

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CARCINOGENICO DE DROGAS
ANTICONCEPTIVAS POR MEIO DO TESTE PARA DETECÇÃO DE TUMOR
EPITELIAL EM *Drosophila melanogaster*.**

EVALUATION OF THE CARCINOGENIC POTENTIAL OF CONTRACEPTIVE
DRUGS BY MEANS OF THE TEST FOR DETECTION OF EPITHELIAL TUMOR IN
Drosophila melanogaster.

Carol Anne Teles¹

Cássio Resende de Morais^{2*}

RESUMO: Os anticoncepcionais hormonais orais são atualmente um dos métodos contraceptivos mais usados pelas mulheres, tendo uma eficácia de 99,9%. A administração da droga resulta no bloqueio da liberação normal do óvulo durante o ciclo menstrual, evitando o acesso do espermatozoide ao gameta feminino durante o ato sexual. Anticoncepcionais de uso oral podem ser classificados de acordo com a quantidade de estrógeno na formulação. Anticoncepcionais de primeira geração, de segunda geração, de terceira e de quarta geração possuem na sua formulação 0,150; 0,050; 0,030 e 0,020 mg de hormônios, respectivamente. Adicionalmente anticoncepcionais de emergência (pílula do dia seguinte) apresentam até 25 vezes mais hormônios do que os anticoncepcionais orais de uso mensal. Em função da ampla utilização de drogas contraceptivas pelo público feminino, o presente trabalho teve como objetivo, avaliar a toxicidade e o potencial carcinogênico de 4 drogas contraceptivas (Neovlar, Yasmin, lumi e DIAD), em *Drosophila melanogaster*. Para avaliar o efeito carcinogênico das drogas, foi utilizado o teste para detecção de tumor epitelial em *D. melanogaster*. Larvas de 3º estágio descendentes do cruzamento entre fêmeas virgens *wts/TM3, sb¹* e machos *mwh/mwh* foram tratadas com diferentes concentrações com os anticoncepcionais Neovlar, Yasmin, lumi e DIAD (0,05; 0,1 e 0,2 g/mL). Não foi observado efeito tóxico e carcinogênico em nenhuma das concentrações avaliadas neste trabalho com os anticoncepcionais Neovlar, Yasmin e lumi. DIAD na maior concentração (0,2 g/mL) diferiu estatisticamente na frequência total de tumor epitelial em *D. melanogaster* quando comparado ao controle negativo. Os resultados sugerem que nestas condições experimentais, neste organismo modelo e na concentração de 0,2 g/mL, DIAD apresenta potencial carcinogênico.

Palavras-chave: Anticoncepcionais; Tumor epitelial; warts

1- Licenciado em Ciências Biológicas pelo Centro Universitário Mário Palmério – UIFUCAMP, Monte Carmelo, MG, Brasil.

2- Doutor em Genética e Bioquímica pela Universidade Federal de Uberlândia – UFU, Uberlândia, MG, Brasil. Docente no Centro Universitário Mário Palmério – UNIFUCAMP, Monte Carmelo, MG, Brasil.

*Autor de correspondência: e-mail: cassio.1015@hotmail.com

ABSTRACT: Oral hormonal contraceptives are currently one of the most widely used contraceptive methods by women, with an efficacy rate of 99.9%. Administration of the drug results in the blocking of the normal release of the egg during the menstrual cycle, preventing sperm from accessing the female gamete during sexual intercourse. Oral contraceptives can be classified according to the amount of estrogen in the formulation. First-generation, second-generation, third-generation and fourth-generation contraceptives have 0.150, 0.050, 0.030 and 0.020 mg of hormones in their formulation, respectively. Additionally, emergency contraceptives (the morning-after pill) have up to 25 times more hormones than monthly oral contraceptives. Due to the widespread use of contraceptive drugs by women, this study aimed to evaluate the toxicity and carcinogenic potential of four contraceptive drugs (Neovlar, Yasmin, lumi and DIAD) in *Drosophila melanogaster*. To evaluate the carcinogenic effect of the drugs, the test for detection of epithelial tumor in *D. melanogaster* was used. Third-stage larvae descended from the cross between virgin *wts/TM3, sb¹* females and *mwh/mwh* males were treated with different concentrations of the contraceptives Neovlar, Yasmin, lumi and DIAD (0.05, 0.1 and 0.2 g/mL). No toxic or carcinogenic effects were observed at any of the concentrations evaluated in this study with the contraceptives Neovlar, Yasmin and lumi. DIAD at the highest concentration (0.2 g/mL) differed statistically in the total frequency of epithelial tumor in *D. melanogaster* when compared to the negative control. The results suggest that under these experimental conditions, in this model organism and at the concentration of 0.2 g/mL, DIAD presents carcinogenic potential.

Keywords: Contraceptives; Epithelial tumor; warts

1. INTRODUÇÃO

Os anticoncepcionais hormonais orais são atualmente um dos métodos contraceptivos mais usados pelas mulheres, tendo uma eficácia de 99,9%. Desde que foram produzidos em larga escala industrial, os anticoncepcionais orais veem sendo usados por mais de 200 milhões de mulheres, representando uma excelente alternativa na prevenção de gestação indesejável (BERAL et al, 1999).

A administração da droga resulta no bloqueio da liberação normal do óvulo durante o ciclo menstrual, evitando o acesso do espermatozoide ao gameta feminino durante o ato sexual (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

Anticoncepcionais hormonais orais podem ser manufacturados por meio de hormônios a base de progesterona ou pela combinação de estrógeno e progesterona (WANNMACHER, 2003). Podem ser classificados em monofásicos, difásicos e trifásicos. Os monofásicos são aqueles que possuem a mesma quantidade de estrógeno e/ou progesterona em todas as pílulas. Os bifásicos e trifásicos possuem em sua constituição uma concentração superior equivalente a

duas e três vezes respectivamente quando comparados à concentração de hormônios dos monofásicos (LUBIANCA e WANNMACHER, 2011).

