

Avaliação do potencial mutagênico e recombinogênico de fármacos através do teste SMART em *Drosophila melanogaster*: Revisão

Natacha Allgayerⁱ

Registro DOI: <http://dx.doi.org/10.22280/revintervol11ed2.340>

Resumo

Fármacos são substâncias essenciais para a sobrevivência humana, já que curam doenças, amenizam dores, mantêm o equilíbrio em determinadas disfunções e permitem a realização de cirurgias. Porém, apresentam muitos efeitos colaterais, entre os quais os genotóxicos são um dos mais preocupantes, já que podem ser o princípio de um câncer futuro. Para avaliar esses eventos genotóxicos existem alguns estudos, *in vivo* e *in vitro*. Entre os estudos *in vivo*, o teste de detecção de mutação e recombinação somática (SMART) em asas de *Drosophila melanogaster* demonstra muitas vantagens como a detecção de diferentes tipos de danos genéticos, presença de genes homólogos a humanos e a não utilização de mamíferos. Portanto, essa revisão busca exemplificar o teste SMART, assim como, mostrar alguns estudos que avaliaram fármacos utilizados por humanos no tratamento de determinadas patologias, através desse teste.

Palavras-chave: Fármacos. Genotoxicidade. Teste SMART.

Evaluation of the mutagenic and recombinogenic potential of drugs through the SMART test in *Drosophila melanogaster*: review

Abstract

Drugs are essential substances for human survival, as they cure diseases, ease pain, maintain balance in certain dysfunctions and allow the performance of surgeries. However, they have many side effects, among which genotoxics are one of the most worrying, since they may be the beginning of a future cancer. To evaluate these genotoxic events there are some studies, *in vivo* and *in vitro*. Among *in vivo* studies, the mutation detection and somatic recombination (SMART) test on *Drosophila melanogaster* wings shows many advantages such as the detection of different types of genetic damage, the presence of homologous genes in humans and the non-use of mammals. Therefore, this review seeks to exemplify the SMART test, as well as to show some studies that evaluated drugs used by humans in the treatment of certain pathologies through this test.

Keywords: Drugs. Genotoxicity. SMART Test.

Recebido em 30/07/2017 Aceito em 03/05/2018

INTRODUÇÃO

Os fármacos são substâncias químicas, estruturalmente definidas, utilizadas para o fornecimento de elementos essenciais ao organismo, na prevenção e no tratamento de doenças, infecções ou de situações de desconforto e na correção de funções orgânicas desajustadas (LARINI, 2008). É difícil imaginar nossa civilização privada dessas notórias e benéficas substâncias. Por meio de seu uso, muitas doenças que trouxeram sofrimento ao longo de nossa história, como varíola ou a poliomielite, estão agora extintas. Doenças como diabetes, depressão ou hipertensão são controladas de modo eficaz por medicamentos modernos. Os procedimentos cirúrgicos de hoje seriam impossíveis sem os benefícios de anestésicos, analgésicos, antibióticos, transfusões sanguíneas e fluidos intravenosos. Mas, muitos fármacos promissores foram abandonados devido a seus potenciais de causar efeitos colaterais excessivos ou prejudiciais, mesmo após sua comercialização, como os efeitos tóxicos. (ALLEN JR. et al., 2013).

Os mecanismos de ação tóxica se iniciam, na maioria das vezes, por acúmulo de metabólitos dos fármacos em determinados tecidos. Estes metabólitos podem produzir peroxidação lipídica, geração de radicais tóxicos de oxigênio, depleção de glutatona e modificação de grupos sulfidrílicos, além de interagirem diretamente com lipídios, proteínas, carboidratos e com o DNA da célula atingida (LUIZ, MEZZARROBA, 2008). A formação de complexos de DNA (metabólitos-DNA) sem reparo ou de reparo inadequado é frequentemente indutora de danos genéticos, muitas vezes mutagênicos, que podem levar ao surgimento de um câncer (WU et al., 2011). Estudos que verificam lesões a essa molécula, verificando a genotoxicidade dos fármacos que utilizamos, são de extrema importância, para o conhecimento de possíveis danos futuros a saúde, assim como, de possíveis alterações químicas que poderiam extinguir ou reduzir a genotoxicidade dessas substâncias.

