UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

Avaliação da atividade Mutagênica e Carcinogênica da Anfotericina B em Células Somáticas de *Drosophila melanogaster*

Aluna: Rosiane Soares Saturnino

UBERLÂNDIA

2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

Avaliação da atividade Mutagênica e Carcinogênica da Anfotericina B em Células Somáticas de *Drosophila melanogaster*

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Genética e Bioquímica (Área de concentração: Genética).

Aluna: Rosiane Soares Saturnino
Orientador: Prof. Dr. Júlio César Nepomuceno

UBERLÂNDIA
2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

S254a
2012

Saturnino, Rosiane Soares, 1988-

Avaliação da atividade mutagênica e carcinogênica da anfotericina b em células somáticas

de *Drosophila melanogaster* / Rosiane Soares Saturnino. -- 2012.

75 f. : il.

Orientador: Júlio César Nepomuceno.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,

Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.

Inclui bibliografia.

1. Genética - Teses. 2. Anfotericina B - Teses. 3. *Drosophila me lanogaster* - Teses. 3. Mutagênese - Teses. I. Nepomuceno, Júlio César. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. III. Título.

CDU: 575

Palavras-chave: Anfotericina B. SMART. *WTS*. Citocromo P450. *Drosophila melanogaster.*

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

Avaliação da atividade Mutagênica e Carcinogênica da Anfotericina B em Células Somáticas de *Drosophila melanogaster*

Aluna: Rosiane Soares Saturnino

Comissão Examinadora

Presidente: Prof. Dr. Júlio César Nepomuceno

Examinadores: Prof. Dr. Maurício Lehmann

Profª. Dr. Alexandre Azenha Alves de Rezende

Data da defesa:

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas da PGGB para o formato da Dissertação foram contempladas

Dr. Júlio César Nepomuceno

“Sábio é aquele que sabe fazer das ruinas da derrota solo firme para se construir a vitória.”

(Rosiane Soares)

Dedico este trabalho aos meus pais Valdir e Marisa, à Minha irmã Thais e ao meu namorado Elian, pela compreensão, carinho e dedicação que foram essenciais nesta conquista.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Agradeço esta conquista primeiramente a **Deus**, por iluminar a mente humana a tornando capaz de produzir conhecimento. E por ser refúgio e fortaleza de bases inabaláveis, que abriga os que acreditam e perseveram.

Ao meu Pai, **Valdir João Saturnino,** pelo apoio incondicional, por ser um pai presente e carinhoso, por ter acreditado nos meus sonhos e os compartilhar e por não medir esforços para fazer com que se tornassem realidade.

À minha Mãe, **Marisa Terezinha Soares Saturnino,** por cumprir com maestria seu papel de mãe, por ter me acalentado nos momentos difíceis, por ter me apoiado nos primeiros e árduos passos da vida escolar, por ter sido paciente e compreensiva.

À minha irmã, **Thaís Soares Saturnino**, pelo carinho a mim dispensado pelo companheirismo, e por sempre distribuir sorrisos e contagiar com sua alegria.

Ao meu namorado, **Elian Nunes Vieira**, a quem tive o prazer de conviver nestes últimos quatro anos de muita felicidade. Você é sem dúvida uma pessoa especial, sempre prestativo e carinhoso. Muito obrigada pelas inúmeras vezes que pude contar com seu apoio e compreensão.

Ao meu prezado tio **Romero Rodrigues Soares**, que onde quer que esteja compartilha de minha alegria. Deixou sua lembrança sempre alegre e seu exemplo a ser seguido.

Ao meu querido e estimado orientador, amigo e educador, **Júlio César Nepomuceno**, pela oportunidade sem a qual eu jamais teria conseguido, por ter

acreditado em minha capacidade, por transmitir e compartilhar seus conhecimentos e por ter me aceitado na família do Laboratório de Citogenética e Mutagênese (LABCIM), minha sincera gratidão e agradecimentos.

Aos colegas **do LABCIM**, pela amizade e companheirismo. E em especial aos meus amigos, companheiros de apartamento e colegas **Nayane Moreira Machado** e **Jeyson Césary Lopes**. **Nay**, obrigada por ter ouvido e compartilhado minhas alegrias e os momentos difíceis pela grande e sincera amizade, conte sempre comigo. **Jeyson**, obrigado pelo companheirismo, paciência e compreensão. Apesar das dificuldades, esse ano que moramos juntos foi um período muito feliz e que sempre me lembrarei com saudade. À **Priscilla Capelari Orsolin**, por ser tão prestativa e amiga. À **Rosiane Gomes de Oliveira**, por ter disponibilizado sua ajuda.