Os anticoncepcionais também podem ser classificados de acordo com a concentração total de estrógeno em cada pílula. Anticoncepcionais de primeira geração podem conter na sua formulação uma concentração final de até 0,150 mg de estrógeno. Com concentrações inferiores aos anticoncepcionais de primeira geração, os de segunda, terceira e quarta geração, são formulados em uma concentração de 0,050 mg, 0,030 mg e 0,020 mg de estrógeno respectivamente (MATTOS, 2011).

Drogas anticonceptivas são administradas objetivando evitar gravidezes indesejáveis ou em potencial risco, no entanto, tais drogas atuam como princípio preventivo, não sendo eficazes em casos onde o zigoto já tenha sido formado. Visando evitar gravidezes indesejáveis, mesmo após o ato sexual, foram desenvolvidas as drogas hormonais de emergência, os quais apresentam mecanismo de ação rápida, conhecidos popularmente como “pílula do dia seguinte” (LUBIANCA e WANNMACHER, 2011).

A diferença do anticoncepcional tradicional (mensal) e o anticoncepcional hormonal de emergência, é que este último possui concentrações hormonais (progesterona + estrógeno ou apenas progesterona), de até 25 vezes acima da concentração usada diariamente pelas mulheres (CONSELHO FEDERAL DE FARMÁCIA, 2009).

Além de oferecer uma margem de segurança (gravidez indesejável), o uso de anticoncepcionais orais (anticoncepcional convencional) trazem alguns benefícios às mulheres, como por exemplo, a redução do volume do sangramento menstrual, redução do risco de doenças inflamatórias na pélvica, melhora da acne (WANNMACHER, 2003), regularização do ciclo menstrual, tratamento e até mesmo prevenção de cistos foliculares persistentes, além de amenizar os sintomas da artrite reumatoide (GIORDANO e GIORDANO, 2009).

No entanto, mesmo demonstrando aspectos que favorecem a homeostase do ciclo menstrual, vários trabalhos acusam a participação de drogas contraceptivas associadas a fatores negativos no organismo. O uso constante dessas drogas está associado com alterações de humor, tonteira e náuseas. Complicações mais pronunciadas podem ocorrer quando as drogas contraceptivas são combinadas com

bebidas alcoólicas e/ou tabaco, como exemplo, trombose venosa profunda, infarto do miocárdio (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2002), aumento da pressão diastólica e sistólica (NARKIEWICZ et al, 1995), com aumento de chances de doenças cardiovasculares (WANNMACHER, 2003), redução da imunidade com vulnerabilidade à infecção pelo HPV (Papiloma Vírus Humano), podendo ainda resultar em lesões intra-epiteliais (NEGRINI et al, 1990).

Somado a esses eventos, de acordo com Bezerra et al (2005) e Almeida et al (2001) o uso dessas drogas aumenta os riscos de desenvolvimento de câncer de mama e no colo do útero.

A transformação de células selvagens em células cancerígenas ocorre por multi - eventos, resultante de acúmulos de mutações, paralelo a deficiência do mecanismo de reparo do organismo (ORSOLIN et al., 2012). Nesse sentido, se a célula portadora de uma mutação se dividir por completo antes que o reparo seja feito, esta mutação poderá se fixar e se tornar uma alteração permanente (KIM *et al.*, 2011).

O DNA (ácido desoxirribonucleico) frequentemente apresenta suas bases expostas a agentes naturais ou artificiais, que podem provocar modificações na sua estrutura ou composição química. Lesões no material genético podem ser resultantes de eventos espontâneos ou pela exposição a agentes químicos, físicos e biológicos (FRANK, 2010).

Eventos agressivos ao material genético podem comprometer o processo de replicação e transcrição gênica, bem como a segregação normal dos cromossomos.

Mutações acima do limite tolerável basal, também podem afetar genes necessários para a sobrevivência das células ou genes envolvidos no controle do ciclo celular. No último caso, essa alteração pode levar a um descontrole na proliferação de células, com o conseqüente aparecimento de quadros cancerígenos (HIB; ROBERTIS, 1998; COSTA; MENK, 2000).

No organismo, o ciclo de proliferação celular é rigorosamente controlado para que as células constituam comunidades organizadas, no entanto, as células cancerígenas não se submetem a esse esquema de cooperação, são células com o DNA alterado que escapam dos mecanismos de controle do ciclo celular (LOPES *et al.*, 2002).

No controle do ciclo celular duas grandes categorias de genes são destacadas: os proto-oncogenes e os genes supressores de tumor (READ; STRACHAN, 2002). Os proto-oncogenes são genes relacionados ao crescimento, diferenciação e proliferação celular (LOPES *et al.*, 2002). Os genes supressores de tumor impõem alguns limites ao ciclo e ao crescimento celular e suprimem algumas propriedades fenotípicas das células tumorais, exercendo uma ação anti-neoplásica (LOURO *et al.*, 2002).

Baseado na necessidade do rastreio da genotoxicidade de potenciais xenobióticos a Genética Toxicológica tem voltado sua atenção para a investigação de agentes mutagênicos e carcinogênicos (MACHADO *et al.*, 2013), bem como para a padronização de protocolos e testes, como ferramentas para a detecção de mutações pontuais, aberrações cromossômicas e eventos de aneuploidias (ANDRADE e LEHMANN, 2003). Partindo desta premissa, o uso de organismo modelo com características específicas intrínsecas (sensibilidade e resposta) é uma peça crucial para a validação de um teste.

A espécie *Drosophila melanogaster*, conhecida popularmente como “mosca da fruta”, é um versátil organismo-modelo usado em pesquisas científicas de Genética e Biologia do Comportamento, e foi responsável por fornecer importantes informações em pesquisas científicas (KIM *et al.*, 2011).

