

ANÁLISE TÓXICO-GENÉTICA COMPARATIVA DOS ANTI-RETROVIRAIS ZIDOVUDINA E DIDANOSINA EM CÉLULAS SOMÁTICAS DE *Drosophila melanogaster*

Nilza Nascimento Guimarães¹ e Kênya Silva Cunha². Laboratório de Genética Toxicológica, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, ICB, Universidade Federal de Goiás (UFG), Goiânia – GO.
nilzang2@hotmail.com

Palavras-chave: Zidovudina, didanosina, Teste SMART, *Drosophila melanogaster*.

INTRODUÇÃO

O uso dos inibidores nucleosídeos da transcriptase reversa (NRTIs) combinados em potentes coquetéis, em terapias anti-virais altamente ativas, diminuiu sensivelmente a morbidade e mortalidade dos pacientes infectados pelo HIV desde o início dos anos 1990. Estes coquetéis apresentaram uma redução permanente da viremia no plasma, com aumento da contagem de linfócitos CD4, indicando ser clinicamente benéficos (Peter & Gambertoglio, 1998; Duan *et al.*, 2001; Turner *et al.*, 2004).

A zidovudina (AZT) e a didanosina (ddI), dois NRTIs, são análogos de base que pertencem à categoria dos medicamentos anti-virais sistêmicos (Farmacopéia USP-DI/98) e atuam como antimetabólitos, causando a inibição de rotas bioquímicas relacionadas com a síntese da cadeia de DNA viral. O mecanismo de ação do AZT e da ddI é semelhante ao dos demais análogos de base. Estas drogas substituem ou imitam bases nitrogenadas que compõem o genoma viral. Durante a atividade da RT, elas atuam como inibidores enzimáticos competitivos, ligando-se ao domínio palma, localizado no sítio ativo da RT, fazendo uma inibição alostérica da enzima, impedindo sua ação no alongamento da cadeia de DNA do HIV, funcionando como terminadores da cadeia (Peçanha *et al.*, 2002; De Clercq, 2004).

Este mecanismo de ação induz lesões que podem levar à morte da célula infectada pelo vírus. Além disso, tem sido demonstrado que estes análogos de base possuem potencial carcinogênico e indutor de anormalidades cromossômicas estruturais sobre as células expostas a eles. Aliados a estes eventos a recombinação mitótica destaca-se como um parâmetro significativo que pode contribuir para o surgimento de neoplasias. Com o intuito de avaliar o potencial genotóxico destes NRTIs, utilizamos o Teste Para Detecção de Mutação e Recombinação em Células Somáticas de *Drosophila melanogaster* (SMART), que avalia parâmetros relacionados com a indução de mutação gênica, mutação cromossômica e/ou recombinação mitótica, eventos que podem contribuir significativamente para o surgimento de neoplasias.

MATERIAL E MÉTODO

SOMATIC MUTATION AND RECOMBINATION TEST (SMART):

Neste trabalho, larvas de terceiro estágio, obtidas a partir do cruzamento de fêmeas virgens da linhagem *flr³* com machos *mwh*, foram tratadas com AZT e ddl, por um período de 48 horas, até atingirem o estágio de pupa. As larvas foram colocadas em 5 tubos, contendo AZT diluído em água, nas concentrações 3,125, 6,25, 12,5, 25 e 50 mg.mL⁻¹ e 5 tubos contendo ddl diluída em solução a 5% tween 80 + 5% etanol absoluto, nas concentrações de 1,875, 3,75, 7,5, 15 e 30 mg.mL⁻¹, até transformarem-se em adultos. Os respectivos solventes foram utilizados como controles negativos. As asas dos indivíduos trans-heterozigotos foram retiradas para a análise dos tricomas presentes em ambas as faces, com o intuito de observar a presença ou não de pêlos mutantes. O fenótipo mutante indica a ocorrência de mutações e/ou recombinações mitóticas. A análise estatística foi feita comparando os resultados das diferentes concentrações com o controle negativo (água destilada). O diagnóstico estatístico foi obtido através do teste binomial condicional, seguindo o procedimento de múltiplas decisões de acordo com Frei e Würigler (1988).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise microscópica dos pêlos mutantes, presentes nas asas dos adultos trans-heterozigotos, revelou que o AZT e a ddl foram capazes de induzir eventos de mutação e/ou recombinação nas doses utilizadas. A tabela 1 mostra uma análise da freqüência padronizada dos clones *mwh*, em áreas de 10^5 células, demonstrando a ação genotóxica total induzida por mg.mL^{-1} dos fármacos, nos indivíduos trans-heterozigotos e heterozigotos para o cromossomo *TM3*. Comparando-se as freqüências padronizadas do AZT e ddl apresentadas na análise estatística, pode-se visualizar que a ddl tem um potencial genotóxico 4,25 vezes maior que o AZT (0,34 clones na ddl para 0,08 clones induzidos no AZT). Por outro lado, nos indivíduos heterozigotos para o cromossomo *TM3*, a ddl tem uma atividade indutora de mutações de 0,07 ao passo que o AZT apresentou indução de 0,01 clone mutante.

