



**AVALIAÇÃO TÓXICO-GENÉTICA DE FÁRMACOS À BASE DE PLATINA
ATRAVÉS DO CRUZAMENTO PADRÃO DO TESTE SMART EM *Drosophila
melanogaster***

Lucía Paola Facciola González¹
Natacha Allgayer²
Rafael Rodrigues Dihl³
Mauricio Lehmann³

RESUMO

Muitos compostos são utilizados na quimioterapia oncológica, e a maioria deles tem como mecanismo de ação a interação com o DNA, como os análogos das bases nitrogenadas, agentes intercalantes e os agentes alquilantes. Dentre os agentes alquilantes, os quimioterápicos a base de platina são amplamente utilizados no tratamento de vários tipos de câncer. A ligação destes compostos ao DNA é considerada o passo crítico para a sua atividade antitumoral, mas também é indicativo de um risco para os pacientes devido ao seu potencial mutagênico. Atualmente, apenas três fármacos a base de platina estão liberados pela Anvisa para uso clínico no Brasil: cisplatina (CIS), carboplatina (CARB) e oxaliplatina (OXA). O presente estudo avaliou a atividade mutagênica destes três fármacos através do teste para detecção de mutação e recombinação em células somáticas (SMART) de *Drosophila melanogaster*. Para tanto foi utilizado o cruzamento padrão, que apresenta níveis basais de enzimas de metabolização do tipo citocromo P450. Os resultados obtidos mostram que a CIS nas concentrações de 0,006; 0,012; 0,025 e 0,05 mM, e a CARB, nas concentrações de 0,1; 0,2; 0,5 e 1 mM, aumentaram a frequência de danos genéticos em todas as concentrações utilizadas, apresentando uma evidente relação dose-efeito. Por outro lado, a OXA não apresentou atividade mutagênica nas concentrações de 2; 1; 0,5; 0,2 e 0,1 mM. Desta forma, os resultados apresentados neste estudo demonstram que o fármaco OXA apresenta comportamento distinto das demais drogas no que se refere à atividade mutagênica.

Palavras chave: cisplatina; carboplatina; oxaliplatina; mutação; recombinação.

INTRODUÇÃO

Muitos compostos são utilizados na quimioterapia oncológica, a maioria deles tem como mecanismo de ação a interação com o DNA, como os análogos das bases nitrogenadas, agentes intercalantes e os agentes alquilantes. Os agentes alquilantes são os mais antigos e um dos grupos de fármacos mais utilizados. A citotoxicidade destes compostos ocorre quando há formação de ligações covalentes com o DNA, interferindo na replicação e/ou transcrição, processos essenciais para a divisão celular. Dentre os agentes alquilantes, os quimioterápicos a base de platina são amplamente utilizados no tratamento de vários tipos de câncer (Schmitt et al., 2013).

O mecanismo de ação antitumoral dos complexos de platina envolve o bloqueio do ciclo celular na fase G2, podendo desencadear a morte da célula. A ligação destes compostos ao DNA é considerada o passo crítico para a sua atividade antitumoral, mas também é indicativo de um risco para o hospedeiro devido ao seu potencial genotóxico. Além disso, a interação direta e indireta de compostos à base de platina com proteínas, RNA e enzimas contribui para a complexidade do mecanismo de apoptose envolvido no efeito antitumoral (Ndinguri et al., 2009).

O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade mutagênica dos fármacos cisplatina (CIS), carboplatina (CARB) e oxaliplatina (OXA) em *D. melanogaster* através do teste para

¹Aluno do Curso de Graduação em Biologia – Bolsista PROBIT/FAPERGS – lucasouza@ulbra.edu.br

²Aluna de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular Aplicada À Saúde (PPGBioSaúde)– natachaallgayer@gmail.com

³Professores do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular Aplicada À Saúde (PPGBioSaúde)-rafael.rodrigues@ulbra.br e mauriciol@ulbra.br

detecção de mutação e recombinação somática (SMART), utilizando o cruzamento padrão, que possui expressão normal de enzimas citocromo P450.

METODOLOGIA

Neste estudo foi empregado o teste SMART de acordo com o descrito em Andrade et al. (2004). Foi utilizado o cruzamento padrão, com fêmeas de *D. melanogaster* da linhagem *flr³* e machos da linhagem *mwh*. As larvas coletadas do meio de ovoposição foram submetidas ao tratamento crônico no qual foram utilizados os seguintes grupos de tratamento: controle negativo (água destilada e deionizada); controle positivo (uretano 20 mM); diferentes concentrações dos fármacos.

Após a eclosão das moscas, as asas dos indivíduos trans-heterozigotos foram retiradas, colocadas em lâminas de vidro e analisadas em microscópio óptico com aumento de 400 x.

Para a avaliação estatística dos dados foi utilizado o teste binomial condicional de Kastambaum e Bowman (1970), seguindo o procedimento de decisões múltiplas de acordo com Frei e Würigler (1988).