O Teste para Detecção de Tumor Epitelial em *Drosophila melanogaster* é um teste utilizado para monitorar o potencial carcinogênico e anticarcinogênico de substâncias puras e compostas de uma grande variedade de xenobióticos (SIDOROV *et al.*, 2001; ORSOLIN e NEPOMUCENO, 2009; SILVA e NEPOMUCENO, 2011; COSTA *et al.*, 2011; FURTADO e NEPOMUCENO, 2012; ORSOLIN *et al.*, 2012). Este teste faz uso de uma linhagem de *D. melanogaster* que possui o marcador *wts* (*Warts*), que quando expresso na condição selvagem atua como um gene supressor de tumor (XU *et al.*, 1995). A deleção do gene e a consequente expressão do alelo recessivo, leva à formação de clones de células que são consideradas altamente invasivas, acarretando na manifestação de tumor epitelial no corpo e apêndices da mosca (NISHIYAMA *et al.*, 1999).

Em função da ampla utilização de anticoncepcionais hormonais orais, pelo público feminino, este trabalho teve como objetivo, avaliar o potencial carcinogênico

de diferentes drogas anticonceptivas nas concentrações de consumo, por meio do Teste para Detecção de Tumor Epitelial em *D. melanogaster*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Agentes químicos

Neovlar em forma de cápsula foi manufaturado pela empresa Schering. Yasmin em forma de comprimido foi fabricado pela empresa Schering. lumi em comprimido foi manufaturado pela empresa LIBBS. DIAD foi fabricado pela empresa Cimed.

Mitomicina C (CAS 50-07-7) na formulação em pó liofilizado foi fabricado por Kyowa Hakko Kirin Co. Ltda. Shizuoka (Japão), embalado por Bristol-Myers Squibb S.r.l Sermoneta-Latina-Itália e importado por Bristol-Myers Squibb Farmacêutica S.A.

2.2 Teste de detecção de tumor epitelial em *Drosophila melanogaster* (Teste *wts*)

2.2.1 Linhagens de *Drosophila*, cruzamento e tratamentos

Duas linhagens mutantes foram usadas nesse teste: Linhagem *multiple wing hairs* (*mwh*, 3-0,3) e linhagem *warts* (*wts*,3-100). A linhagem *multiple wing hairs* é mantida em homozigose recessiva para o marcador *mwh*, localizado no cromossomo 3, em posição distal em relação ao centrômero (*mwh*, 3-0,3). Quando expresso em homozigose recessiva o gene *mwh*, produz fenótipo de pelos nas asas da mosca em formato múltiplo, diferente do fenótipo selvagem (um único pelo por célula).

A linhagem *warts* possui o marcador *wts* no cromossomo 3, que é mantido em hemizigose na presença do balanceador cromossômico *TM3, Sb¹*. O marcador *wts*, quando expresso na condição selvagem, atua como um gene supressor de tumor. A deleção desse gene, e a expressão do alelo recessivo, leva à formação de clones de células que são consideradas altamente invasivas, acarretando na manifestação de tumor epitelial no corpo e apêndices da mosca.

Essas linhagens foram mantidas em estoque, em frascos contendo ¼ meio de cultura a base de banana (1230 mL de água; 16,5 g de ágar; 234 g de banana; 37,5 g de fermento biológico e 1,5 g de nipagin em pó) em estufa B.O.D (SOLAB) em

ciclos luz/escuro (12h:12h) na temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e $65 \pm 5\%$ de umidade relativa.

Foi realizado o cruzamento entre machos *mwh/mwh* e fêmeas virgens da linhagem *wts*, [1] in [1] kni [ri-1] p [p] *wts* [3-17]/TM3,S B [1]. Duas progênies são geradas nesse cruzamento: Progênie MH, trans-heterozigoto marcado (*mwh+/+wts*) e progênie BH, heterozigoto balanceado (*mwh+/+TM3, Sb¹*). No Teste de Detecção de Tumor epitelial (teste *wts*), apenas a progênie MH é analisada. A identificação da progênie é feita mediante a expressão do balanceador cromossômico *TM3, Sb¹*, que apresenta fenótipo de pelos curtos e espessos no corpo da mosca, o que difere da progênie MH, com fenótipo de pelos longos e finos.

A coleta de ovos do cruzamento *mwh+/+mwh* x *wts+/TM3, Sb¹* ocorreu dentro do período de 8 horas em frascos contendo meio de cultura a base de ágar (4%) e fermento biológico suplementado com sacarose. Após 72 ± 4 horas, larvas de 3º estágio foram lavadas com água ultrapura MiliQ (Millipore) e coletadas com auxílio de peneira de malha fina. Posteriormente, as larvas foram submetidas a tratamento crônico (48 horas) até completar o processo da metamorfose. As larvas foram colocadas em *vials* (2,5 cm de diâmetro por 8 cm de comprimento) contendo 1,5 g de purê de batatas (Yoki® Alimentos S.A) e 5 mL de solução das drogas contraceptivas nas concentrações de 0,2; 0,1 e 0,05 g/mL de dieta.

Paralelo ao teste *wts*, neste estudo, foi avaliado a toxicidade das drogas em larvas de 3º estágio de *D. melanogaster*. A toxicidade foi mensurada pela taxa de indivíduos que completaram o processo de metamorfose após o tratamento crônico (48 horas).

O teste *wts* foi acompanhado de controle negativo, água ultrapura e controle positivo, mitomicina C (MMC) na concentração de 0,1 mM. Esta concentração foi baseada em estudos de recombinação mitótica em *Drosophila melanogaster* (TSUDA; TAKEDA, 1987) e ensaios de carcinogênese (ORSOLIN, NEPOMUCENO, 2009; ORSOLIN; SILVA-OLIVEIRA; NEPOMUCENO, 2012).

