



ESTUDO DO POTENCIAL MUTAGÊNICO DE FÁRMACOS À BASE DE PLATINA ATRAVÉS DO TESTE SMART EM *Drosophila melanogaster*

Rodrigo Antonio de Campos¹
Natacha Allgayer²
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 e 1 mM) através do teste para detecção de mutação e recombinação em células somáticas de *D.melanogaster* (teste SMART). Foram utilizados os cruzamentos padrão e aprimorado, que apresenta níveis basais e aumentados de enzimas de metabolização do tipo citocromo P450 (CYP450), respectivamente. Os resultados mostram que a CIS e CARB foram capazes de induzir lesões no material genético em todas as concentrações avaliadas em ambos os cruzamentos enquanto a OXA apresentou atividade mutagênica apenas no cruzamento aprimorado na concentração de 0,5 mM. Nas demais concentrações e no cruzamento padrão a OXA não foi capaz de induzir lesões no material genético. Não foram encontradas diferenças significativas entre os dois cruzamentos no que se refere à ação mutagênica da CIS e CARB, porém as enzimas CYP450 podem estar influenciando a atividade mutagênica da OXA.

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

INTRODUÇÃO

A quimioterapia quando aplicada ao câncer é chamada de quimioterapia antineoplásica ou quimioterapia antitumoral (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*-diaminodichloroplatina(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

1 Aluno do curso de graduação em Biomedicina – Bolsista PIBIT/CNPq – campos.rodri@hotmail.com

2 Aluna de Doutorado do PPGBioSaúde – Bolsista CAPES – natachaallgayer@gmail.com

3 Professor do PPGBioSaúde – mauriciol@ulbra.br

aparecimento de resistência em vários tipos de câncer. Neste sentido, um grande número de 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 os cruzamentos padrão e aprimorado, que possuem expressão normal e aumentada de enzimas de metabolização do tipo citocromo P450 (CYP450), respectivamente.

METODOLOGIA

Neste estudo foi empregado o teste SMART de acordo com o descrito em Andrade *et al.* (2004). Foram utilizados os cruzamentos: (i) padrão, com fêmeas de *D. melanogaster* da linhagem *flr³* e, (ii) aprimorado, com fêmeas *ORR;flr³*, ambas cruzadas com 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 Kastembaum 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 obtidos referentes à toxicidade-genética dos fármacos CIS e CARB, mostram que ambos foram capazes de induzir alta frequência de danos no DNA nos dois cruzamentos utilizados e apresentaram uma clara relação dose-efeito (Tabela 1 e 2).

Quando comparamos os resultados do cruzamento aprimorado (Tabela 2) com os dados obtidos com o cruzamento padrão (Tabela 1), 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, apenas na concentração de 0,5 mM, o que pode indicar uma possível participação das enzimas CYP450 na metabolização deste fármaco.

Enquanto a CIS e a CARB são amplamente descritas como potentes mutágenos, no que se refere à OXA, 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 OXA. Os autores concluíram que a CIS induziu maior quantidade de adutos se comparado à OXA *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 OXA e a CARB 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 padrão após exposição crônica de larvas de 3^o estágio a cisplatina, carboplatina e oxaliplatina

Genótipos e concentrações	moscas (N)	Manchas por mosca (n° de manchas) diagnóstico estatístico ^a							Total de manchas mwh ^d (n)	
		Manchas simples pequenas		Manchas simples grandes		Manchas gêmeas ^c		Total de manchas		
		(1-2 céls) ^b		(>2 céls) ^b						
		m = 2		m = 5		m = 5		m = 2		
<i>mwh/flr³</i>										
Controle negativo	60	1,47 (88)		0,18 (11)		0,07 (04)		1,72 (103)		101
Uretano 20 mM	60	9,17 (550) +		1,53 (92) +		0,28 (17) +		10,98 (659) +		652
CIS 0.006 mM	50	3,00 (150) +		1,04 (52) +		0,36 (18) +		4,40 (220) +		217
CIS 0.012 mM	50	4,96 (248) +		1,82 (91) +		0,62 (31) +		7,40 (370) +		363
CIS 0.025 mM	50	12,66 (633) +		4,36 (218) +		1,56 (78) +		18,58 (929) +		920
CIS 0.05 mM	50	20,16 (1008) +		11,50 (575) +		4,40 (220) +		36,06 (1803) +		1765
CARB 0.1 mM	50	6,80 (340) +		0,48 (24) +		0,12 (06) -		7,40 (370) +		370
CARB 0.2 mM	50	11,00 (550) +		0,94 (47) +		0,10 (05) -		12,04 (602) +		601
CARB 0.5 mM	50	35,72 (1786) +		2,10 (105) +		0,26 (13) +		38,08 (1904) +		1902
CARB 1 mM	50	86,98 (4349) +		8,56 (428) +		0,32 (16) +		95,86 (4793) +		4793
OXA 0.1 mM	50	2,04 (102) -		0,12 (06) -		0,00 (00) -		2,16 (108) -		108
OXA 0.2 mM	50	1,60 (80) -		0,20 (10) -		0,02 (01) -		1,82 (91) -		90
OXA 0,5 mM	50	1,42 (71) -		0,30 (15) -		0,08 (04) -		1,80 (90) -		90
OXA 1 mM	50	1,40 (70) -		0,08 (04) -		0,06 (03) -		1,54 (77) -		77
<i>mwh/TM3</i>										
Controle negativo	40	1,90 (76)		0,35 (14)				2,25 (90)		90
CIS 0.006 mM	40	3,03 (121) +		0,65 (26) +				3,68 (147) +		147
CIS 0.012 mM	40	3,30 (132) +		0,85 (34) +				4,15 (166) +		166
CIS 0.025 mM	40	7,08 (283) +		1,48 (59) +				8,55 (342) +		342
CIS 0.05 mM	40	11,45 (458) +		2,68 (107) +				14,13 (565) +		565
CARB 0.1 mM	40	5,55 (222) +		0,40 (16) -				5,95 (238) +		238
CARB 0.2 mM	40	9,13 (365) +		0,50 (20) -				9,63 (385) +		385
CARB 0.5 mM	40	30,45 (1218) +		1,83 (73) +				32,28 (1291) +		1291
CARB 1 mM	40	69,08 (2763) +		6,25 (250) +				75,33 (3013) +		3013

^aDiagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würzler (1988): +, positivo; -, negativo, quando comparado ao controle negativo (água deionizada e destilada), *m*, fator de multiplicação para a avaliação de resultados significativamente negativos. Níveis de significância $\alpha = \beta = 0,05$. ^bIncluindo manchas simples *flr³* raras. ^cApenas manchas simples *mwh* podem ser observadas nos indivíduos heterozigotos *mwh/TM3*, já que o cromossomo balaceador *TM3* não contém o gene mutante *flr³*. ^dConsiderando os clones *mwh* para as manchas simples *mwh* e para as manchas gêmeas.

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.

Tabela 2: 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 concentrações	Nº de moscas (N)	Manchas por mosca (nº de manchas) diagnóstico estatístico ^a						Total de manchas <i>mwh</i> ^d (n)
		Manchas simples pequenas		Manchas simples grandes		Manchas gêmeas ^c	Total de manchas	
		(1-2 céls) ^b		(>2 céls) ^b				
		<i>m</i> = 2		<i>m</i> = 5		<i>m</i> = 5	<i>m</i> = 2	
<i>mwh/flr³</i>								
Controle negativo	60	2,43 (146)		0,42 (25)		0,08 (05)	2,93 (176)	175
Uretano 20 mM	40	31,38 (1255) +		9,90 (396) +		1,98 (79) +	43,25 (1730) +	1712
CIS 0.006 mM	50	5,22 (261) +		1,08 (54) +		0,20 (10) -	6,50 (325) +	324
CIS 0.012 mM	50	9,28 (464) +		2,16 (108) +		0,54 (27) +	11,98 (599) +	594
CIS 0.025 mM	50	21,48 (1074) +		4,94 (247) +		0,76 (38) +	27,18 (1359) +	1348
CIS 0.05 mM	48	22,52 (1081) +		8,52 (409) +		2,35 (113) +	33,40 (1603) +	1594
CARB 0.1 mM	50	8,24 (412) +		0,76 (38) +		0,10 (05) -	9,10 (455) +	460
CARB 0.2 mM	50	17,48 (874) +		0,90 (45) +		0,10 (05) -	18,48 (924) +	924
CARB 0.5 mM	50	41,18 (2059) +		3,02 (151) +		0,08 (04) -	44,28 (2214) +	2210
CARB 1 mM	50	83,44 (4172) +		9,12 (456) +		0,16 (08) -	92,72 (4636) +	4632
OXA 0.1 mM	50	3,00 (150) -		0,48 (24) -		0,04 (02) -	3,52 (176) -	176
OXA 0.2 mM	50	3,10 (155) -		0,50 (25) -		0,02 (01) -	3,62 (181) -	181
OXA 0.5 mM	50	3,64 (182) +		0,36 (18) -		0,00 (00) -	4,00 (200) +	200
OXA 1 mM	50	3,06 (153) -		0,26 (13) -		0,02 (01) -	3,34 (167) -	138
<i>mwh/TM3</i>								
Controle negativo	40	3,20 (128)		0,43 (17)		d	3,63 (145)	145
CIS 0.006 mM	40	3,33 (133) -		0,83 (33) +			4,15 (166) -	166
CIS 0.012 mM	40	5,68 (227) +		1,18 (47) +			6,85 (274) +	274
CIS 0.025 mM	40	10,63 (425) +		2,10 (84) +			12,73 (509) +	509
CIS 0.05 mM	30	12,67 (380) +		2,93 (88) +			15,60 (468) +	468
CARB 0.1 mM	40	6,18 (247) +		0,70 (28) i			6,88 (275) +	275
CARB 0.2 mM	40	12,05 (482) +		1,23 (49) +			13,28 (531) +	531
CARB 0.5 mM	40	33,13 (1325) +		2,98 (119) +			36,10 (1444) +	1444
CARB 1 mM	40	63,68 (2547) +		8,98 (359) +			72,65 (2906) +	2906
OXA 0.5 mM	40	3,08 (123) -		0,73 (29) i			3,80 (152) -	152

^aDiagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würgler (1988): +, positivo; -, negativo, quando comparado ao controle negativo (água deionizada e destilada), *m*, fator de multiplicação para a avaliação de resultados significativamente negativos. Níveis de significância $\alpha = \beta = 0,05$. ^bIncluindo manchas simples *flr³* raras. ^cApenas manchas simples *mwh* podem ser observadas nos indivíduos heterozigotos *mwh/TM3*, já que o cromossomo balanceador *TM3* não contém o gene mutante *flr³*. ^dConsiderando os clones *mwh* para as manchas simples *mwh* e para as manchas gêmeas.

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.