As concentrações utilizadas foram definidas a partir da avaliação do índice de sobrevivência. Para tanto, colocou-se 100 larvas em cada tubo de tratamento, com o objetivo de estabelecer as porcentagens de sobrevivência após a contagem das moscas adultas eclodidas. Para a avaliação tóxico-genética utilizou-se concentrações que apresentaram índice de sobrevivência de no mínimo 70%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados parciais obtidos referentes à toxicidade-genética mostram que a CIS e a CARB aumentaram a frequência de danos genéticos em todas as concentrações utilizadas, apresentando uma evidente relação dose-efeito. O aumento verificado ocorreu em todos os tipos de manchas, incluindo as manchas gêmeas, indicando que estes fármacos induzem lesões genéticas originadas também por recombinação somática. Entretanto, é possível observar que a CIS apresenta frequência de danos cerca de 10x maior que a CARB, evidenciando assim um maior efeito mutagênico deste fármaco (Tabela 1).

Tabela 1: Resultados obtidos no teste SMART com a progênie *mwh/flr³* do cruzamento padrão após exposição crônica de larvas de 3º estágio a cisplatina, carboplatina e oxaliplatina

Genótipos e Conc. (mM)	N. de Indiv. (N)	Manchas por indivíduo (no. de manchas) diag. estatístico ^a			
		MSP	MSG	MG	TM
		(1-2 céls) ^b <i>m</i> = 2	(>2 céls) ^b <i>m</i> = 5	<i>m</i> = 5	<i>m</i> = 2
Controle negativo	60	1,48 (89)	0,23 (14)	0,07 (04)	1,78 (107)
Uretano 20 mM	60	9,17 (550) +	1,53 (92) +	0,28 (17) +	10,98 (659) +
CIS 0.006 mM	50	3,00 (150) +	1,04 (52) +	0,36 (18) +	4,40 (220) +
CIS 0.012 mM	50	4,96 (248) +	1,82 (91) +	0,62 (31) +	7,40 (370) +
CIS 0.025 mM	50	12,66 (633) +	4,36 (218) +	1,56 (78) +	18,58 (929) +
CIS 0.05 mM	50	20,16 (1008) +	11,50 (575) +	4,40 (220) +	36,06 (1803) +
CARB 0.1 mM	50	6,80 (340) +	0,48 (24) +	0,12 (06) i	7,40 (370) +
CARB 0.2 mM	50	11,00 (550) +	0,94 (47) +	0,10 (05) i	12,04 (602) +
CARB 0.5 mM	50	35,72 (1786) +	2,10 (105) +	0,26 (13) +	38,08 (1904) +
CARB 1 mM	50	86,98 (4349) +	8,56 (428) +	0,32 (16) +	95,86 (4793) +
OXA 0.1 mM	50	2,04 (102) f ^c	0,12 (06) -	0,00 (00) -	2,16 (108) -
OXA 0.2 mM	50	1,60 (80) -	0,20 (10) -	0,02 (01) i	1,82 (91) -
OXA 0,5 mM	50	1,42 (71) -	0,30 (15) i	0,08 (04) i	1,80 (90) -
OXA 1 mM	50	1,40 (70) -	0,08 (04) -	0,06 (03) i	1,54 (77) -
OXA 2 mM	20	2,45 (49) +	0,45 (09) i	0,05 (01) i	2,95 (59) -

MSP: manchas simples pequenas, MSG: manchas simples grandes, MG: manchas gêmeas, TM: total de manchas.
^aDiagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würigler (1988), teste binomial condicional: -, negativo; i, inconclusivo, quando comparado ao controle negativo. ^bIncluindo manchas simples *flr³* raras. ^cForam considerados apenas os clones *mwh* das manchas simples *mwh* e das manchas gêmeas.

Ao contrário destes compostos, os resultados encontrados com a OXA mostram que este fármaco não foi capaz de induzir danos genéticos no teste SMART em concentrações que variaram de 0,006 a 0,5 mM (Tabela 1). Foi utilizada uma maior amplitude de concentrações, pois este fármaco além de ter sido menos tóxico que a CIS, não apresentou atividade mutagênica nas concentrações nas quais CIS e CARB mostraram este potencial.

Os fármacos CIS e CARB são descritos na literatura como potentes mutágenos tendo sido avaliados em bioensaios *in vivo* e *in vitro*. Neste sentido, a cisplatina foi capaz de induzir trocas entre cromátides irmãs (TCIs), aberrações cromossômicas e aumentar a frequência de micronúcleos quando avaliada em cultura de linfócitos humanos, células da medula óssea e sangue periférico de camundongos e ratos (Kosminder et al., 2004; Oliveira et al., 2009; Rjiba-Touati et al., 2012; Serpeloni et al., 2013). Este fármaco e a carboplatina, quando avaliados em linfócitos humanos através do teste de micronúcleos com bloqueio de citocinese (CBMN) associado ao uso da técnica de hibridização *in situ* por fluorescência (FISH), apresentaram aumento na frequência de micronúcleos, gerados tanto por quebras, quanto por alterações cromossômicas numéricas (Nersesyan et al., 2006). Adicionalmente, foram descritos como indutores de mutação gênica, quando avaliados através do SOS-cromoteste em *Escherichia coli* (Overbeck et al., 1996; Gebel et al., 1997) e do teste de mutação do gene *Hprt* em células de ovário de hamster chinês CHO-K1 (Gebel et al., 1997).