Aos meus amigos **Pollyana Castro, Pedro Viana, Jacqueline Gonçalves, John Luciano, Roberto Ferreira, Elias Vieira, Rayane Rodrigues, Pollyana Tibúrcio, Dione Rodrigues, Maria Luisa, Alex Nunes e Queliana Gonçalves**, **Eduardo Henrique,** entre outros, por me proporcionarem momentos de descontração e alegria, tenho orgulho de ter amigos como vocês.

AGRADECIMENTOS

À **Universidade Federal de Uberlândia**, por oportunizar a realização deste trabalho.

Ao **Centro Universitário de Patos de Minas**, por fornecer os subsídios para a realização do trabalho.

Ao Prof. **Dr. Ulrich Graf** do Instituto de Toxicologia da Universidade de Zurich, Schwerzenbach, Suíça, pelo fornecimento das linhagens mutantes de *Drosophila melanogaster*, utilizadas no Teste para Detecção de Mutação e Recombinação Somática (SMART).

Ao **Bloomington Drosophila Stock Center,** meus agradecimentos.

Aos membros da banca examinadora, Dr. **Maurício Lehmann** e ao Dr. **Alexandre Azenha Alves de Rezende**, pela disponibilidade de ler este trabalho e propor as devidas sugestões.

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)** por ter acreditado neste trabalho e fornecer apoio financeiro.

Enfim, agradeço a todas as pessoas que contribuíram para a realização deste trabalho, e a todos que me apoiaram.

APOIO FINANCEIRO

Este trabalho recebeu o apoio financeiro dos seguintes órgãos e instituições:

- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – **CNPq**;
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – **CAPES**;
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – **FAPEMIG**;
- Universidade Federal de Uberlândia – **UFU**;
- Centro Universitário de Patos de Minas – **UNIPAM**.

Lista de Abreviaturas

Anf B- Anfotericina B

BH- Balanceador Heterozigoto

CYP450- Citocromo P450

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

DXR - Doxorrubicina

flr^3- *Flare*

HB- alta bioativação

RNA- Ácido Ribonucleico

mg- miligrama

MH- Balanceador trans-heterozigoto

mL-mililitro

mM- Milimolar

mwh- *multiple wing hairs*

ORR - *oregon R(R)*

SMART- Somatic Mutation and Recombination Test

ST - Standard Cross

TM3 bd^s - Third Multiple 3 Beaded Serrate

WTS- *warts tumor epitelial*

Lista de Tabelas

Tabela 1- Frequência de manchas mutantes nos descendentes transheterozigotos para os genes marcadores (*mwh/flr*^{3}), do cruzamento padrão tratados com Anfotericina B.....50

Tabela 2- Frequência de manchas mutantes nos descendentes transheterozigotos para os genes marcadores (*mwh/flr*^{3}) e heterozigotos pra o cromossomo *TM3 (mwh*/*TM3*) do cruzamento de alta bioativação tratados com Anfotericina B.....51

Tabela 3- Frequência de clones de tumor observada em *Drosophila melanogaster*, heterozigota para o gene supressor de tumor *wts*, pré-tratada com mitomicina C (6 horas) e posteriormente tratada com anfotericina B.....52

Lista de Figuras

Capítulo I

Figura 1- Metilação do DNA.....05

Figura 2- Etapas da carcinogênese e mecanismos relacionados a esse processo.....06

Figura 3- Ciclo Catalítico do CYP450.....09

Figura 4- Mecanismo de ação do CYP450.....10

Figura 5- Fórmula estrutural da Anfotericina B.....11

Figura 6-Mecanismo de ação da Anfotericina B.....13

Figura 7- Fórmula estrutural da Doxorrubicina.....14

Figura 8-Fórmula estrutural da Mitomicina C.....16

Figura 9-Casal de *Drosophila melanogaster*.....18

Figura 10- Fenótipo das asas dos descendentes de *D. melanogaster*.....20

Figura 11-Tipos de manchas mutantes observadas em asas de *Drosophila melanogaster*.....21