2.2.2 Fixação de moscas e análise de tumor epitelial

Para análise de tumor epitelial, adultos eclodidos do cruzamento *mwh+/+mwh* x *wts+/TM3, Sb¹* foram fixados em etanol 70% (v/v) e analisados sob lupa estereoscópica (Bel® Photonics) em placa de petri com glicerina. A análise baseou-

se na contagem de tumores de acordo com a descrição de Justice (1995). Os resultados foram registrados em um diagrama padrão expressando os números de tumores observados em cada parte do corpo das moscas: olhos, cabeça, corpo, asas, pernas e halteres.

2.2.3 Análise estatística

As diferenças estatísticas entre a frequência de tumores epiteliais nas concentrações testadas e os controles (negativo e positivo) foram calculadas usando o teste *U*, não paramétrico, de Mann-Whitney, utilizando o nível de significância $P < 0,005$.

Comparações estatísticas referentes à taxa de sobrevivência das moscas tratadas com as drogas e os controles (negativo e positivo) foram feitas com o teste do Chi-quadrado para razões de amostras independentes.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente estudo foi avaliado o efeito tóxico e carcinogênico de diferentes drogas contraceptivas na concentração de 0,05, 0,1 e 0,2 mg/mL via dieta para *D. melanogaster*. Conforme apresentado na **figura 1** não foi evidenciado efeito tóxico em moscas tratadas em nenhuma das concentrações e em nenhuma das drogas analisadas. Os controles negativos e positivos responderam fielmente ao teste de toxicidade, sendo evidenciados 90% de sobrevivência nos respectivos controles.

Na **tabela 1** está apresentado o resumo dos resultados referente à análise de tumor epitelial em moscas trans-heterozigotas *mwh+/+wts*. É possível verificar (**Tabela 1**) a ocorrência de tumores em moscas tratadas com DIAD, na concentração de 0,2 mg/mL, sendo evidenciado diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$) quando comparado ao controle negativo. Diferenças estatisticamente significativas ($P < 0,05$), quando comparado ao controle negativo foram também observados em moscas tratadas com a menor concentração de lumi (0,05 mg/mL), no entanto esta diferença não expressa efeito carcinogênico como o observado com o tratamento de 0,2 mg/mL de DIAD.

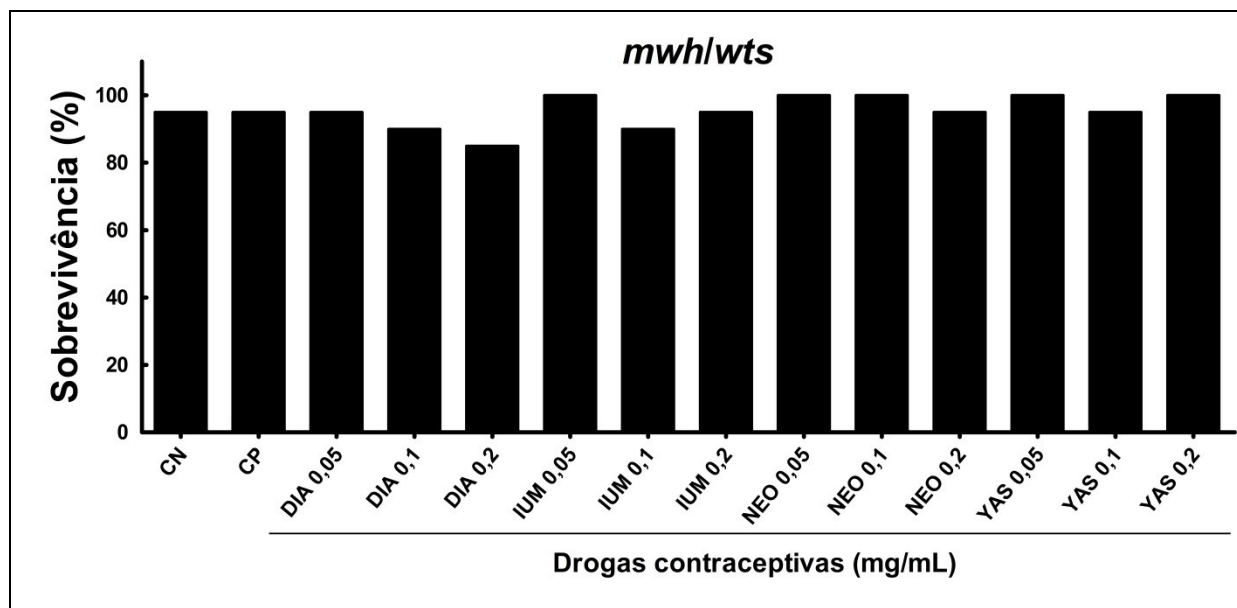


Figura 1. Taxas de sobrevivência das progênes de *Drosophila melanogaster* resultantes do cruzamento *mwh/mwh* x *wts/TM3, Sb¹*. CN = Controle negativo (Água); CP = Controle positivo (MMC 0,1 mM); DIA = DIAD; IUM = Iumi; NEO = Neovlar; YAS = Yasmin. Drogas contraceptivas, concentrações em mL/g.

*Diferença estatisticamente significativa ($P \leq 0,05$) de acordo com o teste do Chi-quadrado para razões de amostras independentes.

Em todos os tratamentos observados com as drogas contraceptivas, o corpo e as asas da mosca foram os locais onde se encontra a maior frequência de tumores (quando presentes). Dos 35 tumores observados em *D. melanogaster* tratados com 0,2 mg/mL de DIAD, 11,5% e 6,9% estão presentes no corpo e asas respectivamente, sendo estes estatisticamente diferente ($P < 0,05$) do controle negativo. Estes dados são concordantes com a frequência de tumores de outros trabalhos que usaram o teste como ferramenta para rastreio da carcinogenicidade (SIDOROV et al., 2001; ORSOLIN e NEPOMUCENO, 2009; SILVA e NEPOMUCENO, 2011; COSTA et al., 2011; FURTADO e NEPOMUCENO, 2012; MORAIS et al., 2016).

