no controle comparado à HU0,1 a oviposição não diferiu.

Para comparação das médias ( $\bar{x}$ ) por dia de oviposição entre os três grupos, observa-se na Tabela 1 que os dados não são homocedásticos, ou seja, as variabilidades dos grupos são diferentes, o que não permite a aplicação do procedimento ANOVA. A aplicação do teste de Kruskal-Wallis para comparação das três medianas (md) resultou nos valores H=7,94 e P=0,019, sendo portanto significantes. Os desdobramentos das comparações dos grupos, dois a dois, utilizando o teste não-paramétrico de Mann-Whitney mostraram: C x HU0,1: ( W=84,0, P=0,929, NS); C x HU0,25: ( W=109,5, P=0,038, S); e HU0,1 x HU0,25: (W=116,0, P=0,008, S).

Embora o controle não mostre diferença significativa quando comparado com o tratamento HU0,1, à vista dos números, observa-se uma redução total de 140 ovos no tratamento HU0,1, diferença essa que se distribuiu ao longo dos nove dias.

Verifica-se, pela observação do gráfico de distribuição da oviposição que, enquanto no grupo controle, até o quinto dia, ela correspondeu a, aproximadamente 80% do total de ovos produzidos, no grupo HU0,1, correspondeu a 67,5% e no grupo HU0,25 a 64%.

Tabela 1: Ovos produzidos, por dia, por 20 fêmeas de *Drosophila melanogaster* colocadas em tubos separados, contados nos nove dias de oviposição: número médio diário e desvio padrão (dp), média, mediana e (dp), para os grupos Controle, HU0,1 e HU0,25.

Grupo	Número de ovos (e dp/dia)									Total	$\bar{x}$	md	dp
	1	2	3	4	5	6	7	8	9				
C	91 (7,8)	165 (10,3)	147 (7,5)	273 (12)	108 (6,1)	89 (8,1)	65 (4,8)	47 (3,9)	6 (0,6)	991	110	91	77,9
HU 0,1	137 (6,7)	95 (4,5)	97 (6,2)	128 (8,8)	115 (6,0)	68 (4,8)	103 (7,4)	99 (5,5)	9 (0,9)	851	94,6	99	37,8
HU 0,25	41 (4,7)	67 (6,3)	56 (4,4)	80 (7,4)	41 (3,0)	33 (2,4)	69 (4,9)	53 (4,9)	6 (0,8)	446	49,6	53	22,3

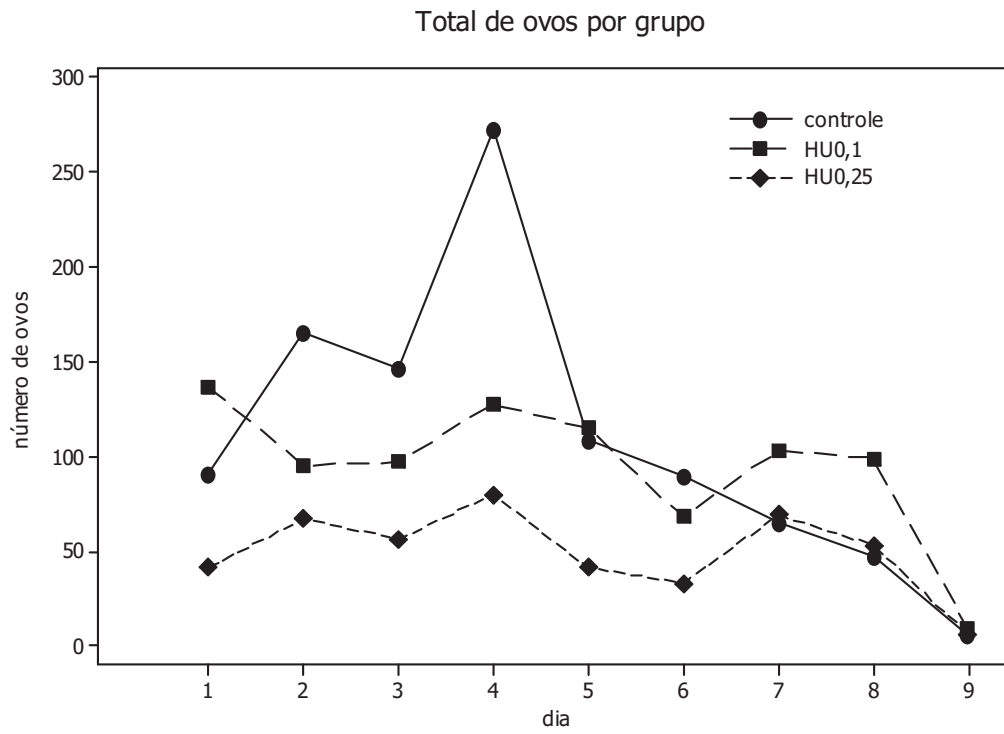


Figura 1: Número de ovos produzidos diariamente por 20 fêmeas de *Drosophila melanogaster*, no período que transcorreu da postura do primeiro ao último ovo, para os grupos Controle e tratados HU0,1 e HU0,25.



#### **4.2 - Produtividade**

Os dados de produtividade dos casais colocados em meio controle e tratados (HU0,1 e HU0,25) estão apresentados na Tabela 2, onde consta a produtividade média por fêmea parental, considerando, separadamente, descendentes fêmeas, machos e sua soma (produtividade total).

A comparação estatística das proporções de fêmeas e machos descendentes mostrou que não diferem nos três experimentos e ao longo das gerações. A análise estatística por aplicação da ANOVA, para comparação das médias de produtividade entre os grupos, seguido do desdobramento para comparações múltiplas duas a duas, mostrou diferenças significantes apenas na geração F5 ( $F= 21,5$ ;  $P= 0,002$ ), envolvendo o controle com os tratados, HU0,1 e HU0,25.

Porém, à vista dos números, observou-se que a produtividade dos casais no experimento controle foi sempre superior ao dos experimentos tratados. Estes por sua vez mostraram que, em todas as gerações, exceto a primeira, o tratado HU0,25 apresentou produtividade menor do que HU0,1, sugerindo um efeito de dose.

O gráfico da Figura 2 apresenta a variação da produtividade média do total de moscas em cada geração e em cada grupo. Além dos diferentes níveis de produtividade nos três grupos, o gráfico mostra que especialmente as linhas correspondentes aos tratamentos HU0,1 e HU0,25, seguem paralelas.

#### **4.3 - Tempo de desenvolvimento**

No primeiro experimento, o tempo de desenvolvimento foi analisado nos intervalos ovo-larva (O-L), larva-pupa (L-P), pupa-adulto (P-A), ovo-pupa (O-P) e ovo-adulto (O-A), este último correspondendo ao tempo integral do desenvolvimento. A estatística descritiva está apresentada na Tabela 3.

A aplicação da ANOVA para a comparação das médias de desenvolvimento (em horas), entre os grupos, mostrou valores de P significantes para todos os intervalos (O-L:  $F=5,97$ ; L-P:  $F= 12,16$ ; P-A:  $F=27,60$ ; O-P:  $F=5,23$ ; e O-A:  $F= 7,55$ ). O desdobramento para comparações duas a duas, mostrou, em O-L, diferenças significantes nas comparações entre controle e HU0,1 e entre os dois tratamentos. Nas comparações L-P, foi significativa a comparação entre controle e HU0,1. Em P-A, todas as comparações foram significantes. Em O-P, foi significativa a

Tabela 2: Produtividade. Número total (N), média ( $\bar{x}$ ) e desvio padrão (dp) de fêmeas (F), machos (M) e soma de fêmeas e machos (T), para a variável produtividade, obtida das fêmeas parentais, nos três grupos de tratamento, em cada geração.

Geração		Grupo	F			M			T		
			N	$\bar{x}$	dp	N	$\bar{x}$	dp	N	$\bar{x}$	dp
F1	Controle	671	14,9	4,3	635	14,1	4,2	1306	29	8,4	
	HU 0,1	396	8,8	3,2	367	8,2	3,9	754	16,8	6,6	
	HU 0,25	494	11	2	482	10,7	3,5	976	21,7	5,4	
F2	Controle	1736	38,6	11	1796	39,9	9,1	3532	78,5	20,1	
	HU 0,1	963	21,4	15,2	1059	23,5	15,5	2022	44,9	30,8	
	HU 0,25	434	9,6	1,2	399	8,9	1,3	833	18,5	2,1	
F3	Controle	1618	35,9	2,9	1575	35	5,4	3193	70,9	8,3	
	HU 0,1	1416	31,5	6,5	1429	31,8	8,1	2845	63,2	14,6	
	HU 0,25	1021	22,7	4,8	967	21,5	4,4	1988	44,2	9	
F4	Controle	1759	39	3,7	1766	39,2	3,8	3525	78,3	7,4	
	HU 0,1	1560	34,7	0,5	1594	35,4	2,6	3154	70	2,3	
	HU 0,25	1250	27,8	6,8	1294	28,8	5	2544	56,5	11,8	
F5	Controle	1451	32,2	4,2	1388	30,8	3,8	2839	63,1	8	
	HU 0,1	647	14,4	5,3	587	13	5	1234	27,4	10,3	
	HU 0,25	581	12,9	2,1	630	14	1,9	1211	26,9	3,1	
F6	Controle	1613	35,8	6,8	1480	32,9	5,6	3093	68,7	12,4	
	HU 0,1	1525	33,9	4,9	1463	32,5	4,8	2988	66,4	9,6	
	HU 0,25	1148	25,5	7,4	1170	26	7,6	2318	51,5	14,7	