Quando se compara as freqüências padronizadas obtidas nos indivíduos trans-heterozigotos e heterozigotos para o cromossomo *TM3* pode-se obter a contribuição de eventos recombinogênicos, considerando a genotoxicidade total induzida pelos anti-retrovirais. Os valores de porcentagem de recombinação apresentados nos experimentos, permitem a diagnose do AZT e da ddl como agentes efetivamente indutores de eventos do tipo recombinação mitótica, sendo que o AZT mostrou potencial recombinogênico pouco maior que a ddl (89,72% para o AZT e 79,51% para a ddl). Ambos induziram mutações em menor proporção (AZT 10,28% e ddl 20,49%) em células somáticas de *D. melanogaster*.

TABELA 3					
Freqüência padronizada de indução de clones <i>mwh</i> por mg / mL de concentração de exposição e a prevalência de eventos recombinacionais ^a					
	Trans-heterozigotos <i>mwh/flr</i> ³		Heterozigotos para os marcadores <i>mwh/TM3</i>		Recombinação (%)
	Freqüência padronizada ^b (clones <i>mwh</i> por 10^5 céls. por mg/ mL)	Freqüência padronizada por 10^5 céls. corrigida p/ tam. dos clones ^d	Freqüência padronizada ^b (clones <i>mwh</i> por 10^5 céls. por mg/ mL)	Freqüência padronizada por 10^5 céls. corrigida p/ tam. dos clones ^d	Sem correção por tamanho de clone
	(f_t)	($f'_t = 2^{it-2} \times f_t$)	(f^h)	($f'_h = 2^{ih-2} \times f_h$)	($1 - f_h/f_t$)x100
ddl	0,34	0,45	0,07	0,04	79,51
AZT	0,08	0,13	0,01	0,01	89,72

^aTodos os valores são corrigidos pelo controle. As freqüências nas moscas heterozigotas para os marcadores *mwh/flr3* são calculadas com e sem correção para o tamanho dos clones; por conseguinte, estimativas um pouco diferentes são obtidas para as contribuições relativas de recombinação para os totais de clones induzidos.

^bAs freqüências de clones por indivíduo, divididas pelo número de células examinadas por indivíduo (48 800) dão uma estimativa das freqüências por célula e por divisão celular em experimentos de exposição crônica (Frei e Würgler, 1988).

^cA média geométrica e as dcorreções foram calculadas de acordo com Frei *et al.* (1992).

CONCLUSÃO

Através da aplicação do teste SMART, com análise microscópica dos fenótipos mutantes dos pêlos presentes nas asas dos adultos trans-heterozigotos e do diagnóstico estatístico obtido através do teste binomial condicional, conclui-se que o AZT e a ddl possuem efeitos mutagênicos e/ou recombinogênicos em células somáticas de *Drosophila melanogaster*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

DE CLERCQ, E., 2004. Antiviral drugs in current clinical use. **Journal of Clinical Virology**, 30: 115-133.

DUAN, C., POTICHA, D., STOECKLI, T. C., PETROPOULOS, C. J., WHITCOMB, J. M., McHENRY, C. S., KURITZKES, D. R., 2001. Inhibition of purified recombinant reverse transcriptase from wild-type and Zidovudine-resistant clinical isolates of human immunodeficiency virus type 1 by Zidovudine, Stavudine, and Lamivudine triphosphates. **The Journal of Infection Diseases**, 184: 1336-1340.

Farmacopéia USP/DI - 98

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

FREI, H. & WÜRGLER, F. E., 1995. Optimal experimental design and sample size for the statistical evaluation of data from somatic mutation and recombination testes (SMART) in *Drosophila*. **Mutation Research**, 334: 247-258.

GARCIA-BELLIDO, A. & DAPENA, J., 1974. Introduction, deletion and characterization of cell differentiation mutants in *Drosophila melanogaster*. **Molecular And General Genetics**, 128:117-130.

PEÇANHA, E. P., ANTUNES, O. A., TANURI, A., 2002. Estratégias farmacológicas para a terapia anti-AIDS. **Química Nova**, 25(6B):1108-1116.

PETER, K., GAMBERTOGLIO, J. G., 1998. Intracellular phosphorylation of zidovudine (ZVD) and other nucleoside reverse transcriptase inhibitors (RTI) used for human immunodeficiency virus (HIV) infection. **Pharmaceutical Research**, 15(6):819-825.

TURNER, D., BRENNER, B., WAINBERG, M. A., 2004. Relationships among various nucleoside resistance-conferring mutation in the reverse transcriptase of HIV-1. **Journal of Antiviral Chemotherapy**, 53:53-57.