Entre os estudos de toxicidade, os *in vivo* oferecem algumas vantagens sobre testes *in vitro*, pois conseguem mimetizar completamente o que ocorre em um organismo. Assim, para evitar o uso de mamíferos, a *Drosophila* aparece como uma boa alternativa de organismo a ser utilizado na avaliação dos fatores de risco à saúde, visto que cerca de 60% dos genes associados a doenças humanas possuem homólogos em *Drosophila* (KOH et al., 2006; MARSH E THOMPSON, 2006; MARCOS E CARMONA, 2013).

O teste de detecção de mutação e recombinação em células somáticas da *Drosophila* (SMART), de asas, é uma das ferramentas atualmente empregadas para estudar os mecanismos

envolvidos na formação de danos ao DNA e na avaliação de substâncias, como os fármacos, ou exposições suspeitas de serem genotóxicas. Como qualquer teste *in vivo*, em *Drosophila* também ocorrem os processos de absorção, distribuição e metabolismo e, neste aspecto, é importante enfatizar que o sistema de ativação metabólica deste organismo é semelhante ao encontrado em mamíferos (ZIJLSTRA et al., 1987).

Essa revisão busca exemplificar o teste SMART em asas de *Drosophila melanogaster*, assim como, mostrar alguns estudos que avaliaram fármacos utilizados por humanos no tratamento de determinadas patologias, através desse teste.

TESTE SMART

O teste SMART de asa foi desenvolvido para detectar a indução de danos genéticos de uma forma rápida e de baixo custo. O teste se baseia no fato de que durante os estágios embrionários da larva, as células dos discos imaginais se proliferam mitoticamente e muitos eventos genéticos, como mutação gênica, deleções, recombinação somática e não-disjunção podem ser detectados nas asas das moscas adultas. A ocorrência de alterações genéticas em uma célula dos discos imaginais durante a proliferação mitótica, irá formar um clone de células mutantes que expressam fenótipos regulados por marcadores genéticos específicos. Estes marcadores são genes mutantes que alteram o número de cerdas (*mwh*) e a forma das cerdas (*flr³*) nas asas, e desta forma permitem a observação de clones de células, vistas como manchas, que expressam fenótipos diferentes do padrão normal das cerdas (GRAF et al., 1989; ANDRADE et al., 2004).

Os diferentes tipos de manchas observadas por microscopia óptica, com um aumento de 400 vezes, são designadas como simples *mwh* ou *flr³*, quando apenas um dos marcadores se expressa, ou como manchas gêmeas, quando ambos os fenótipos mutantes, cerdas múltiplas (*mwh*), e base alargada (*flr³*) (Figura 1) estão presentes dentro de uma mesma mancha. Manchas simples com uma ou duas células mutantes são designadas como pequenas e as demais como grandes. São considerados clones independentes aqueles separados por 3 ou mais fileiras de tricomas normais (GRAF et al., 1984).