Figura 12- Tumores observados em *Drosophila melanogaster*.....23

Capítulo II

Figura 1 Fórmula estrutural da Anfotericina B.....40

SUMÁRIO

Apresentação.....1

CAPÍTULO I – FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1. Genética e Câncer.....4

2. Citocromo P450.....7

3. Anfotericina B.....10

4. Controles Positivos.....14

4.1. Doxorrubicina.....14

4.2. Mitomicina C.....15

5. Organismo Teste.....17

6. Testes Utilizados.....18

6.1. *Somatic Mutation and Recombination Test* (SMART).....18

6.2. Teste para Detecção de Tumor Epitelial (*WTS)*.....22

Referências.....24

CAPITULO II – ARTIGO

Resumo.....35

Abstract.....36

1. Introdução.....37

2. Materiais e Métodos.....39

2.1. Agentes químicos.....39

2.2 **Teste para a Detecção de Mutação e Recombinação Somática (SMART) em células somáticas de *Drosophila melanogaster***.....40

2.2.1 Linhagens Estoques, Cruzamentos, Tratamentos.....40

2.2.2. Preparação e análise das asas.....42

2.2.3. Análise Estatística.....42

2.3 **Teste para a detecção de clones de tumor epitelial (*wts)* em *Drosophila melanogaster***.....43

2.3.1. Linhagens Estoques, Cruzamentos, Tratamentos.....43

2.3.2 Análise das moscas e Análise Estatística.....44

3. Resultados e Discussão.....45

Referências.....53

APRESENTAÇÃO

O câncer é uma doença genética que acomete milhões de pessoas em todo o mundo e o seu desenvolvimento está intrinsecamente ligado às alterações (mutações, recombinações) que acontecem no material genético. Os fatores que podem desencadear o câncer são encontrados no meio ambiente ou podem ser herdados, mas a maioria ocorre devido a interações com o ambiente. Assim, vários agentes físicos, químicos e biológicos podem conter propriedades capazes de interferir nos mecanismos moleculares dando início ao processo de desenvolvimento do câncer.

Deste modo, fazem-se necessários estudos envolvendo medicamentos e seus possíveis efeitos na promoção do câncer. Nesse contexto, encontra-se a Anfotericina B (Anf B), um importante antifúngico derivado de *Streptomyces nodosus,* amplamente utilizado por ser uma droga de referência para a maioria das infecções fúngicas.

A atividade fungicida da Anf B está associada à interação desse fármaco com o ergosterol (presente na membrana dos fungos), formando poros e desencadeando danos à seletividade de membrana. Como consequência, ocorre à perda de íons e moléculas pequenas da célula, alterando o equilíbrio iônico e promovendo a morte celular. Este antifúngico é conhecido por sua elevada toxicidade, sobretudo, por sua nefrotoxicidade, podendo desencadear uma série de efeitos colaterais graves. A Anf B é tema de vários estudos, mas com poucas informações disponíveis no que se refere a possíveis efeitos mutagênicos, recombinogênicos e/ou carcinogênicos.

Diante do exposto, o presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo principal de avaliar o potencial mutagênico e carcinogênico da Anfotericina B por meio do teste SMART (*Somatic Mutation and Recombination Test*) e do teste para detecção de tumores epiteliais (*WTS),* ambos realizados em *Drosophila melanogaster*.

Este trabalho foi estruturado da seguinte maneira:

Capitulo I: compreende a fundamentação teórica, na qual são destacados os principais assuntos a que se refere o trabalho: mecanismos

moleculares envolvidos com a gênese do câncer, agentes mutagênicos, mecanismos de biotransformação metabólica (CYP450), doxorrubicina e mitomicina C (drogas utilizadas como controles positivos na pesquisa), utilização da *D. melanogaster* em testes de mutagenicidade e os testes SMART e *WTS*. Esse capítulo contém, portanto, informações básicas imprescindíveis à compreensão do assunto.

Capitulo II: apresenta o manuscrito intitulado “Potencial mutagênico e carcinogênico da Anfotericina B em *Drosophila melanogaster* avaliado por meio dos testes SMART e *WTS*”, a ser enviado para publicação no periódico Food and Chemical Toxicology. Os resultados apresentados no referido artigo revelam que a Anf B é um promutágeno recombinogênico.

