



**AVALIAÇÃO TÓXICO-GENÉTICA DE QUIMIOTERÁPICOS DERIVADOS
DA PLATINA ATRAVÉS DO TESTE SMART EM *Drosophila
melanogaster***

Natacha Allgayer

Aluna de Doutorado do PPGBIOSAÚDE ULBRA Canoas-RS. Laboratório de
Toxicidade Genética – TOXIGEN.

Vicente R. da Silva

Aluno do Curso de Graduação em Biomedicina, ULBRA Canoas-RS.

Rafael R. Dihl

Professor do Curso de Graduação em Biologia e PPGBIOSAÚDE.
Laboratório de Toxicidade Genética – TOXIGEN.

Mauricio Lehmann

Professor do Curso de Graduação em Engenharia Ambiental e
PPGBIOSAÚDE. Laboratório de Toxicidade Genética – TOXIGEN,
mauriciol@ulbra.br.

Resumo

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. 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. A principal via citotóxica desses compostos caracteriza-se pela formação de ligações cruzadas intercadeias ou pontes intercadeias de DNA. Apesar disto, os complexos de platina ainda são os fármacos de escolha no tratamento de aproximadamente 50 a 70% dos pacientes tratados com medicamentos antitumorais. Atualmente, apenas três fármacos a base de platina estão liberados pela Anvisa para uso clínico no Brasil: cisplatina (CIS), carboplatina (CARB) e oxaliplatina (OXA). Considerando a escassez de informações referentes ao potencial mutagênico da oxaliplatina e a necessidade de compará-la aos demais fármacos deste grupo, o presente estudo avaliou esta

atividade através do teste para detecção de mutação e recombinação em células somáticas (SMART) de *Drosophila melanogaster*. Os resultados obtidos mostram que a CIS e a CARB aumentaram a frequência de danos genéticos em todas as concentrações utilizadas (0,006, 0,012, 0,025 e 0,05 mM), com exceção da CARB na concentração de 0,006 mM, apresentando uma evidente relação dose-efeito. Adicionalmente, foi possível observar que a CIS apresentou frequência de danos cerca de 10x maior que a CARB, além de ter aumentado a frequência de manchas gêmeas, indicando a ocorrência de recombinação somática. Ao contrário destes compostos, os resultados encontrados com a OXA mostram que este quimioterápico não induziu danos genéticos quando avaliado através do teste SMART em concentrações que variaram de 0,006 a 0,5 mM. Desta forma, 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 20x 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.

Palavras-chave: Cisplatina. Carboplatina. Oxaliplatina.

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 (BOWDEN, 2014).

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 (BECKER; WEISS; THEILE, 2014).

OBJETIVO

Ao considerarmos a escassez de informações referentes à atividade mutagênica da oxaliplatina, somada a ausência de dados referentes à atividade recombinogênica dos derivados da platina, o presente trabalho avaliou a toxicidade genética dos quimioterápicos cisplatina, carboplatina e oxaliplatina através do teste para a Detecção de Mutação e Recombinação Somática (SMART) em *Drosophila melanogaster*.

METODOLOGIA

O Teste SMART de asa baseia-se na identificação de cerdas com fenótipos mutantes que representam a expressão fenotípica da ocorrência de lesões em nível de DNA. Tais alterações são primordialmente induzidas nas células dos discos imaginais que, por inúmeras divisões mitóticas, darão origem às asas dos adultos com suas cerdas. Os tricomas mutantes organizam-se em manchas, com fenótipos característicos, que indicam a ocorrência de eventos genéticos relacionados com mutações pontuais, aberrações cromossômicas e rearranjos estruturais devidos à recombinação mitótica. Para maiores detalhes sobre o teste SMART ver Andrade; Reguly; Lehmann (2004).

Foram utilizadas, no mínimo, quatro concentrações dos compostos, definidas a partir da avaliação do índice de sobrevivência. Para a avaliação tóxico-genética utilizou-se concentrações que apresentaram índice de sobrevivência de no mínimo 70%.

