

 **PDF**
Complete

*Your complimentary
use period has ended.
Thank you for using
PDF Complete.*

[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA**

**ESTUDO COMPARATIVO DA GENOTOXICIDADE DO
ANTIRRETROVIRAL ABACAVIR ISOLADO E EM COMBINAÇÃO
COM ZIDOVUDINA E LAMIVUDINA *IN VIVO***

CLÁUDIA DE JESUS SILVA CARVALHO

GOIÂNIA-GO

2015



TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS (TEDE) NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: ☒ [x] Dissertação ☐ [] Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação

Autor (a):	Cláudia de Jesus Silva Carvalho		
E-mail:	claudiajc11@hotmail.com		
Seu e-mail pode ser disponibilizado na página?	☒ [x] Sim	☐ [] Não	
Vínculo empregatício do autor			
Agência de fomento:	CAPES	Sigla:	CAPES
País:	Brasil	UF:GO	CNPJ: 00889834/0001-08
Título:	Estudo Comparativo da Genotoxicidade do Antirretroviral Abacavir Isolado e em Combinação com Zidovudina e Lamivudina <i>in vivo</i> .		
Palavras-chave:	ABC, antirretroviral, NRTIs, mutação, recombinação.		
Título em outra língua:			
Palavras-chave em outra língua:	ABC, antiretroviral, NRTIs, mutation, recombination.		
Área de concentração:	Biologia Celular e Molecular		
Data defesa: (dd/mm/aaaa)	17/03/2015		
Programa de Pós-Graduação:	Ciências Biológicas		
Orientador (a):	Dra. Lee Chen Chen		
E-mail:	chenleego@yahoo.com.br		
Co-orientador (a):*			
E-mail:			

*Necessita do CP- quando não constar no SisPG

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento ☒ [x] SIM ☐ [] NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF ou DOC da tese ou dissertação.

O sistema da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações garante aos autores, que os arquivos contendo eletronicamente as teses e ou dissertações, antes de sua disponibilização, receberão procedimentos de segurança, criptografia (para não permitir cópia e extração de conteúdo, permitindo apenas impressão fraca) usando o padrão do Acrobat.

Cláudia de Jesus S. Carvalho
Assinatura do (a) autor (a)

Data: 15/04/2015

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.



CLÁUDIA DE JESUS SILVA CARVALHO

**ESTUDO COMPARATIVO DA GENOTOXICIDADE DO
ANTIRRETROVIRAL ABACAVIR ISOLADO E EM COMBINAÇÃO
COM ZIDOVUDINA E LAMIVUDINA *IN VIVO***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biologia.

Orientadora: Profa. Dra. Lee Chen Chen

**GOIÂNIA-GO
2015**



PDF
Complete

*Your complimentary
use period has ended.
Thank you for using
PDF Complete.*

[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)

Ficha catalográfica elaborada automaticamente
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob orientação do Sibi/UFG.

Carvalho, Cláudia de Jesus Silva

Estudo comparativo da genotoxicidade do antirretroviral abacavir
isolado e em combinação com zidovudina e lamivudina in vivo
[manuscrito] / Cláudia de Jesus Silva Carvalho. - 2015.
10, 44 f.: il.

Orientador: Profa. Dra. Lee Chen Chen.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de
Ciências Biológicas (ICB), Programa de Pós-Graduação em Biologia,
Goiânia, 2015.

Bibliografia.

Inclui siglas, abreviaturas, gráfico, tabelas, lista de figuras.

1. ABC. 2. antirretroviral. 3. NRTIs. 4. recombinação. 5. mutação. I.
Chen Chen, Lee, orient. II. Título.

GRADECIMENTOS

À Deus por me conceder vida e saúde e pelo amor incondicional...

Obrigada Senhor, por iluminar o meu caminho e pela oportunidade de conhecer pessoas que contribuem para que eu seja uma pessoa melhor.

À Profa Dra Kênya Silva Cunha por ser minha orientadora na grande parte deste trabalho e que mesmo estando aposentada não mediu esforços em me ajudar quando a procurei. Obrigada pela oportunidade, apoio, confiança, paciência, atenção, e isso não se restringiram somente à execução deste trabalho, mas também, a outros momentos que foram importantes para meu crescimento pessoal. Para mim, você é um exemplo de pessoa guerreira.

À minha atual orientadora Profa. Dra. Lee Chen Chen, por ter aceitado dar continuidade na minha orientação. Sou grata pela confiança e por suas contribuições, às quais tornaram viável a conclusão deste trabalho.

Agradeço meu esposo Marcos Leandro pelo incentivo, compreensão, pela força nos momentos difíceis, e por sempre acreditar em mim. Seu companheirismo e determinação contribuíram muito para que eu chegasse até aqui. Agradeço sempre o Papai do Céu por ter colocado você em meu caminho. Amo-te muito.

À minha família, especialmente minha mãezinha Rosalina e a Tia Jeomar pelas orações e incentivos. Mãezinha, sua presença em minha vida faz com que meus dias sejam mais Felizes.

Agradeço também os meus amigos de laboratório, Aroldo e Ana Clara pela amizade, convivência e os conhecimentos compartilhados.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa que me auxiliou financeiramente para realização da pesquisa.

Enfim, à todos que de alguma forma contribuíram para este trabalho, muito obrigada!

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas e Siglas.....	IV
Lista de Figuras.....	VIII
Resumo.....	IX
Abstract.....	X
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. <i>AIDS e terapia antirretroviral</i>	1
1.2. <i>Abacavir (ABC)</i>	4
1.2.1. <i>Atividade antiviral e terapia</i>	6
1.2.2. <i>Resistencia viral</i>	7
1.2.3. <i>Efeitos adversos relacionados ao ABC</i>	8
1.2.4. <i>Carcinogênese/mutagênese relacionada à terapia com ABC</i>	9
1.3. <i>Zidovudina (AZT)</i>	9
1.4. <i>Lamivudina (3TC)</i>	12
1.5. <i>Genética toxicológica</i>	14
2. OBJETIVOS.....	17
2.1. <i>Objetivo geral</i>	17
2.2. <i>Objetivos específicos</i>	17
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	18
3.1. <i>Agente antirretroviral</i>	18
3.2. <i>Teste para detecção de mutação e recombinação somática (SMART)</i>	18
3.3. <i>Linhagens de D. melanogaster</i>	19
3.4. <i>Procedimento experimental</i>	19
3.5. <i>Montagem das lâminas</i>	21
3.6. <i>Análise microscópica das asas e classificação dos clones</i>	23
3.7. <i>Análise estatística</i>	24
4. RESULTADOS.....	25
4.1. <i>Efeito tóxico</i>	25
4.2. <i>Toxicidade genética</i>	28
5. DISCUSSÃO.....	33
6. CONCLUSÃO.....	36
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	37

ABREVIATURAS E SIGLAS

3TC: lamivudina

ABC-MP: abacavir monofosfato

ADH: álcool desidrogenase

AIDS: síndrome da imunodeficiência adquirida

ATP: adenosina trifosfato

AZT: zidovudina

CBV-MP: carbovir monofosfato

CBV-TP: carbovir trifosfato

DBS: *double strand breaks*

ddl: didanosina

dGTP: desoxiguanosina-5-trifosfato

DNA: ácido desoxirribonucleico

dNTPs: desoxinucleotídeos trifosfato

FDA: *food and drug administration*

GT: glucuronil transferase

HAART: *highly active antiretroviral therapy*

HIV: vírus da imunodeficiência humana

HPRT: hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase

ICR: inidores de correceptores

IF: inibidores de fusão

IP: inibidores de protease

LOH: *Loss of heterozygosity*

NNRTIs: inibidores da transcriptase reversa não análogos de nucleosídeos

NRTIs: inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleosídeos

NtRTIs: inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleotídeos



RT: transcriptase reversa

SCE: *Sister chromatids exchange*

SMART: teste para detecção de mutação e recombinação somática

TDF: tenofovir

TK: timidina quinase

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Principais vias metabólicas do abacavir em humanos.....	6
Figura 2. Estrutura química da zidovudina	10
Figura 3. Estrutura química da lamivudina	12
Figura 4. Visualização em microscopia eletrônica dos fenótipos dos pelos das asas de <i>D. melanogaster</i>	19
Figura 5. Fenótipos dos indivíduos adultos provenientes do cruzamento entre machos mwh e fêmeas flr ³	20
Figura 6. Cruzamento padrão das moscas parentais entre machos mwh e fêmeas flr ³	20
Figura 7. Moscas adultas conservadas em álcool 70%	21
Figura 8. Montagem das lâminas para análise microscópica	22
Figura 9. Visualização das asas alinhadas sob a luz de uma lupa com aumento de 20x	22
Figura 10. Lâmina montada com um total de 6 pares de asas de indivíduos fêmeas e 6 pares asas de machos.....	22
Figura 11. Visualização das asas em microscopia óptica.....	23
Figura 12. Classificação das manchas de acordo com Graf et al. (1984).....	23
Figura 13. Curvas de sobrevivência dos indivíduos tratados com diferentes concentrações do ABC isolado e em combinações	26 e 27
Figura 14. Representação das frequências relativas do total de indução de manchas mutantes em indivíduos tratados com ABC ABC/AZT, ABC/3TC, ABC/3TC/AZT e AZT/3TC	29

RESUMO

O abacavir (ABC), a zidovudina (AZT) e a lamivudina (3TC) são os inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleosídeos (NRTIs) mais usados como eixo principal da terapia antirretroviral altamente ativa (HAART). Apesar da eficácia das combinações de NRTIs na supressão viral, há comprovações que demonstram que o potencial genotóxico dos NRTIs pode ser potencializado quando administrado em combinação. Neste contexto, este trabalho se propôs a investigar o potencial tóxico e genotóxico induzido pelo ABC quando administrado isoladamente e em combinação com a AZT e/ou a 3TC, utilizando o teste para detecção de mutação e recombinação em células somáticas de *Drosophila melanogaster* (SMART). O SMART avalia simultaneamente dois eventos relacionados com a carcinogênese, a mutação e a recombinação somática, e baseia-se na identificação de pelos mutantes resultantes de lesões que levam a perda de heterozigose em dois genes marcadores para forma dos pelos das asas: *mwh* e *flr*³. No teste de toxicidade, grupos de 100 larvas de terceiro estágio, provenientes do cruzamento padrão, foram tratados por 48 horas com diferentes concentrações dos fármacos. Dos resultados obtidos, foi estabelecida uma faixa de concentrações apresentando mais do que 70% de sobreviventes para proceder as análises de genotoxicidade. Empregando o teste binomial condicional, foram comparadas as frequências de manchas de pelos mutantes presentes nos indivíduos trans-heterozigotos e heterozigotos para o cromossomo TM3 de cada grupo tratado com seus respectivos controles. Os resultados dessas investigações indicaram que o ABC foi tóxico para as larvas em concentrações superiores a 2 mg/mL. As combinações que continham ABC apresentaram efeitos tóxicos semelhantes ao ABC isolado. Todos os tratamentos foram capazes de induzir alterações genéticas relacionadas com mutação e recombinação somática. Dentre todas as combinações, AZT/3TC foi a que demonstrou menor potencial tóxico e genotóxico nas concentrações testadas. O potencial recombinogênico tanto de ABC isolado quanto em combinação foi relativamente alto com índices superiores a 83,7%.

Palavras-chave: ABC, antirretroviral, NRTIs, recombinação, mutação, SMART.

ABSTRACT

Abacavir (ABC), zidovudine (AZT) and lamivudine (3TC) are nucleoside reverse-transcriptase inhibitors (NRTIs) widely used as the main axis of highly active antiretroviral therapy (HAART). Despite the effectiveness of combinations of NRTI in viral suppression, there is evidence to show that the genotoxic potential of NRTIs can be increased when administered in combination. In this context, this study proposed to investigate the toxic and genotoxic potential ABC induced when administered isolated and in combination with AZT and/or 3TC, using the wing SMART in *Drosophila melanogaster*. This test simultaneously evaluates two events related to carcinogenesis, mutation and somatic recombination, and is based on the identification of the mutants hairs resulting from lesions that lead to loss of heterozygosity in two marker genes involved in the formation of the wings of hair: *mwh* and *flr*³. In toxicity tests, groups of 100 larvae of third instar from the standard cross were treated for 48 hours with different concentrations of drugs. From the results obtained, was established a range of concentrations presenting more than 70% of survivors flies to proceed the analysis of genotoxicity. Employing the conditional binomial test, were compared the spots of mutants hair frequencies present in trans-heterozygotes and heterozygous flies for chromosome TM3 of each treated group with the respective controls. The results of investigations indicated that ABC was toxic to larvae in concentrations greater than 2 mg/ml. The combinations which contained ABC showed toxic effects similar to isolated ABC. All treatments were able to induce genetic alterations related to mutation and somatic recombination. Among all combinations, AZT/3TC was the one that showed less toxic and genotoxic potential at the concentrations tested. The potential recombinogenic both ABC isolated or in combination was relatively high, with indices of over 83.7%.

Keywords: ABC, antiretroviral, NRTIs, recombination, mutation, SMART.

1.1. AIDS e terapia antirretroviral

O vírus da imunodeficiência humana (HIV), pertence à família Retroviridae, gênero *Lentivirus*. Esse vírus infecta o sistema imunológico humano, principalmente os linfócitos T auxiliares (LT CD4⁺), alterando o DNA destas células. Em consequência disso, a situação clínica do hospedeiro traduz-se em progressiva perda da função do sistema imune, culminando no estágio mais avançado da infecção pelo HIV - *Acquired Immuno Deficiency Syndrome* (AIDS) ou síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA) (Brasil, 2014a).

A AIDS é uma doença grave, de comportamento pandêmico e, mesmo com inegáveis esforços concentrados no diagnóstico precoce da infecção bem como no tratamento da doença, a epidemia de HIV/AIDS continua a ser um dos grandes desafios para a saúde global. Estima-se que 35,3 milhões de pessoas vivem com HIV em todo o mundo (UNAIDS, 2014a). No Brasil, de acordo com o último boletim epidemiológico do Ministério da Saúde, desde o início da epidemia de AIDS no país até junho de 2014, foram registrados 757.042 casos da doença. Nos últimos cinco anos, o Brasil tem registrado uma média de 39,7 mil casos de AIDS e a taxa de detecção nacional tem apresentado estabilização nos últimos dez anos, com uma média de 20,5 casos para cada 100.000 habitantes (Brasil, 2014b).