CAPÍTULO I

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1 Genética e Câncer

A genética ocupa uma posição central em todo o campo da biologia. Esta ciência se desenvolveu a partir do século XIX com os estudos de hereditariedade de Mendel, chegando até a complexa biologia molecular atual (MARTINEZ *et al*.,, 2006). O notável avanço do conhecimento na área da genética nos últimos anos possibilitou a compreensão dos processos biológicos relacionados a muitas doenças, tais como o câncer (CATELANI, 2010).

Um dos eventos mais marcantes para obtenção de tais conquistas foi a elucidação da estrutura de DNA por Watson e Crick em 1957. Tal descoberta revolucionou a genética, pois através do estudo dessa molécula foi possível a identificação dos processos de divisão, replicação, tradução, que participam da formação dos organismos vivos, e, também, dos processos fisiológicos e patológicos que neles acontecem, tais como as mutações (SUZUKI *et al*., 2009).

As mutações são modificações genotípicas que podem ocorrer tanto em células da linhagem germinativa, como em células somáticas. No entanto, somente as alterações germinativas podem ser herdadas. Por outro lado, as que ocorrem nas células somáticas podem resultar na morte do portador ou na diminuição da função celular (SCHNEIDER *et al*., 2011).

As mutações podem ser causadas por agentes ambientais (poluentes como alcatrão, tabagismo, raios ultravioletas, alimentação), agentes biológicos (infecção por vírus oncogênicos, exemplo, o papiloma vírus) e até mesmo por predisposições genéticas (quando um gene danificado que confere alta suscetibilidade ao câncer é passado para diversas gerações). Essas substâncias são denominadas de agentes mutagênicos (FERNANDES e MELLO, 2008; GATES e FINK, 2008).

Os agentes mutagênicos estão intrinsecamente associados à indução de câncer no homem e em animais por serem capazes de promover alterações no material genético (INCA, 2008), uma vez que podem acelerar ou aumentar o aparecimento de mutações que estão associadas ao desenvolvimento de neoplasias (RIBEIRO e MARQUES, 2003). É pertinente ressaltar, entretanto, que

uma só alteração no DNA não causa câncer, essa doença se desenvolve quando várias destas alterações ocorrem (DANTAS *et al*., 2009).

Segundo Fernandes e Mello (2008) quando ocorrem mutações sucessivas no DNA, as células sofrem mudanças expressivas no padrão de comportamento resultando no processo de carcinogênese. Nesse caso, as células perdem a capacidade de limitar e controlar o seu próprio crescimento e passam a se multiplicar rapidamente e sem nenhum controle.

A carcinogênese pode iniciar-se de forma espontânea ou ser provocada pela ação de agentes carcinogênicos. Em ambos os casos verifica-se a indução de alterações, que podem ser alterações simples na sequência de DNA, ou mais drásticas como deleções, inserções ou rearranjos na estrutura cromossômica. Mas, pode ser iniciada também por modificações não-mutagênicas, alterando o padrão epigenético do DNA, como a metilação (adição de um grupo metil) e a alquilação (adição de um grupo alquila); porém, a maioria tem origem na alteração do DNA (YOO e JONES, 2006). Conforme Figura 1.

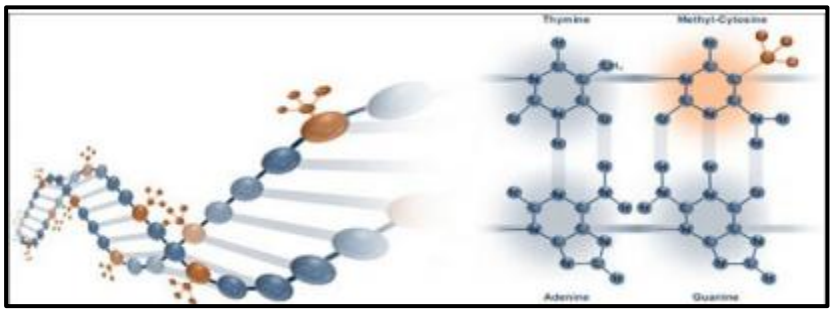

Figura 1:Metilação do DNA.
Fonte:CMLS, Cell Mol. Life Sci. 59 (2002) 241-257.

