ANÁLISE DO POTENCIAL GENOTÓXICO DA LAMIVUDINA EM CÉLULAS SOMÁTICAS DE *Drosophila melanogaster.*

FRANCHI, Leonardo Pereira[1]; **OLIVEIRA**, Igor Gomes; **CUNHA**, Kênya Silva[2].

Palavras-chave: Lamivudina, Mutagênese, Teste SMART.

1.INTRODUÇÃO

A Lamivudina é um antimetabólito análogo de base, utilizada no tratamento da AIDS, sendo reconhecida e incorporada como intermediário metabólico normal, causando a inibição de rotas bioquímicas críticas - especialmente no que se refere ao bloqueio do metabolismo dos ácidos nucléicos. O mecanismo de ação deste fármaco se caracteriza pela metabolização intracelular formando um metabólito ativo trifosfatado (3TC-TP) - análogo da citidina-TP - que inibe a ação da transcriptase reversa (RT) na incorporação de nucleotídeos ao DNA, atuando, dessa forma, como terminador de cadeia, comprometendo a elongação do DNA viral. Estudos realizados no Laboratório de Mutagênese da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, com os quimioterápicos Ara-C e DAC, utilizados no tratamento do câncer, apontam para uma alta atividade tóxico-genética de medicamentos que atuam como análogos de base (Cunha *et al*., 2002). O presente estudo teve como objetivo a identificação dos tipos de eventos tóxico-genéticos induzidos pela Lamivudina e a determinação do seu potencial recombinogênico e/ou mutagênico. Para tanto foi utilizado o Teste para Detecção de Mutação e Recombinação em Células Somáticas de *Drosophila melanogaster* - SMART (Graf *et al*., 1984).

2. METODOLOGIA

2.1 Agente químico

Foi utilizado o análogo de base Lamivudina (2-desoxi, 3-tiacitidina), gentilmente cedido pela Indústria Química de Goiás (IQUEGO). As diferentes soluções de tratamento foram preparadas à hora do experimento, por dissolução em água destilada, sendo o diluente utilizado como controle negativo.

2.2 Teste de Mutação e Recombinação Somática (SMART)

O teste SMART em células de asas de *Drosophila melanogaster* foi desenvolvido por Graf *et al*. (1984). Este teste detecta a perda da heterozigose, que pode ocorrer espontaneamente ou ser induzida por agentes físicos e químicos, em células primordiais dos discos imaginais de asas, no período de larva. A análise das possíveis lesões induzidas é feita pela observação de grupos celulares (manchas) com fenótipo marcador específico (*mwh* e/ou *flr*^{3}), que se manifesta visualmente na forma de tricomas mutantes. Enquanto o número de manchas mutantes fornece resultados quantitativos sobre os danos induzidos, os tipos de manchas dão informações sobre a natureza da lesão que as originou. Os diferentes tipos de manchas são designados como simples - quando apenas um dos marcadores se expressa, *mwh* ou *flr*^{3} - ou como gêmeas quando - quando tanto pêlos múltiplos (*mwh*), como pêlos com a base alargada (*flr*^{3}) estão presentes dentro de uma mesma mancha. As manchas simples indicam a ocorrência de mutação gênica e/ou cromossômica, bem como eventos recombinogênicos. Por outro lado, as gêmeas são originadas exclusivamente por recombinação somática. Os experimentos utilizaram o cruzamento padrão (ST), o qual é realizado usando-se fêmeas virgens da linhagem *flr*^{3} e machos *mwh*. Neste caso, analisa-se o efeito de genotoxinas de ação direta justificado pela presença, nessas linhagens, de níveis basais de enzimas

de metabolização do tipo CYP6A2. Tal cruzamento produz dois tipos de progênie: (i) indivíduos trans-heterozigotos para os genes marcadores, com constituição genotípica *mwh* + / + *flr*^{3}; e (ii) indivíduos heterozigotos balanceados, constituídos por *mwh* + / + *TM3 Bd*^{S}.

2.3 Tratamento Crônico e Avaliação Genotóxica

Larvas de terceiro estágio, resultantes do cruzamento ST, foram coletadas e colocadas em frascos de 1/36L (100 larvas por tubo) contendo meio sintético onde foram acrescentados 3mL das soluções de tratamento (controle negativo - 0,15625 - 0,3125 - 0,625 - 1,125 - 2,5 – 5 mg/mL). As larvas permaneceram em tratamento por aproximadamente 48 horas, isto é, até atingirem o estágio de pupa. Após a eclosão foram montadas lâminas contendo as asas dos adultos. As lâminas foram, então, analisadas em microscópio com aumento de 400x para a detecção da ocorrência de manchas mutantes simples ou manchas gêmeas. A avaliação dos efeitos genotóxicos induzidos pela Lamivudina foi feita através da comparação das freqüências de clones mutantes por mosca das séries tratadas com o controle negativo (água destilada). O diagnóstico estatístico foi obtido através do teste de qui-quadrado para proporções, seguindo o procedimento de múltiplas decisões de acordo com Frei e Würgler (1988).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir do tratamento das larvas de *Drosophila melanogaster*, oriundas do cruzamento padrão (ST), com diferentes concentrações de Lamivudina elaborou-se uma curva de sobrevivência, demonstrada no Gráfico 1. Observando este Gráfico podemos inferir que houve uma resposta dose-dependente, onde o fármaco agiu em suas maiores concentrações como um agente citotóxico aumentando o índice de mortalidade. Os resultados referentes à indução de alterações genéticas induzidas nas células dos discos imaginais de larvas de terceiro estágio – trans-heterozigotas é representada no Gráfico 2. A ocorrência de alterações no material genético destas células levou à formação de manchas contendo clones de células com os fenótipos pêlos múltiplos e/ou pêlos com a base alargada – que refletem a expressão dos genes marcadores recessivos *mwh* e/ou *flr*^{3}, respectivamente. O Gráfico 3 apresenta os resultados obtidos através da análise dos tricomas presentes nas asas dos indivíduos heterozigotos para o cromossomo *TM3.* Os dados obtidos para a Lamivudina demonstram efeitos positivos para o total de manchas em todas as concentrações utilizadas. Considerando-se que a análise dos indivíduos heterozigotos para o cromossomo *TM3* revela somente a ocorrência de mutação, foram realizadas comparações destes resultados com os dados obtidos nos indivíduos trans-heterozigotos, com o objetivo de quantificar a porcentagem individual de eventos mutagênicos e eventos recombinogênicos no total de eventos genotóxicos ocorridos para a Lamivudina (Gráfico 4). A Lamivudina demonstrou freqüência de indução de recombinação de 48% e, conseqüentemente, maior freqüência de eventos mutacionais induzidos (52%).