O desenvolvimento de medicamentos antirretrovirais, especificamente o desenvolvimento de terapias que combinam dois ou mais medicamentos, mudou o curso da doença e a vida das pessoas infectadas. Atualmente, a AIDS é considerada uma doença crônica controlável, permitindo que os pacientes submetidos ao tratamento anti HIV/AIDS, tenham melhor qualidade e maior expectativa de vida (Hawkins, 2010). Ao final de 2012, cerca de 9,7 milhões de pessoas tiveram acesso à terapia antirretroviral, e a meta global para 2015 é que cerca de 15 milhões de pessoas estejam fazendo uso da terapia antirretroviral (UNAIDS, 2014b).

Os primeiros casos de AIDS foram notificados em 1981, e dois anos depois, o vírus HIV foi identificado como agente causador da doença. A partir disso, várias etapas do ciclo de replicação do vírus foram identificadas como alvos para

Desde então, pesquisas científicas tem avançado no âmbito do desenvolvimento de compostos que inibem as etapas do ciclo de replicação viral e que são efetivos no tratamento dos indivíduos infectados (Peçanha et al., 2002; Tintori et al., 2014).

O primeiro composto descrito que mostrou atividade contra o HIV foi a suramina. No entanto, este composto se mostrou muito tóxico para uso sistêmico, não podendo ser usado no tratamento da AIDS. De fato, o primeiro fármaco aprovado pela agência americana *Food and Drug Administration* (FDA) para uso clínico foi o antirretroviral zidovudina (AZT) em 1987. Depois disto, vários outros fármacos foram disponibilizados para o tratamento da AIDS (De Clercq, 2009; 2010).

Atualmente mais de 25 drogas foram aprovadas pela FDA para o tratamento da doença, as quais pertencem a diferentes classes de acordo com sua interação no ciclo de replicação do HIV. A enzima viral transcriptase reversa (RT) é o alvo das seguintes classes de antirretrovirais: inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleosídeos (NRTI), inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleotídeos (NtRTI), e inibidores da transcriptase reversa não análogos de nucleosídeos (NNRTI). Outros fármacos também utilizados contra o HIV são os inibidores de protease (IP). Estes IPs inibem a atividade catalítica de proteases, sendo reconhecido pela enzima por apresentar estrutura semelhante à dos substratos naturais destas enzimas. Os inibidores de fusão (IF) constituem-se uma classe de antirretrovirais que tem como mecanismo de ação impedir a fusão do envelope viral à membrana celular. Os inibidores de integrase bloqueiam a ação de integrases, impedindo dessa forma a inserção do DNA do vírus dentro da cadeia de DNA da célula infectada. Os inibidores de correceptores (ICR) se ligam aos receptores CCR5 (receptores U^1 -quimiocinas usados pelas cepas R5 do HIV) ou CXCR4 (receptores t^1 -quimiocinas usados pelas cepas R4 do HIV) impedindo a entrada do vírus na célula hospedeira (De Clercq, 2009; 2010).

A descoberta de novas drogas e das classes de antirretrovirais permitiu o desenvolvimento da terapia de antirretrovirais combinada conhecida como terapia antirretroviral altamente ativa ou *highly active antiretroviral therapy* (HAART). A HAART surgiu como avanço promissor no tratamento da AIDS e consiste na combinação de dois ou mais medicamentos pertencentes à mesma ou a diferentes classes de antirretrovirais. Esses medicamentos são administrados com os objetivos

o viral, reconstituição imunológica do hospedeiro, e prevenção de doenças oportunistas, tendo como resultado a redução da mortalidade por AIDS (Hawkins, 2010).

Apesar do inquestionável sucesso na expectativa e qualidade de vida dos pacientes infectados pelo HIV, a HAART não é capaz de erradicar a infecção e, além do mais, a terapia é bastante limitada devido ao seu alto custo, exigência de adesão ao longo da vida e do desconhecido efeito do tratamento em longo prazo (Richman et al, 2009). Diante disso, vários fatores aumentam a atenção em relação à toxicidade da HAART, tendo em vista que a gravidade da epidemia de HIV/AIDS conduziu ao licenciamento acelerado de muitos agentes antirretrovirais, muitas vezes, com muito pouco conhecimento sobre a segurança em longo prazo. Assim, diante da quantidade de antirretrovirais disponíveis, as combinações possíveis são enormes, e a escolha entre essas combinações depende muito do conhecimento da toxicidade destes fármacos (Carr & Cooper, 2000).

Tem sido reconhecido que todas as classes de agentes antirretrovirais apresentam múltiplos efeitos colaterais além da supressão da replicação do HIV, alguns dos quais podem ser fatais (Butt et al., 2011; Miller et al., 2014). Entre esses efeitos adversos, a toxicidade genética dos antirretrovirais tem sido alvo de muitos estudos (Guimarães et al, 2013; Olivero et al, 2013; Kaushik et al., 2014). Em relação aos NRTIs, os principais componentes da HAART, estudos descritos na literatura indicam que os efeitos colaterais relacionados com esta classe são principalmente devido a sua atividade genotóxica e mutagênica, e isso conduz a um risco aumentado para o desenvolvimento de neoplasias (Benhammou et al.; 2008; André-Schmutz et al., 2013).

Os NRTIs são análogos dos nucleosídeos endógenos que não possuem uma hidroxila (-OH) no carbono 3 da desoxirribose e consequentemente não conseguem formar uma ligação fosfodiéster. No meio intracelular, após uma sequência de reações de fosforilação, os NRTIs competem pelo sítio ativo da RT com seus correspondentes endógenos, os desoxinucleotídeos trifosfato (dNTPs). Uma vez incorporados no DNA proviral, os NRTIs agem como terminadores de cadeia, pois impedem a ligação do próximo nucleotídeo (Ray, 2005). Em decorrência deste mecanismo de ação, os NRTIs podem ser incorporados no DNA nuclear e mitocondrial das células não infectadas causando danos irreparáveis nestas

estes danos, podem ocorrer eventos mutagênicos, clastogênicos, encurtamento de telômeros e aneuploidias (Olivero, 2007, Olivero et al., 2013).

O potencial genotóxico dos NRTIs é suportado por vários dados experimentais, e esse potencial difere entre as drogas e envolve uma complexa rede de eventos que podem levar a uma instabilidade genômica (Olivero, 2007; Benhammou et al, 2008; Olivero et al., 2013). Estudos com NRTIs isolados e em combinação revelaram que o potencial genotóxico desta classe pode ter efeito sinérgico, antagônico ou aditivo quando administrados em combinação (Torres et al., 2007; Guimarães et al., 2013). Além disso, algumas combinações de NRTIs podem ser mais genotóxicas que outras. Por exemplo, foi verificado que a tripla combinação zidovudina+lamivudina+nevirapina foi mais genotóxica para prole de macacas (*Erythrocebus patas*) que a combinação zidovudina+lamivudina+abacavir (Olivero et al., 2013). Com base nesses pressupostos, torna-se indispensável um contínuo monitoramento dos fármacos isolados e em combinação visando a identificação de atividades tóxicas e genotóxicas e com isso oferecer sempre que possível mais segurança para a saúde dos pacientes que fazem uso de terapia antirretroviral combinada, possibilitando escolhas de tratamento que apresentem menos efeitos colaterais.

1.2. Abacavir (ABC)

ABC, {(1*S*,4*R*)-4-[2-amino-6-(cyclopropylamino)-9*H*- purin-9-yl]cyclopent-2-en-1-yl}metanol, é um fármaco pertencente aos medicamentos antivirais que foi aprovado pela FDA em dezembro de 1998. O ABC é utilizado em combinação com outros antirretrovirais e está disponível como um agente único (Ziagen[®]), em coformulação com a lamivudina (Epzicom[®]), com zidovudina/lamivudina (Trizivir[®]) e a mais recente coformulação ABC/lamivudina/dolutegravir. A dose de ABC recomendada para adulto é de 300 mg duas vezes ao dia ou 600 mg uma vez ao dia (FDA, 2012; Wu et al., 2012).

O ABC é absorvido e distribuído pelo organismo, apresenta biodisponibilidade oral superior a 80% e pode ser administrado com alimentos. Aproximadamente 50% do fármaco se ligam às proteínas do plasma humano (Sivasubramanian et al., 2010; Batista, 2011). As principais vias de metabolização do ABC utilizam duas enzimas

e (ADH) e glucuronil transferase (GT) (McDowell et al., 2000; Batista, 2011). Sendo assim, esse composto não inibe ou induz enzimas do complexo citocromo P-450 (CYP-450) e, portanto, não interage com medicamentos metabolizados por este sistema (McDowell et al., 2000). Oitenta e três por cento (83%) da dose do fármaco é primariamente excretada na urina como metabólitos, e cerca de 2% na forma inalterada (McDowell et al., 2000; Sivasubramanian et al., 2010).

O metabolismo do etanol também utiliza a ADH, assim uma interação entre ABC e etanol poderia alterar a farmacocinética, a concentração plasmática de ABC e criar efeitos potenciais sobre a segurança e eficácia deste fármaco. No entanto, foi avaliado o uso simultâneo etanol+ABC e verificou-se que apesar de alterar os parâmetros farmacocinéticos do ABC, clinicamente essas alterações não foram significativas (McDowell et al., 2000).

O ABC é um NRTI análogo de guanosina, que é amplamente usado no tratamento de indivíduos infectados com HIV como parte da HAART. E assim como os outros NRTIs, o ABC sofre fosforilação intracelular para formar o seu metabólito ativo, o carbovir trifosfato (Cross et al., 2009). O processo de fosforilação do ABC é catalisado pela enzima adenosina-fosfotransferase, produzindo a forma monofosfato (ABC-MP). Esta por sua vez, é convertida na forma monofosfato de carbovir (CBV-MP) por uma desaminase citosólica. Subsequentemente, CBV-MP é convertido para a forma de di- e trifosfato respectivamente. O carbovir trifosfato, é um análogo da desoxiguanosina-5-trifosfato (dGTP), que compete com dGTP endógeno pela incorporação no DNA do HIV. Uma vez incorporado impede o alongamento da cadeia e por consequência inibe a replicação viral (Faletto et al., 1997; Andrade et al., 2011). Além de formar o metabólito ativo carbovir trifosfato, a biotransformação também produz dois outros metabólitos identificados como 5'-carboxilato e 5'-glicuronídeo, formado pelas enzimas citosólicas ADH e GT, respectivamente (Good et al., 1995; Andrade et al., 2011) (Fig. 1).

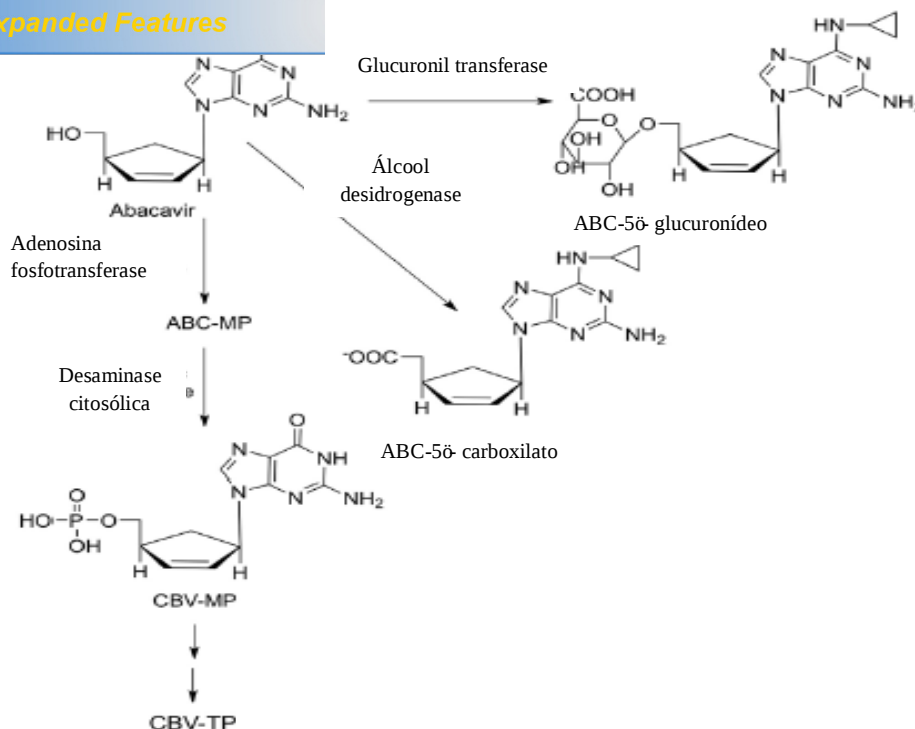


Figura 1. Principais vias metabólicas do ABC em humanos.

Fonte: Adaptado de Andrade et al. (2011).

1.2.1. ABC: atividade antiviral e terapia

A avaliação da eficácia e segurança das diferentes combinações de antirretrovirais é importante, pois desta maneira pode-se prevenir possíveis falhas terapêuticas e maximizar o efeito antiviral. Neste contexto, estudos *in vitro* que avaliaram o efeito de combinações de NRTIs sobre a replicação do HIV mostraram que o ABC possui um fraco efeito antagônico quando combinado com didanosina (ddI), lamivudina (3TC) e tenofovir (TDF) (Perez-Olmeda et al., 2009), e também atividade sinérgica em cultura de células quando em combinação com o NRTI zidovudina (AZT), com o NNRTI nevirapina, e com o IP amprenavir (FDA, 2012). Estudos *in vivo*, verificaram que o ABC combinado com a AZT ou a 3TC produz maior redução da carga viral do que a AZT combinada com 3TC. Dentre estas combinações a que resultou em maior redução da carga viral foi ABC/3TC (Cross et al., 2009).

Além da atividade anti-HIV, foi demonstrado que a forma ativa do ABC inibe a atividade da enzima telomerase em células humanas (Tendian & Parker, 2000). A telomerase é uma polimerase responsável pela manutenção dos telômeros e a sua atividade parece ser necessária em todos os tipos de tumores (Rossi et al., 2009).

am ainda que o ABC inibe o crescimento celular em linhagens de células de meduloblastoma humano e este efeito está associado com a *downregulation* da atividade da telomerase. Somando-se a esse resultado, Carlini et al. (2010) demonstraram que o ABC inibe o crescimento de células, afeta a progressão do ciclo celular e induz a senescência em linhagens de células de câncer de próstata. Esses resultados abriram uma perspectiva para o uso do ABC no tratamento de câncer.