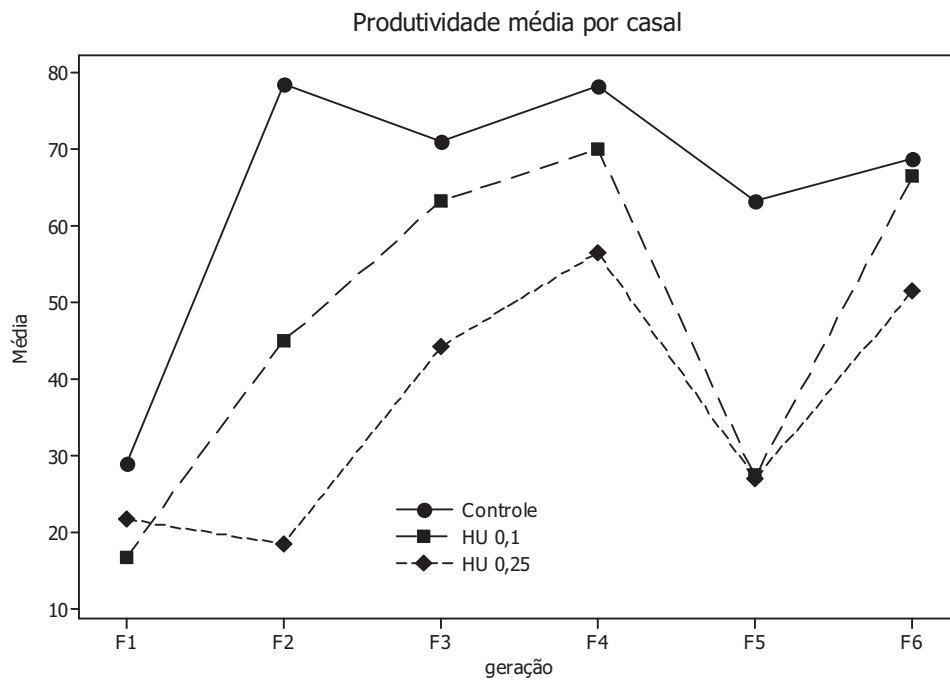


Figura 2: Produtividade média de moscas (fêmeas + machos), por casal parental, ao longo das gerações, em cada grupo.

Tabela 3: Tempo de desenvolvimento. Média ( $\bar{x}$ ), desvio padrão (dp), mínimo e máximo, para a variável tempo de desenvolvimento medido em horas, nos diferentes estadios e em cada um dos tratamentos.

Estadio	Grupo	$\bar{x}$	dp	mínimo	máximo
Ovo-larva	Controle	67,5	21,9	24	120
	HU 0,1	60,3	16,9	24	96
	HU 0,25	74	21,1	48	120
Larva-Pupa	Controle	138,3	21,2	96	168
	HU 0,1	151,4	17,2	120	192
	HU 0,25	141,8	19,5	96	168
Pupa-Adulto	Controle	170,8	18,4	144	216
	HU 0,1	156,3	22,2	96	192
	HU 0,25	138,7	17,6	120	192
Ovo-Pupa	Controle	205,8	17	168	240
	HU 0,1	210,5	19,8	168	264
	HU 0,25	218,2	20,8	168	240
Ovo-Adulto	Controle	371,7	17	336	408
	HU 0,1	365,7	25,4	312	408
	HU 0,25	352	23,3	312	384

comparação entre controle e HU0,25 e em O-A, foram significantes as comparações C x HU 0,25 e entre os tratados.

No segundo experimento, foi computado o tempo de desenvolvimento ovo-adulto em dias. A Tabela 4 e a Figura 3 apresentam os resultados obtidos nos três grupos. Observa-se que os grupos controle e tratado HU0,1 apresentaram a emergência total em três dias, enquanto no tratado HU0,25 esse tempo estendeu-se até o quinto dia. A soma do tempo decorrido desde a oviposição até a emergência mostrou, respectivamente, para as duas situações as médias, em horas, constantes da Tabela 4. Embora os grupos controle e HU0,1 tenham mostrado o mesmo tempo de emergência, em dias, houve modificação das frequências das moscas nascidas diariamente. O pico de emergência ocorreu, em ambos os casos, no segundo dia, mas a frequência de nascidos no primeiro dia foi inferior à de nascidos no terceiro dia para o grupo tratado em relação ao controle.

A aplicação do teste ANOVA mostrou valores de P significantes para a comparação das médias (em horas) entre os grupos controle e tratados. O desdobramento para comparações duas a duas, mostrou que tanto machos como fêmeas tratadas com HU0,25 apresentaram maior tempo de desenvolvimento em relação ao controle e ao tratamento com HU0,1, conforme mostrado a seguir:

Para machos controle X tratados

				Individual 95% CIs For Mean Based on Pooled StDev			
Level	N	Mean	StDev	-----+-----+-----+-----+			
C	72	316,33	12,94	(-*-*)			
HU 0,1	68	319,06	13,15	(-*-*)			
HU 0,25	70	340,11	20,82	(-*-*)			
				-----+-----+-----+-----+			
				320,0	328,0	336,0	344,0

Pooled StDev = 16,06

Tukey 95% Simultaneous Confidence Intervals  
All Pairwise Comparisons among Levels of trat

Individual Confidence level = 98,09%

trat = C subtracted from:

trat	Lower	Center	Upper	-----+-----+-----+-----+			
HU 0,1	-3,69	2,73	9,14	(-*-*)			
HU 0,25	17,41	23,78	30,15	(-*-*)			
				-----+-----+-----+-----+			
				-15	0	15	30

trat = HU 0,1 subtracted from:

trat	Lower	Center	Upper	-----+-----+-----+-----+			
HU 0,25	14,60	21,06	27,51	(-*-*)			
				-----+-----+-----+-----+			
				-15	0	15	30

O resultado das comparações para as fêmeas foi o mesmo obtido para os machos.

Observa-se que o tempo de desenvolvimento é maior nos tratados do que no controle, obedecendo a um efeito de dose.

Tabela 4. Distribuição diária da emergência e tempo médio de desenvolvimento ( $\bar{x}$ ), em horas, dos adultos machos (M) e fêmeas (F) nascidos a partir de 200 ovos por grupo. C = controle; HU0,1 e HU0,25 = tratados com Hidroxiuréia. TG = total de machos + fêmeas. A média do tempo de desenvolvimento foi calculada considerando o tempo decorrido a partir da oviposição.

Grupo	Dias										Total			$\bar{x}$ (h)	
	1		2		3		4		5		M	F	TG	M	F
	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F					
C	5	28	49	87	18	13	-	-	-	-	72	128	200	316,3	309,2
HU0,1	3	19	42	88	23	20	-	-	-	-	68	127	195	319,0	312,2
HU0,25	1	9	13	29	34	45	17	16	5	7	70	106	176	340,1	332,1