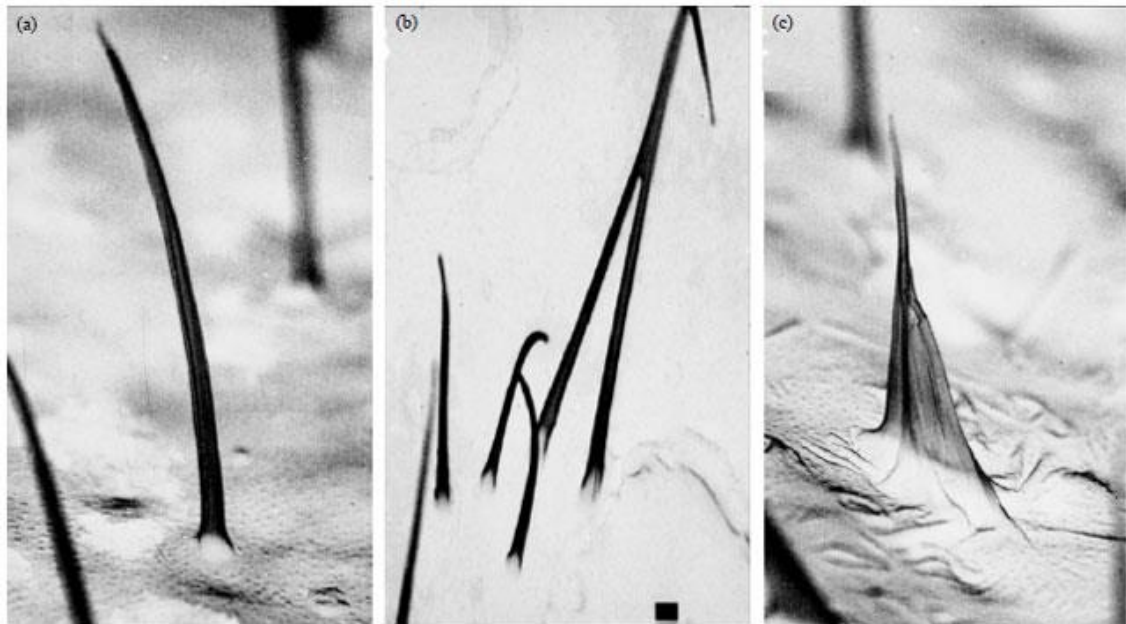


Figura 1: Microscopia eletrônica dos fenótipos presentes nas asas de *D. melanogaster*, (a): cerdas normais, (b) cerdas múltiplas (*mwh*) e (c): cerdas com a base alargada (*flr³*) (ZAFRED et al., 2016).

Entre as características de destaque deste bioensaio está o fato de possibilitar a detecção de diferentes tipos de danos genéticos e, principalmente, de permitir a quantificação dos eventos de origem recombinacional em relação aos eventos mutacionais (GRAF et al., 1984; FREI E WÜRGLER, 1988). Adicionalmente, podem ser utilizadas linhagens de *D. melanogaster* com diferentes níveis de enzimas de metabolização do tipo citocromo P450, possibilitando a investigação de compostos de ação indireta, que são bioativados após a transformação metabólica (FRÖLICH E WÜRGLER, 1989).

São empregadas, usualmente, três linhagens de *D. melanogaster*. Tais linhagens são designadas como *flr³*, *ORR;flr³* e *mwh* e apresentam, respectivamente, as seguintes constituições genéticas:

- *flr³* - *flr³/In(3LR)TM3,ri p^p sep l(3)89Aa bx^{34e} e Bd^S*
- **ORR; *flr³*** – *ORR;flr³/In (3LR)TM3, rⁱ p^p sep l(3)89Aabx^{34e} e Bd^S*
- *mwh* - *mwh/mwh*

E podem ser utilizados dois tipos de cruzamentos, o cruzamento padrão no qual fêmeas virgens *flr³* são cruzadas com machos *mwh*, originando larvas portadoras de nível basal de

atividade metabólica dependente de citocromo P450. E o cruzamento aprimorado, que se baseia no cruzamento de fêmeas virgens $ORR:flr^3$ com machos mwh . As fêmeas $ORR:flr^3$ são portadoras de cromossomos 1 e 2 provenientes da linhagem *Oregon* (R) resistente ao dicloro-difenil-tricloroetano (DDT) (FRÖLLICH E WÜRGLER, 1989). Um gene principal (R), presente no cromossomo 2, juntamente com outros genes existentes no cromossomo 1, confere a esta linhagem alto nível constitutivo de citocromo P450 (HÄLLSTRON E BLANCK, 1985).

Esses dois cruzamentos geram indivíduos trans-heterozigotos para os marcadores recessivos mwh , flr^3 e heterozigotos para o cromossomo *TM3*. A análise microscópica das asas dos adultos heterozigotos para o cromossomo *TM3* revela a presença exclusiva de manchas simples que expressam o fenótipo cerdas múltiplas - uma vez que estes imagos são homozigotos para o gene selvagem flr^{3+} .

Adicionalmente, o cromossomo *TM3* caracteriza-se por possuir uma série de inversões - que cobrem aproximadamente 90% da sua extensão - de tal forma que as células que sofrem recombinação mitótica apresentam configurações cariotípicas que são inviáveis. Assim, as células mutantes detectadas nestes indivíduos são o resultado de mutações gênicas e/ou aberrações cromossômicas, o que permite quantificar a real contribuição da recombinação para a genotoxicidade de substâncias a serem estudadas.

O tipo de mancha mutante observada nas asas dos adultos trans-heterozigotos permite a caracterização de eventos genotóxicos distintos. Desta forma, manchas simples - com os fenótipos de cerdas múltiplas ou cerdas com a base alargada - podem originar-se por:

- (i) alteração no conteúdo informacional dos genes selvagens flr^{3+} ou $mwh+$;
- (ii) deleção de um fragmento cromossômico contendo os marcadores selvagens mwh^+ ou flr^{3+} ;
- (iii) não-disjunção.