1.2.2. Resistência viral

Segundo Manenti (2008), a resistência viral é definida pela presença de mutações no genoma viral que reduzem a suscetibilidade à droga quando comparada ao vírus selvagem. As mutações que conferem resistência aos antirretrovirais são selecionadas por exposição à terapia e representa um problema importante na concepção de novas terapias e à gestão dos esquemas de tratamento de pessoas infectadas. Em outras palavras, as mutações que conferem resistência limitam a eficácia do tratamento e quase sempre leva à falha terapêutica (Schinazi et al., 2011).

Quatro mutações têm sido associadas à resistência ao ABC *in vitro*: L74V, M184V, Y115F e K65R. Essas mutações também foram selecionadas durante a monoterapia *in vivo*, com exceção do códon mutante Y115F, que sozinho raramente é observado em amostras de pacientes (Tisdale et al., 1997; Walter et al., 2002). Durante ensaios clínicos, M184V foi uma das mutações mais comuns (> 25%), seguida por L74V/I (11%) e K65R (3,3%) (McColl et al., (2008).

De acordo com Gibbs et al. (2002) o padrão de mutações de resistência selecionado por esquemas de tratamentos com NRTIs contendo ABC diferem de acordo com os outros NRTIs no regime de tratamento. Por exemplo, *in vitro* a mutação mais frequente que confere resistência ao ABC é M184V, porém quando o ABC é colocado em regime que contém AZT e não contém 3TC esta mutação parece não conferir resistência ao ABC. Além disso, a combinação ABC/3TC parece selecionar as mesmas quatro mutações observadas quando administrado ABC em monoterapia (Lanier et al., 2004).

acionados ao ABC

A maioria dos efeitos adversos atribuídos aos NRTIs pode ser explicada pela síndrome da toxicidade mitocondrial, que é causada pela inibição da DNA polimerase γ induzida por esses análogos nucleosídeos, resultando na diminuição da síntese de proteínas mitocondriais que participam da síntese de ATP por fosforilação oxidativa (Carr & Cooper, 2000; Gardner et al., 2013). Essa toxicidade é tecido específica e pode se manifestar clinicamente em um ou mais tecidos alvo. Por exemplo, no fígado (hepatotoxicidade) a toxicidade mitocondrial está associada ao aumento da deposição de lipídeos, resultando na esteatose micro ou macrovesicular que pode progredir para uma acidose láctica (Carr & Cooper, 2000).

Quando comparado a outros NRTIs, o ABC é um dos compostos que está associado com a menor taxa de disfunção mitocondrial, e isso pode ser explicado pela baixa afinidade da forma ativa do ABC (CBV-trifosfato) pela DNA polimerase γ (Rabie et al., 2009).

Embora o ABC seja apresentado como seguro e bem tolerado, uma reação de hipersensibilidade (HSR) ao ABC é um efeito adverso significativo que ocorre em 4 a 8% dos indivíduos que recebem este fármaco. Esta reação limita seu uso em terapia antirretroviral, e requer um alto grau de vigilância clínica (Pérez-Prior et al., 2009). A HSR ao ABC está fortemente associada a um gene altamente polimórfico pertencente ao antígeno de leucócitos humanos (HLA), especificamente à presença do alelo HLA-B*5701, cuja frequência varia entre as populações (Ostrov et al., 2012; Adam et al., 2012).

Os sintomas de uma HSR ao ABC incluem febre, erupção cutânea, náuseas, vômitos, dores abdominais, sintomas respiratórios, entre outros. A suspensão imediata e permanente do ABC é obrigatória, resultando em uma rápida reversão dos sintomas. Esta reação ao ABC é uma contra-indicação absoluta para o tratamento posterior com qualquer formulação que inclui este fármaco, uma vez que pode resultar em uma reação mais intensa, rápida, e potencialmente com risco de morte (Mallal et al., 2008; Pavlos et al., 2012).

gênese relacionada à terapia com ABC

Foram encontrados poucos estudos de avaliação da toxicidade genética do ABC isolado. Entre eles, resultados de estudos de carcinogenicidade com ratos e camundongos que tiveram administração oral de ABC por dois anos, mostraram um aumento na incidência de tumores malignos e não malignos. Os tumores malignos ocorreram na glândula prepucial dos machos e na glândula clitoridiana das fêmeas de ambas as espécies, e no fígado de ratas. Além disso, os tumores não malignos ocorreram também no fígado e na glândula tireoide de ratas (Brambilla et al., 2012; Wu et al., 2012; FDA, 2012).

Também foi demonstrado que o ABC foi capaz de induzir alterações cromossômicas em linfócitos humanos *in vitro*. O ABC induziu efeito clastogênico em machos e não em fêmeas, quando avaliados pelo ensaio de micronúcleos em medula óssea de camundongos (FDA, 2012), mas não foi mutagênico em ensaios de mutagenicidade bacteriana (Ching et al., 1995; Wu et al., 2012). A genotoxicidade do ABC isolado também foi verificada por Kaushik et al., (2014) em ensaio de micronúcleos em sangue periférico de ratos, verificando a formação de micronúcleos de forma dose dependente, além de significativas alterações cromossômicas.

De acordo com especificações da FDA, não foi observado nenhum efeito do ABC em relação à reprodução ou à fertilidade em estudos com roedores, em doses cerca de 8 vezes maior do que a recomendada para exposição terapêutica humana (FDA, 2012). Um resultado diferente foi encontrado por Kaushik et al. (2014) que verificaram que ratos tratados com ABC por 28 dias consecutivos, tiveram decréscimos na contagem de espermatozoides e também no peso dos testículos, sugerindo toxicidade de ABC em órgãos reprodutores masculinos e consequente indução de infertilidade em animais machos.

1.3. Zidovudina (AZT)

A AZT (3'-azido-3'-desoxitimidina) (Fig. 2) é um NRTI análogo de timidina que foi inicialmente sintetizado como agente antitumor. No entanto, este composto apresentou também atividade anti-HIV *in vitro* e tornou-se a primeira droga antirretroviral aprovada pela FDA para o tratamento da AIDS (Revisado por Peçanha et al., 2002). A AZT é indicada em combinação com outros antirretrovirais no

e em monoterapia na prevenção da transmissão vertical do HIV (Zapor et al., 2004).

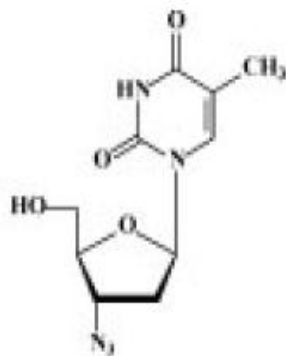


Figura 2. Estrutura química da zidovudina

Fonte: adaptado de De Clercq, (2009).

Após absorção, a AZT é metabolizada no fígado por enzimas da via UDP-glucuronosiltransferase (UGT) e cerca de 60 a 80% da dose administrada é detectada na urina na forma do metabólito 5' O-glicuronideo (Cretton et al., 1991). A forma ativa do fármaco, AZT-5' trifosfato, é um análogo da timidina-5' trifosfato que atua como competidor do sítio catalítico da RT-HIV e terminador de cadeia de DNA (Barbier et al., 2000).

Dentre os NRTIs, a AZT tem sido o alvo da maioria dos estudos *in vitro* e *in vivo* e está relacionada com uma série de efeitos genotóxicos. Em 2002, Von Tungeln et al. demonstraram que a AZT foi mutagênica para o gene *timidina quinase* (*Tk*) em linfócitos de camundongos B6C3F1/*Tk*^{+/-} tratados com a droga, e as mutações nos camundongos tratados foram associadas com um aumento na frequência de perda de heterozigose (*loss of heterozygosity*- LOH), envolvendo o alelo *Tk* tipo selvagem. Além disso, a análise mutacional sugere que a AZT induz um padrão único de mutações no gene *Tk* de camundongos e que os principais mecanismos de mutagênese induzidos por AZT envolvem deleção e recombinação mitótica (Mittelstaedt et al., 2004). Compatível com estes resultados, AZT foi associado com eventos mutagênicos e recombinogênicos em células somáticas de *Drosophila melanogaster* (Franchi et al., 2009; Guimarães et al., 2013).

no a AZT apresentou alta citotoxicidade e atividade mutagênica relativamente fraca para as linhagens TA102 sem fração S9. Utilizando ensaio cometa, Zeller et al. (2013) mostrou que células de camundongo incubadas por 3 horas com AZT exibiram aumento de danos primários no DNA de forma dose dependente.

A AZT foi capaz de induzir formação de micronúcleos em linfócitos humanos binucleados e em células de camundongos da linhagem L5178Y (Lourenço et al., 2010), demonstrando que a atividade genotóxica deste fármaco está também associada a mecanismos clastogênicos (Zeller et al., 2013). Também foi descrito que o tratamento com AZT induz encurtamento de telômeros, promove a amplificação centrossomal e aumenta a taxa de aneuploidia em células mamárias e células de ovário de hamster chinês (CHO) (Borojerdi et al., 2009).

A AZT induziu efeitos deletérios em células tronco embrionárias de ratos e estes efeitos foram associados a uma atividade aneugênica do fármaco (Campos et al., 2012). Adicionalmente, foi relatado que sangue do cordão umbilical de recém-nascidos que foram expostos a terapias contendo AZT durante a gestação, teve três vezes mais células aneuplóides do que o grupo controle (André-Shmutz et al., 2013). Estes dados enfatizam a importância de estudar ainda mais os seus efeitos secundários durante a embriogênese, uma vez que a AZT é indicada durante a gravidez em mulheres infectadas pelo HIV.

Estudos transplacentários em camundongos também indicaram potenciais efeitos carcinogênicos da AZT. A prole de camundongos tratados com AZT apresentou um aumento significativo de forma dose-dependente na incidência de tumores envolvendo os pulmões, fígado e sistema reprodutivo de fêmeas (Olivero et al., 1997; Chiappini et al., 2014).

Walker et al. (2007) em estudo transplacentário com camundongos da linhagem B6C3F1 e ratos da linhagem F344, mostraram um aumento significativo de forma dose dependente, na incidência de hemangiossarcoma em camundongos machos e leucemia de células mononucleares em ratas após tratamento com este fármaco, evidenciando uma ação carcinogênica da AZT.

A 3TC (enantiômero negativo de 2'-desoxi-3'-tiacitidina) é um análogo da citidina, um didesoxinucleosídeo em que o carbono 3' do anel da ribose é substituído por um átomo de enxofre (Fig. 3). A 3TC é frequentemente usada em combinação com outros agentes antivirais para o tratamento anti-HIV-1 e em monoterapia no tratamento da infecção pelo vírus da hepatite B (HBV). A 3TC é convertida por enzimas intracelulares em seu metabólito ativo a 3TC-5ötrifosfato. A formação da 3TC monofosfato é catalisada pela enzima desoxicitidina quinase, e as enzimas citidina monofosfato quinase e desoxicitidina monofosfato quinase converte a forma 3TC monofosfato em 3TC difosfato. Finalmente, o metabólito ativo 3TC trifosfato é formado pela ação da enzima pirimidina nucleosídeo difosfato quinase, e este por sua vez inibe a atividade do HIV por meio de sua incorporação ao DNA viral, induzindo a terminação do alongamento da cadeia (Johnson et al., 1999).

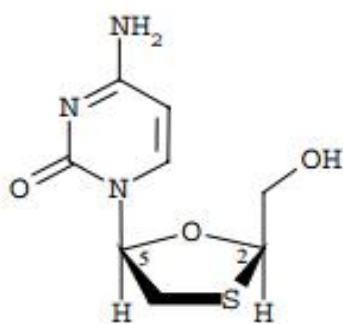


Figura 3. Estrutura química da lamivudina

Fonte: FDA.

http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2002/20564s14,20596s15lbl.pdf

Em estudos clínicos, a 3TC é o fármaco que apresenta melhor perfil favorável de segurança quando comparado com outros NRTIs. Além disso, não mostra associação com efeitos adversos relacionados à toxicidade mitocondrial (Perry et al., 1997). Entretanto, em estudo *in vitro* de mutagenicidade com células linfoblásticoide TK6 humana, a 3TC foi capaz de induzir aumento na frequência de mutação no *locus hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase (HPRT)* e *Tk* de forma dose dependente após três dias de exposição ao fármaco (Torres et al., 2007). Além disso, a 3TC é considerada mutagênica transplacentária, pois foi capaz de induzir

antes Tk em camundongos fêmeas da linhagem B6C3F1/Tk^{+/-} (Von Tungeln et al., 2007).

Adicionalmente, Bayram & Topaktas (2008) avaliaram o potencial clastogênico da 3TC em células de linfócitos humanos de sangue periférico. O fármaco induziu troca de cromátides irmãs (*Sister Chromatids Exchange*- SCE) na concentração 150 > g/mL no tratamento de 24 h, e nas concentrações de 125 e 150 > g/mL do tratamento de 48 h. Apesar de ser estatisticamente significativo, o aumento observado de SCE de aproximadamente 22% foi considerado pequeno. E ainda, durante os dois períodos de tratamento, aberrações cromossômicas estruturais aumentaram significativamente nas três maiores concentrações (100,125 e 150 > g/mL). Observou-se um fraco, porém, significativo aumento na formação de micronúcleos após o tratamento de 48 h com estas três concentrações.

O potencial mutagênico e recombinogênico, bem como a genotoxicidade total induzida por 3TC foi avaliada com o teste para detecção de mutação e recombinação somática (SMART) em asas de *D. melanogaster*. Neste sistema, aproximadamente, 86% da atividade genotóxica total induzida por 3TC foi relacionada com recombinação mitótica e 14% com mutação somática, indicando um alto potencial recombinogênico deste fármaco (Franchi et al., 2009).

Apesar desses resultados, a 3TC não foi mutagênica em ensaio com bactéria (Teste Ames), e não mostrou potencial carcinogênico em ensaios com ratos e camundongos. Também apresentou resultados negativos quando testada pelo teste de micronúcleos com roedores *in vivo* (Wu et al., 2012).

De acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA), câncer é o nome dado a um conjunto de mais 100 doenças que tem em comum o crescimento desordenado de células, que invadem tecidos e órgãos (INCA, 2014). Portanto, câncer se desenvolve quando as células já não seguem o seu padrão normal de crescimento controlado (Bishop & Schiestl, 2003). E hoje se sabe que a alteração genética é a causa deste comportamento celular (Hanahan & Weinberg, 2011; Vogelstein et al., 2013).