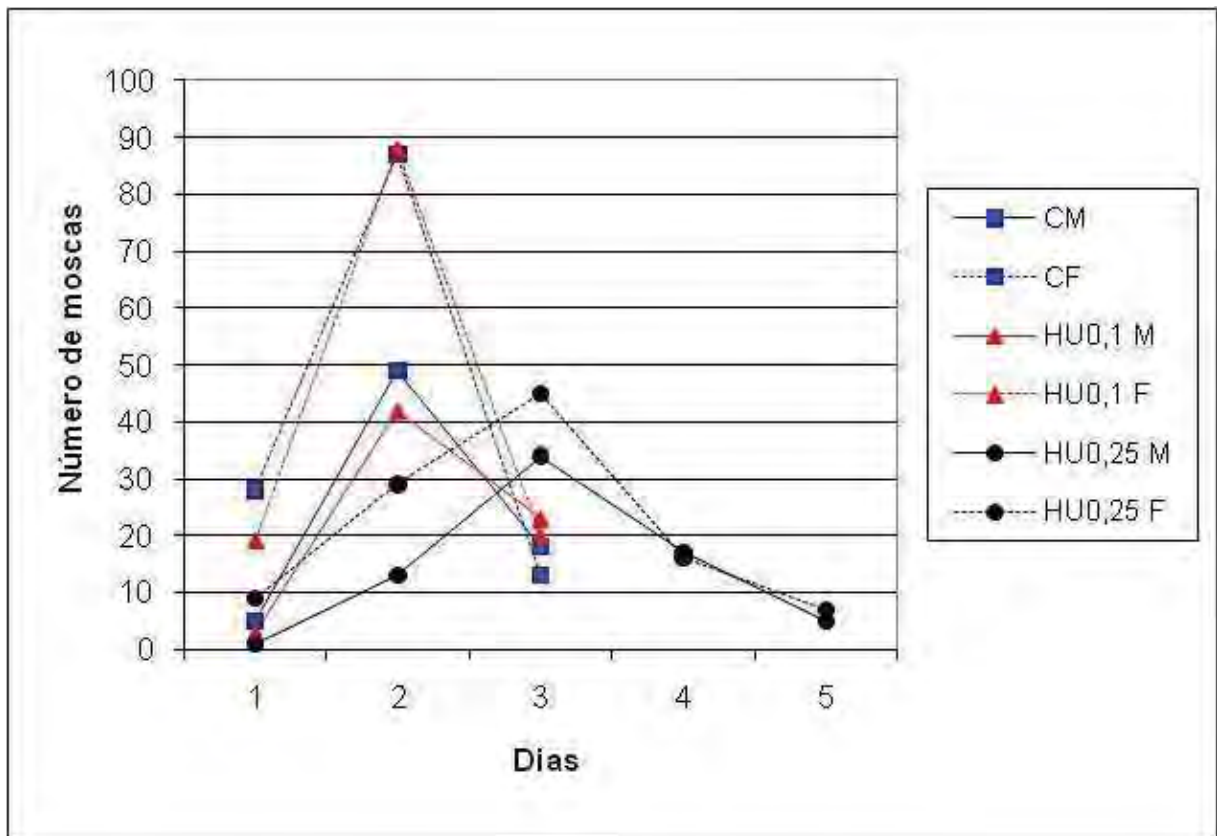


Figura 3: Distribuição da produção diária de fêmeas e machos, por grupo controle e tratados obtidos a partir de 200 ovos por grupo.



#### **4.4 - Mortalidade**

Os dados de mortalidade ovo-larva, larva-pupa, pupa-adulto e ovo-adulto foram obtidos a partir de 240 ovos por tratamento, divididos em oito garrafas com 30 ovos. Para comparação entre os grupos controle e tratados foi utilizada a transformação arco - seno da raiz da proporção de mortes, com aplicação da ANOVA em cada intervalo entre as fases do desenvolvimento.

Os dados obtidos nos intervalos entre as fases do desenvolvimento, constam na Tabela 5. Esses dados foram analisados pela estatística ANOVA comparando-se as médias entre os grupos com intervalo de 95%. Para os intervalos ovo-larva (O-L) e ovo-adulto (O-A) foram significantes as comparações do controle com HU0,25 e dos dois tratamentos entre si. Para as fases larva-pupa (L-P) e pupa-adulto (P-A) não foram realizadas as comparações entre os três grupos devido aos valores de F não-significantes.

No segundo experimento para estudo do tempo de desenvolvimento, a comparação entre o número inicial de ovos, que foi de 200 para cada grupo e o número total de adultos obtidos, permitiu verificar que, no controle, no tratado HU0,1 e no tratado HU0,25, a mortalidade ovo-adulto foi respectivamente 0%, 2,5% e 12%.

#### **4.5 - Longevidade**

A Tabela 6 mostra que, à vista dos números, a média da longevidade de ambos os tratamentos, avaliada em dias, foi menor do que a do controle, exceto para fêmeas na geração F3, em que o tratado HU0,25 superou o tratado HU0,1 e o controle. Ainda à vista dos números, na comparação entre os tratados, ocorreu aumento da longevidade no tratado HU0,25 em relação ao HU0,1 em todos os casos, exceto nos machos F4.

A análise estatística mostrou que as diferenças em F3 foram significantes para as fêmeas, nas comparações do tratado HU0,1 com o controle e entre os dois tratamentos, sendo essa diferença devida ao aumento da longevidade no tratamento HU0,25 em relação a HU0,1, e uma redução da longevidade em HU0,1 comparado ao controle. Na geração F3, com relação aos machos, apenas a comparação entre HU0,1 e o controle foi significativa (Figura 4).

Na geração F4, todas as comparações foram significantes para as fêmeas, enquanto que nos machos isto ocorreu apenas na comparação de HU0,25 com o controle.

Tabela 5: Mortalidade. Média ( $\bar{x}$ ), desvio padrão (dp), e números mínimo e máximo de moscas mortas nos intervalos ovo-larva (O-L), larva-pupa (L-P), pupa-adulto (P-A) e ovo-adulto (O-A) obtidos nos grupos controle (C) e tratados com Hidroxiuréia a 0,1mg/ml e 0,25mg/ml (HU0,1 e HU0,25, respectivamente). Resultados obtidos pela aplicação do arco seno da raiz da proporção de mortes ( $x = \arcsen\sqrt{p}$ ).

Intervalo	Grupo	$\bar{x}$	dp	mínimo	máximo
	Controle	0,61	0,37	0,00	1,19
O-L	HU 0,1	0,91	0,21	0,61	1,15
	HU 0,25	1,35	0,27	0,85	1,57
L-P	Controle	0,00	0,00	0,00	0,00
	HU 0,1	0,12	0,18	0,00	0,42
	HU 0,25	0,24	0,48	0,00	0,96
P-A	Controle	0,42	0,22	0,00	0,69
	HU 0,1	0,24	0,16	0,00	0,42
	HU 0,25	0,15	0,29	0,00	0,59
O-A	Controle	0,78	0,28	0,37	1,25
	HU 0,1	0,95	0,19	0,68	1,15
	HU 0,25	1,38	0,23	0,99	1,57

Tabela 6: Longevidade. Média ( $\bar{x}$ ), desvio padrão (dp), mínimo, mediana e máximo, para a variável longevidade (dias), nos três grupos de tratamento, gerações F3 e F4 respectivamente para fêmeas e machos.

Geração	Gênero	Grupo	$\bar{x}$	dp	mínimo	mediana	máximo
F3	Fêmea	Controle	65,5	21,6	4	73	92
		HU 0,1	50,2	24,1	3	50	97
		HU 0,25	71,7	26,3	5	84	96
	Macho	Controle	64,5	19,1	16	72	94
		HU 0,1	52,9	25,6	6	53	97
		HU 0,25	57,5	26,2	3	60	94
F4	Fêmea	Controle	68,0	16,9	10	71	92
		HU 0,1	48,6	21,4	6	44	81
		HU 0,25	57,7	20,0	7	64	83
	Macho	Controle	63,3	18,4	7	62	89
		HU 0,1	56,0	20,0	6	59	84
		HU 0,25	50,3	21,0	10	55	83

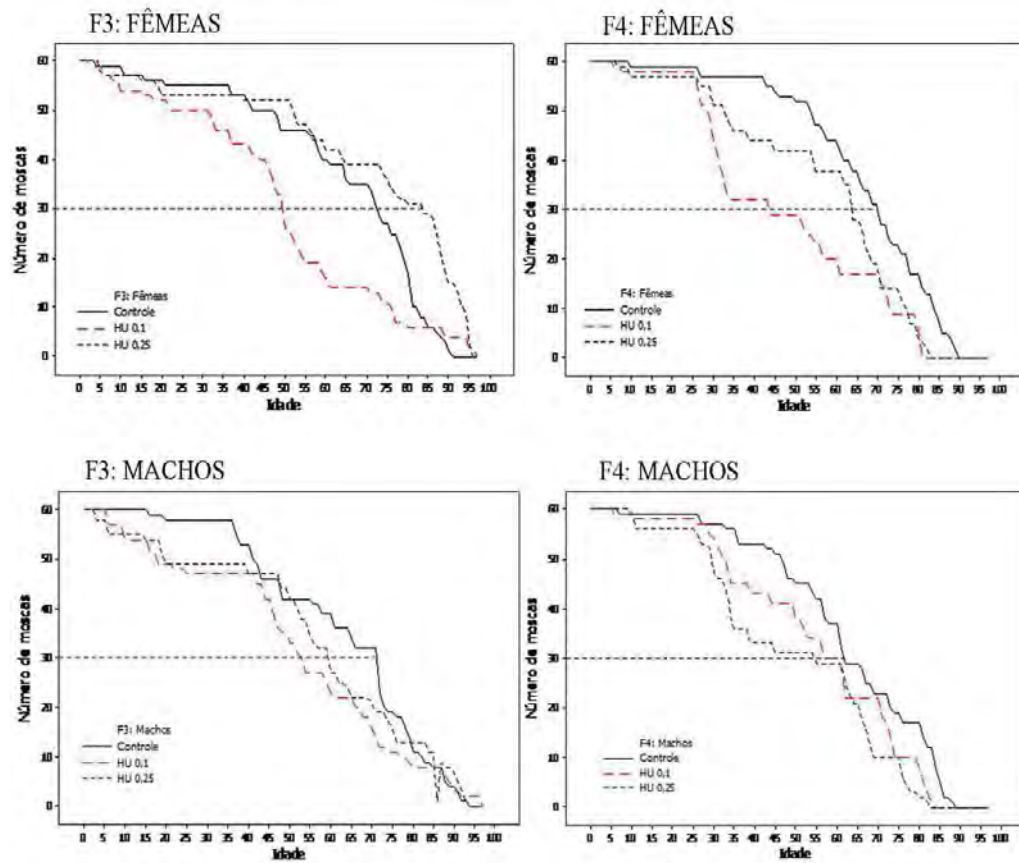


Figura 4: Gráficos de sobrevivência ao longo do tempo (medido em dias) para 60 fêmeas da geração F3, 60 fêmeas da geração F4, 60 machos da geração F3 e 60 machos da geração F4, para os grupos Controle, HU 0,1 e HU 0,25.