Além disso, a ocorrência de recombinação simples entre os locos mwh e flr^3 leva ao aparecimento de manchas simples com o fenótipo cerdas múltiplas, enquanto que uma recombinação simples entre flr^3 e o centrômero, seguida de uma recombinação simples entre flr^3 e mwh origina cerdas com a base alargada.

Portanto, as manchas simples podem originar-se tanto por eventos mutacionais - incluindo mutações pontuais e aberrações cromossômicas - como também por conversão ou recombinação mitótica. Já as manchas gêmeas, que expressam concomitantemente os fenótipos flr^3 e mwh , são produtos exclusivos de eventos recombinacionais - envolvendo a ocorrência de

uma recombinação simples entre flr^3 e o centrômero, com posterior segregação de um cromossomo recombinado e um parental (GRAF et al., 1989).

Na estatística predominantemente é utilizado o teste binomial condicional de Kastebaum e Bowman (1970), seguindo o procedimento de decisões múltiplas de acordo com Frei e Würigler (1988).

FARMÁCOS

Os fármacos escolhidos, em sua grande maioria, para estudos com o teste SMART de asas de *Drosophila*, são utilizados no tratamento de doenças atualmente frequentes em humanos como diabetes, infecção por HIV e câncer. Na tabela abaixo (tabela 1) consta alguns estudos, com os dados ofertados pelos mesmos, focando na questão indução de danos genéticos evidenciados pelo teste, mutação e recombinação somática.

Fármaco	Classe/Tratamento	Cruzamentos	Indutor de danos genéticos	Mutação e Recombinação - predominante	Outras Informações	Referência
Anfotericina B	antifúngico	padrão e aprimorado	sim	recombinação somática		SATURNINO et al., 2017
Fenitoína Sódica	antiepilético	padrão	sim		altamente genotóxico	YÜKSEL et al., 2010
Pregabalina	antiepilético	padrão	não			YÜKSEL et al., 2010
Gabapentina	antiepilético	padrão	sim			YÜKSEL et al., 2010
Metformina	antidiabético	padrão e aprimorado	não			OLIVEIRA et al., 2017
Vimblastina	antineoplásico	padrão	sim	alta atividade recombinogênica aprox. 88%		TIBURI et al., 2012
Vincristina	antineoplásico	padrão	sim	atividade recombinogênica aprox. 58%	menor toxicidade	TIBURI et al., 2012
Vinorelbina	antineoplásico	padrão	sim	baixa atividade recombinogênica aprox. 46%	altamente tóxica	TIBURI et al., 2012
Orlistate	tratamento obesidade	padrão e aprimorado	sim	atividade recombinogênica aprox. 70%	baixa genotoxicidade	ORSOLIN et al., 2012
Daurorubicina	antineoplásico	padrão	sim	alta atividade recombinogênica aprox. 90%		LEHMANN et al., 2004
Idarrubicina	antineoplásico	padrão	sim	alta atividade recombinogênica aprox. 86%		LEHMANN et al., 2004
Aclarrubicina	antineoplásico	padrão	sim	atividade recombinogênica aprox. 62%	alta toxicidade	LEHMANN et al., 2004
Efavirenz	tratamento HIV	padrão e aprimorado	não		tóxico somente nas altas concentrações	DE MORAES FILHO et al., 2017
Tenofovir disoproxil fumarate	tratamento HIV	padrão e aprimorado	não			DE MORAES FILHO et al., 2017
Efavirenz + Zidovudina + Lamivudina	tratamento HIV	padrão e aprimorado	sim	prevalência de eventos recombinogênicos		DE MORAES FILHO et al., 2017
Tenofovir disoproxil fumarate + Lamivudina	tratamento HIV	padrão e aprimorado	sim	prevalência de eventos recombinogênicos		DE MORAES FILHO et al., 2017
Lamivudina	tratamento HIV	padrão	sim	alta atividade recombinogênica aprox. 86%	altamente genotóxico	FRANCHI et al., 2009
Estavudina	tratamento HIV	padrão	sim	atividade recombinogênica aprox. 76%	baixa genotoxicidade	FRANCHI et al., 2009
Zidovudina	tratamento HIV	padrão	sim	alta atividade recombinogênica aprox. 85%	alta genotoxicidade	GUIMARÃES et al., 2008
Didanosina	tratamento HIV	padrão	sim	somente atividade recombinogênica, 100%		GUIMARÃES et al., 2008

Tabela 1. Estudos realizados com fármacos através do teste SMART em *Drosophila melanogaster*. Observação: Quando o parâmetro não está preenchido, não consta a informação no estudo. Aprox. = aproximadamente.