No que se refere à oxaliplatina, existem poucos estudos descritos acerca de suas propriedades mutagênicas. Almeida et al. (2006) utilizaram a versão alcalina do teste cometa em células da linhagem tumoral H460 para medir a formação de pontes no DNA pelos agentes oxaliplatina e cisplatina, assim como estudar a cinética de reparação destes danos. Adicionalmente, os autores investigaram através deste mesmo bioensaio os adutos induzidos no DNA dos linfócitos de pacientes submetidos à quimioterapia com a oxaliplatina. Os autores concluíram que a cisplatina induziu maior quantidade de adutos se comparada à oxaliplatina *in vitro*, utilizando as mesmas concentrações, e que houve diferenças na eficiência de reparação dos danos induzidos. Da mesma forma, estes fármacos foram capazes de induzir lesões em linfócitos *in vivo*, apresentando diferenças na formação de pontes e no reparo destas lesões (Krüger et al., 2015). Também utilizando a versão alcalina do teste cometa, porém em células de câncer colorretal HCT116, Pang et al. (2007) observaram que apenas a oxaliplatina e a carboplatina foram capazes de induzir lesões no DNA, ao contrário da cisplatina que mostrou-se não-genotóxica. Esta diferença encontrada sugere padrões distintos de indução de danos no DNA entre estes fármacos.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados apresentados neste estudo demonstram que os fármacos CIS, CARB e OXA apresentam comportamentos distintos no que se refere à atividade mutagênica. Enquanto a CIS e CARB mostram-se potentes indutores de danos genéticos, a OXA, em concentrações iguais e até 10x superiores, não foi capaz de induzir lesões no material genético. Desta forma, somados aos dados descritos na literatura, os resultados do presente trabalho indicam haver diferenças importantes no padrão de indução de lesões genéticas e também em relação aos mecanismos de reparação do DNA envolvidos na correção destes danos.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, G. M., et al. Detection of oxaliplatin-induced DNA crosslinks *in vitro* and in cancer patients using the alkaline comet assay. **DNA Repair**, v. 5, p. 219-225, 2006.

ANDRADE, H. H. R., et al. Wing Somatic Mutation and Recombination Test (SMART). In: Henderson, DS (Ed.), **Drosophila Cytogenetics Protocols**, Human Press Inc. Totowa, p. 389-412, 2004.

FREI, H., WÜRGLER, F. E. Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from Drosophila assays indicate positive, negative or inconclusive result. **Mutation Research**, v. 203, p. 297-308, 1988.

GEBEL, T., et al. Genotoxicity of platinum and palladium compounds in human and bacterial cells. **Mutation Research**, v. 389, p. 183-190, 1997.

KASTEMBAUM, M. A., BOWMAN, K. O. Tables to determining the statistical significance of mutation frequencies. **Mutation Research**, 1970;9:527-49.

KOSMINDER, B., et al. Evaluation of the genotoxicity of cis-bis-(3-aminoflavone) dichloroplatinum(II) in comparison with cis-DDP. **Mutation Research**, 2004;558:93-110.

KRÜGER, K., et al. Platinum-induced kidney damage: Unraveling the DNA damage response (DDR) of renal tubular epithelial and glomerular endothelial cells following platinum injury. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1853, n. 3, p. 685-698, 2015.

NDINGURI, M.W., et al. Peptide targeting of platinum anti-cancer drugs. **Bioconjugate Chemistry**, v. 20, p. 1869-78, 2009.

OLIVEIRA, R. J., et al. Evaluation of chemopreventive activity of glutamine by the comet and the micronucleus assay in mice's peripheral blood. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 28, p. 120-124, 2009.

OVERBECK, T. L., et al. comparison of the genotoxic effects of carboplatin and cisplatin in *Escherichia coli*. **Mutation Research**, v. 362, p. 249-259, 1996.

PANG, S. K., et al. DNA damage induced by novel demethylcantharidin-integrated platinum anticancer complexes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 363, p. 235-240, 2007.

RJIBA-TOUATI, K., et al. Induction of DNA fragmentation, chromosome aberrations and micronuclei by cisplatin in rat bone-marrow cells: Protective effect of recombinant human erythropoietin. **Mutation Research**, v. 747, p. 202-6, 2012.

SCHMITT, S. M., et al. New applications of old metal-binding drugs in the treatment of human cancer. **NIH Public Front Biosci** v. 4, p.375-91, 2013.

SERPELONI, J. M., et al. Effects of lutein and chlorophyll b on GSH depletion and DNA damage induced by cisplatin *in vivo*. **Human & Experimental Toxicology**, v. 32, p. 828-36, 2013.