As frequências de manchas obtidas nos tratamentos com as diferentes concentrações dos fármacos foram comparadas com o controle negativo. Para tanto, foi utilizado o teste binomial condicional de Kastembaum e Bowman, seguindo o procedimento de decisões múltiplas de acordo com Frei e Würigler (1988).

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).

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).

Através do teste SMART em *Drosophila melanogaster*, a cisplatina foi caracterizada como mutagênica e recombinogênica (DANESI et al., 2010) além de induzir recombinação mitótica em células diplóides de *Aspergillus nidulans* (MIYAMOTO et al., 2007). Em células do gânglio cerebral de *D. melanogaster* este composto foi capaz de aumentar a frequência de quebras na dupla fita de DNA (GARCÍA SAR et al., 2008).

Tabela 1: Resultados obtidos no cruzamento padrão (CP) do teste SMART após exposição crônica de larvas de 3º estágio a diferentes concentrações dos fármacos cisplatina e oxaliplatina

Tratamentos	No. de moscas (<i>N</i>)	Manchas por mosca (no. de manchas) diagnóstico estatístico ^a				
		Manchas simples pequenas ^b (1–2 céls.) <i>m</i> = 2	Manchas simples grandes ^b (>2 céls.) <i>m</i> = 5	Manchas gêmeas <i>m</i> = 5	Total de manchas ^b <i>m</i> = 2	Manchas com clones <i>mwh</i> ^c (<i>n</i>)
Controles						
CN ^d	30	1,07 (32)	0,27 (08)	0,07 (02)	1,40 (42)	40
CP ^e	20	6,10 (122) +	0,75 (15) +	0,30 (06) +	7,15 (143) +	140
Cisplatina (mM)						
0,006	30	3,40 (102) +	1,03 (31) +	0,47 (14) +	4,90 (147) +	144
0,012	30	5,53 (166) +	1,93 (58) +	0,77 (23) +	8,23 (247) +	242
0,025	30	14,47 (434) +	4,53 (136) +	1,43 (43) +	20,43 (613) +	607
0,05	30	26,20 (786) +	13,13 (394) +	5,17 (155) +	44,50 (1335) +	1315
Carboplatina (mM)						
0,006	30	1,77 (53) +	0,13 (04) -	0,00 (00) -	1,90 (57) -	57
0,012	30	1,96 (57) +	0,27 (06) -	0,03 (01) -	2,20 (66) +	66
0,025	30	1,93 (58) +	0,27 (08) -	0,07 (02) -	2,27 (68) +	68
0,05	30	3,77 (113) +	0,20 (06) -	0,03 (01) -	4,00 (120) +	120
Oxaliplatina (mM)						
0,006	30	0,97 (29) -	0,00 (00) -	0,07 (02) i	1,03 (31) -	31
0,012	30	1,00 (30) -	0,07 (02) -	0,03 (01) -	1,10 (33) -	33
0,025	30	1,43 (43) i	0,20 (06) -	0,07 (02) -	1,70 (51) -	50
0,05	30	1,17 (35) -	0,03 (01) -	0,00 (00) -	1,20 (36) -	35
0,1	30	1,40 (42) -	0,10 (03) -	0,00 (00) -	1,50 (45) -	45
0,2	30	1,33 (40) -	0,10 (03) -	0,03 (01) -	1,47 (44) -	43
0,5	30	0,93 (28) -	0,30 (09) -	0,03 (01) -	1,27 (38) -	38

^aDiagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würzler (1988): +, positivo; -, negativo; i, inconclusivo, $P \leq 0,05$. ^bIncluindo manchas simples *flr*³ raras. ^cForam considerados apenas os clones *mwh* das manchas simples *mwh* e das manchas gêmeas. ^dCN: controle negativo, água destilada e deionizada; ^eCP: controle positivo, uretano 20 mM.