A instabilidade genômica tem sido considerada como um importante fator na formação e progressão de neoplasias, dado que é uma característica de quase todos cânceres humanos. Instabilidade genômica é resultante de alterações genéticas e especialmente daquelas que afetam a homeostasia celular nos processos de reparo, replicação e recombinação do DNA e divisão celular (Ward, 2002).

Alguns mecanismos de alteração genética que causam instabilidade genômica estão comprovadamente relacionados com o processo de carcinogênese, destacando-se (i) as mutações, seja por erros durante processo de replicação ou deficiência no mecanismo de reparo; e a (ii) recombinação homóloga (RH) (Bishop & Schiestl, 2003).

A RH é um dos mecanismos usados na reparação de quebras duplas do DNA (*double strand breaks* - DBS) e a instabilidade genômica, derivada da incapacidade de reparar estas lesões está relacionada com a carcinogênese por meio da ativação de oncogenes, inativação de supressores tumorais ou LOH, (Stark & Jasin, 2003; Klug et al., 2010).

Além de contribuir para LOH, outras evidências reforçam a ideia da participação da RH no processo carcinogênico. Algumas doenças genéticas indutoras de câncer estão relacionadas com elevadas frequências de recombinação e rearranjos genômicos, como é o caso da síndrome da quebra de Nijmegen, ataxia telangiectasia, síndrome de Bloom, síndrome de Werner e anemia de Fanconi que são caracterizadas por apresentarem várias alterações genéticas que levam a instabilidade cromossômica, devido a defeitos nos genes ou proteínas relacionados à via de reparo por RH (Thompson & Schild, 2002). A RH também é um mecanismo alternativo para manutenção de telômeros, e essa manutenção promove

característica quase universal de células tumorais

(Bishop & Schiestl, 2003).

A genética toxicológica é uma área da ciência que faz uso de diferentes ensaios biológicos que são capazes de detectar alterações genéticas que estão correlacionadas com o desenvolvimento do processo carcinogênico. A grande maioria dos bioensaios utilizados é capaz de detectar mutações pontuais e mutações cromossômicas. No entanto, nem toda alteração no material genético é essencialmente uma mutação, como é o caso da recombinação mitótica (Erdtmann, 2003). Uma vez que este processo está comprovadamente relacionado com a carcinogênese, outros sistemas testes foram desenvolvidos para detectar substâncias que são indutoras de recombinação.

Entre estes ensaios, o teste para detecção de mutação e recombinação em células somáticas de *D. melanogaster* (SMART), um teste *in vivo*, é conhecido por ser um teste rápido e de baixo custo. Além disso, mostra eficiência na avaliação do potencial genotóxico de diversas substâncias (Andrade & Lehmann, 2003), incluindo medicamentos antirretrovirais.

Esse teste utiliza como organismo modelo a *D. melanogaster*, conhecida como mosca-da-fruta. A *D. melanogaster* é um organismo eucarioto, diplóide, e possui um total de quatro cromossomos, três dos quais carregam a maior parte do genoma (Fonseca e Pereira, 2004). Embora existam muitas diferenças entre o ser humano e a mosca-da-fruta, algumas propriedades biológicas, fisiológicas e neurológicas básicas são bem conservadas entre mamíferos e a *Drosophila* (Pandey & Nichols, 2011). Estima-se que em torno de 75% dos genes relacionados a doenças humanas possuem genes homólogos na mosca-da-fruta e entre eles os que estão envolvidos na regulação do ciclo celular (Bier, 2005; Lloyd & Taylor, 2010).

A avaliação da atividade genotóxica de novos fármacos é de fundamental relevância para a introdução na terapêutica de compostos mais seguros para uso humano. Além disso, a identificação do potencial genotóxico dos fármacos existentes nos remete à busca de novos compostos (Santos et al., 2007). Diversos trabalhos têm avaliado os efeitos genotóxicos dos fármacos utilizados na terapia anti-HIV, que são considerados precursores para o desenvolvimento da

os trabalhos avaliaram eventos relacionados com a recombinação mitótica.

No que diz respeito ao antirretroviral ABC, foram encontrados poucos estudos *in vivo* que mostram os efeitos genotóxicos deste fármaco tanto isolado quanto em combinação. Com intuito de oferecer mais informações a respeito dos efeitos genotóxicos induzidos por este fármaco incluindo aqueles relacionados com recombinação mitótica, nos propusemos a avaliar comparativamente o potencial genotóxico do ABC isolado e em combinações por meio do bioensaio SMART. Uma vez que este sistema teste é capaz de detectar simultaneamente eventos mutacionais e os eventos associados com recombinação somática. Além disso, é capaz de quantificar separadamente a contribuição desses eventos, na atividade total induzida por um composto (Andrade et al., 2003).

2.1. Objetivo geral

Avaliação do potencial tóxico e genotóxico induzido pelo antirretroviral ABC quando administrado isoladamente e em combinação com outros NRTIs, por meio do bioensaio SMART.

2.2. Objetivos específicos

- I) Avaliar comparativamente o potencial tóxico, mutagênico e recombinogênico do antirretroviral ABC quando administrado isoladamente e em combinação com AZT e 3TC.
- II) Quantificar separadamente a contribuição dos eventos mutacionais e recombinacionais na atividade genotóxica total induzida pelo ABC isolado e em combinação.

3.1. Agente antirretroviral

Foram utilizados neste trabalho o medicamento abacavir (ABC, CAS 188062-50-2), na forma de sulfato de abacavir, o medicamento combivir[®] [zidovudina (AZT, CAS 30516-87-1)/lamivudina (3TC, CAS 134678-17-4)].

Cada comprimido de combivir[®] contém 300 mg de AZT e 150 mg de 3TC e cada comprimido de ABC contém 300 mg deste fármaco. Ambos os medicamentos foram doados pelo Hospital de Doenças Tropicais/Dr Anuar Auad, Goiânia-GO. Os fármacos isolados, AZT e 3TC, foram adquiridos da Indústria Química de Goiás (IQUEGO).

As soluções foram preparadas na hora dos tratamentos e o solvente, água destilada, foi utilizado como controle negativo com o objetivo de determinar a frequência dos eventos espontâneos.

3.2. Teste para detecção de mutação e recombinação somática (SMART)

O SMART é um bioensaio *in vivo* que utiliza a *D. melanogaster* como organismo experimental. Esse teste foi desenvolvido por Ulrich Graf e colaboradores e publicado em 1984 (Graf et al., 1984). O SMART baseia-se na detecção e quantificação de pelos mutantes, que exibem a expressão fenotípica de lesões ocorridas em nível de DNA nas células dos discos imaginais das asas.

As alterações genéticas detectadas pelo SMART incluem mutações pontuais, mutações cromossômicas e/ou recombinação mitótica, as quais levam a perda da heterozigose de dois genes marcadores - *mwh* (*multiple wing hairs*) e *flr*³ (*flare*) - envolvidos na formação dos pelos das asas do indivíduo adulto. Os dois genes são recessivos e localizam-se em diferentes regiões do braço esquerdo do cromossomo 3, *mwh* (3-3.0) e *flr*³ (3-38.8) (Graf et al., 1984; Andrade & Lehmann, 2003).

A expressão fenotípica do gene *mwh* em condição de homozigose é caracterizada pela presença de três ou mais pelos por célula, ou seja, pelos múltiplos (Fig. 4A), enquanto que a expressão do gene *flr*³ é caracterizada pela forma do pelo que normalmente lembra uma óchama de velaô (Fig. 4B). A ausência de expressão dos genes mutantes caracteriza-se pela presença de um único pelo por célula (Fig. 4C) (Graf et al., 1984).

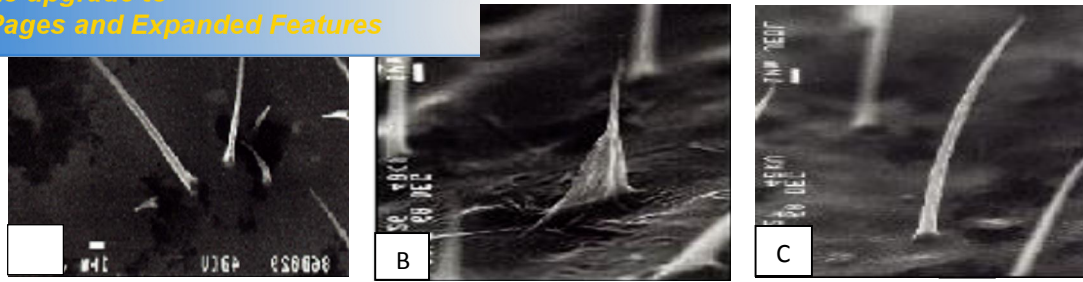


Figura 4. Visualização em microscopia eletrônica dos fenótipos dos pelos das asas de *D. melanogaster*: (A) pelos múltiplos, (B) pelo *flare* e (C) pelo normal.

A análise das lesões é feita por meio de observação de clones de pelos mutantes, formando manchas na superfície das asas dos adultos, que evidenciam fenótipos característicos dos genes envolvidos. O tipo de manchas mutantes fornece dados qualitativos dos eventos genéticos ocorridos, como mutação e/ou recombinação, e o número total destas manchas ou clones fornecem dados quantitativos sobre a atividade genotóxica de um dado composto (Andrade et al., 2004).

3.3. Linhagens de *D. melanogaster*

Foram utilizadas duas linhagens mutantes de *D. melanogaster*. A linhagem *mwh* (*mwh/mwh*) com seu marcador específico (pelos múltiplos) mantido em homozigose e a linhagem *flr*³(*flr*³/*ln*(3LR)TM3,*rip*^{psepl}(3)89 *Aabx*^{34e}*eBd*^S). O alelo *flr* é letal zigótico se estiver em homozigose. Entretanto, células do disco imaginal das asas homozigotas para este gene, são viáveis mesmo expressando fenotipicamente o gene *flr*. Neste caso, esses alelos são mantidos na linhagem em heterozigose, na presença de um cromossomo balanceador (TM3), portador de múltiplas inversões (Andrade & Lehmann, 2003).

3.4. Procedimento experimental

Para a obtenção das larvas utilizadas no procedimento, foi realizado o cruzamento padrão do SMART, de acordo com Graf et al. (1984). As larvas provenientes desse cruzamento apresentam duas constituições genóticas: trans heterozigotas (*mwh*+/*flr*³) para os marcadores recessivos *mwh* e *flr*³, cujos indivíduos adultos possuem extremidades das asas arredondadas (Fig. 5A), e

como balanceador TM3 ($mwh +/TM3, Bd^S$), que apresentam as asas com extremidades recortadas (Fig. 5B).

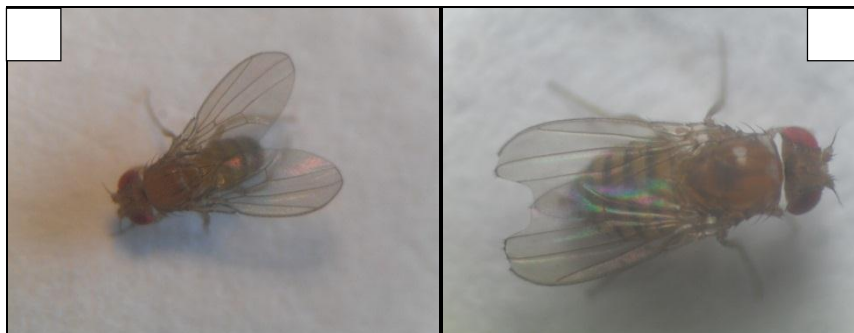


Figura 5. Fenótipos dos indivíduos adultos provenientes do cruzamento entre machos mwh e fêmeas flr^3 . (A) trans-heterozigoto ($mwh+/+flr^3$), (B) heterozigoto para o cromossomo TM3 ($mwh +/TM3, Bd^S$).

Para a realização dos experimentos os casais foram colocados em frascos de 300 mL contendo meio de cultura padrão (Fig. 6A), onde permaneceram por um período de três dias. Após este período, as moscas parentais foram transferidas para frascos contendo meio de ovoposição (Fig. 6B) composto por uma base sólida de ágar-ágar 2,5% coberta por aproximadamente 3 cm de fermento biológico, previamente aquecido em banho-maria e fermentado com sacarose.



Figura 6. Cruzamento padrão das moscas parentais entre machos mwh e fêmeas flr^3 . Em (A) meio de cultura padrão e (B) meio de ovoposição.

As moscas permaneceram neste meio por 8 h e após esse período foram retiradas e descartadas. Três dias depois (72 ± 4 h após início da ovoposição) as larvas de terceiro estágio foram coletadas do meio de ovoposição e grupos de 100

s de tratamento contendo 0,9 g de purê de batata instantâneo, hidratado com 3 mL das soluções de tratamento. As larvas ficaram expostas ao tratamento por aproximadamente 48 h, ou seja, até atingirem estágio de pupa. Após a eclosão das pupas, os indivíduos adultos foram coletados e conservados em álcool 70% (Fig. 7).



Figura 7. Moscas adultas conservadas em álcool 70%.

3.5. Montagem das lâminas

As moscas conservadas em álcool 70% foram lavadas com água e as asas foram destacadas do corpo com auxílio de duas pinças de ponta fina, sob a luz de uma lupa. Em seguida, as asas foram mergulhadas em solução de Faure (30 g de goma arábica, 20 mL de glicerol, 50 g de hidrato cloral e 50 mL de água). Ao serem retiradas desta solução, as asas foram alinhadas na superfície de uma lâmina de vidro (Fig. 8 e Fig. 9) e mantidas por 24 horas em temperatura ambiente dentro de uma placa de Petri (Fig. 10A). Cada lâmina foi montada com um total de 6 pares de asas de indivíduos fêmeas e 6 pares de machos. Para perfeita aderência, as asas foram cobertas com uma lamínula (24 x 32 mm) contendo uma gota de solução de Faure, e mantidas pressionadas por 24 h à temperatura ambiente, sobre blocos de metal (400 g) (Fig. 10B).

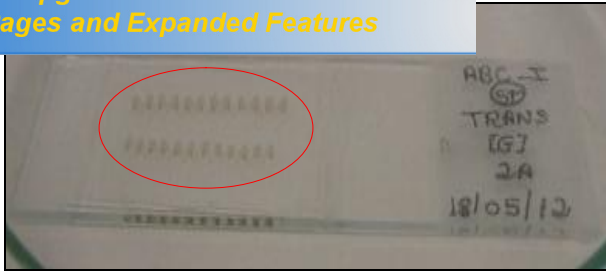


Figura 8. Montagem das lâminas para análise microscópica.