Os controles positivo e negativo responderam fielmente ao teste. Moscas tratadas com 0,1 mM de MMC durante 6 horas apresentaram alta frequência de tumor epitelial, diferindo estatisticamente ($P < 0,05$) em todos os apêndices da mosca, quando comparado ao controle negativo.

Tabela 1. Frequência de clones de tumor epitelial observados em *Drosophila melanogaster*, heterozigota para o gene supressor de tumor *wts*, tratadas com mitomicina C e diferentes concentrações de drogas contraceptivas.

Tratamentos	Nº de moscas	Frequência de tumor (número total de tumor)						Total
		Olhos	Cabeça	Asas	Corpo	Pernas	Halteres	
Controle negativo	130	0,000 (00)	0,015 (02)	0,015 (02)	0,023 (03)	0,007 (01)	0,000 (00)	0,061 (08)
Controle positivo	130	0,230 (30)*	0,153 (20)*	1,546 (201)*	1,346 (175)*	0,192 (25)*	0,076 (10)*	3,546 (461)*
<i>DIAD</i>								
0,05	130	0,000 (00)	0,007 (01)	0,000 (00)	0,030 (04)	0,000 (00)	0,007 (01)	0,046 (06)
0,1	130	0,000 (00)	0,000 (00)	0,015 (02)	0,076 (10)*	0,000 (00)	0,000 (00)	0,092 (12)
0,2	130	0,023 (03)	0,023 (03)	0,069 (09)*	0,115 (15)*	0,038 (05)	0,000 (00)	0,269 (35)*
<i>lumi</i>								
0,05	130	0,000 (00)	0,000 (00)	0,000 (00)	0,000 (00)	0,000 (00)	0,000 (00)	0,000 (00)*
0,1	130	0,000 (00)	0,000 (00)	0,000 (00)	0,015 (02)	0,000 (00)	0,000 (00)	0,015 (02)
0,2	130	0,000 (00)	0,015 (02)	0,007 (01)	0,023 (03)	0,000 (00)	0,000 (00)	0,046 (06)
<i>Neovlar</i>								
0,05	130	0,000 (00)	0,000 (00)	0,007 (01)	0,030 (04)	0,000 (00)	0,000 (00)	0,038 (05)
0,1	130	0,000 (00)	0,007 (01)	0,007 (01)	0,038 (05)	0,000 (00)	0,000 (00)	0,053 (07)
0,2	130	0,000 (00)	0,000 (00)	0,015 (02)	0,053 (07)	0,007 (01)	0,000 (00)	0,076 (10)
<i>Yasmin</i>								
0,05	130	0,000 (00)	0,007 (01)	0,030 (03)	0,000 (01)	0,000 (00)	0,000 (00)	0,038 (05)
0,1	130	0,007 (01)	0,000 (00)	0,015 (02)	0,000 (00)	0,007 (01)	0,000 (00)	0,030 (04)
0,2	130	0,000 (00)	0,000 (00)	0,015 (02)	0,053 (07)	0,000 (00)	0,000 (00)	0,069 (09)

Diagnóstico estatístico de acordo com o teste de Mann-Whitney. Nível de significância de ($P \leq 0.05$).

*Valores considerados estatisticamente diferentes do controle negativo.

Controle positivo: MMC, Mitomicina C (0.1 mM). Controle negativo: Água ultra - pura. Drogas contraceptivas em mg/mL.

Por serem drogas amplamente utilizadas atualmente como métodos contraceptivos pelo público feminino, os anticoncepcionais hormonais orais foram escolhidos (Neovlar – 2ª geração, Yasmin – 3ª geração, lumi – 4ª geração, DIAD – anticoncepcional de emergência) para avaliação de seu potencial carcinogênico usando como organismo modelo a *D. melanogaster* um eucarioto que apresenta considerável homologia com o ser humano (KIM et al., 2011). Embora neste trabalho não tenha evidenciado efeito carcinogênico dos três anticoncepcionais comerciais orais (lumi, Neovlar e Yasmin) avaliados, diversos trabalhos na literatura têm demonstrado a relação de diferentes tipos de cânceres com o uso crônico de

anticoncepcionais pelo público feminino. Segundo Ministério da Saúde (2002) o uso de anticoncepcionais é considerado um dos fatores de risco de câncer de mama (Susan G. Komen for the Cure, 2009/2010), que de acordo com estes mesmos autores, podem ser em função dos hormônios que compõem esses medicamentos, os quais estimulam as glândulas mamárias, resultando em descontrole celular e finalmente o câncer nas mamas.

A maior parte dos estudos já realizados sobre contraceptivos hormonais associados ao câncer de mama informa que estes quando administrados de maneira crônica (o que se espera do uso da droga), aumenta 1,3 a 1,5 o risco de desenvolver a doença, tendo a tendência de aumentar mais ainda após 5 anos de uso (SCHUNEMANN et al., 2011).

Segundo o *Women's Health Initiative* (2002), o uso de contraceptivos a base de hormônio isolado (estrogênio) tende a aumentar o risco de neoplasias em 0,73, enquanto que o uso de anticoncepcionais combinados (estrogênio e progesterona) em mulheres potencializa as chances em 1,26 vezes, ambos usando como referência o tempo de 5 anos de exposição.