A carboplatina quando avaliada *in vitro* em linfócitos humanos induziu aumentos significativos de TCIs, aberrações cromossômicas e micronúcleos, assim como aumentou a frequência de aberrações cromossômicas em células CHO (CID; MUDRY; LARRIPA, 1995). Resultados semelhantes foram encontrados em outro estudo com linfócitos humanos, onde a carboplatina promoveu aumentos significativos de TCIs e aberrações cromossômicas *in vitro* e *in vivo* (SHINKAY; SAIJO; EGUCHI, 1988). Adicionalmente, quando avaliado em células de tumor ascítico de Ehrlich, este fármaco induziu aumento dose-dependente na frequência de micronúcleos (QUINTANA et al., 1994). Também em camundongos tratados com três injeções intraperitoneais de carboplatina durante cinco dias consecutivos, foi observado aumento dose-dependente na frequência de micronúcleos em eritrócitos da medula óssea (QUITA et al., 2012).

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.

CONCLUSÕES

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.

AGRADECIMENTOS

Agências financiadoras: FAPERGS e CNPq.

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, n. 2, p. 219-225, 2006.
- ANDRADE, H. H. R.; REGULY, M. L.; LEHMANN, M. Wing Somatic Mutation and Recombination Test (SMART). In: HENDERSON, D. S. (Ed.). **Drosophila Cytogenetics Protocols**. Totowa: Human Press Inc., 2004. p. 389-412.
- BECKER, J. P.; WEISS, J.; THEILE, D. Cisplatin, oxaliplatin, and carboplatin unequally inhibit *in vitro* mRNA translation. **Toxicology Letters**, v. 225, n. 1, p. 43-47, 2014.
- BOWDEN, N. A. Nucleotide excision repair: why is it not used to predict response to platinum-based chemotherapy? **Cancer Letters**, v. 346, p. 163-171, 2014.
- CID, M.G.; MUDRY, M.; LARRIPA, I. Chromosome damage induced by carboplatin (CBDCA). **Toxicology Letters**, v.76, p. 97-103, 1995.
- DANESI, C. C. et al. Mutagenic evaluation of combined paclitaxel and cisplatin treatment in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Mutation Research**, v. 696, n. 2, p. 139-143, 2010.

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, n. 4, p. 297-308, 1988.

GARCÍA SAR, D. et al. *In vivo* detection of DNA adducts induced by cisplatin using capillary HPLC-ICP-MS and their correlation with genotoxic damage in *Drosophila melanogaster*. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 390, n. 1, p. 37-44, 2008.

GEBEL, T. et al. Genotoxicity of platinum and palladium compounds in human and bacterial cells. **Mutation Research**, v. 389, n. 2-3, p. 183-190, 1997.

HARPER, B. W. et al. Advances in platinum chemotherapeutics. **Chemistry**, v. 16, n. 24, p. 7064-7077, 2010.

KOSMINDER, B. et al. Evaluation of the genotoxicity of cis-bis-(3-aminoflavone) dichloroplatinum(II) in comparison with cis-DDP. **Mutation Research**, v. 558, n. 1-2, p. 93-110, 2004.

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.

MIYAMOTO, C. T. et al. Genotoxicity (mitotic recombination) of the cancer chemotherapeutic agents cisplatin and cytosine arabinoside in *Aspergillus nidulans*. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, n. 6, p. 1091-1095, 2007.

NERSESYAN, A. et al. Cytogenetic toxicity of cycloplatin in human lymphocytes: detection by the micronucleus test and fluorescence in situ hybridization. **Anti-Cancer Drugs**, v. 17, n. 3, p. 289-295, 2006.

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, n. 1, p. 120-124, 2009.

OVERBECK, T. L.; KNIGHT, J. M.; BECK, D. J. A comparison of the genotoxic effects of carboplatin and cisplatin in *Escherichia coli*. **Mutation Research**, v. 362, n. 3, 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, n. 1, p. 235-240, 2007.

QUINTANA, E.; PERTUSA, J.; GONZALES, R.; RENAU-PIQUERAS, J. Carboplatin treatment induces dose-dependent increases in the frequency of micronuclei in Erlich ascites tumor cells. **Mutation Research**, v. 322, p. 55-60, 1994.

QUITA, S.; MUTAWAKAL, M.Z.; KURDI, L.; HIFNI, B. Mutagenic effects of carboplatin on somatic cells of male albino mice. **Arab Gulf J Sci Research**, v.30, p. 164-71, 2012.

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, n. 2, p. 202-206, 2012.

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, n. 8, p. 828-836, 2013.