#### ***4.6 - Tempo de pré-cópula e cópula***

À vista dos números, a observação da Tabela 7 mostra que a frequência de cópula foi maior para os casais controle em ambos os períodos e a frequência total maior de cópula ocorreu no período da tarde. A duração média da cópula foi maior no período da manhã para todos os cruzamentos. O tempo médio de pré-cópula também foi maior em todas as combinações, no período da manhã, exceto na combinação FT x MC.

#### ***4.7 - Análise da morfologia externa***

Entre os machos controle e os tratados não foram observadas alterações morfológicas aparentes. Apenas uma das fêmeas tratadas e duas, das controle apresentaram leve alteração em um dos tergitos (Figura 5).

#### ***4.8 - Análise do aparelho reprodutor masculino***

No aparelho reprodutor masculino foram observados morfologicamente os testículos e as paragônias (Figura 6). Aparentemente não houve diferenças entre os machos tratados e os controle quanto a essas estruturas. Observou-se uma grande quantidade de espermatozoides nos dois grupos e a mobilidade dos mesmos também aparentemente não diferiu.

#### ***4.9 - Peso das moscas***

Já é conhecido o fato de que os machos de *Drosophila* são menores e apresentam peso menor do que as fêmeas. Na tabela 8 observa-se que essa diferença entre os sexos ocorreu em todas as gerações analisadas, tanto no experimento controle como nos tratados. Entretanto, observou-se também, no presente caso, diferenças para um mesmo sexo, entre as gerações. À vista dos números, na segunda geração as fêmeas tratadas, especialmente com HU0,25, mostraram peso maior do que as do controle. A partir da segunda geração, porém, houve uma tendência de redução de seu peso, enquanto as fêmeas controle tenderam a aumentá-lo a partir da terceira geração. Com relação aos machos as variações foram menores, sendo que na sexta geração, controle e tratados se igualaram.

Tabela 7. Tempo de pré-cópula e cópula (em minutos) obtidos em observações nos períodos da manhã (10:00h; 24<sup>o</sup>C) e da tarde (15:00h; 26<sup>o</sup>C), nas combinações de machos e fêmeas controle (C) e tratados a HU0,25 (T). Dez casais virgens, de cinco dias de idade foram utilizados em cada combinação.

Casais			Número de cruzamentos ocorridos	Tempo de pré-cópula			Duração da cópula		
F	M	Período		Min	Max	$\bar{x}$	Min	Max	$\bar{x}$
C	C	Manhã	5	9'	1h	33'	19'	28'	22'
		Tarde	8	7'	42'	19'	3'	22'	16'
		Total	13(65%)						
T	T	Manhã	2	21'	35'	28'	21'	23'	22'
		Tarde	5	6'	29'	16'	13'	18'	16'
		Total	7(35%)						
C	T	Manhã	4	17'	47'	31,5'	20'	27'	23'
		Tarde	1			13'			16'
		Total	5(22%)						
T	C	Manhã	2	6'	7'	6,5'	20'	26'	23'
		Tarde	6	10'	32'	17'	15'	22'	18'
		Total	8(40%)						



Figura 5. Alteração da morfologia dos tergitos (seta) observada em duas fêmeas controle (A) e em uma fêmea do tratado com HU0,25 (B).



Figura 6. Aparelho reprodutor masculino. T= testículo, P= paragonia.



Tabela 8. Pesagens (em mg) de grupos de 15 moscas dos experimentos controle (C) e tratados (HU0,1 e HU0,25), da segunda à sexta geração. F=fêmea, M=macho

Gerações	Sexo	C	HU0,1	HU0,25
Segunda	F	26,5	29,1	35,8
	M	18,6	20,9	21,1
Terceira	F	26,2	27,4	27,3
	M	18,6	19,2	20,4
Quarta	F	31,4	25,9	30,1
	M	19	18,2	19
Quinta	F	35,3	38,7	32,6
	M	20	25,2	20,4
Sexta	F	33,7	28,1	29,4
	M	21,1	21,1	21,1

#### ***4.10 - Análise cromossômica***

A análise comparada dos cromossomos politênicos dos três grupos observados nas glândulas salivares, nas diferentes técnicas utilizadas, não mostrou alterações da estrutura cromatínica nos indivíduos tratados comparados ao controle.

#### ***4.11 - Análise do padrão de esterases***

O padrão de esterases dos três grupos (controle, HU0,1 e HU0,25) foi analisado por eletroforese em géis de poliacrilamida nas gerações F2 a F6. O gel apresentado na Figura 7 mostra as bandas que apresentaram alguma diferenciação entre os indivíduos analisados: uma  $\alpha$ -esterase (cor preta) de intensa atividade que é a banda já conhecida AChE e uma  $\beta$ -esterase (cor vermelha) também já conhecida, denominada EST-6. A primeira tem função neurológica e a segunda está envolvida com a reprodução. EST-6 expressa-se mais intensamente nos machos do que nas fêmeas, sendo esta uma característica da espécie, já conhecida. No presente trabalho observou-se que essa forma de expressão ocorre independentemente do grupo considerado, isto é, no controle e nos dois tratamentos.

Quanto à AChE, verificou-se alteração possivelmente causada pelo tratamento. Essa banda foi analisada individualmente, em fêmeas e machos dos três grupos, quanto ao grau de expressão baseado na observação da intensidade de cor, a partir de F3 (devido ao pequeno número de moscas de F2 analisadas), classificando-se essa intensidade em ordem crescente de um a quatro sinais +. Os dados obtidos encontram-se resumidos na Tabela 9.

Considerando juntos os grupos iguais das quatro gerações F3 a F6 (isto é, todos os controles, todos os tratados HU0,1 e todos os tratados HU),25, foi obtido o gráfico da Figura 8. A observação dos dados da Tabela 9 e da Figura 8 mostrou que a frequência da classe de maior expressão da banda AChE (++++) sofreu redução dose-dependente, nos machos, e aumento nas fêmeas.

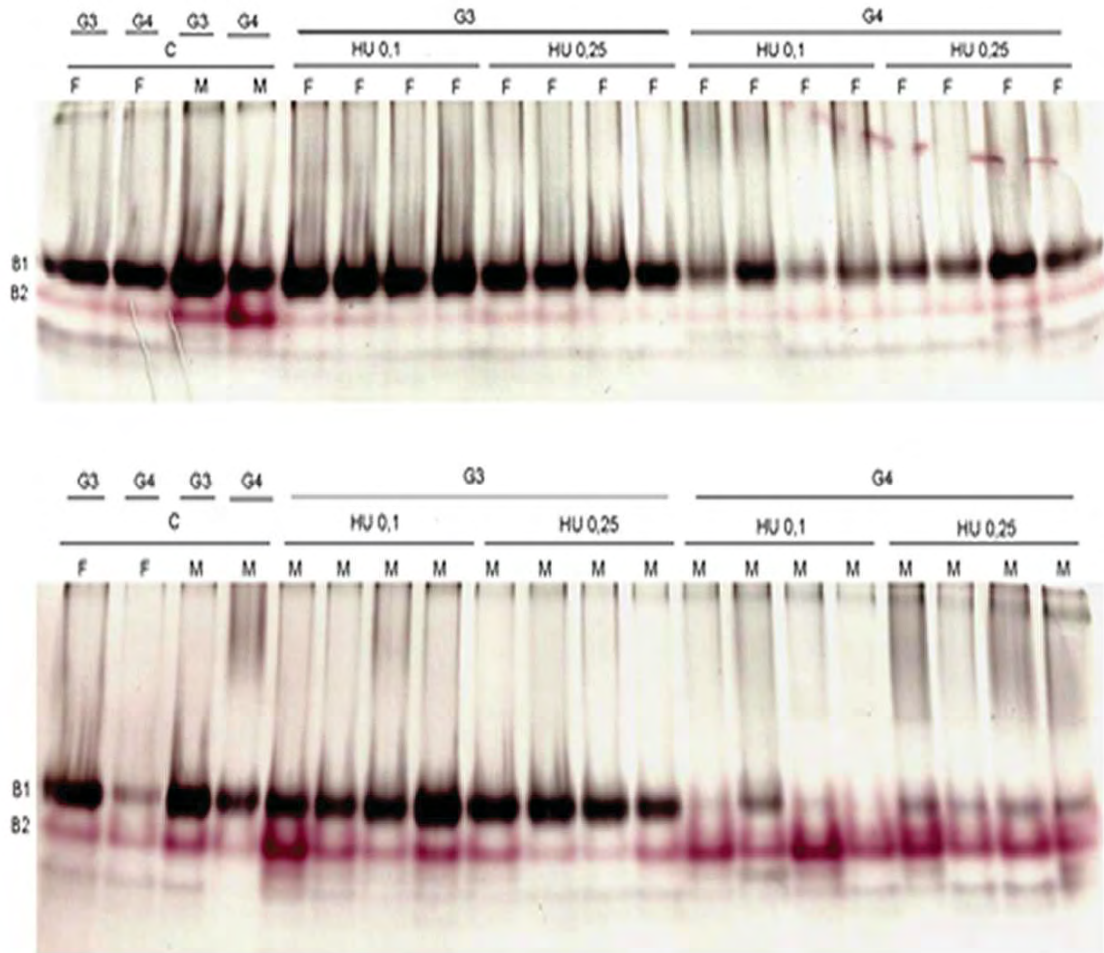


Figura 7. Gel de poliacrilamida com expressão das bandas AChE ( $\alpha$ -esterase) e EST-6 ( $\beta$ -esterase), em fêmeas e machos dos grupos controle e tratados nas concentrações HU0,1 e 0,25, nas gerações G3 e G4. AChE = B1; EST-6 = B2.