Já o *Control Group of Hormonal Factors on Breast Cancer* em um estudo realizado em 1999, em 5 anos de uso da droga, mostra que o risco é de 1,35. Uma análise apontou também que o uso de anticoncepcionais orais aumenta 1,9 vezes as chances de câncer de colo de útero, se comparado com mulheres que usaram os mesmo por um período < 5 anos. Câncer cérvico-uterino já foi documentado por Bezerra et al (2005) em função do uso prolongado de anticoncepcionais orais. Vários outros trabalhos na literatura relacionam o uso crônico de anticoncepcionais orais com casos de câncer (PINTO et al., 2002; FRIGATO e HOGA. 2003; RIMAN et al., 2004; ANJOS et al., 2007).

Vale ressaltar que há também, redução do risco de câncer após a interrupção do uso, depois de 10 anos o risco equipara-se ao de mulheres não usuárias do medicamento (APPLEBY et al., 2007).

Embora não tenha sido encontrados relatos sobre genotoxicidade, mutagenicidade e carcinogenicidade de anticoncepcionais de emergência (pílula do dia seguinte), o presente estudo é o primeiro trabalho que demonstra o efeito carcinogênico do DIAD (marca comercial), em *D. melanogaster*. Conforme apresentado na **tabela 2**, DIAD apresenta levonorgestrel em maior quantidade (0,75

mg), quando comparado com outros anticoncepcionais orais mensais, tais como o lumi analisado neste trabalho.

Tabela 2. Ingredientes declarados pelos fabricantes contidos na formulação das drogas contraceptivas.

Drogas	Classificação	Ingredientes hormonais	Excipientes*
DIAD	Pílula de emergência	Levonorgestrel (0,75 mg)	Amido, lactose, amidoglicolato de sódio, dióxido de silício, estearato de magnésio e talco farmacêutico.
lumi	4ª Geração	Drospirenona (3 mg) e etinilestradiol (0,02 mg)	Povidona, lactose monoidratada, amido, croscarmelose sódica, corante amarelo quinolina laca nº 10, estearato de magnésio, hipromelose e macrogol.
Neovlar	2ª Geração	Levonorgestrel (0,25 mg) e etinilestradiol (0,05 mg).	Amido, lactose, povidona, talco, estearato de magnésio, sacarose, macrogol, carbonato de cálcio, glicerol, dióxido de titânio, pigmento de óxido de ferro amarelo, pigmento de óxido de ferro vermelho e cera montanglicol.
Yasmin	3ª Geração	Drospirenona (3 mg) e etinilestradiol (0,03 mg)	Amido, lactose, povidona, estearato de magnésio, hipromelose, macrogol, talco, dióxido de titânio, pigmento de óxido de ferro amarelo.

* Concentrações dos excipientes não são informadas pelos fabricantes.

Na literatura os possíveis efeitos neoplásicos do levonorgestrel já foram colocados em questão. Um estudo realizado por Soini et al (2016) feito por meio de levantamentos de dados de mulheres com idade entre 30 e 49 anos da Finlândia, que usaram sistema intrauterino de liberação de levonorgestrel para tratamento de menorragia, apontaram a correlação do hormônio com casos de câncer de mama, o mesmo resultado foi observado em mulheres que utilizaram este mesmo sistema intrauterino, sendo observado uma maior incidência de câncer de mama nestas mulheres quando comparado a população não usuária (SOINI et al., 2014).

Levonogestrel aumenta a proliferação de células MCF-7 de cancro de mama (RUAN et al., 2012). Os possíveis efeitos de levonorgestrel sobre a instabilidade genética não se restringe apenas ao sistema intrauterino, segundo Hunter et al (2010) os anticoncepcionais orais são responsáveis por fornecer um grande risco de câncer de mama. O autor afirma que diferentes formulações de contraceptivos orais

podem resultar neste risco, porém destaca as preparações trifásicas a base de Levonorgestrel como sendo o grupo que necessita de maior atenção.

Apesar dos relatos que associam Levonogestrel a câncer de mama, dados sobre o perfil genotóxico/mutagênico do composto afirmam este como não sendo capaz de causar aumento de mutações acima do limite normal basal. Jemilev et al (1981) avaliaram o efeito de Levonorgestrel sobre babuínos fêmeas logo após o acasalamento e posteriormente nos recém nascidos. Segundo estes autores não foi constatado aumento de aberrações cromossômicas em células de medula óssea da mãe, tão pouco foi observado alterações cromossômicas em células de medula óssea dos recém nascidos.

Lang e Reimann (1993) avaliaram a capacidade mutagênica de levonogestrel nas concentrações de 5 a 2500 µg por meio do teste Ames em Salmonella e não foi evidenciado efeito mutagênico. Dados fornecidos pela *Food and Drug Administration* (FDA) e dados disponíveis na literatura esclarecem que Levonogestrel não oferece perigo de toxicidade e genotoxicidade, de acordo com dados obtidos por meio de teste em microrganismos e mamíferos (JORDAN, 2002).

No meio científico a capacidade genotóxica/mutagênica e carcinogênica continua muito escassa. O real efeito do hormônio sobre a integridade genética continua obscuro. No presente trabalho o aumento da frequência de tumor epitelial em *Drosophila* trans-heterozigotas para o gene supressor de tumor *Warts* tratadas com 0,2 mg/mL de DIAD pode ser resultante da alta concentração de Levonogestrel na formulação quando comparado a concentração declarada nos anticoncepcionais orais mensais. Tais dados alertam para a necessidade de mais testes com o Levonogestrel, bem como a avaliação dos diferentes anticoncepcionais orais, usando outros sistemas testes e outros organismos modelos, visando a obtenção de mais dados sobre a cinética das moléculas destes produtos formulados.

4. CONCLUSÃO

O presente trabalho conclui que nestas condições experimentais, no teste empregado neste trabalho e neste organismo modelo, o DIAD na concentração de 0,2 mg/mL apresenta potencial carcinogênico.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, A.M., MAMEDE, M.V., PANOBIANCO, M.S., PRADO, M.A.S., CLAPIS, M.J. Construindo o significado da recorrência da doença: a experiência de mulheres com câncer de mama. Ver Latino-am Enferm. V. 9, n. 5, p. 63-9, 2001.