O processo carcinogênico envolve as etapas de iniciação, promoção e progressão (ALMEIDA *et al*., 2005). A iniciação é o primeiro estágio da carcinogênese onde ocorre a exposição ao agente carcinogênico que condiciona mudanças irreversíveis no DNA celular. A promoção, fase subsequente, envolve uma série de mudanças celulares que resultam na proliferação e expansão das células. Estes mecanismos celulares proliferativos dependerão de fatores hormonais e de crescimento tumoral, com estímulo da atividade de fatores de transcrição e da ação gênica. A progressão é o terceiro e último estágio da

carcinogênese, caracterizado pela alteração da reprodução celular ou a expansão clonal das células iniciadas. Este processo é considerado irreversível, pois o câncer já está instalado evoluindo até o surgimento das primeiras manifestações clínicas da doença (ALMEIDA *et al*., 2005; PIAZZA *et al*., 2010). Sendo assim, o câncer se desenvolve quando células mutantes com rápida taxa de divisão, não controladas pelos mecanismos de regulação do ciclo celular, adquirem capacidade de invadir tecidos diferentes do qual tiveram origem, através de metástases, acometendo progressivamente o organismo (RIBEIRO; MARQUES, 2003). Por ser uma doença complexa com muitos subtipos, o câncer pode afetar vários tecidos de diversas maneiras (DALKIC *et al.,* 2010). Como pode ser observado na Figura 2.

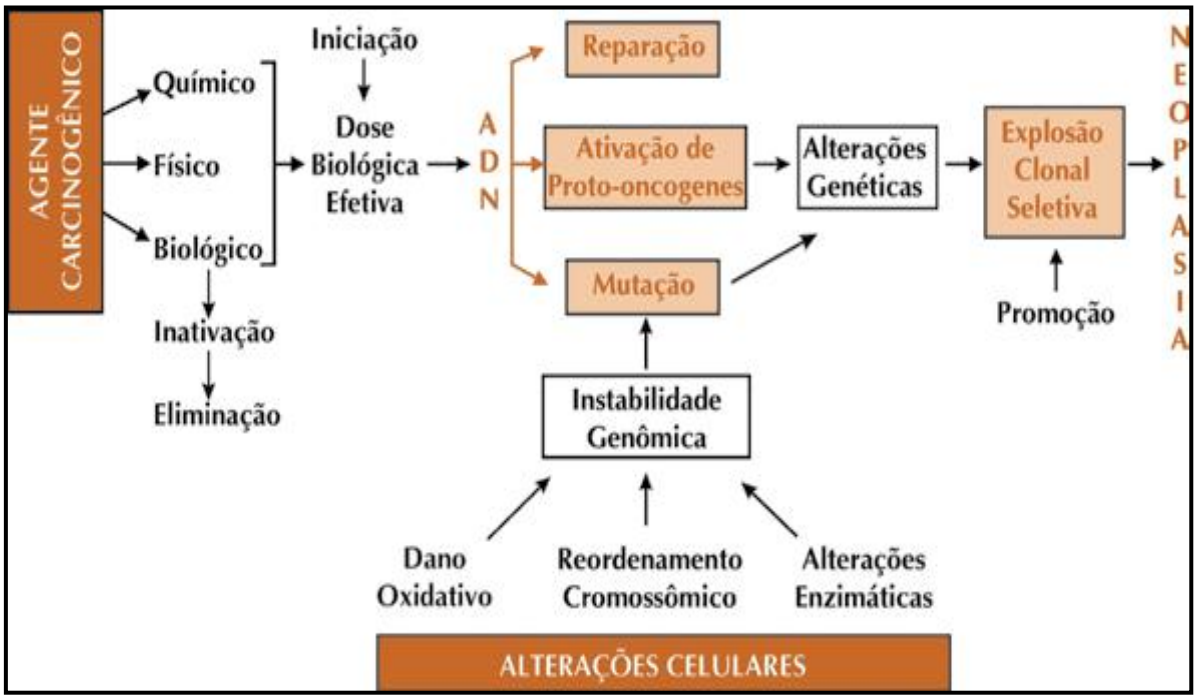

Figura 2: Etapas da carcinogênese e mecanismos relacionados a esse processo. Fonte: INCA, 2008.

Vários genes estão envolvidos no controle genético do câncer. Dentre eles destacam-se os proto-oncogenes, responsáveis pela proliferação celular ordenada, e supressores de tumor, responsáveis por manter a proliferação celular controlada (LOURO *et al*., 2002; GAO *et al*., 2012). A superexpressão ou perda (inativação) destes genes pode causar a proliferação celular descontrolada e

juntamente com uma falha na sinalização para apoptose levar a formação do câncer (ALBERTS *et al.*, 2004).