Tabela 9. Grau de expressão das esterases classificado com base na intensidade de coloração, em ordem crescente de 1 a 4 sinais +, para fêmeas e machos das gerações F3 a F6, nos três grupos experimentais: controle (C) e tratados com Hidroxiuréia (HU0,1 e HU0,25). Total refere-se ao número de moscas analisadas.

Geração	Grupo	Sexo	Grau de expressão				Total
			+	++	+++	++++	
F3	C	F	0	1	5	14	20
		M	0	0	0	20	20
	HU0,1	F	0	0	3	17	20
		M	0	0	6	14	20
	HU0,25	F	0	1	4	15	20
		M	0	2	6	12	20
F4	C	F	1	4	6	7	18*
		M	0	2	6	10	18*
	HU0,1	F	3	2	6	5	16*
		M	3	1	2	10	16*
	HU0,25	F	3	5	6	2	16*
		M	4	4	8	0	16*
F5	C	F	0	1	7	2	10
		M	0	1	4	5	10
	HU0,1	F	1	4	9	6	20
		M	0	1	4	15	20
	HU0,25	F	0	1	5	14	20
		M	0	0	0	20	20
F6	C	F	0	0	5	5	10
		M	0	1	2	7	10
	HU0,1	F	0	6	4	10	20
		M	0	3	7	10	20
	HU0,25	F	0	5	3	12	20
		M	0	2	5	13	20

\* = a qualidade de um dos géis não permitiu análise, reduzindo o número total.

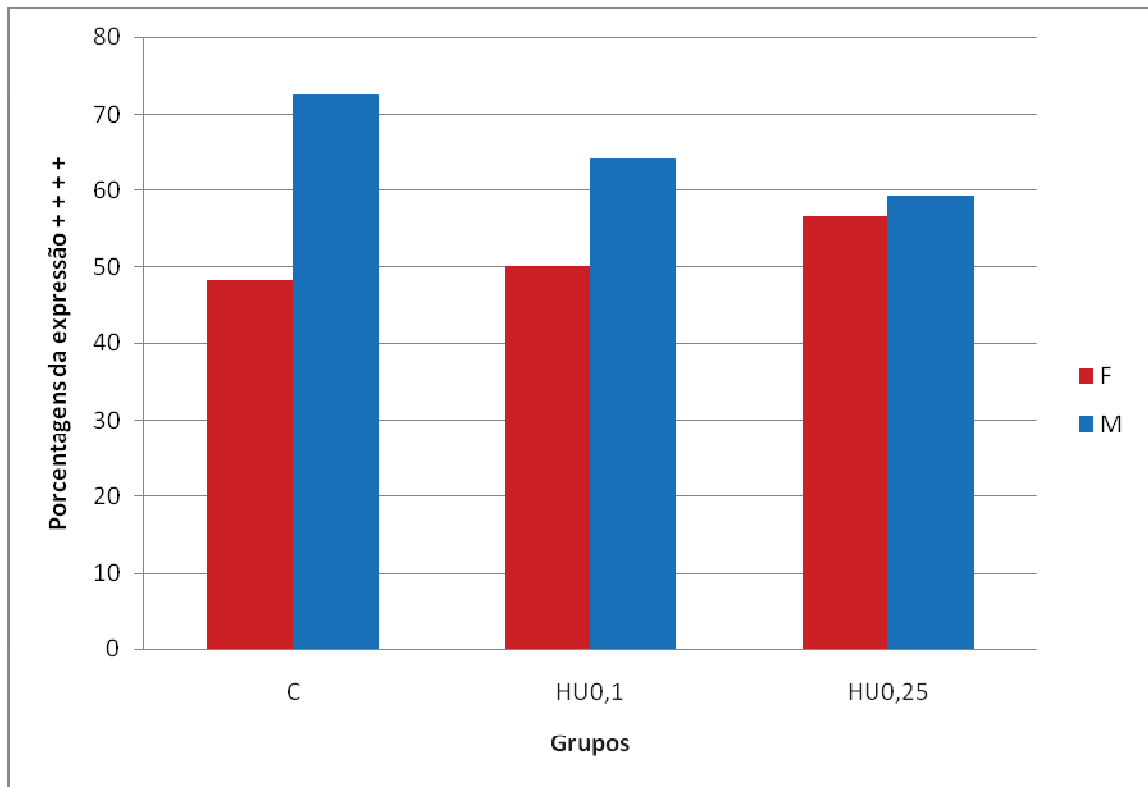


Figura 8. Distribuição das porcentagens de fêmeas e machos *D. melanogaster* portadores do grau de expressão (++++) da banda AChE, nos grupos controle (C) e tratados, somando dados das quatro gerações analisadas.

## 5. DISCUSSÃO

A doença falciforme (SCD) apresenta uma alta prevalência na população mundial. Nos EUA, calcula-se em 50.000 a 100.000 o número de pessoas afetadas, enquanto no Brasil esse número está entre 25.000 e 30.000. A estatística mostra, ainda, que nos EUA nascem anualmente 2.000 crianças portadoras da mesma e, no Brasil, 3.500 (CANÇADO; JESUS, 2007; BRAWLEY *et al.*, 2008). Essa alta prevalência justifica o interesse nas pesquisas com HU que é considerada, atualmente, o principal medicamento para o tratamento da SCD. Um estudo amplo, realizado na década de 90, envolvendo aproximadamente 300 adultos com SCD demonstrou, claramente, que a HU reduz o número e a severidade de episódios de dor nos pacientes tratados, melhorando assim alguns aspectos de sua qualidade de vida. Nos EEUU, a FDA (Food and Drug Administration) aprovou o uso da HU nos adultos, em 1998. A eficácia da aplicação em crianças ainda não está completamente evidenciada, embora os dados iniciais mostrem uma boa perspectiva (BRAWLEY *et al.*, 2008).

No Brasil, a HU é recomendada pelo Ministério da Saúde como forma de tratamento da SCD desde 2002.

Porém, mesmo no que se refere aos adultos, o uso da droga ainda mostra alguns aspectos não resolvidos, gerando dúvidas sobre a segurança de sua aplicação. Esses aspectos têm sido objeto de discussão em várias oportunidades, em publicações e reuniões científicas, como na conferência realizada em fevereiro de 2008, nos EUA, patrocinada pelo National Institute of Health (NIH) e, no Brasil, mais especificamente, em simpósio realizado em Belo Horizonte, em outubro de 2009. Nessas reuniões, foram discutidas questões como os riscos do tratamento a médio e longo prazos e os possíveis impedimentos bem como as soluções potenciais para o uso da HU no tratamento da SCD, em adultos e crianças. As necessidades futuras de pesquisas também foram discutidas.

No presente trabalho foram realizadas observações quanto aos efeitos da HU em parâmetros biológicos, utilizando como modelo a *Drosophila melanogaster*. Essa espécie foi escolhida como modelo porque, em mais de 100 anos de estudo, tem propiciado o desenvolvimento de várias áreas biológicas, e mais recentemente tem sido aplicada, com sucesso crescente, em pesquisas médicas e farmacológicas, por razões já apresentadas.

Embora haja na literatura vários trabalhos realizados com essa substância no mesmo organismo, suas abordagens são predominantemente moleculares, buscando informações

diretamente em nível da expressão gênica. No presente trabalho, essa mosca foi utilizada para estudo dos efeitos da HU sobre aspectos biológicos básicos que, de alguma forma, relacionam-se aos supostos efeitos negativos do tratamento com essa substância, em seres humanos.

A literatura mostra que uma das preocupações com o uso da HU em humanos são seus efeitos na reprodução. Entre eles incluem-se, como já foi mencionado, na Introdução, redução da fertilidade masculina e a possibilidade de morte ou dano ao feto. Os aspectos reprodutivos analisados no presente trabalho em *Drosophila*, sob o efeito da HU, abrangeram a produtividade de adultos (número de descendentes), a taxa de oviposição e a frequência e os tempos de pré-cópula e cópula. Os resultados obtidos com o estudo da produtividade mostraram a ocorrência de redução do número de descendentes. Parte dessa redução pode ser atribuída à diminuição da taxa de oviposição das moscas tratadas em relação ao controle, também observada. Tanto no que se refere à oviposição como à produtividade de adultos, embora nem todas as comparações entre os experimentos controle e tratados sejam estatisticamente significantes, à vista dos números predominam diferenças que mostram o efeito negativo dessa substância na reprodução. No que se refere à oviposição, verificou-se que tanto fêmeas controle como tratadas ovipositaram durante nove dias. No entanto, as fêmeas controle produziram 80% de seus ovos até o quinto dia, contra 67,5% e 64% nas tratadas com HU 0,1 e HU 0,25, respectivamente.