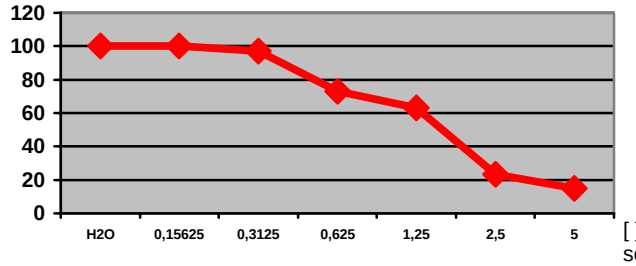

Gráfico 1. Curva de sobrevivência das moscas tratadas com diferentes soluções de 3TC (mg/mL).

Resultados obtidos com diagnóstico pelo teste binomial condicional (Kastembaun e Bowman):

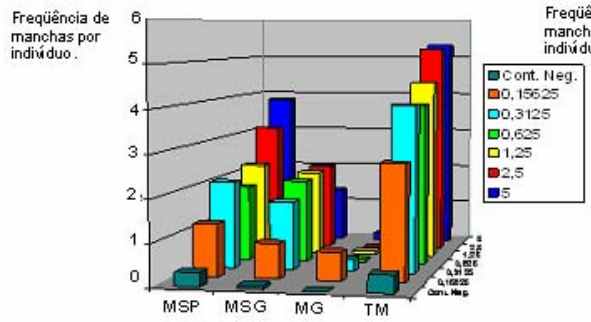

Gráfico 2. Efeito mutagênico e/ou recombinogênico de 3TC em células somáticas de larvas trans-heterozigotas de terceiro estágio provenientes do cruzamento padrão.

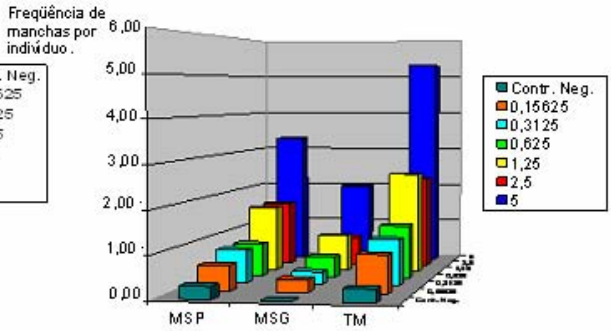

Gráfico 3. Ação mutagênica de 3TC em células somáticas de larvas heterozigotas para o cromossomo TM3 provenientes do cruzamento padrão

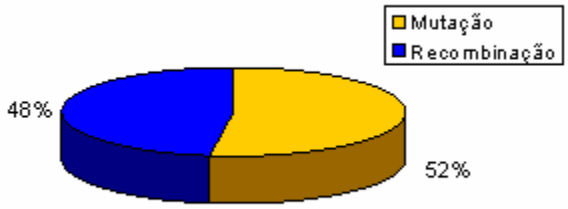

Gráfico 4. Porcentagem de contribuição dos eventos mutagênicos e recombinogênicos para a genotoxicidade total induzida pela Lamivudina.

4. CONCLUSÃO

Para a Lamivudina os resultados positivos foram progressivamente maiores com o aumento da dose utilizada, refletindo um efeito dose-resposta. O conjunto destes resultados demonstra a possível ação direta deste composto no que se refere à indução de mutações e/ou recombinações somáticas. O conjunto destas observações sugere que, o agente antimetabólito estudado apresenta ação tóxico-genética relacionada com a indução de mutação gênica e/ou cromossômica e recombinação, fatores estes intimamente relacionados com a perda da heterozigose de genes envolvidos no processo neoplásico.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CUNHA, K.S., REGULY, M. L., GRAF, U. & ANDRADE, H. H. R. Somatic recombination: a major genotoxic effect of two pyrimidine antimetabolitic chemotherapeutic drugs in Drosophila melanogaster. **Mutation Research**, 514:95-103, 2002.

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

GRAF, U.; WURGLER, F. E.; KATZ, A. J.; FREI, H.; HALL, C. B. & KALE, P. G. Somatic Mutation and Recombination Test in Drosophila melanogaster. **Enviromental Mutagenesis**. V. 6, p.153- 188, 1984.

[1] Bolsista de iniciação científica. ICB-II - Laboratório de Genética Toxicológica, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, UFG, leonardofranchi@yahoo.com.br.

[2] Orientador/Instituto de Ciências Biológicas/UFG, kenya@icb.ufg.br.