

# TOXICIDADE GENÉTICA DE COMBINAÇÕES DE NRTIs EM CÉLULAS SOMÁTICAS DE *Drosophila melanogaster*

GUIMARÃES, Nilza Nascimento; CUNHA, Kênya Silva.

Laboratório de Genética Toxicológica, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, ICB, UFG, Goiânia – GO – Brasil.

\*kenya@icb.ufg.br

## Introdução

Projetadas para reduzir a replicação viral e inibir a transmissão perinatal do vírus HIV-1, as terapias antivirais altamente ativas (HAART) consistem na associação de dois ou mais fármacos que atuam em diferentes alvos moleculares, visando a obtenção de sinergia entre diferentes compostos, bem como a redução das dosagens dos medicamentos. Conseqüentemente, as HAART são capazes de reduzir os efeitos secundários tóxicos dos medicamentos no indivíduo e a probabilidade de desenvolvimento de resistência viral às drogas, promovendo assim uma melhora na qualidade e sobrevida dos pacientes (Olivero, 2007). A maioria das HAART consiste de dois ou mais inibidores nucleosídeos da transcriptase reversa (NRTI). Estes compostos imitam as bases nitrogenadas durante a síntese de DNA viral, interrompendo a construção da cadeia. Algumas vezes, há também a associação com outra categoria de medicamentos antirretrovirais, como os inibidores de proteases, inibidores de entrada celular ou inibidores da integrase (Torres *et al.*, 2007).

Diversos estudos *in vitro* e *in vivo*, demonstraram que os medicamentos antivirais, utilizados no tratamento da Aids, possuem um grande potencial indutor de lesões no DNA, compatíveis com o seu mecanismo de ação (Torres *et al.*, 2007). O desenvolvimento das HAART potencializou os riscos de lesões no genoma de células não infectadas, uma vez que os NRTIs podem também ser incorporados ao DNA nuclear e mtDNA, onde eles interrompem a construção da cadeia e são capazes de provocar danos irreparáveis nestas estruturas (Carter *et al.*, 2007). Como resultados destes danos, podem ocorrer mutações pontuais, grandes deleções e instabilidade genômica em grande escala, como mutagênese, clastogênese e encurtamento de telômeros. Estes

eventos também estão associados à indução de micronúcleos, trocas entre cromátides irmãs e aberrações cromossômicas (Olivero, 2007).

Utilizando cultura de células humanas, Meng *et al.* (2007) demonstraram que houve um aumento sinérgico da incorporação dos NRTIs ao DNA e na indução de mutações, causado pelos combinados em comparação com as drogas isoladas. Em outros estudos, utilizando células TK6, foi observado o aumento da frequência de mutações nos locus *HPRT* e *TK*, após a exposição às drogas administradas individualmente e em combinações, sendo que os combinados demonstraram o maior potencial indutor de lesões (Torres *et al.*, 2007). De modo geral, a análise da complexidade da genotoxicidade induzida pelos NRTIs poderia revelar mecanismos adicionais que permitiriam o desenvolvimento de estratégias de intervenção mais seguras (Olivero, 2007).

A Genética Toxicológica tem centrado suas investigações no uso de diferentes bioensaios capazes de detectar mutações pontuais ou cromossômicas e, mais recentemente, a recombinação mitótica, uma vez que este evento poderia estar envolvido na promoção do câncer mediada por fármacos e outros agentes físicos ou biológicos (Andrade e Lehmann, 2003). Neste contexto, o teste para detecção de mutação e recombinação em células somáticas de *Drosophila melanogaster* (SMART) foi desenvolvido para qualificar possíveis efeitos mutagênicos e/ou recombinaçômicos de muitas substâncias (Graf, *et al.*, 1984; Andrade e Lehmann, 2003).

## **Material e Método**

Neste trabalho foram utilizados antirretrovirais adquiridos da Indústria Química de Goiás (IQUEGO) e Fundação para Remédio Popular (FURP), nas combinações AZT+3TC, AZT+d4T e AZT+ddl em comparação ao AZT individualmente. As soluções foram preparadas à hora dos tratamentos, em diferentes concentrações, tendo os solventes como respectivos controles negativos. Foi avaliado o potencial genotóxico dos fármacos utilizando, simultaneamente, parâmetros relacionados com a indução de mutação gênica, mutação cromossômica e/ou recombinação mitótica (Graf e van Schaik, 1992). Para isto foi utilizado o cruzamento padrão do teste SMART, no qual larvas de terceiro estágio, originadas do cruzamento entre fêmeas *flr*<sup>3</sup> e machos *mwh*, foram tratadas, via alimentação, com diferentes concentrações dos

combinados. Uma vez que o cruzamento padrão envolve linhagens de *Drosophila* que apresentam nível basal de enzimas de metabolização, estes resultados experimentais puderam indicar se estes fármacos podem exercer ação genotóxica direta relacionada com mutação e/ou recombinação somática (Andrade e Lehmann, 2003). Na análise estatística foi feita uma comparação entre as séries tratadas e o controle negativo, observando-se, nas diferentes concentrações dos fármacos, a diferença da ocorrência de manchas de pêlos mutantes. Estas comparações estatísticas foram realizadas utilizando-se o teste binomial condicional, seguindo um procedimento de múltiplas escolhas de acordo com Frei and Würigler (1995).