Figura 9. Visualização das asas alinhadas sob a luz de uma lupa com aumento de 20x.

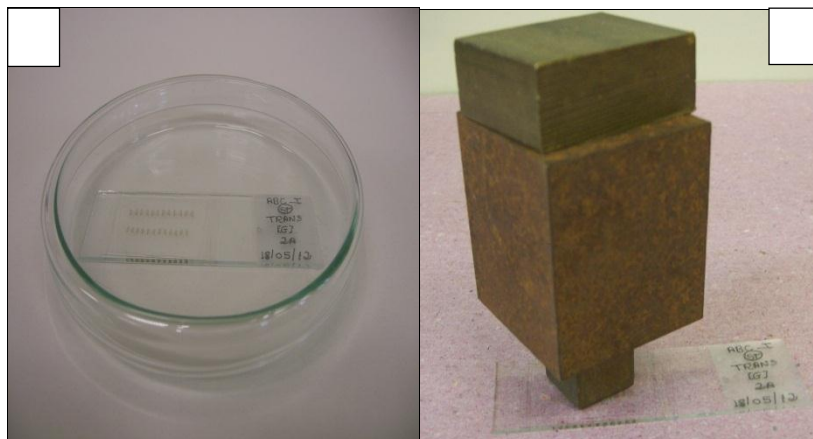


Figura 10. Lâmina montada com um total de 6 pares de asas de indivíduos fêmeas e 6 pares de asas de machos. (A) Pares de asas mantidas dentro de uma placa de Petri por 24 h em temperatura ambiente; (B) blocos de metal pressionando lâmina e lamínula para melhor aderência das asas.

das asas e classificação dos clones

Foram analisadas as superfícies dorsal e ventral das asas em microscópio óptico de luz (Fig. 11) com aumento de 400x, procurando identificar a presença de clones mutantes.



Figura 11. Visualização das asas em microscopia óptica.

Durante a análise, os clones encontrados foram devidamente anotados em protocolos, de acordo com as especificações de Graf et al., (1984). Quanto ao tipo de manchas os clones foram considerados simples (Fig. 12A e 12B), quando ocorreu expressão fenotípica de um dos marcadores *mwh* ou *flr*³, e gêmeos (Fig. 12C), quando ocorreu a expressão simultânea de ambos marcadores em células adjacentes.

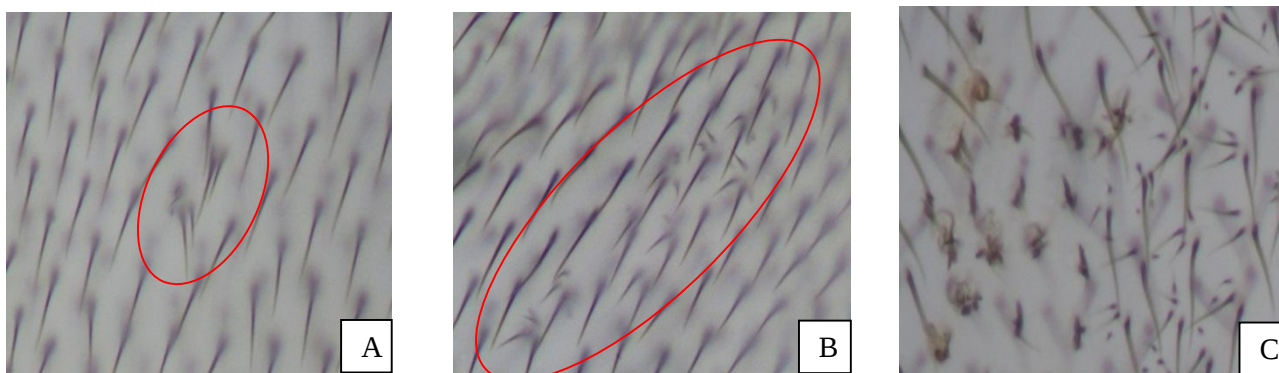


Figura 12. Classificação das manchas de acordo com Graf et al. (1984). (A) mancha simples pequena, (B) mancha simples grande e (C) mancha gêmea.

As manchas simples podem ser originadas tanto por eventos mutacionais, que incluem mutações pontuais e cromossômicas, bem como por recombinação mitótica. Já as manchas gêmeas ocorrem exclusivamente por recombinação mitótica. Os indivíduos adultos (F1) trans heterozigotos (*mwh*+/*flr*³) podem apresentar os dois tipos de clones (simples e gêmeos) originados por eventos como mutações pontuais,

mitótica. Já os indivíduos heterozigotos para o cromossomo TM3 (*mwh* +/TM3, *Bd^S*), apresentam apenas clones simples expressando o fenótipo pelos múltiplos, uma vez que o cromossomo balanceador TM3 que possui múltiplas inversões torna inviável o produto da recombinação (Graf et al., 1984; Andrade & Lehmann, 2003; Andrade et al., 2004).

Quanto ao tamanho os clones foram divididos em classes distintas de acordo como o número de células afetadas: 1, 2, 3-4, 5-8, 9-16, 17-32, 33-64, 65-128, 129-256, >256. Manchas, independente do tipo, que envolvem as duas primeiras classes (com uma ou duas células afetadas) são classificadas como pequenas e são formadas durante o último e/ou penúltimo ciclos de divisão mitótica e as demais são consideradas grandes e são produzidas mais cedo durante as primeiras divisões mitóticas do estágio larval.

3.7. Análise estatística

Para a análise dos efeitos genotóxicos do ABC isolado e em combinação, foram comparadas as frequências de manchas de pelos mutantes induzidas nas séries tratadas com o controle negativo (eventos espontâneos). Estas comparações estatísticas foram realizadas utilizando-se o teste binomial condicional, seguindo um procedimento de múltiplas escolhas proposto por Frei & Würigler (1988), que é baseado nas seguintes hipóteses: (i) hipótese nula H_0 : não há diferença entre a frequência de mutações do grupo controle (frequência espontânea) e do grupo tratado, e (ii) hipótese alternativa H_A : a frequência de mutações do grupo tratado é ϕ vezes maior do que a frequência espontânea obtida no grupo controle, onde ϕ é um fator de multiplicação inserido para minimizar os riscos de falso-positivo: $m = 2$ para manchas simples pequenas e total de manchas, pois elas apresentam altas frequências espontâneas e $m = 5$ para manchas simples grandes e gêmeas, porque elas raramente surgem de forma espontânea (Frei & Würigler, 1988).

Testando essas hipóteses, quatro diferentes diagnósticos estatísticos são possíveis:

- (i) inconclusivo: aceita-se ambas as hipóteses;
- (ii) negativo: aceita H_0 e rejeita H_A ;
- (iii) positivo: rejeita H_0 e aceita H_A ;
- (iv) fraco-positivo: rejeita-se ambas as hipóteses.

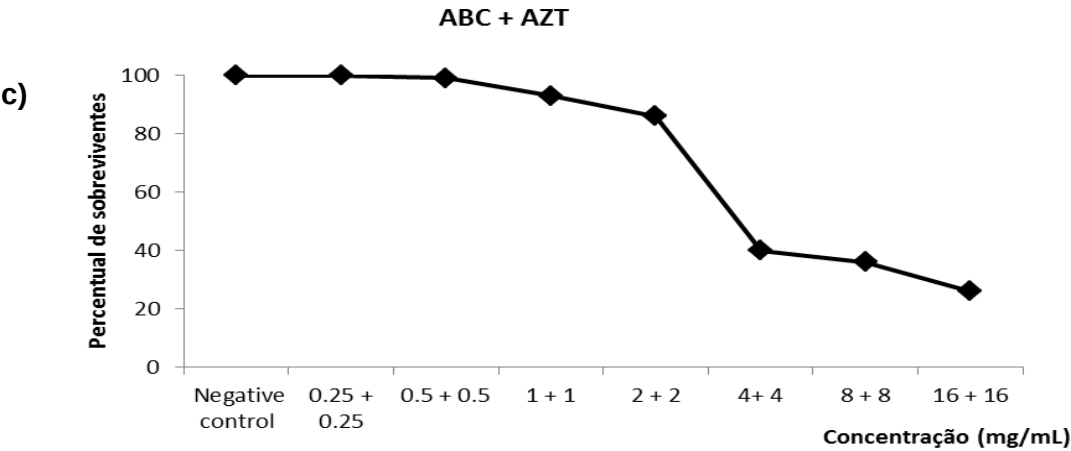
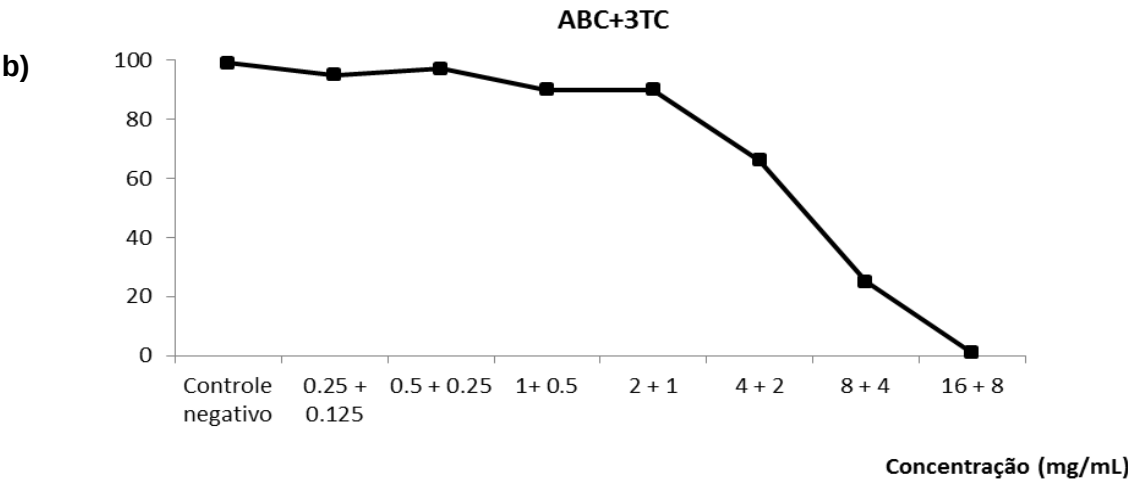
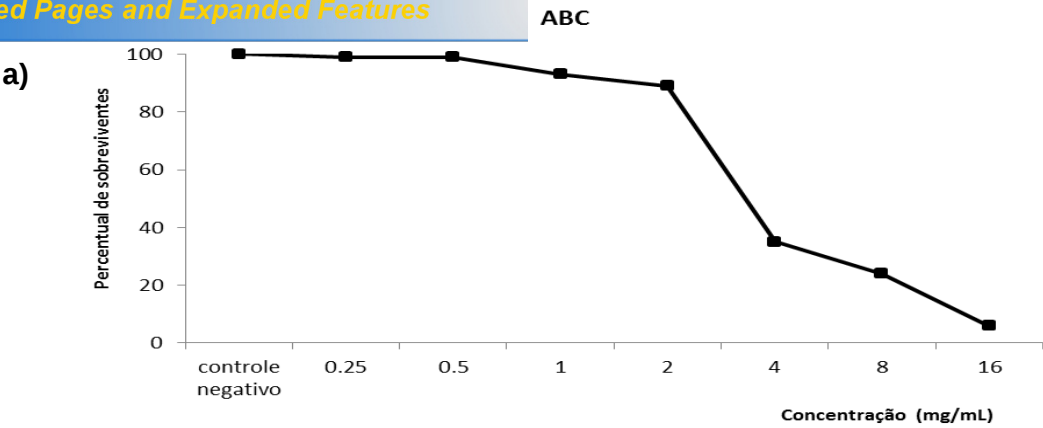
4.1. Efeito tóxico

O teste de toxicidade do ABC de forma isolada ou combinada utilizou grupos de 100 larvas de terceiro estágio provenientes do cruzamento padrão que foram tratados por 48 horas com as diferentes concentrações dos tratamentos. Após a eclosão as moscas adultas sobreviventes foram contadas e armazenadas em álcool 70%. O número de moscas sobreviventes por tubo de tratamento nos forneceu dados para estabelecer as curvas de sobrevivência (Fig.13), que é a representação gráfica da toxicidade dos compostos avaliados. Os resultados aqui apresentados foram obtidos a partir de dois experimentos independentes.

Na avaliação dos efeitos tóxicos, foram usadas as concentrações 0,25; 0,5; 1; 2; 4; 8; 16 mg/mL tanto para ABC isolado quanto para as combinações, nas proporções dos coquetéis utilizadas clinicamente: 2:2 (ABC/AZT), 2:1 (ABC/3TC e AZT/3TC) e 2:1:2 (ABC/3TC/AZT).

O resultado deste procedimento demonstrou que ABC isolado (Fig13a) foi capaz de comprometer o desenvolvimento larval de *D. melanogaster* em concentrações maiores ou igual a 4 mg/mL. Os resultados de toxicidade das combinações contendo ABC foram similares ao observado com este fármaco isolado (Fig. 13b,13c,13d). Portanto, a presença da AZT, 3TC ou AZT+3TC não alterou de forma significativa o padrão de toxicidade induzido pelo ABC.

Entretanto, quando comparamos a toxicidade induzida pelas combinações AZT/3TC e ABC/AZT/3TC, pudemos concluir que o ABC foi o responsável pelo aumento nas frequências de toxicidade.



