



**AValiação DO POTENCIAL MUTAGÊNICO DE FÁRMACOS À BASE DE
PLATINA ATRAVÉS DO CRUZAMENTO APRIMORADO DO TESTE SMART EM
*Drosophila melanogaster***

Rodrigo Antonio de Campos¹
Natacha Allgayer²
Rafael Rodrigues Dihl³
Mauricio Lehmann³

RESUMO

A maioria dos agentes quimioterápicos atua de forma não-específica, lesando tanto células malignas quanto normais, resultando em diferentes efeitos colaterais. Muitos compostos 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, e apenas cisplatina (CIS), carboplatina (CARB) e oxaliplatina (OXA) estão sendo comercializados. Ao considerarmos a escassez de informações referentes à atividade tóxico-genética da oxaliplatina, o presente estudo teve como objetivo avaliar a atividade mutagênica da CIS (0,006; 0,012; 0,025 e 0,05 mM), CARB (0,1; 0,2; 0,5 e 1 mM) e OXA (0,1; 0,2; 0,5; 1 e 2 mM) através do teste para detecção de mutação e recombinação em células somáticas de *D.melanogaster* (teste SMART). Foi utilizado o cruzamento aprimorado, que apresenta níveis aumentados de enzimas de metabolização do tipo citocromo P450 (CYP450). Os resultados obtidos até o presente momento mostram que todos os fármacos foram capazes de induzir lesões no material genético em todas as concentrações avaliadas. Os dados deste estudo somados a outra investigação, na qual estes fármacos foram avaliados no cruzamento padrão do teste SMART, que diferentemente do cruzamento aprimorado apresenta níveis normais de CYP450, mostram que a OXA apresentou atividade mutagênica apenas na presença de altos níveis destas enzimas. Desta forma, pode-se caracterizar este fármaco como um agente mutagênico de ação indireta, cujos metabólitos apresentam a capacidade de lesar a molécula de DNA.

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

INTRODUÇÃO

A quimioterapia quando aplicada ao câncer é chamada de quimioterapia antineoplásica ou quimioterapia antiblástica (INCA, 2016). Quando usada como terapia adjuvante após a cirurgia e a radioterapia, a quimioterapia prolonga o tempo de progressão da doença e a média de sobrevivência, embora muitos quimioterápicos não induzam respostas satisfatórias nesses casos. Os fármacos utilizados no tratamento do câncer interferem nos mecanismos de sobrevivência, proliferação e migração celulares. Na década de 1960, a descoberta da ação citostática da *cis*-diaminodicloroplatina(II), também conhecida como cisplatina ou *cis*-DDP, possibilitou o início das investigações sobre o potencial antineoplásico deste agente, que mais tarde conduziram à aprovação do seu uso terapêutico, isoladamente ou em combinação com outros fármacos, sendo atualmente utilizado para o tratamento dos tumores de bexiga, ovário, cabeça e pescoço, testículo e pulmão. Apesar da sua ampla utilização, a administração deste composto está associada a efeitos colaterais envolvendo toxicidade severa, bem como o aparecimento de resistência em vários tipos de câncer. Neste sentido, um grande número de

¹Aluno do Curso de Graduação em Biomedicina – Bolsista PIBIT/CNPq – campos.rodri@gmail.com

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

compostos derivados da platina, similares à cisplatina, foram desenvolvidos e avaliados clinicamente. Entretanto, apenas dois destes agentes, a carboplatina e a oxaliplatina, foram aprovadas para uso clínico (Harper *et al.*, 2010). Embora apresentem algumas vantagens em relação à cisplatina, os problemas associados a efeitos-colaterais e resistência ainda persistem. Apesar disto, os derivados de platina continuam sendo utilizados no tratamento de 50 a 70% dos pacientes com câncer (Theiner *et al.*, 2015).

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 detecção de mutação e recombinação somática (SMART), utilizando o cruzamento aprimorado, que possui expressão aumentada de enzimas de metabolização do tipo citocromo P450.

METODOLOGIA

Neste estudo foi empregado o teste SMART de acordo com o descrito em Andrade *et al.* (2004). Foi utilizado o cruzamento aprimorado, com fêmeas de *D. melanogaster* da linhagem *ORR;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 com o cruzamento aprimorado do teste SMART mostram que os três fármacos aumentaram a frequência de danos genéticos em todas as concentrações utilizadas, entretanto apenas a CIS e CARB apresentaram relação dose-efeito (Tabela 1).