## **Resultados**

Os resultados mostraram a existência de efeitos genotóxicos do AZT sozinho e em todas as combinações utilizadas. Entretanto a atividade genotóxica dos tratamentos com combinados AZT+ddl e AZT+3TC foram maiores do que o potencial do AZT individualmente. Provavelmente, esses incrementos ocorreram devido à disputa entre os análogos ddl e 3TC com os nucleotídeos endógenos guanidina e citidina, respectivamente. Por outro lado, mesmo desmonstrando aumento da frequência de indução de manchas mutantes com relação ao AZT individualmente, a indução de atividade genotóxica da combinação AZT+d4T foi bem menor que os índices apresentados nas outras combinações. Como o AZT e o d4T são ambos derivados da timidina, estes podem estar competindo entre si e ainda com a timidina endógena durante a construção da cadeia de DNA, reduzindo a possibilidade de que sejam utilizados. A recombinação mitótica foi responsável por mais de 70% da toxicidade genética induzida em todos os tratamentos testados. Os tratamentos combinados AZT+ ddl e AZT+3TC foram os mais recombinogênicos, atingindo acima de 90% de recombinação em todas as concentrações testadas.

## **Discussão**

Para interagirem com o sítio catalítico da enzima transcriptase reversa os NRTIs precisam ser fosforilados para as formas difosfato e trifosfato. Desequilíbrios no pool de nucleotídeos podem prejudicar a fidelidade da

replicação do DNA, levando a uma variedade de tipos de danos genotóxicos (Kunz *et al.*, 1994) e ainda alterar as taxas de erro de substituição de uma forma imprevisível. As consequências incluem a indução de mutagênese, a estimulação da recombinação, anormalidades cromossômicas, quebra de DNA, bem como morte celular (Kunz *et al.*, 1994). Um fator importante, que justifica a necessidade de estudos mais aprofundados sobre os efeitos da NRTIs, é que essas drogas podem ser incorporadas ao DNA nuclear e mitocondrial da célula hospedeira, e induzir danos persistentes se não forem reparados com sucesso (Meng *et al.*, 2007).

## **Conclusões**

Os resultados obtidos com o teste SMART refletem o potencial de indução de mutações e/ ou recombinação mitótica em *Drosophila melanogaster* causadas pela combinação de NRTIs, sendo a potência genotóxica maior no combinado AZT+3TC seguido por AZT+ddI, AZT+d4T e AZT respectivamente. O conhecimento dos efeitos destes combinados sobre o genoma celular é de grande importância, já que a persistência das lesões não detectadas por mecanismos de reparo do DNA podem levar a instabilidade genômica de alto risco para a indução do câncer.

## **Referências Bibliográficas**

- Andrade, H.H.R., Reguly, M.L., Lehmann, M. (2003) Wing Somatic Mutation and Recombination Test. In: Ribeiro, L.R., Salvadori, D.M.F., Marques, E.K.. Mutagênese Ambiental, Canoas: ULBRA, pp. 281-307.
- Campesato, V.R., Graf, U., Reguly, M.L., Andrade, H.H.R., (1997) Recombinagenic activity of integerrimine, a pyrrolizidine alkaloid from *Senecio brasiliensis*, in Somatic Cells of *Drosophila melanogaster*. *Environ. Mol. Mutagen.*, **29**, 91-97.
- Carter, M.M., Torres, S.M., Cook, D.L. Jr., et al. (2007) Relative mutagenic potencies of several nucleoside analogs, alone or in drug pairs, at the HPRT and TK loci of human TK6 lymphoblastoid cells. *Environ. Mol. Mutagen.*, **48**, 239-247.

- Frei, H., Würigler, F. E. (1995) Optimal experimental design and sample size for the statistical evaluation of data from somatic mutation and recombination tests (SMART) in *Drosophila*. *Mutat. Res.*, **334**, 247–258.
- Graf, U., Würigler, F. E., Katz, A. J. et al. (1984) Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environ. Mutagen.*, **6**, 153-187.
- Graf, U. & Van Schaik, N.; 1992. Improved bioactivation cross for the wing somatic and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Mut. Res.*, **271**:59-67.
- Kunz, B. A., Kohalmi, S. E., Kunkel, T. A. et al. (1994) Deoxyribonucleoside triphosphate levels: a critical factor in the maintenance of genetic stability. *Mutat. Res.*, **318**, 1-64.
- Meng, Q., Olivero, O. A., Fasco, M.J. et al. (2007) Plasma and cellular markers of AZT metabolism as indicators of DNA damage in cord blood mononuclear cells from infants receiving reparatum NRTIs. *Environ. Mol. Mutagen.*, **48**, 307-321.
- Olivero, O. A. (2007) Mechanisms of genotoxicity of nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *Environ. Mol. Mutagen.*, **48**, 215-223.
- Torres, S. M., Walker, D. M., Carter, M. M. et al. (2007) Mutagenicity of zidovudine, lamivudine, and abacavir following In vitro exposure of human lymphoblastoid cells or in utero exposure of CD-1 mice to single agents or drug combinations. *Environ. Mol. Mutagen.*, **48**, 224–238.