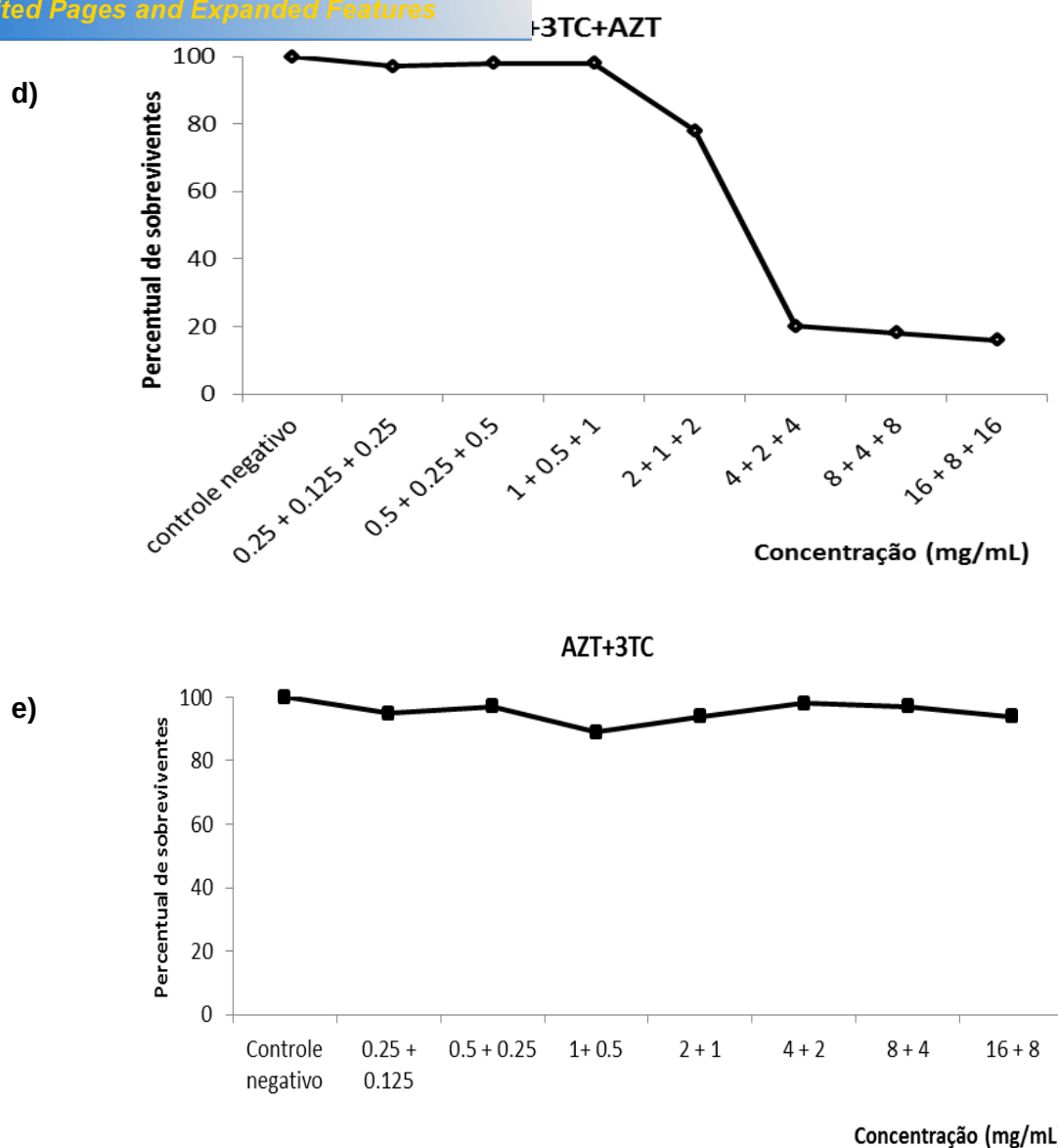


Figura 13. Curvas de sobrevivência dos indivíduos tratados com diferentes concentrações do ABC isolado e em combinação.

Para proceder a análise de genotoxicidade foram utilizadas apenas as quatro menores concentrações de ABC (0,25; 0,5; 1; 2 mg/mL), baseando-se no percentual de sobreviventes do ABC isolado, que mostraram percentual de indivíduos adultos sobreviventes superior a 70%. O resultado resumido desta análise e o diagnóstico estatístico para cada concentração do ABC e das combinações estão representados na Tabela 1.

Foi analisado um total de quarenta indivíduos para cada concentração testada, derivados dos dois experimentos independentes. Na análise estatística dos resultados, foram comparadas as frequências de manchas mutantes em cada grupo tratado com o seu respectivo controle negativo (água destilada).

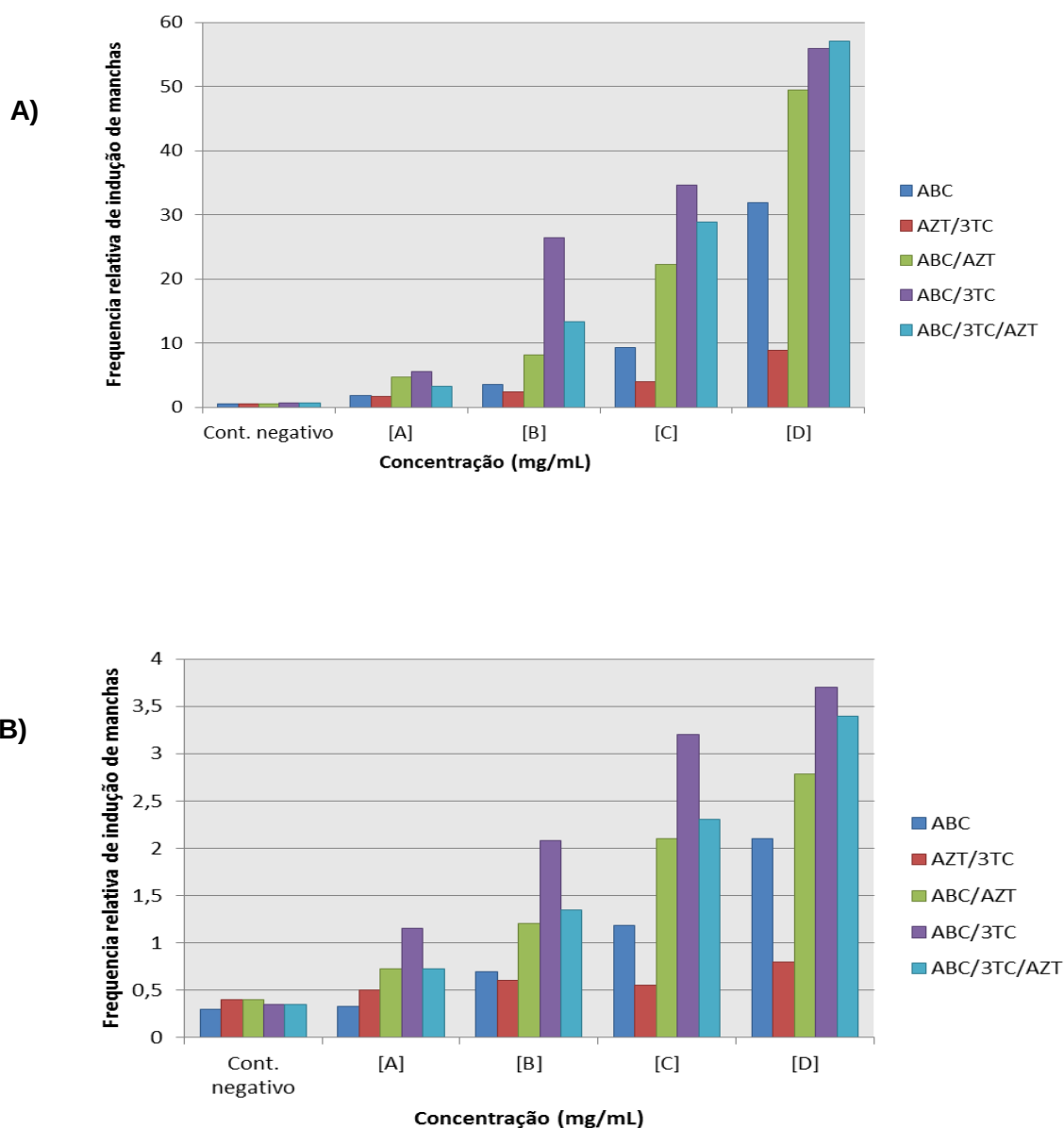
Nos indivíduos trans heterozigotos ($mwh+/+flr^3$), nos quais podem ser observado tanto eventos mutacionais quanto recombinacionais, houve aumento significativo na frequência total de indução de manchas em todos os tratamentos tanto com ABC isolado quanto nas combinações (Fig.14A). Por outro lado, os efeitos induzidos pela combinação AZT/3TC foram bem inferiores àqueles observados em todos os tratamentos contendo ABC. Dentre todos os tratamentos, ABC/3TC foi o que causou maior frequência de indução em todos os tipos de manchas (simples pequena, simples grande e gêmea) com exceção da maior concentração testada na combinação ABC/3TC/AZT (Tabela 1).

Considerando a indução de efeito genotóxico nos indivíduos trans heterozigotos de todos os tratamentos, foram analisados os indivíduos heterozigotos para o cromossomo TM3, visando quantificar separadamente, a contribuição da mutação e da recombinação na atividade genotóxica total do ABC individual e das combinações.

Nos indivíduos heterozigotos para o cromossomo TM3, nos quais são observados eventos exclusivamente mutacionais, também foram observados aumentos significativos nas frequências totais de manchas quando comparado com o controle negativo (Fig.14B), com exceção dos tratamentos com AZT/3TC nos quais os valores das frequências de manchas nas séries tratadas ficaram próximos às

controles, considerando manchas simples pequenas, manchas simples grandes, e, total de manchas (Tabela 1).

Para todos os tratamentos, as frequências de manchas mutantes induzidas nos indivíduos heterozigotos para o cromossomo TM3 foram bem menores que aquelas induzidas nos indivíduos trans heterozigotos (Tabela 1), demonstrando que a atividade mutagênica destes fármacos neste bioensaio contribui pouco para a genotoxicidade total.



ABC: [A] = 0.25; [B] = 0.5; [C] = 1; [D] = 2 mg/mL. Nas combinações, foram usadas concentrações iguais à de ABC, na proporção 2:1 (ABC/3TC e AZT/3TC); 1:1 (ABC/AZT) e 2: 1: 2 (ABC/3TC/AZT).

frequências relativas do total de indução de manchas
mutantes em indivíduos tratados com ABC, ABC/AZT, ABC/3TC, ABC/3TC/AZT e AZT/3TC
A: indivíduos trans heterozigotos. **B:** indivíduos heterozigotos para o cromossomo TM3.

Para calcular a porcentagem de recombinação e mutação, fez-se a razão entre o total de manchas dos indivíduos trans heterozigotos e heterozigotos para o cromossomo TM3, de acordo com Frei e Würigler (1988). O resultado da análise de toxicidade genética induzida destaca a recombinação somática como a principal alteração genética, induzida pelos tratamentos, sem relação dose-resposta, com índices variando de 83,7 a 98%.

O conjunto dos resultados apresentados mostra que a combinação AZT/3TC foi a menos tóxica e também a menos genotóxica, portanto a presença da ABC foi a responsável pelos incrementos nas frequências de toxicidade e genotoxicidade.



Your complimentary
 use period has ended.
 Thank you for using
 PDF Complete.

Click Here to upgrade to
 Unlimited Pages and Expanded Features



PDF Complete

Click Here to upgrade to unlimited Pages and Expanded Features

your complimentary use period has ended.

Thank you for using PDF Complete.

</



Your complimentary
 use period has ended.
 Thank you for using
 PDF Complete.

[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)

				0,15 (06)	0,03 (01)	0,53 (21)	21	1,08				
				1,65 (66) +	0,75 (30) +	4,65 (186) +	185	9,48	8,40	92,0	8,0	
0,5	0,25	40	4,08 (163) +	2,63 (105) +	1,53 (61) +	8,23 (329) +	326	16,70	15,63	89,5	10,5	
1	0,5	40	10,55(422) +	8,13 (325) +	3,60 (144) +	22,28 (891) +	886	45,39	44,31	92,1	7,9	
2	1	40	22,90 (916)+	19,13 (765)+	7,43 (297) +	49,45 (1978) +	1961	100,46	99,39	95,1	4,9	
mwh/TM3												
Controle negativo		40	0,40 (16)	0,00 (00)		0,40 (16)	16	0,82				
0,25	0,125	40	0,63(25) i	0,10 (04) i		0,73 (29) +	29	1,49	0,67			
0,5	0,25	40	1,08 (43) +	0,13 (05) i	f	1,20 (48) +	48	2,46	1,64			
1	0,5	40	1,68 (67) +	0,43 (17) +		2,10 (84) +	84	4,30	3,48			
2	1	40	2,10 (84) +	0,68 (27) +		2,78 (111) +	111	5,69	4,87			
ABC		3TC		AZT								
mwh/flr³												
Controle negativo		40	0,63(25)	0,05 (02)	0,00 (0)	0,68 (27)	27	1,38				
0,25	0,125	40	1,98 (79) +	0,75 (30) +	0,50 (20) +	3,23 (129) +	129	6,61	5,23	85,3	14,7	
0,5	0,25	40	6,18 (247) +	4,98 (199) +	2,23 (89) +	13,38 (535) +	531	27,20	25,82	92,1	7,9	
1	0,5	40	13,38 (535) +	11,25 (450) +	4,20 (168) +	28,83 (1153) +	1105	56,61	55,23	91,8	8,2	
2	1	40	23,63 (945) +	25,23(1009) +	8,25 (330) +	57,10 (2284) +	2272	116,39	115,01	94,6	5,4	
mwh/TM3												
Controle negativo		40	0,35 (14)	0,00 (0)		0,35 (14)	14	0,72				
0,25	0,125	40	0,65 (26) +	0,08 (03) i		0,73 (29) +	29	1,49	0,77			
0,5	0,25	40	1,13 (45) +	0,23 (09) +	f	1,35 (54) +	54	2,77	2,05			
1	0,5	40	1,65 (66) +	0,65 (26) +		2,30 (92) +	92	5,23	4,51			
2	1	40	2,68 (107) +	0,73 (29) +		3,40 (136) +	136	6,97	6,25			
AZT		3TC										
mwh/flr³												
Controle negativo		40	0,50 (20)	0,08 (03)	0,00(0)	0,58 (23)	23	1,18				
0,25	0,125	40	0,95 (38) +	0,40 (16) +	0,30(12) +	1,65 (66) +	66	3,38	2,20	90,9	9,1	
0,5	0,25	40	1,38 (55) +	0,58 (23) +	0,48 (19) +	2,43 (97) +	97	4,97	3,79	89,2	10,8	
1	0,5	40	1,60 (64) +	1,35 (54) +	0,98 (39) +	3,93 (157) +	155	7,94	6,76	95,4	4,6	
2	1	40	3,85 (154) +	3,53 (141) +	1,53 (61) +	8,90 (356) +	356	18,24	17,06	95,2	4,8	
mwh/TM3												
Controle negativo		40	0,38 (15)	0,03 (01)		0,40 (16)	16	0,82				
0,25	0,125	40	0,48 (19) i	0,03 (01) i	f	0,50 (20) i	20	1,02	0,20			
0,5	0,25	40	0,50 (20) i	0,10 (04) i		0,60 (24) i	24	1,23	0,41			
1	0,5	40	0,50 (20) i	0,05 (02) i		0,55 (22) i	22	1,13	0,31			
2	1	40	0,68 (27) i	0,13 (05) i		0,80 (32) i	32	1,64	0,82			

^a Diagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würgler (1988): +, positivo; -, negativo; i, inconclusivo. *m*, fator de multiplicação para a avaliação de resultados significativamente negativos. Níveis de significância a = b = 0,05.