Quando comparamos os resultados do cruzamento aprimorado com os dados prévios obtidos com o cruzamento padrão, que apresenta níveis basais de enzimas de metabolização CYP450, observa-se que a CIS e a CARB apresentam resultados similares, mostrando que não há interferência destas enzimas sobre a atividade genotóxica. Entretanto, para a OXA, enquanto os resultados obtidos com o cruzamento padrão indicaram ausência de toxicidade genética, no cruzamento aprimorado este fármaco mostrou-se genotóxico, evidenciando a bioativação do mesmo pelas enzimas CYP450.

Enquanto a CIS e a CARB já são amplamente descritas como potentes mutágenos, 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 comparado 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. 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.

Tabela 1: Resultados obtidos no teste SMART com a progênie *mwh/flr³* do cruzamento aprimorado 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				Total manchas <i>mwh</i> ^c (n)
		MSP (1-2 céls) ^b m = 2	MSG (>2 céls) ^b m = 5	MG m = 5	TM m = 2	
<i>mwh/flr³</i>						
Controle negativo	30	1,63(49)	0,17 (05)	0,07 (02)	1,87(56)	55
Uretano 20 mM	30	25,63(769) +	4,37 (131)+	1,60 (48)+	31,60(948) +	937
CIS 0.006 mM	50	5,22(261) +	1,08 (54)+	0,20 (10)i	6,50(325) +	325
CIS 0.012 mM	50	9,28(464) +	2,16 (108)+	0,54 (27)+	11,98(599) +	599
CIS 0.025 mM	30	9,93(298) +	2,27 (68)+	0,60 (18)+	12,80(384) +	383
CIS 0.05 mM	42	13,19(554) +	5,74 (241)+	1,57 (66)+	20,50(861) +	861
CARB 0.05 mM	30	5,80(174) +	0,90 (27)+	0,07 (02)i	6,77(203) +	203
CARB 0.1 mM	29	8,48(246) +	0,86 (25)+	0,07 (02)i	9,41(273) +	273
CARB 0.2 mM	30	17,50(525) +	1,03 (31)+	0,13 (04)i	18,67(560) +	560
CARB 0.5 mM	35	43,63(1527)+	2,94 (103)+	0,06 (02)i	46,63(1632)+	1632
CARB 1 mM	30	76,70(2301)+	6,93 (208)+	0,20 (06)i	83,83(2515)+	2515
OXA 0.1 mM	30	4,07(122) +	0,63 (19)+	0,03 (01)i	4,73(142) +	142
OXA 0.2 mM	25	4,52(113) +	0,68 (17)+	0,08 (02)i	5,28(132) +	132
OXA 0.5 mM	40	3,78(151) +	0,40 (16)i	0,00 (00)i	4,18(167) +	167
OXA 1 mM	40	3,15(126) +	0,28 (11)i	0,03 (01)i	3,45(138) +	138
OXA 2 mM	20	6,10(122) +	0,50 (10)+	0,15 (03)i	6,75(135) +	135

MSP: manchas simples pequenas, MSG: manchas simples grandes, MG: manchas gêmeas, TM: total de manchas.^aDiagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würzler (1988): +, positivo; -, negativo; i, inconclusivo. *m*, fator de multiplicação para a avaliação de resultados significativamente negativos. Níveis de significância $\alpha = \beta = 0,05$. ^bIncluindo manchas simples *flr3* raras. ^cConsiderando os clones *mwh* para as manchas simples *mwh* e para as manchas gêmeas. ^dApenas manchas simples *mwh* podem ser observadas nos indivíduos heterozigotos *mwh/TM3*, já que o cromossomo balanceador *TM3* não contém o gene mutante *flr³*.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados apresentados neste estudo somados a estudos prévios 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 tanto no cruzamento padrão quanto no aprimorado, a OXA, não foi capaz de induzir lesões no material genético quando utilizado o cruzamento padrão, porém mostrou-se genotóxico no cruzamento aprimorado. Desta forma, somados aos dados descritos na literatura, os resultados do presente trabalho indicam haver diferenças importantes no padrão de indução de lesões genéticas, nos mecanismos de reparação do DNA envolvidos na correção destes danos e nos aspectos relacionados à interação com as enzimas CYP450.

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.
- HARPER, B. W., et al.. Advances in platinum chemotherapeutics. **Chemistry - A European Journal**, v. 16, p. 7064-7077, 2010.
- INCA, Instituto Nacional de Câncer. **Estimativas da incidência e mortalidade por câncer**, 2016. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/index.asp?ID=1> Acesso em: 14/12/2016.
- KASTEMBAUM, M. A., BOWMAN, K. O. Tables to determining the statistical significance of mutation frequencies. **Mutation Research**, 1970;9:527-49.
- 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.
- THEINER, S., et al. Comparative in vitro and in vivo pharmacological investigation of platinum(IV) complexes as novel anticancer drug candidates for oral application. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 20, p. 89-99, 2015.