ANDRADE, H.H.R.; LEHMANN, M. Teste para a detecção de mutação e recombinação somática (SMART) em *Drosophila melanogaster*. In: RIBEIRO, R.L.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. Mutagênese Ambiental. ULBRA, v. 1, p.281-307, 2003.

ANJOS, S. J. S. B., VASCONCELOS, C. T. M., FRANCO, E. S., ALMEIDA. P. C., PINHEIRO, A. K. B. Fatores de risco para câncer de colo do útero segundo resultados de IVA, citologia e cervicografia. Ceará, p. 912 – 920, 2007.

APPLEBY, P., BERAL, V., BERRINGTON DE GONZALEZ, A., COLIN, D., FRANCESCHI, S., GOODHILL, A., et al. Cervical cancer and hormonal contraceptives: collaborative reanalysis of individual data for 16,573 women with cervical cancer and 35,509 women without cervical cancer from 24 epidemiological studies. Lancet. 2007; 370 (9599):1609-21.

BERAL V, et al. Mortality associated with oral contraceptive use: 25 years follow up of cohort of 46000 women from Royal College of General Practitioners oral contraception study. BMJ, [S.I.], n. 318, p. 96-100, 1999.

BEZERRA, S.J.S., GONÇALVES, P.C., FRANCO, E.S., PINHEIRO, A.K.B. Perfil de mulheres portadoras de lesões cericais por HPV, quanto aos fatores de risco para câncer de colo de útero. J Bras Doenças Sex Transm.2005; 17(2):143-8.

COLLABORATIVE GROUP ON HORMONAL FACTORS IN BREAST CANCER. Breast cancer and hormonal contraceptives: collaborative reanalysis of individual data on 53.297 women with breast cancer and 100.239 women without breast cancer from 54 epidemiological studies. Lancet. 1996;347(9017):1713-27.

Conselho Federal de Farmácia. Uso racional da contracepção hormonal de emergência, n. 3, p. 1-3, 2005.

COSTA, R.M.A.; MENK, C.F.M. Biomonitoramento de mutagênese ambiental. Biotecnologia: ciência e desenvolvimento, v.3, n.12, 2000.

COSTA, W.F.; OLIVEIRA, A.B.; NEPOMUCENO, J.C. Lapachol as an epithelial tumor inhibitor agent in *Drosophila melangaster* heterozygote for tumor supressor gene wts. Genetics and Molecular Research, v. 10, p. 3236-3245, 2011.

Durst M, Gissmann L, Ikenberg H, zurHausen H. A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. ProcNatlAcadSci USA 1983; 80:3812-5.

FRANK, S.A. Evolution in health and medicine sackler colloquium: somatic evolutionary genomics: mutations during development cause highly variable genetic

mosaicism with risk of cancer and neurodegeneration. Proceedings of the National Academy Sciences of the United States of America, v. 107, n. 1 p. 1725-30, 2010.

FRIGATO, S., HOGA, L. A. K. Assistência à mulher com câncer de colo uterino: o papel da enfermagem. Revista Brasileira de Cancerologia, 49(4): 209 – 214, 2003.

FURTADO, S.G.; NEPOMUCENO, J.C. Redução de tumor epitelial em *Drosophila melanogaster*, pela enzima metaloprotease isolada da peçonha da serpente *Bothrops pauloensis*, por meio do teste wts (Warts). Perquirere, v. 9, p. 224-240, 2012.

GIORDANO, M.V., GIORDANO, L.A. Contraceção na Adolescência, v. 6, n. 4, p. 11-16, 2009.

HIB, J., ROBERTIS, E. M. F. Bases da biologia celular e molecular. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1998.

HUNTER, D. J.; COLDITZ, G. A.; HANKINSON, S. E.; MALSPEIS, S.; SPIEGELMAN, D.; CHEN, W.; STAMPFER, M. J.; WILLETT, W. C. Oral contraceptive use and breast cancer: a prospective study of young women. Cancer Epidemiolo Biomarkers Prev, v. 19, n. 10 , p. 2496-2502 , 2010.

KIM, S. I.; J. W.; JUNG, J. W.; A. H. N, Y. J.; RESTIFO, L. L.; KWON, H. W. *Drosophila* as a model system for studying lifespan and neuroprotective activities of plant-derived compounds. Journal of Asia-Pacific Entomology, v. 14, n. 4, p.509-517, 2011.

JEMILEV, Z. A.; KOMOR, A.; STRECKE, J.; OETTEL, M.; SCHUBERT, K. Chromosomal analysis of baboons and their mothers, following application to mothers of potentially post-ovulation fertility-inhibiting steroids (author's transl). Zentralbl Gynakol, v. 103 n. 20, p. 1215-1219, 1981.

JORDAN, A. Toxicology of progestogens of implantable contraceptives for women. Contraception. V. 65, n. 1, p. 3-8, 2002.

LOPES, A. A.; OLIVEIRA, A. M.; PRADO, C. B. C. Principais genes que participam da formação de tumores. Revista de Biologia e Ciências da Terra, v. 2, n. 2, p.1-7, 2002.

LOURO, I. D; LLERENA Jr., J.C.; MELO, M. S. V.; ASHTON-PROLLA, P.; CNFORTI, N. F. Genética Molecular do Câncer. 2.ed. São Paulo: MSG Produção Editorial, 2002.

LUBIANCA, J.N., WANNMACHER, L .Uso racional de contraceptivos hormonais orais. O uso racional de medicamentos, n. 10, p. 1-16, 2011.