^b Incluindo manchas simples *flr³* raras. ^c Considerando os clones *mwh* para as manchas simples *mwh* e para as manchas gêmeas. ^d Calculado de acordo com Frei et al. (1992). ^e *C* = 48.000, isto é, número aproximado de células examinadas por indivíduo.

^f Apenas manchas simples *mwh* podem ser observadas nos indivíduos heterozigotos *mwh/TM3*, já que o cromossomo balanceador *TM3* não contém o gene mutante *flr³*. ^g Porcentagem de recombinação calculada de acordo com a fórmula R = 1/2 [(n/NC em indivíduos *mwh/TM3*)/(n/NC em indivíduos *mwh/flr³*)]*100.

A classe dos NRTIs englobam fármacos que são análogos estruturais de nucleosídeos endógenos, capazes de serem reconhecidos e incorporados erroneamente como intermediários metabólicos normais durante metabolismo de ácidos nucleicos. Esses nucleosídeos são os principais componentes da HAART e têm demonstrado efeitos colaterais relacionados com a sua genotoxicidade (Olivero, 2007).

Encontram-se na literatura, vários estudos experimentais utilizando testes *in vitro* e *in vivo* demonstrando o potencial mutagênico e carcinogênico de NRTIs separadamente. No entanto, foram encontrados poucos ensaios investigando a atividade mutagênica e carcinogênica de combinações de NRTIs.

Estudos com NRTIs isolados e em combinação revelaram que o potencial genotóxico desta classe pode ter efeito sinérgico, antagônico ou aditivo quando administrados em combinação (Torres et al., 2007; Guimarães et al., 2013). No presente trabalho, analisamos os efeitos da atividade genotóxica do ABC isolado em combinação com AZT e/ou 3TC em células somáticas de *D. melanogaster*.

Os resultados de toxicidade mostraram que os efeitos tóxicos das combinações que contém ABC são semelhantes aos efeitos deste fármaco isolado. Este resultado corroboram os resultados de citotoxicidade obtidos por Torres et al., (2007), que observaram que os efeitos tóxicos induzidos pela combinação ABC/3TC/AZT eram semelhantes aos efeitos induzidos pelo ABC isolado.

Na literatura, foram encontrados poucos estudos que informam sobre a genotoxicidade do ABC isolado. Ching et al., (1995) demonstraram que ABC não foi mutagênico em ensaio de mutagenicidade com bactéria. E revisões feitas por Brambilla et al., (2012) e Wu et al., 2012 mostraram que ratos e camundongos tratados oralmente com ABC por dois anos, tiveram aumento na incidência de tumores malignos e não malignos.

Os resultados de Kaushik et al., (2014) demonstrou que o ABC foi capaz de induzir a formação de micronúcleos de maneira dose dependente em

os, e frequências aumentadas de aberrações cromossômicas no teste de aberrações cromossômicas com células de medula óssea, relacionada com quebras de cromátides-irmãs, deleções e poliploidia. A genotoxicidade do ABC isolado induzida em células somáticas foi confirmada em neste estudo. Além disso, verifica-se que a atividade deste fármaco está relacionada com recombinação mitótica com índices relativamente altos, variando de 83,7 a 98%.

Os resultados mostraram que a frequência total de manchas mutantes induzidas pelo ABC quando administrado individualmente foi bem menor do que as frequências totais das combinações que continham este fármaco, demonstrando que o potencial genotóxico do fármaco isolado e combinações podem ser distintos. Além disso, algumas combinações foram mais genotóxicas que outras. O ABC quando administrado com 3TC demonstrou ser mais genotóxico do que quando administrado com AZT.

Vários fatores podem influenciar a toxicidade dos NRTIs, entre eles as diferenças individuais nas concentrações intracelulares dos análogos nucleosídeos (Anderson et al., 2004; Paintsil et al., 2011). Foi demonstrado que o tempo de meia-vida intracelular da forma trifosfato de ABC, 3TC e AZT são de 20, 22 e 7 h, respectivamente (Anderson et al., 2004). Sabendo que as concentrações intracelulares desses análogos no interior da célula influencia na toxicidade e que o tempo de meia vida dos mesmos, é relativamente longo, isso nos leva a inferir que a genotoxicidade induzida tanto por ABC isolado quanto pelas combinações pode, pelo menos em parte, ser explicada pelo período contendo altas concentrações desses análogos no meio intracelular. A permanência dos análogos dentro da célula mantém alterado o *pool* de nucleosídeos/nucleotídeos e isso permite que esses análogos de bases sejam utilizados como substrato pelas DNA-polimerases por longos períodos.

Nossos resultados mostraram que, quando o ABC foi administrado isoladamente induziu altas frequências de manchas mutantes, mas as frequências foram ainda maiores quando ABC foi administrado com AZT e/ou 3TC. Isto indica que AZT e 3TC exercem efeitos genotóxicos sinérgicos ou aditivos com ABC e isso foi verificado quando comparamos os tratamentos

onde foi demonstrado que AZT/3TC exerceu o menor efeito genotóxico entre todos os tratamentos.

Resultados similares foram encontrados por Venhoff et al., (2007) que avaliaram a toxicidade mitocondrial induzida por NRTIs e mostraram que a toxicidade do ABC foi aumentada quando combinado com AZT ou 3TC.

Tem sido demonstrado que a combinação de ABC/3TC é ideal e eficiente para o tratamento HIV/AIDS, porque não há competição para a fosforilação intracelular destes NRTIs (Revisado por Sivasubramanian et al., 2010). Loeliger et al., (2001) também mostraram que a farmacocinética da 3TC não é afetada significativamente pelo ABC.

Diante disso, os resultados encontrados em nosso estudo com a combinação ABC/3TC e ABC/3TC/AZT, as quais mostraram os maiores efeitos genotóxicos em relação às outras combinações testadas, podem ser explicados em termos de altas concentrações tanto do CBV-trifosfato quanto da 3TC-trifosfato. Uma vez que a eficácia de fosforilação por cinases celulares pode não ser afetada pela competição entre estes análogos, como consequência há maior disponibilidade de ambos os análogos em relação aos nucleotídeos endógenos, possibilitando maior utilização desses NRTIs pelas DNA-polimerases.

Os efeitos genotóxicos da combinação ABC/3TC/AZT foram avaliados por Olivero et al., (2013). Esse estudo demonstrou que a atividade desta combinação está associada com amplificação centrossomal e formação de micronúcleos. Adicionalmente, Torres et al., (2007) demonstraram que esta combinação também é mutagênica em células linfoblastóides humana. Os resultados apresentados neste estudo, a genotoxicidade da tripla combinação foi associada tanto com eventos mutacionais quanto recombinacionais, no entanto, o potencial recombinogênico foi relativamente maior.

Não foram encontrados estudos de mutagenicidade e carcinogenicidade para análise das combinações ABC/AZT e ABC/3TC.

Os objetivos do presente trabalho foram avaliar o potencial tóxico e genotóxico do antirretroviral ABC, quando administrado isolado e em combinação com AZT e/ou 3TC utilizando o SMART, quantificar separadamente a contribuição de dois eventos envolvidos no processo carcinogênico: mutação e recombinação. Diante dos resultados concluímos que:

- I) O ABC comprometeu o desenvolvimento das larvas de *D. melanogaster* de forma significativa em concentrações superiores a 4 mg/mL.
- II) As combinações que contém ABC têm efeitos tóxicos semelhantes ao ABC isolado.
- III) Dentre todas as combinações, AZT/3TC demonstrou menor potencial tóxico e menor efeito genotóxico nas concentrações testadas.
- IV) Todos os tratamentos foram capazes de induzir alterações genéticas relacionadas com mutação e recombinação somática.
- V) O potencial recombinogênico tanto de ABC isolado quanto em combinação foi relativamente alto, com índices superiores a 83,7%.

De maneira geral, os resultados obtidos no presente trabalho destacam a importância de definir o perfil mutagênico e recombinogênico das drogas usadas na HAART, uma vez que a terapia anti-HIV é designada para ser um tratamento em longo prazo. Neste contexto, dado a grande similaridade genética e bioquímica do organismo modelo *D. melanogaster*, este estudo contribui para uma avaliação cuidadosa do risco/benefício no momento da indicação do ABC como monoterapia, bem como suporte para uma investigação no caso das terapias combinadas, no intuito de oferecer sempre que possível mais segurança para os pacientes que são submetidos ao tratamento antirretroviral.

ICAS

- Adam J, Eriksson KK, Schnyder B, Fontana S, Pichler WJ, Yerly D. Avidity determines T-cell reactivity in abacavir hypersensitivity. *Eur J Immunol* **2012**; 42: 1706-1716.
- Anderson PL, Kakuda TN, Lichtenstein KA. The cellular pharmacology of nucleoside-and nucleotide-analogue reverse-transcriptase inhibitors and its relationship to clinical toxicities. *Clin Infect Dis* **2004**; 38:743-753.
- Andrade HHR, Lehmann M. Teste para detecção de mutação e recombinação somática (SMART) em *Drosophila melanogaster*. In Ribeiro LR, Salvadori DMF, Marques EK. Mutagênese ambiental, Canoas: Editora ULBRA, Edição Única. **2003**; p.281-307.
- Andrade HHR, Reguly ML, Lehmann, M. *Drosophila* Cytogenetics Protocols. Edited by: D. S. Henderson. *Methods in Molecular Biology*. **2004**; 247:389-409.
- Andrade CH, Freitas LM, Oliveira V. Twenty-six years of HIV science: an overview of anti-HIV drugs metabolism. *Brazilian Journal Pharmaceutical Sciences* **2011**; 47: 2.
- André-Schmutz A, Dal-Cortivo L, Six E, Kaltenbach S, Fabienne Cocchiarella F, Chenadec JL, et al. Genotoxic signature in cord blood cells of newborns exposed in utero to a zidovudine-based antiretroviral combination. *J Infect Dis* **2013**; 208:235-43.
- Barbier O, Turgeon D, Girard C, Green MD, Tephly TR, Hum DW, Bélanger A. 3-azido-2-deoxythymidine (AZT) is glucuronidated by human UDP-glucuronosyltransferase 2B7 (UGT2B7). *Drug Metab Dispos* **2000**; 28: 497-502.
- Batista JCR. Mecanismo de ação de substâncias antivirais. Porto. Dissertação [Mestrado em Ciências farmacêuticas] - Universidade Fernando Pessoa; **2011**.
- Bayram S, & Topaktas M. Confirmation of the Chromosome Damaging Effects of Lamivudine in In Vitro Human Peripheral Blood Lymphocytes. *Environ Mol Mutagen* **2008**; 49:328-333.
- Benhammou V, Warszawski J, Bellec S, François D, Nicolas A, Brigitte L, et al. Incidence of cancer in children perinatally exposed to nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *AIDS Oct* **2008**; 22:2165-77.
- Bier E. *Drosophila*, the golden bug, emerges as a tool for human genetics. *Nat Rev Genet* **2005**; 6:9-23.
- Bishop AJR, Schiestl RH. Role of homologous recombination in carcinogenesis. *Exp Mol Pathol* **2003**; 74: 94-105.

- l Y, Semino-Mora C, Yu M, et al. Centrosomal amplification and aneuploidy induced by the antiretroviral drug AZT in hamster and human cells. *Mutat Res* **2009**; 665:67-74.
- Brambilla G, Mattioli F, Robbiano L, Martelli A. Update of carcinogenicity studies in animals and humans of 535 marketed pharmaceuticals. *Mutat Res* **2012**; 750:1-51
- Brasil - Ministério da Saúde. Disponível em:
<http://www.aids.gov.br/pagina/o-que-e-hiv>. Acesso em: 15/06/14. **(2014a)**.
- Brasil - Ministério da Saúde. Boletim epidemiológico Aids e DST 2014.
Disponível em:
<http://www.aids.gov.br/sites/default/files/anexos/publicacao/2014/56677/boletim_2014_1_pdf_60254.pdf>. Acesso em: 16/12/14. **(2014b)**
- Butt AA, Chang CC, Kuller L, Goetz MB, Leaf D, Rimland D, et al. Risk of heart failure with human immunodeficiency virus in the absence of prior diagnosis of coronary heart disease. *Arch Intern Med*. **2011**; 171: 737-743.
- Campos PB, Sartore RC, Ramalho BL, Costa ES, Rehen SK. Cycle arrest and aneuploidy induced by zidovudine in murine embryonic stem cells. *Mutagenesis* **2012**; 27(4):431-6.
- Carlini F, Ridolfi B, Molinari A, Parisi C, Bozzuto G, Toccaceli L, et al. The Reverse Transcription Inhibitor Abacavir Shows Anticancer Activity in Prostate Cancer Cell Lines. *Plos One* **2010**; 5 (12):e14221.
- Carr A, Cooper DA. Adverse effects of antiretroviral therapy. *The Lancet*. **2000**; (356): 1423-30.
- Chiappini E, Berti E, Ganesinb K, Petrara M R, Galli L, Giaquinto C, Martino M, Rossi ADe. Pediatric Human Immunodeficiency Virus infection and cancer in the Highly Active Antiretroviral Treatment (HAART) era. *Cancer Lett*. **2014**; 28; 347(1):38-45
- Ching SV, Ayers KM, Dornsife RE, Grebe GL, Howard JL. Nonclinical toxicology and in vitro toxicity studies with the novel anti-HIV agent (1S,4R)-4-[2-amino-6-(cyclopropylamino)-9H-purin-9-yl]-2-cyclopentene-1-methanol (1592U89) succinate. Abstract. *NLM aidsline* **1995**.
- Cretton EM, Schinazi RF, McClure HM, Anderson DC, Sommadossi JP. Pharmacokinetics of 3'-azido-3'-deoxythymidine and its catabolites and interactions with probenecid in rhesus monkeys. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **1991**; 35(5):801-807.
- Cross SJ, Rodman JH, Lindsey JC, Robbins BL, Rose CH, Yuen JG, D'angelo, LJ. Abacavir and metabolite pharmacokinetics in HIV-1 infected children and adolescents. *J Acquir Immune Defic Syndr*. **2009**; 51:(1)54-59.

De Clercq E. Anti-HIV drugs: 25 compounds approved within 25 years after the discovery of HIV. *Int J Antimicrob Agents* **2009**; 33:307-320.