Através da tabela 1, conclui-se que o evento predominante indutor de danos genéticos, causado pela maioria dos fármacos aqui relatados, é a atividade recombinogênica. O problema desses dados é que coincidem com o fato de defeitos nas vias de manutenção do DNA, incluindo o reparo de quebras de fitas duplas de DNA (DSB), serem uma característica do câncer. Especificamente, a manutenção defeituosa do genoma é característica habilitadora da carcinogênese, pois permite a acumulação de erros genéticos. O reparo defeituoso de DSBs também mostrou resultar em mutações ou aberrações cromossômicas subjacentes à carcinogênese (TALENS et al., 2017). O reparo por recombinação homóloga (HR) é um mecanismo pelo qual uma sequência homóloga no genoma, preferencialmente uma cromátide irmã disponível durante ou após a replicação do DNA, é utilizada como um molde para a reparação de DSB. Sendo considerado como uma das vias de tolerância, pois permite às células completarem a duplicação e a mitose ao custo de mutações e aumento nas frequências de recombinação (HINZ, 2010). Uma pesquisa extensiva na década de 90 resultou na identificação de dois genes *BRCA1* e *BRCA2*, genes que exercem funções na recombinação homóloga, dos quais as mutações da linha germinal heterozigótica resultam em um aumento no risco de desenvolver câncer de mama e /ou câncer do ovário (TALENS et al., 2017).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A utilização de fármacos para diversas patologias e desequilíbrios esta prolongando a expectativa de vida humana, mas podemos estar sobrevivendo e desenvolvendo a cada ano novas doenças em consequência desse uso. Principalmente doenças relacionadas a indução de danos ao DNA e a falta de reparo desses danos como o câncer. A grande maioria dos fármacos mostrados nessa revisão induziram danos ao DNA, principalmente danos ao reparo da molécula. Portanto, estudos com fármacos, que avaliam a toxicidade genética, como o SMART, são de extrema importância, para termos conhecimento de suas consequências futuras e também para possíveis modificações na estrutura química que possam reduzir esses danos.

REFERÊNCIAS

ALLEN JR, L.V.; POPOVICH, N.G.; ANSEL, H.C. **Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos**. Artmed. Porto Alegre, 2013.

ANDRADE, H.H.R.; REGULY, M.L.; LEHMANN M. Wing Somatic Mutation and Recombination Test (SMART). In: Henderson DS (ed). *Drosophila Cytogenetics Protocols*. **The Humana Press Inc**, p. 389-412, 2004.

DE MORAES FILHO, A.V.; DE JESUS SILVA CARVALHO, C; VERÇOSA, C.J; ET AL. In vivo genotoxicity evaluation of efavirenz (EFV) and tenofovir disoproxil fumarate (TDF) alone and in their clinical combinations in *Drosophila melanogaster*. **Mutation Research** , p. 31-38, 2017.

FRANCHI, L.P.; PENTIADO, N.H.; SILVA RDO N.; GUIMARÃES, N.N.; ET AL. Mutagenic and recombinogenic effects of lamivudine and stavudine antiretrovirals in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Food and Chemical Toxicology**, p. 578-82, 2009.

FREI, H.; WÜRGLER, F.E. Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative, or inconclusive result. **Mutation Research**, n. 203(4), p. 297-308, 1988.

FRÖLICH, A.; WÜRGLER, F.E. New tester strains with improved bioactivation capacity for the *Drosophila* wing-spot test. **Mutation Research**, n. 216, p. 179-87, 1989.

Guimarães, N.N; de Castro Pereira, K.; de Andrade, H.H; et al. Comparative analysis of genetic toxicity of azt and ddI antiretrovirals in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, p.312-7, 2008.

GRAF, U.; FREI, H.; KÄGI, A.; ET AL. Thirty compounds tested in the *Drosophila* wing spot test. **Mutation Research**, n. 222, p. 359-73, 1989.

GRAF, U.; WÜRGLER, F.E.; KATZ, A.J.; ET AL. Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, n. 6, p. 153-188, 1984.

HÄLLSTROM, I.; BLANCK, A. Genetic regulation of the cytochrome p-450 system in *Drosophila melanogaster*. I. chromosomal determination of some cytochrome p-450 dependent reactions. **Chemico-Biological Interactions**, n. 56, p. 157-71, 1985.