A divisão celular normal é positivamente regulada ou estimulada através de vias sinalizadoras. A progressão do ciclo celular é, em parte, controlada, por uma série de proteínas chamadas quinases dependentes de ciclinas (CDKs), particularmente nas transições de fases. Os níveis de ciclinas oscilam durante as etapas do ciclo celular, determinando o momento apropriado de sua ligação com CDKs. Este grupo de enzimas, por sua vez, fosforila substratos-chave que permitem a progressão do ciclo celular (VERMEULEN *et al.*, 2003). Por outro lado, existe um grupo de inibidores do ciclo que atua impedindo ou regulando negativamente as vias sinalizadoras de tal progressão no ciclo de divisão celular. De forma similar aos fatores estimuladores que levam à produção de ciclinas/CDKs, os reguladores negativos ativarão inibidores de CDKs (WARD, 2002).

Dentro do grupo de proteínas inibidoras do ciclo celular encontram-se a p15 e p16, que atuam bloqueando CDKs e ciclinas, impedindo o avanço do ciclo, e as proteínas p21 e p53, que monitoram a saúde celular, a integridade de seus cromossomos e a execução correta das diferentes fases do ciclo (RIVOIRE *et al*., 2001; VERMEULEN *et al.*, 2003).

Verifica-se, portanto, que o ciclo celular é controlado por uma série de sinais e, se estes sinais são incorretamente sentidos ou se a célula responde de maneira inadequada, o processo neoplásico se desenvolve (LOURO *et al.*, 2002),

As neoplasias são um grave problema de saúde pública em todo o mundo, portanto, o estudo do potencial mutagênico e carcinogênico de medicamentos, aditivos alimentares, e outros compostos utilizados pela população é primordial para um melhor entendimento e controle desta doença.

2 Sistema de Biotransformação de Fármacos: Citocromo P450

O ser humano está constantemente exposto a uma série de xenobióticos (agrotóxicos, medicamentos e produtos quimicamente industrializados, aditivos alimentares, poluentes ambientais) que podem causar danos celulares (LUMAR, 2010).

Como a maioria dos xenobióticos são lipossolúveis, eles apresentam fácil absorção e difícil eliminação. Sendo assim, para evitar o acúmulo destes produtos tóxicos é necessário um sistema de metabolização e biotransformação, que os transforme em compostos mais hidrossolúveis dificultando sua reabsorção e facilitando a eliminação (PARKINSON, 2008).

Entretanto, esse processo de transformação pode também ativar compostos antes inertes e de pouca toxicidade, originando produtos altamente nocivos que podem se ligar ao DNA, RNA e proteínas e gerar radicais livres que podem interferir nos mecanismos celulares. Portanto, o sistema responsável por eliminar os produtos tóxicos, pode também conferir toxicidade a compostos que anteriormente não eram prejudiciais (GUENGERICH, 2008).

Segundo Penildon (2006), as reações tóxicas podem ser aparentes com baixos níveis de exposição ao composto original, quando os mecanismos alternativos de desintoxicação estão saturados ou comprometidos e a disponibilidade de co-substratos endógenos desintoxicantes é limitada. Portanto, quando esses recursos são esgotados, pode prevalecer a via tóxica, resultando em toxicidade orgânica e até carcinogênese.

A metabolização xenobiótica possui dois tipos de enzimas: as de metabolismo oxidativo mediado, ou de fase I, e as enzimas conjugadas, ou de fase II. Muitas formulações, tais como hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, as nitrosaminas e várias drogas medicamentosas, são convertidas a metabólitos altamente reativos pelas enzimas oxidativas da Fase I, que são principalmente enzimas da superfamília do citocromo P450, através da introdução de um ou mais grupamentos hidroxila ao substrato (LOURO *et al.*, 2002).

De todos os sistemas de biotransformação o mais catalítico e versátil é o Citocromo P450 (CYP450), que é responsável pela metabolização de diversos compostos (MICHAUD *et al*., 2010). As enzimas desse sistema representam os agentes oxidantes mais poderosos *in vivo*, capazes de promover a oxidação de

uma grande variedade de substratos, estando envolvidas na oxidação de 70 a 90% dos fármacos utilizados clinicamente (CHEN *et al*., 2011).