De Clercq E. Antiretroviral drugs. *Curr Opin Pharmacol* **2010**; 10: 507-515.

Erdtmann B. A genotoxicidade nossa de todos os dias. In Silva J, Erdtmann B, Pêgas-Henrique JA. *Genética Toxicológica*. Porto alegre: ED. Alcance. **2003**: p 23-47.

Faletto MB, Miller WH, Garvey EP, St Clair MH, Daluge SM, Good SS. Unique intracellular activation of the potent anti-human immunodeficiency virus agent 1592U89. *Antimicrob Agents Chemother* **1997**; 41:1099 -1107.

Food and Drug Administration (FDA): Disponível em:
<http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2002/20564s14,20596s15lbl.pdf> Acesso em: 05/14. **(2014)**

Food and Drug Administration (FDA): Disponível em:
<http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2011/020977s023,020978s027lbl.pdf> Acesso em: 03/13. **(2012)**.

Fonseca CA, Pereira DG. Aplicação da genética toxicológica em planta com atividade medicinal. *Infarma* **2004**; 16:7-8.

Franchi LP, Pentiado NHGR, Silva RN, Guimaraes NN, Jesuino RSA, Andrade HHR, et al. Mutagenic and recombinogenic effects of lamivudine and stavudine antiretrovirals in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Food Chem Toxicol* **2009**; 47: 578-582.

Frei H, Wurgler FE. Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assay indicate a positive, negative, or inconclusive result. *Mutat Res* **1988**; 203 p.297-308.

Gardner K, Hall PA, Chinnery PF, Payne BAI. HIV Treatment and Associated Mitochondrial Pathology: Review of 25 Years of in Vitro, Animal, and Human Studies. *J Toxicol Pathol* **2013**; 00: 1-12.

Gibbs D, Walker A, Kaye S, Rossi A, Ait-Khaled M, Pillay D, et al. Evolution of antiretroviral phenotypic and genotypic drug resistance in antiretroviral naive HIV-1-infected children treated with abacavir/lamivudine, zidovudine/lamivudine or abacavir/zidovudine, with or without nelfinavir (the PENTA 5 trial). *Antiviral therapy* **2002**; 7: 293-303.

Good SS, Daluge SM, Ching SV, Ayers MM, Mahony WB, Falletto M, et al. 1592U89 succinate-preclinical toxicological and disposition studies and preliminary clinical pharmacokinetics. Abstract. *Antiviral Res* **1995**; 26:A229.

Graf U, Wurgler FE, Katz AJ, Frei H, Juon H, Hall CB, et al. Somatic Mutation and Recombination Test in *Drosophila melanogaster*. Environ Mutagen **1984**; 6:153-188.

Guimarães NN, Silva CJ, Andrade HHR, Dihl RR, Lehmann M, Cunha KS. Comparative analysis of genetic toxicity of antiretroviral combinations in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. Food Chem Toxicol **2013**; 53: 299-309.

Hanahan D, Weinberg RA. Review: Hallmarks of Cancer: The Next Generation. Cell **2011**; 144: 646-674.

Hawkins T. Understanding and managing the adverse effects of antiretroviral therapy. Antiviral Res **2010**; 85: 201-209.

Instituto Nacional de Câncer (INCA). Disponível em:
<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/cancer/site/oquee> Acesso em: 07/14. (2014).

Johnson MA, Moore KHP, Yuen GJ, Bye A, Pakes GE. Clinical Pharmacokinetics of Lamivudine. Clin Pharmacokinet **1999**; 36: 41-66.

Kaushik D, Saini R, Rana AC, Kaushik P. Genotoxicity study of antiretroviral drug used in HIV- therapy. J Innov Biol **2014**; 1: 63-67.

Klug W, et al. Conceitos de Genética. Tradução: Maria Regina Borges-Osório, Rivo Fisher. Porto Alegre. 9ª ed. Artmed. **2010** p. 426 e 514.

Lanier E, Givens N, Stone C, Griffin P, Gibbs D, Walker S, et al. Effect of concurrent zidovudine use on the resistance pathway selected by abacavir-containing regimens. HIV Medicine **2004**; 5: 394-399.

Lloyd TE, Taylor, J. P. Flightless Flies: *Drosophila* models of neuromuscular disease. Ann N Y Acad Sci **2010**; 1184: e1-20.

Loeliger AE, Steel H, McGuirk S, Powell WS, Hetherington SV. The abacavir hypersensitivity reaction and interruptions in therapy. AIDS. **2001** Jul; 15(10):1325-6.

Lourenço ED, Amaral VS, Lehmann M, Dihl RR, Virginia M, Schmitt VM, Cunha KS, et al. Micronuclei induced by reverse transcriptase inhibitors in mononucleated and binucleated cells as assessed by the cytokinesis-block micronucleus assay. Genetics and Molecular Biology **2010**; 33 (4): 756-760.

Mallal S, Phillips E, Carosi G, et al. HLA-B*5701 screening for hyper-sensitivity to abacavir. The New England Journal of Medicine **2008**; 358:568-579.

Manenti SA. Epidemiologia e Caracterização Molecular do HIV-1 em Gestantes do Sul de Santa Catarina do Período de Janeiro a Dezembro de 2007. 136 f.

- ias da Saúde) ã Universidade do Extremo Sul
Catarinense. Crici ma. (2008).
- Mccoll DJ, Chappey C, Parkin NT, Miller MD. Prevalence, genotypic associations and phenotypic characterization of K65R, L74V and other HIV-1 RT resistance mutations in a commercial database. *Antiviral Therapy* **2008**; 13:189-197.
- Mcdowell JA, Chittick GE, Stevens CP, EDwards KD, Stein DS. Pharmacokinetic Interaction of Abacavir (1592U89) and Ethanol in Human Immunodeficiency Virus-Infected Adults. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2000**; 44 (6): 1686 1690.
- Miller CJ, Baker JV, Bormann AM, Erlandson KM, Huppler Hullsiek K, Justice AC, et al. Adjudicated Morbidity and Mortality Outcomes by Age among Individuals with HIV Infection on Suppressive Antiretroviral Therapy. *PLoS ONE* **2014** Apr; 11; 9(4): e95061.
- Mittelstaedt, RA, Von Tungeln LS, Shaddock JG, Dobrovolsky VN, Beland FA, Heflich RH. Analysis of mutations in the Tk gene of Tk(+/-) mice treated as neonates with 3'-azido-3'-deoxythymidine (AZT). *Mutat Res* **2004** Mar 22; 547(1-2):63-9.
- Olivero OA, Anderson L, Diwan B. Transplacental effects of 3 azido-3  deoxythymidine (AZT): tumorigenicity in mice and genotoxicity in mice and monkeys. *J of the National Cancer Institute* **1997**; 69: 1602-1608
- Olivero OA. Mechanisms of genotoxicity of nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *Environ Mol Mutagen* **2007**; 48: 215-223.
- Olivero OA, Torres LR, Gorjifard S, Momot D, Marrogi E, Divi LR, et al. Perinatal exposure of patas monkeys to antirretroviral nucleoside reverse-transcriptase inhibitors induces genotoxicity persistent for up to 3 years of age. *J Infect Dis* **2013**; 208: 244-248.
- Ostrov DA, Grant BJ, Pompeu YA, Sidney J, HarndahL M, Southwood S, et al. Drug hypersensitivity caused by alteration of the MHC-presented self-peptide repertoire. *PNAS* **2012**; 109: (25)9959-9964.
- Paintsil E, Dutschman GE, Hu R, Grill SP, Wang CJ, Lam W et al. Intracellular Accumulation of Anti-HIV Determinants of Individual Variation in Nucleoside Analog Metabolites. *Antimicrob Agents Chemother.* **2011**; 55(2): 895 903.
- Pandey UB, Nichols CD. Human Disease Models in *Drosophila melanogaster* and the Role of the Fly in Therapeutic Drug Discovery. *Pharmacol Rev* **2011**; 63: 411-436.
- Pavlos R, Mallal S, Phillips E. HLA and pharmacogenetics of drug hypersensitivity. *Pharmacogenomics* **2012**; 13: (11)1285-1306.

1. Estratégias Farmacológicas para a Terapia Anti-AIDS. *Química Nova*. **2002**; 25:(6b)1108-1116.
- Perez-Olmeda M, Garcia-Perez J, Mateos E, Spijkers S, Ayerbe MC, Carcas A, et al. In vitro analysis of synergism and antagonism of different nucleoside/nucleotide analogue combinations on the inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication. *Journal of Medical Virology*. **2009**; 81(2): 211-6.
- Pérez-Prior N, Milla AR, Company ES, Cid JF, Chust BS. Correlación, en pacientes infectados por el VIH-1 y previamente tratados, entre la reacción de hipersensibilidad a abacavir y el alelo HLA-B*5701. *Farmacia Hospitalaria* **2009**; 33: (3)155-60.
- Perry CM, Faulds D. Lamivudine: a review of its antiviral activity, Pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy in the management of HIV infection. *Drugs* **1997**; 53 (4): 657-80.
- Rabie H, Henning KL, Schoeman P, DE Villiers N, Pretorius GHJ, Cotton MF. Abacavir: Its Use and Hypersensitivity. *South Afr J HIV Med* **2009**; 81-84.
- Ray AS. Intracellular interactions between nucleos(t)ide inhibitors of HIV reverse transcriptase. *AIDS Reviews* **2005**; 7:113-25.
- Richman DD, Margolis DM, Delaney M, Greene WC, Hazuda D, Pomerantz RJ. The Challenge of Finding a Cure for HIV Infection. *Science* **2009**; 323:1304-1307.
- Rossi A, Russo G, Puca A, LA Montagna R, Caputo M, Mattioli E et al.,The antiretroviral nucleoside analogue Abacavir reduces cell growth and promotes differentiation of human medulloblastoma cells. *Int J Cancer* **2009**; 125(1): 235ñ 243.
- Santos JL, Varanda EA, Lima LM, Chin CM. Avaliação da atividade mutagênica da talidomida pelo teste de ames. *Revista Eletrônica de Farmácia*. **2007**; IV (2). 154-158.
- Schinazi RF, Massud I, Rapp KL, Cristiano M, Detorio MA, Stanton RA, et al. Selection and Characterization of HIV-1 with a Novel S68 Deletion in Reverse Transcriptase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2011**; 55:(5) 2054-2060.
- Sivasubramanian G, Frempong-Manso E, Macarthur RD. Abacavir/lamivudine combination in the treatment of HIV: a review. *Ther Clin Risk Manag* **2010**; 6: 83ñ94.
- Stark JM, Jasin M. Extensive Loss of Heterozygosity Is Suppressed during Homologous Repair of Chromosomal Breaks. *Molecular and Cellular Biology* **2003**; 23(2):733-743.

- Tenreiro SW, Parker WB. Interaction of deoxyguanosine nucleotide analogs with human telomerase. *Mol Pharmacol* **2000**; 57(4):695-9.
- Thompson LH, Schild D. Recombinational DNA repair and human disease. *Mutat Res* **2002**. 509: 49-78.
- Tintori C, Brai AL, Fallacara AL, Fazi R, Schenone S, Botta M. Protein-protein interactions and human cellular cofactors as new targets for HIV therapy. *Curr Opin Pharmacol* **2014**; 18: 1-8.
- Tisdale M, Alnadaf T, Cousens, D. Combination of Mutations in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Reverse Transcriptase Required for Resistance to the Carbocyclic Nucleoside 1592U89. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **1997** 41(5): 1094-1098.
- Torres SM, Walker DM, Carter MM, Cook DL, Mccash CL, Cordova EM, et al. 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* **2007**; 48: 224-238.
- UNAIDS: disponível em:
<<http://www.unaids.org.br/documentos/Aids%20by%20the%20numbersPORT.pdf>> Acesso em 06/14 (**2014a**).
- UNAIDS: disponível em:
<http://www.unaids.org.br/documentos/Treatment_Report_2015.pdf> Acesso em: 06/14 (**2014b**).
- Venhoff N, Setzer B, Melkaoui K, Walker UA. Mitochondrial toxicity of tenofovir, emtricitabine and abacavir alone and in combination with additional nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *Antiviral therapy* **2007**; 12: 1075-1085.
- Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, Zhou S, Diaz LA Jr, Kinzler KW. Cancer Genome Landscapes. *Science* **2013**; 339 (6127): 1546-1558.
- Von Tungeln LS, Hamilton LP, Dobrovolsky VN, Bishop ME, Shaddock JG, HeÄich RH, Beland FA. Frequency of Tk and Hprt lymphocyte mutants and bone marrow micronuclei in B6C3F1/Tk+/+ mice treated neonatally with zidovudine and lamivudine. *Carcinogenesis* **2002** Sep; 23: 1427-1432.
- Von Tungeln LS, Williams LD, Doerge DR, Shaddock JG, McGarrity LJ, Morris SM, et al. Transplacental drug transfer and frequency of Tk and Hprt lymphocyte mutants and peripheral blood micronuclei in mice treated transplacentally with zidovudine and lamivudine. *Environ Mol Mutagen* **2007**; 48: 258-269.
- Walker DM, Malarkey DE, Seilkop SK, Ruecker FA, Funk KA, Wolfe MJ, et al. Transplacental carcinogenicity of 3-azido-2,3-dideoxythymidine in B6C3F1 mice and F344 rats. *Environ. Mol. Mutagen* **2007**; 48: 283-298.

Schwingel E, Korn K. Prediction of abacavir resistance from genotypic data. Impact of zidovudine and lamivudine resistance *in vitro* and *in vivo*. *Antimicrob Agents Chemother*. **2002**; 48 (1): 89-94.

Ward LS. Entendendo o processo molecular da tumorigênese. *Arq Bras Endocrinol Metab*. **2002**; 46 (4): 351-360.

Wu KM, Powley MW, Ghantous H. Timing of carcinogenicity studies and predictability of genotoxicity for tumorigenicity in anti-HIV drug development. *International Journal of Toxicology* **2012**; 31(3): 211-21.

Zapor MJ, Cozza KL, Wynn GH, Wortmann GW, Armstrong SC. Antiretrovirals, part II: Focus on non-protease inhibitor antiretrovirals (NRTIs, NNRTIs, and fusion inhibitors). *Psychosomatics* **2004**; 45 (6), 524-535.

Zeller A, Koenig J, Schmitt G, Singer T and Guérard M. Genotoxicity Profile of Azidothymidine *In Vitro*. *Toxicological sciences* **2013**; 135(2), 317-327.