HINZ, J.M. Role of homologous recombination in DNA interstrand crosslink repair. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, n. 51, p. 582-603, 2010.

KASTENBAUM, M.A.; BOWMAN, K.O. Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies. **Mutation Research**, n.9(5), p. 527-49, 1970.

KOH, K; EVANS, J.M.; HENDRICKS, J.C.; ET AL. A *Drosophila* model for age-associated changes in sleep: wake cycles. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, n. 103, p. 13843-47, 2006.

LARINI, L. **Fármacos e medicamentos**. Artmed. Porto Alegre, 2008.

LEHMANN M.;VILAR KDE, S.; FRANCO, A.; ET AL. Activity of topoisomerase inhibitors daunorubicin, idarubicin, and aclarubicin in the *Drosophila* Somatic Mutation and Recombination Test. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, p. 250-7, 2004.

LUIZ, G.H.R.; MEZZAROBA, L. Efeitos tóxicos de Medicamentos decorrentes de erros de medição. **Infarma**, n. 7/8 p. 18-27, 2008.

MARCOS, R.; CARMONA, E.R. The wing-spot and the comet tests as useful assays detecting genotoxicity in *Drosophila*. **Methods in Molecular Biology**, n.1044, p. 417-27, 2013.

MARSH, J.L.; THOMPSON, L.M. *Drosophila* in the study of neurodegenerative disease. **Neuron**, n. 52, p. 169-78, 2006.

OLIVEIRA, V.C.; CONSTANTE, S.A.R.; ORSOLIN, P.C.; NEPOMUCENO, J.C.; ET AL. Modulatory effects of metformin on mutagenicity and epithelial tumor incidence in doxorubicin-treated *Drosophila melanogaster*. **Food and Chemical Toxicology**, p. 283-291, 2017.

ORSOLIN, P.C; SILVA-OLIVEIRA, R.G; NEPOMUCENO, J.C. Assessment of the mutagenic, recombinogenic and carcinogenic potential of orlistat in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Food and Chemical Toxicology**, p. 2598-604, 2012.

SATURNINO, R.S.; MACHADO, N.M.; LOPES, J.C.; NEPOMUCENO, J.C. Assessment of the mutagenic, recombinogenic, and carcinogenic potential of amphotericin B in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Drug and Chemical Toxicology**, n.9, p.1-7, 2017.

TALENS, F.; JALVING, M.; GIETEMA, J.A; VAN VUGT, M.A. Therapeutic targeting and patient selection for cancers with homologous recombination defects. **Expert Opinion on Drug Discovery**, n. 12(6), p. 565-581, 2017.

TIBURI, M.; REGULY, M.L; SCHWARTSMANN, G; CUNHA, K.S; ET AL. Comparative genotoxic effect of vincristine, vinblastine, and vinorelbine in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Mutation Research**, p. 141-9, 2012.

YÜKSEL, M.; SARIKAYA, R.; BOSTANCI, N. Genotoxic evaluation of antiepileptic drugs by *Drosophila* somatic mutation and recombination test. **Food and Chemical Toxicology**, n. 48(10), p. 2682-7, 2010.

WU, B.; DAVEY, G.E.; NAZAROV, A.A.; DYSON, P.J.; DAVEY, CA. Specific DNA structural attributes modulate platinum anticancer drug site selection and cross-link generation. **Nucleic Acids Research**, n. 39, p. 8200-12, 2011.

ZAFRED, R.R.T; SPANO, M.A; MARTINS, R; ET AL. Pro-oxidant Activity and Genotoxicity of the *Astronium fraxinifolium* Using Wing SMART and *Allium cepa* Test. **Journal of Medicinal Plants Research**, n.10 (4), p. 276-285, 2016.

ZIJLSTRA, J.A.; VOGEL, E.W.; BREIMER, D.D. Pharmacological and toxicological aspects of mutagenicity research in *Drosophila melanogaster*. In: Hodgson E, Bend J, Philpot RM (eds) **Reviews in biochemical toxicology**, vol 8. Amsterdam: Elsevier, p. 121–154, 1987.

ⁱ Possui graduação em Biomedicina pela Universidade Feevale (2012) e mestrado em Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde pela Universidade Luterana do Brasil (2015). Atualmente é doutoranda do PPGBioSaúde da Universidade Luterana do Brasil. E-mail: allgayerbiomedica@gmail.com