Os níveis mais elevados de CYP 450 estão presentes no fígado. Porém, estas proteínas são encontradas em praticamente todos os tecidos. As enzimas do CYP 450 desempenham importante papel na biotransformação de substâncias exógenas (xenobióticos) e endógenas (esteróides, ácidos graxos, vitaminas lipossolúveis, eicosanoides), ressaltando sua versatilidade catalítica (PARKINSON, 2008).

O genoma humano contêm aproximadamente 60 genes do CYP450, que codificam diversas enzimas. As enzimas do CYP450 contém um grupamento heme geralmente em seu estado férrico (Fe^{3+}), podendo ser reduzido ao seu estado ferroso (Fe^{2+}), possibilitando sua ligação ao oxigênio ou ao monóxido de carbono, conforme Figura 3. As enzimas que agem sobre os substratos endógenos têm função na biossíntese e catabolismo de esteróides, prostaglandinas e ácidos graxos. Já as que agem sobre os xenobióticos são expressos principalmente no fígado e tecidos epiteliais e tem como função proteger o organismo de toxinas e substâncias cancerígenas (PARKINSON, 2008).

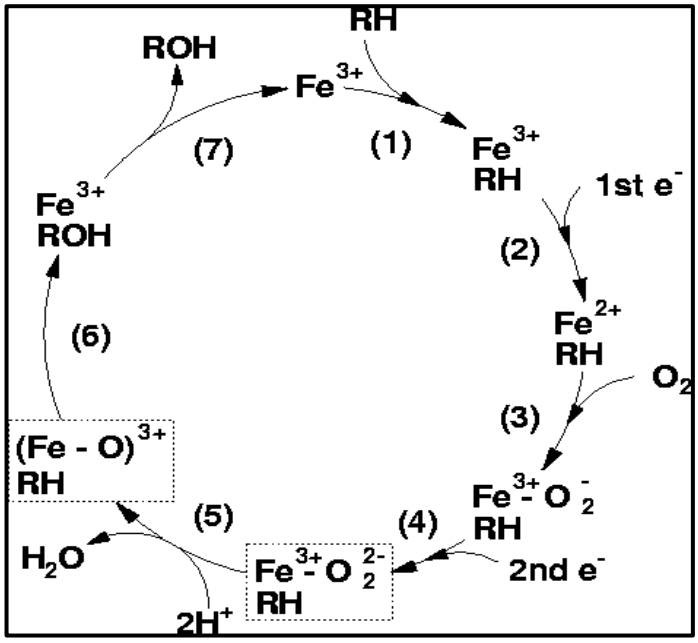

Figura 3- ciclo catalítico do CYP450.
Fonte: www.ebah.com.br

O ciclo de reação do CYP 450, mostrado na Figura 4, envolve seis etapas: (1) ligação da enzima ao substrato, no sítio ativo; (2) transferência do primeiro elétron do NADPH para o CYP 450 (via NADPH-P450 redutase); (3) incorporação de uma molécula de oxigênio e transferência do segundo elétron para o átomo de ferro via citocromo NADPH-P450 redutase e citocromo b_5; (4) clivagem da ligação O-O e liberação de uma molécula de água; (5) retirada de um átomo de hidrogênio e adição de um grupo hidroxila; (6) liberação do produto final (SAKAKI e INOUYE, 2000).