MACHADO, N. M.; LOPES, J. C.; SATURNINO, R. S.; FAGAN, E. B.; NEPOMUCENO, J. C. Lack of Mutagenic effect by multi-walled functionalized carbono nanotubes in the somatic cells of *Drosophila melanogaster*. Food and Chemical Toxicology, v. 62, n. 1, p. 355-360, 2013.

MATTOS, J.M. Pílulas anticoncepcionais, p. 1-6, 2011.

Ministério da Saúde (BR). Assistência em Planejamento Familiar .Brasília: Ministério da Saúde, v. 4, n. 40, p. 1-60, 2002.

NARKIEWICZ K, et al. Ambulatory blood pressure in mild hypertensive women taking oral contraceptives. A case-control study. Am J Hypertence, [51], v.8, p.249-253, 1995.

NEGRINI, B.P, SCHIFFMAN, M.H., KURMAM, R.J., BARNES, W., LANNON, L., MALLEY, K. Oral contraceptive use, human papillomavirus infection, and risk of early cytological abnormalities of the cervix. Cancer Res.1990;50(15):4670,5.

NISHIYAMA, Y.; HIROTA, T.; MORISAKI, T.; HARA, T.; MARUMOTO, T.; IADA, S.; MAKINO, K.; YAMAMOTO, H.; HIRAOKA, T.; KITAMURA, N.; SAYA.; H. A human homolog *Drosophila* warts suppressor, h-warts, localized to mitotic apparatus and specifically phosphorylated during mitosis. Febs Letters, v. 459, n. 2, p.159-165, 1999.

ORSOLIN, P.C.; NEPOMUCENO, J.C. Potencial carcinogênico do açafrão (*Curcuma Longa L*) identificado por meio do teste para detecção de clones de tumor em *Drosophila melanogaster*. Perquiere, v. 6, p. 55-69, 2009.

ORSOLIN, P.C.; SILVA-OLIVEIRA, R.G.; NEPUMOCENO, J.C. Assessment of the mutagenic, recombinagenic and carcinogenic potential of orlistat in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. Food and Chemical Toxicology, v. 50, n.8, p. 2598-2604, 2012.

PINTO, A. P., TULIO, S., CRUZ, O. R. Co - fatores do HPV na oncogênese cervical. São Paulo, v. 48, n. 1, 2002.

Poppe WA, Peeters R, Drijkoningem M, Ide PS, Daenens P, Lauweryns JM, et al. Cervical continine and macrophage. Langerhans cells density in the normal human uterine cervix. GynecolObstet In vest.1996;41(4):253-9.

READ, A. P.; STRACHAN, T. Genética molecular humana. 2 ed. Porto Alegre: Editora Artmed, 2002.

RIMAN, T., NILSSON, S., PERSSON, I. R. Review of epidemiological evidence for reproductive and hormonal factors in relation to the risk of epithelial ovarian malignancies. Acta Obstet Gynecol Scand. 2004;83(9):783-95.

ROSSOUW, J. E., ANDERSON, G. L., PRENTICE, R.L., LACROIX, A.Z., KOOPERBERG, C., STEFANICK, M.L., et al. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results from the Women's Health Initiative randomized controlled trial. JAMA. 2002; 288(3):321-33.

ROOKUS, M. A.; LEEUWEN, F. E. Oral contraceptives and breast cancer in women aged 20-54 years. *Lancet*1994; 344:844-51.

RUAN, X.; NEUBAUER, H.; SEEGER, H.; FEHM, T.; CAHILL, M.A.; YANG, Y.; MUECK, M.O. Progestogens and membrane-initiated effects on the proliferation of human breast cancer cells. *Climacteric*, v. 15, p. 467-472, 2012.

SCHUNEMMAN JUNIOR, E.; SOUZA, R. T.; DÓRIA, M. T. Femina - Anticoncepção hormonal e câncer de mama. *Curitiba*, v. 39, n. 4, p. 231 – 235, 2011.

SIDOROV, R. A.; UGNIVENKO, E. G.; KHOVANOVAE, E. M.; BELISTSKY, G. A. Induction of tumor clones in *Drosophila melanogaster* wts/+ heterozygotes with chemical carcinogenesis. *Mutation Research*, v. 498, n.1, p. 181-191, 2001.

SILVA, L.M.; NEPOMUCENO, J.C. Efeito modulador da polpa da graviola (*Annona muricata*) sobre a carcinogenicidade da mitomicina C, avaliado por meio do teste para detecção de clones de tumor (*warts*) em *Drosophila melanogaster*. *Perquirere*, v. 8, p. 80-94, 2011.

SOINI, T.; HURSKAINEN, R.; GRÉNMAN, S.; MÄENPÄÄ, J.; PAAVONEN, J.; PUKKALA, E. Cancer risk in women using the levonorgestrel-releasing intrauterine system in Finland. *Obstet Gynecol*, v. 124, p. 292-299, 2014.

SOINI, T.; HURSKAINEN, R.; GRÉNMAN, S.; MAENPAA, J.; PAAVONEN, J.; JOENSUU, H.; PUKKALA, E. Levonorgestrel-releasing intrauterine system and the risk of breast cancer: A nationwide cohort study. *Acta Oncologica* v. 55, p. 188-92, 2016.

SUSAN G. KOMEN FOR THE CURE. Como os hormônios afetam o câncer de mama, p. 1 – 2, 2009/2010.

WANNMACHER, L. Anticoncepcionais Orais: O que há de novo. O uso racional de medicamentos, v. 1, n. 1, p. 1-6, 2003.

XU, T.; WANG, W.; ZHANG, S.; STEWART, R.A.; YU, W. Identifying tumor suppressors in genetic mosaics: the *Drosophila* *lats* gene encodes a putative protein kinase. *Development*, v. 12, n. 4, p.1053-1063, 1995.

TSUDA, H.; TAKEDA, N. Effect of tumor promoter TPA on spontaneous and Mitomycin C induced mitotic recombination in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research*. 189: 375-379, 1987.