Os dados de pré-cópula e cópula analisados em *Drosophila* também mostraram interferência dessa substância: a frequência de cópula foi maior para os casais controle em relação aos tratados. Além disso, nos acasalamentos entre fêmea controle e macho tratado, o tempo de pré-cópula foi o dobro e no acasalamento entre tratados foi mais do que o dobro dos tempos do controle. O fato desse tempo ser maior no acasalamento entre fêmea controle e macho tratado do que no acasalamento recíproco permite supor que o retardo esteja relacionado ao comportamento dos machos. Esse aspecto reforça a preocupação com o efeito na reprodução masculina em humanos, devendo ser melhor investigado.

O estudo da mortalidade e do tempo de desenvolvimento sob efeito da HU mostrou que esses parâmetros também são afetados em comparação ao controle. A mortalidade foi predominantemente ampliada nos indivíduos tratados quando comparados com os do grupo controle, sendo que em algumas fases do desenvolvimento as diferenças foram estatisticamente significantes. Em um segundo experimento referente ao tempo de desenvolvimento, observou-se,

como subproduto, que a mortalidade ovo-adulto foi zero no controle e no tratado mostrou-se dose-dependente, isto é, seu efeito foi maior no tratamento com HU 0,25 do que com HU 0,1.

O tempo de desenvolvimento, que foi analisado em dois experimentos, por sua vez, mostrou, no primeiro, diferenças significantes, entre o controle e cada um dos tratamentos, na maioria das fases do desenvolvimento, desde o ovo até o adulto, como também entre os tratamentos com diferentes concentrações. No segundo experimento, no qual foi computado apenas o tempo de desenvolvimento ovo-adulto, observou-se que os grupos controle e tratado com HU 0,1 apresentaram o desenvolvimento total em três dias, contra cinco dias do tratado com HU 0,25. É possível que o desenvolvimento mais lento dos indivíduos tratados, da mesma forma que o retardo na oviposição esteja relacionado com o bloqueio ou retardo da fase S do processo de divisão celular. Como foi mencionado, anteriormente, um dos efeitos da HU está ligado a problemas com a síntese do DNA (PFEIFFER ; TOLMACH, 1967; DUBACQ *et al.*, 2006). Por outro lado, sabe-se que quando há dano no DNA, o ponto de checagem para reparo causa um atraso no processo de divisão celular (HOLWAY *et al.* 2006).

A mortalidade que se observa ao longo do desenvolvimento mostra que a toxicidade da HU pode se manifestar em qualquer fase do ciclo de vida e é também um dos componentes da redução da produtividade, juntamente com a redução da taxa de oviposição.

O estudo da longevidade sob efeito da HU apresentou efeitos variáveis, porém, os indivíduos tratados mostraram predominantemente redução do tempo de sobrevivência em relação ao controle. Com relação à longevidade, em geral a literatura menciona uma possível extensão nos pacientes de SCD tratados com a HU (BRAWLEY *et al.*, 2008), mas isto decorre da melhor qualidade de vida que ela proporciona aos indivíduos doentes, incluindo redução dos episódios de dor e da necessidade de internação. Na *Drosophila*, porém, observamos redução da longevidade de forma dose-dependente. Possivelmente, este seria o efeito de ministrar HU a indivíduos sãos.

O uso de duas concentrações de HU nos tratamentos das moscas mostraram efeito de dose, isto é, os parâmetros mais afetados ocorreram geralmente na concentração maior de HU (0,25 mg/ml). Isto foi observado em todos os parâmetros analisados, com exceção da longevidade. Esse efeito de dose observado em *Drosophila* e também bastante mencionado na literatura (Cokic *et al.*, 2006) reforça a idéia de que a dose do medicamento a ser prescrito deve ser estabelecida cuidadosamente.



Uma das preocupações na aplicação da HU como medicamento refere-se ao possível aumento de seus efeitos negativos por uso prolongado. Conforme a literatura, o uso por longo tempo amplia o risco de desenvolvimento de câncer e interfere também na reprodução. Embora não tenhamos analisado o efeito da HU em tempos diferentes de tratamento, analisamos o efeito em gerações sucessivas como forma de obter informações que mostrassem soma de efeitos nessas condições. Os resultados de produtividade e longevidade não parecem suportar essa hipótese. De modo geral, não foram observadas variações significantes estatisticamente ou mesmo à vista dos números, entre as gerações, para essas duas características.

A morfologia externa das moscas adultas não mostrou alterações que indicassem malformações decorrentes do tratamento com HU. Da mesma forma, no nível de nossas observações, o aparelho reprodutor masculino não diferiu morfológicamente entre as moscas controle e tratadas. Embora a literatura mencione a ocorrência de malformações em animais de laboratório (coelhos e ratos) tratados com HU, as dosagens utilizadas eram muito mais elevadas do que as utilizadas no presente estudo, chegando a corresponder à dosagem máxima ou até a três vezes a dosagem máxima utilizada no tratamento humano.

Há dados na literatura que indicam redução do peso da descendência de animais de laboratório tratados com HU (FRITZ; HESS, 1980). No presente trabalho verificamos, na *Drosophila*, à vista dos números, algumas alterações de peso ao longo das gerações, que consistiram principalmente em um peso maior para as fêmeas tratadas, na segunda geração. Porém, nas demais gerações houve uma variação no peso das mesmas. Com relação aos machos, os tratados com HU<sub>0,25</sub> apresentaram peso maior que o controle e os tratados com HU<sub>0,1</sub>, na segunda e terceira gerações, e também variaram nas demais. Esse parâmetro deverá ser melhor avaliado, com um número maior de moscas e análise estatística.

Na busca de um mecanismo bioquímico para os efeitos observados com o uso da HU, em *Drosophila*, foi realizado um estudo dos padrões de esterases apresentados pelas moscas na fase adulta. Os resultados indicaram redução do nível de expressão gênica de uma banda  $\alpha$ -esterásica. As esterases são enzimas que realizam múltiplas funções nos organismos, participando de processos importantes, alguns dos quais estão ligados às relações envolvidas na divisão, mobilidade e diferenciação das células. Algumas dessas enzimas também respondem à presença de substâncias tóxicas, podendo gerar resistência a inseticidas e outras substância exógenas.

É interessante observar que diferentemente do ocorrido nos parâmetros analisados, o estudo das esterases mostrou diferença entre as gerações, pois a manifestação de decréscimo da atividade da  $\alpha$ -esterase afetada passou a ser visualizada a partir da geração F4, sugerindo que nesse aspecto (síntese de esterases) pode ocorrer uma soma de efeitos na sequência de gerações. SCOZZAFAVA; SUPURAN, (2003) verificaram que a HU age como um inibidor fraco da atividade esterásica do acetato 4-nitrofenil.

A partir dos dados da literatura e das observações que puderam ser realizadas no presente estudo, fica evidente que o conhecimento dos mecanismos que geram tanto os efeitos benéficos como os efeitos colaterais da HU depende ainda de muitos estudos. Entendemos que a *Drosophila* que, como já foi acentuado, apresenta alta homologia com o homem quanto a doenças genéticas, paralelamente a uma redução da complexidade dos processos fisiológicos, é um modelo promissor para esse fim, pois os dados do presente trabalho mostraram que este organismo é bastante suscetível aos efeitos dessa droga.

Podemos concluir dizendo que, embora a HU apresente efeitos colaterais indesejáveis, reconhecidos na literatura, ainda assim continua sendo muito importante pelo menos no tratamento da anemia falciforme. Talvez possamos acompanhar Peter Kovacic (2010) quando diz que se deve reconhecer a HU como uma substância tóxica, como são geralmente as drogas, mas ainda considerá-la basicamente segura para uso terapêutico desde que seja utilizada em dosagem e frequência apropriadas.

## 6. CONCLUSÕES

Os dados do presente estudo permitem apresentar as seguintes conclusões:

- 1- A *Drosophila* é suscetível ao efeito da HU.
- 2- Esse efeito se manifesta na maioria das características analisadas, constituindo exceções a morfologia externa, a morfologia dos órgãos reprodutores masculinos e a estrutura dos cromossomos politênicos.
- 3- Nos estudos da produtividade e da taxa de oviposição observou-se redução da quantidade de descendentes e de ovos, respectivamente, nos tratamentos em relação ao controle.
- 4- A mortalidade, o tempo de desenvolvimento, a longevidade, o tempo de pré-cópula e cópula e o peso das moscas, também foram, de alguma forma, afetados pela HU.
- 5- A análise do padrão de esterases indicou que o tratamento com HU reduz a frequência de machos portadores do grau máximo de expressão (++++) da banda  $\alpha$ -esterásica AChE. Por outro lado, as fêmeas mostraram aumento da frequência de portadores do grau (++++) da mesma banda.

Os efeitos da HU observados, no presente trabalho, em *Drosophila melanogaster* relacionam-se de alguma forma aos efeitos colaterais observados nos pacientes humanos, podendo este organismo ser considerado adequado ao aprofundamento do estudo desses problemas.

## 7. REFERÊNCIAS

ALVINO, G.M., Collingwood, D., Murphy, J.M., Delrow, J., Brewer, B.J. and Raghuraman, M.K. Replication in Hydroxyurea: It's a Matter of Time. Washington. Molecular and Cellular Biology, v. 27, n. 18, p. 6396-6406, 2007.

AMENYA, D.A., Naguran, R., Lo, T.C.M., Ranson, H., *et al.* Over expression of a Cytochrome P450 (CYP6P9) in a Major African Malaria Vector, *Anopheles funestus*, Resistant to Pyrethroids. Insect Molecular Biology, v. 17, n. 1, p. 19-25, 2008.

APIDIANAKIS, Y. and RAHME, L.G. *Drosophila melanogaster* as a model for human intestinal infection and pathology. Disease Models and Mechanisms, v. 4, n. 1, p. 21-30, 2011.

BACHETTI, S. and Whitmore, G.F. The action of Hydroxyurea on mouse – L – cells. Cell Prolifetion, v. 2, p. 1365-2184, 2008.

BANDEIRA, F.M.G.C.; Peres, J.C.; Carvalho, E.J.; Bezerra, I.; *et al.* Hydroxyurea in sickle cell disease patients in Recife, Brazil. Revista Brasileira de Hematologia, v. 26, p. 189-194, 2004.

BANGA, S.S.; Shenkar, R.; Boyd, J.B. Hypersensitivity of *Drosophila mei-41* mutants to hydroxyurea is associated with reduced mitotic chromosome stability. Mutat. Res., v. 163, n. 2, p. 157-165, 1986.

BERGÉ, J., Feyereisen, R.; Amichot, M. Cytochrome P450 monooxygenases and insecticide resistance in insects. Phil. Trans. R. Soc. Lond, v. 353, n. 1376, p. 1701-1705, 1998.

BERTHAUT, I.; Guignedoux, G.; Kirsch-Noir, F.; *et al.* Influence of sickle cell disease and treatment with hydroxyurea on sperm parameters and fertility of human males. Haematologica, v. 93, p. 988-993, 2008.

BEST, P.J.; Pettit, R.M. Multiple skin cancers associated with hydroxyurea therapy. *Mayo Clin. Proc.*, v. 73, n. 10, p. 961-3, 1998.

BRADNER, J.E., Mak, R., Tanguturi, S.K., Mazitschek, R., *et al.* Chemical genetic strategy identifies histone deacetylase 1 (HDAC1) and HDAC2 as therapeutic targets in sickle cell disease. *PNAS*, v. 107, n. 28, p. 12617–12622, 2010.

BRAWLEY, O.W.; Cornelius, L.J.; Edwards, L.R.; *et al.* National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement: Hydroxyurea Treatment for Sickle Cell Disease. *Annals of Internal Medicine*, v. 148, p. 932-938, 2008.

CANÇADO;JESUS, 2007

CHARACHE, S.; Terrin, M.L.; Moore, R.D.; *et al.* Effect of hydroxyurea on the frequency of painful crises in sickle cell anemia. *N. Engl. J. Med.*, v. 332, p. 1317-1322, 1995.

COKIC, V.P.; Smith, R.D.; Beleslin-Cokic, B.B., *et al.* "Hydroxyurea induces fetal hemoglobin by the nitric oxide-dependent activation of soluble guanylyl cyclase". *J. Clin. Invest.*, v.111, p. 231–239, 2003.

DONEHOWER, R. An overview of the clinical experience with hydroxyurea. *Semin Oncol.*, v. 19, p. 11–19, 1992.

DUARTE, A.S.S., Saad, S.T. O. Efeito da hidroxiuréia e progesterona na regulação da transcrição do gene da gama globina. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, v. 24, n. 2, p. 147-148, 2002.

DUBACQ, C.; Chevalier, A.; Courbeyrette, R.; Petat, C.; Gidrol, X.; Mann, C. Role of the iron mobilization and oxidative stress regulons in the genomic response of yeast to hydroxyurea. *Mol. Gen. Genomics*, v. 275, p. 114-124, 2006.

EVENSON, D.P. and Jost, L.K. Hydroxyurea exposure alters mouse testicular kinetics and sperm chromatin structure. *Cell Proliferation*, v. 26, p. 147-159, 2009.

FLANAGAN, J. M., Howarda, T. A., Mortiera, N., et al. Assessment of genotoxicity associated with hydroxyurea therapy in children with sickle cell anemia. *Mutation Research*, v. 698, p.38–42, 2010.

FORTINI, M. E. and Bonini, N.M. Modeling human neurodegenerative diseases in *Drosophila*: on a wing and a prayer. *Trends in Genetics*, v. 16, p. 161-167, 2000.

FORTINI, M. E., Skupski, M.P., Boguski, M. S. and Hariharan, I.K. A Survey of Human Disease Gene Counterparts in the *Drosophila* Genome. *The Journal of Cell Biology*, v. 150, n. 2, p. 23-30, 2000.

FRANK, I.; Bosch, R.J.; Fiscus, S.; *et al.* Activity, safety, and immunological effects of hydroxyurea added to didanosine in antiretroviral-naïve and experienced HIV type 1-infected subjects: a randomized, placebo-controlled trial, ACTG 307. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, v. 20, n. 9, p. 916–26, 2004.

FRIEDRISCH, J.R.; Prá, D.; Maluf, S.W. *et al.* DNA damage in blood leukocytes of individuals with sickle cell disease treated with hydroxyurea. *Mutation Research*, v.649, p.213–220, 2008.

FRITZ, H., HESS, R. Effects of hydroxyurea on postnatal growth and behaviour of rats. *Agents Actions*, v. 10, n. 4, p. 389-93, 1980.

GANDHI, T. K. B.; Zhong,J.; Mathivanan, S.; Karthick, K. N.; Chandrika, S.; Sujatha, M.; Sharma, S.; *et al.* Analysis of the human protein interactome and comparison with yeast, worm and fly interaction datasets. *Nature Genetics*, v.38, p.285 – 293, 2006.

GAO, W.; Cara, A.; Gallo, R.; Lori F. Low levels of deoxynucleotides in peripheral blood lymphocytes: a strategy to inhibit HIV type 1 replication. *Proc Natl Acad Sci, USA*, v.90, p.8925–8928, 1993.

GRIGG, A. Effect of hydroxyurea on sperm count, motility and morphology in adult men with sickle cell or myeloproliferative disease. *Internal Medicine Journal*, v.7, p.192, 2007.

GÜERCI, A.; Liviae, D. & Marcus, R. Detection of excision repaired DNA damage in the comet assay by using Ara-C and Hydroxyurea in three different cell types. *Cell. Biol. Toxicol.*, v.25, p.73-80, 2009.

HANFT, V.N., Fruchtman, S.R., Pickens, C.V., Rosse, W.F., et al. Acquired DNA mutations associated with in vivo hydroxyurea exposure. *Blood*, v. 95, n. 11, p. 3589–3593, 2000.

HEIFETZ, Y., Lung, O., Frongillo Jr, E.A., *et al.* The *Drosophila* seminal fluid protein Acp26Aa stimulates release of oocytes by the ovary. *Current Biology*, v. 10, n. 2, p. 99-102, 2000.

HILLERY, C. A., Du, M. C., Wang, W. C. and Scott, J. P. Hydroxyurea therapy decreases the in vitro adhesion of sickle erythrocytes to thrombospondin and laminin. *British Journal of Haematology*, v. 109, p. 322-327, 2000.

HO, C. C., Siu, W.Y., Lau, A., Chan, W.M., Arooz, T. and Poon, R.Y.C. Stalled Replication Induces p53 Accumulation through Distinct Mechanisms from DNA Damage Checkpoint. *Hong Kong. Cancer Research*, v. 66, p. 2333-2341, 2006.

HUANG, V., Lu, X., Jiang, Y., Wang, J.Y. Effect of hydroxyurea on the promoter occupancy profiles of tumor suppressor p53 and p73. *BMC Biology*, v. 7, n.35, p. 1-16, 2009.

Hydroxyurea Official FDA information ([http:// www.drugs.com/pro/hydroxyurea.html](http://www.drugs.com/pro/hydroxyurea.html) - consultado em 09/05/2011).

JONG, K. et al. Characterization of the phosphatidylserine exposing subpopulation of sickle cells. *Blood*, Washington, DC, v. 98, n. 3, p. 860-867, 2001.

KOREN, A., Levin, C., Dgany, O., Kransnov, T., *et al.* Response to hydroxyurea therapy in  $\beta$ -thalassemia. InterScience, 2008.

KOVACIC, P. Hydroxyurea (therapeutics and mechanism): Metabolism, carbamoyl nitroso, nitroxyl, radicals, cell signaling and clinical applications. Med Hypotheses, 2010.

KRISHNAMURTI, L., Kharbanda, S., Biernachi M. A., *et al.* Stable long-term donor engraftment following reduced-intensity hematopoietic cell transplantation for Sickle Cell Disease. Biology of Blood Marrow Transplantation, v. 14, p. 1270-1278, 2008.

LEFFAK, M. Non-random assembly of chromatin during hydroxyurea inhibition of DNA synthesis. Biochemistry, v.27, p.686-691, 1988.

LORI, F.; Malykh, A.; Cara, A.; Sun, D.; Weinstein, J.N.; Lisziewicz, J. & Gallo, R.C. Hydroxyurea as an inhibitor of human immunodeficiency virus-type 1 replication. Science, v.266, p.801-805, 1994.

LUKUSA, A.K and Vermylen, C. Use of hydroxyurea from childhood to adult age in sickle cell disease: semen analysis. Haematologica, v.93, p.67, 2008.

MAGALHÃES, I. Q. Alterações renais nas doenças falciformes. Revista Brasileira de Hematologia, v. 29, n. 3, p. 279-284, 2007.

MATMATI, N., Kitagaki, H., Montefusco, D., Mohanty, B.K., Hannun, Y.A. Hydroxyurea Sensitivity Reveals a Role for *ISCI* in the Regulation of G2/M. THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, v. 284, n. 13, p. 8241–8246, 2009.

MOREIRA, L.S., Andrade, T.G., Albuquerque, D.M, Cunha, A.F., *et al.* IDENTIFICATION OF DIFFERENTIALLY EXPRESSED GENES INDUCED BY HYDROXYUREA IN RETICULOCYTES FROM SICKLE CELL ANAEMIA PATIENTS. Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology, v. 35, p. 651–655, 2008.



ORKIN, S. H and Higgs, D. R. Sickle Cell Disease at 100 Years. *Science*, v. 329, p. 291, 2010.

PFEIFFER, S. E., TOLMACH, L.J. Inhibition of DNA Synthesis in HeLa Cells by Hydroxyurea. *CANCER RESEARCH*, v. 27, p. 124-129, 1967.

PLATT, O.S. Hydroxyurea for the treatment of sickle cell anemia. *N. Engl. J. Med.*, v.358, n.13, p.1362–1369, 2008.

PREUSS, P. Fruit fly sequencing stands as genetic research milestone. Berkeley Lab – USA. *Research News*, p. 1-3, 2000.

SABAN, N. and Bujak, M. Hydroxyurea and hydroxamic acid derivatives as antitumor drugs. *Cancer Chemother Pharmacol*, v. 64, p. 213–221, 2009.

SASSI, H., Bachir, D., Habibi, A., Astier, A., *et al.* No effect of CYP450 and P-glycoprotein on hydroxyurea in vitro metabolism. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, v. 24, p. 83–90, 2010.

SAUAIA, H.; Laicine, E. M. & Alves, M.A.R. Hydroxyurea-induced inhibition of DNA puff development in the salivary gland chromosomes of *Bradysia hygida*. *Chromosoma*, v. 34, p.129-151, 1971.

SCOZZAFAVA, A.; Supuran, C.T. Hydroxyurea Is a Carbonic Anhydrase Inhibitor. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 11, p. 2241–2246, 2003.

SEKI, J.T; Al-Omar, H.M.; Amato, D.; Sutton, D.M. Acute tumor lysis syndrome secondary to hydroxyurea in acute myeloid leukemia. *The Annals of pharmacotherapy*, v.37, n.5, p.675-678, 2003.

SHIMAUTI, E.L.T. Capacidade antioxidante na Hb S: influência da alfa talassemia, haplótipo e melatonina. São José do Rio Preto, 2011.

SILVA, M.C.; Shimauti, E.L.T. Eficácia e toxicidade da hidroxiuréia em crianças com anemia falciforme. *Revista Brasileira Hematologia*, v.28, n.2, p.144-148, 2006.

SINGH, H., Dulhani, N., Kumar, B.N., Singh, P., Tiwari, P. Effective control of sickle cell disease with hydroxyurea therapy. *Indian Journal of Pharmacology*, v. 42, n. 1, p. 32–35, 2010.

SMITH, W.R., Bauserman, R. L., Ballas, S. K., McCarthy, W. F., *et al.* Climatic and geographic temporal patterns of pain in the Multicenter Study of Hydroxyurea. *PAIN*, v. 146, p. 91-98, 2009.

SORSA, V. and Sorsa, M. Ultrastructure of Induced Transitions in the Chromatin Organization of *Drosophila* Polytene Chromosomes. *Chromosoma (Berl.)*, v.31, p.346-355, 1970.

SPEIT, G. and Schütz, P. The effect of inhibited replication on DNA migration in the comet assay in relation to cytotoxicity and clastogenicity. *Mutation Research*, v. 655, p. 22–27, 2008.

STEINBERG, M. H., McCarthy, W. F., Castro, O., Ballas, S. K., Armstrong, F. D., *et al.* The risks and benefits of long-term use of hydroxyurea in sickle cell anemia: A 17.5 year follow-up. *American Journal of Hematology*, p. 1-6, 2010.

STROUSE, J.J., Lanzkron, S., Beach, M.C., Haywood, C., *et al.* Hydroxyurea for Sickle Cell Disease: A Systematic Review for Efficacy and Toxicity in Children. *Pediatrics*, v. 122;1332-1340, 2011.

TANG, D.C., Zhu, J., Liu, W., Chin, K., *et al.* The hydroxyurea-induced small GTP-binding protein SAR modulates  $\gamma$ -globin gene expression in human erythroid cells. *Blood*, v. 106, n. 9, p. 3256-3263, 2005.

TATSUOSHI, F. and Wong, R.W. The role of nuclear pore complex in tumor microenvironment and metastasis. *Cancer and Metastasis Review*, v. 30, n. 2, p. 239-251, 2011.

THORNBURG, C.D.; Dixon, N.; Burguett S *et al.* A Pilot Study of Hydroxyurea to Prevent Chronic Organ Damage in Young Children With Sickle Cell Anemia. *Pediatr Blood Cancer*, v.52, p.609-615, 2009.

ULUG, P.; Vasavda, N.; Kumar, R. *et al.* Hydroxyurea therapy lowers circulating DNA levels in sickle cell anemia. *American Journal of Hematology*, p.714-716, 2008.

VOKES, E.E., Stenson, K., Rosen, F.R., Kies, M.S., Rademaker, A.W., Witt, M.E., *et al.* Weekly Carboplatin and Paclitaxel Followed by Concomitant Paclitaxel, Fluorouracil, and Hydroxyurea Chemoradiotherapy: Curative and Organ-Preserving Therapy for Advanced Head and Neck Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, v. 21, n. 2, p. 320-326, 2003.

WARE, R. E., Rees, R. C., Sarnaik, S. A., *et al.* Renal Function in Infants with Sickle Cell Anemia: Baseline Data from the BABY HUG Trial. *The Journal of pediatrics*, v. 156, n. 1, p. 66-70, 2010.

WEINLICH, G., Schuler, G., Greil, R., Kofler, H. and Fritsch, P. Leg ulcers associated with long-term hydroxyurea therapy. *Journal of the American Academy of Dermatology*, v. 39, n. 2, p. 372-374, 1998.

WOLF, M.J., Amrein, H., Izatt, J.A., Choma, M.A., *et al.* *Drosophila* as a model for the identification of genes causing adult human heart disease. *PNAS*, v. 103, n. 5, p. 1394-1399, 2006.

WOLFGANG, J.W., Miller, T.W., Webster, J.M., Huston, J.S., Thompson, L.M., *et al.* Suppression of Huntington's disease pathology in *Drosophila* by human single-chain Fv antibodies. *PNAS*, v. 102, n. 32, p. 11563–11568, 2005.

WONG, A. S. C., Soo, R.A., Lu, J.J., Loh, K.S., Tan, K.S., Hsieh, W.S., *et al.* Paclitaxel, 5-fluorouracil and hydroxyurea concurrent with radiation in locally advanced nasopharyngeal carcinoma. *Annals of Oncology*, v. 17, p. 1152–1157, 2006.

WOO, G.H.; Bak, E.J.; Nakaiama, H. & Doi, K. Molecular mechanisms of hydroxyurea (HU)-induced apoptosis in the mouse fetal brain. 2005.

YARBRO, J. Mechanism of action of hydroxyurea. *Semin Oncol*, v.19, p.1–10, 1992.

YOUNG, H.S., Khan , A.S.A., Kendra, J.R., Coulson, I.H. The cutaneous side-effects of hydroxyurea. Burnley, UK. *Clin. Lab. Haem.*, v. 22, p. 229-232, 2000.

ZHU, F., Parthasarathy, R., Bai, H., Woithe, K., *et al.* A brain-specific cytochrome P450 responsible for the majority of deltamethrin resistance in the QTC279 strain of *Tribolium castaneum*. *PNAS*, v. 107, n. 19, p. 8557-8562, 2010.