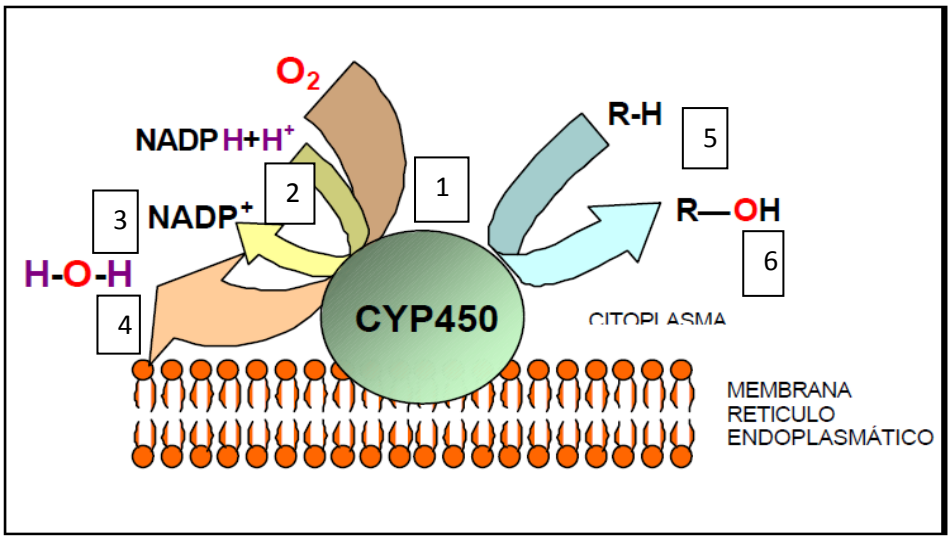

Figura 4- Mecanismo de ação do CYP450. Hidroxilação de uma droga lipossolúvel, aumentando sua solubilização em água e facilitando sua eliminação. Fonte: Santiago *et al*., 2002.

A principal reação catalisada pelas CYP 450 é uma reação mono-oxigenase, isto é, inserção de um átomo de oxigênio em um substrato orgânico (RH) enquanto o outro átomo oxigênio é reduzido à água (SANTIAGO *et al.* 2002; PARKINSON, 2008). Porém, essas enzimas podem catalisar diversas reações químicas tais como a hidroxilação de átomos de carbono, epoxidação, desidrogenação, clivagem de ésteres, transferência de grupos oxidativos, desalogenação oxidativa e alquilação de heteroátomos (SANTIAGO *et al*., 2002).

3 Anfotericina B

A Anfotericina B (Anf B) é um antibiótico poliênico de amplo espectro, obtido de culturas de *Streptomyces nodosus,* que apresenta propriedades anfipáticas, ou seja, possui porções hidrofóbicas e hidrofílicas que a torna pouco solúvel em água. A maior solubilidade em água é conseguida por formulação com desoxicolato ou uma variedade de transportadores lipídicos (LESTNER *et al*., 2010). Apesar das formulações dissolvidas em lipídeos estarem associadas com menores efeitos colaterais, elas são de alto custo e não são mais efetivas do que a Anf B em desoxicolato (PINTO, 2006). A fórmula estrutural da Anf B pode ser observada na Figura 5.

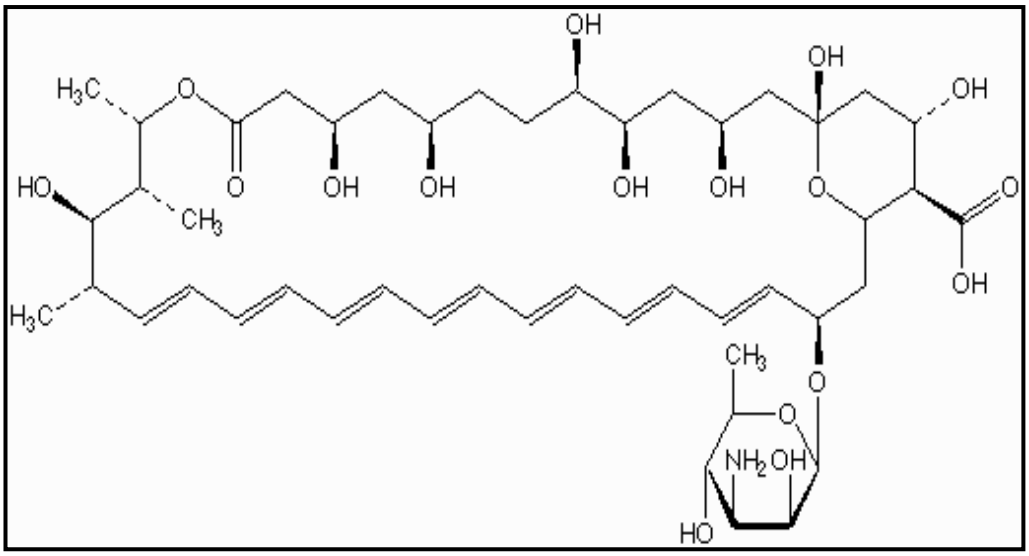

Figura 5- Fórmula estrutural da Anfotericina B.
Fonte: Katzung, 2006.

Este fármaco possui atividade antibiótica efetiva contra diversas espécies de fungos patogênicos, tais como: *Candida spp*, *Cryptococcus neoformans, Blastomyces desmatitidis, Histoplasma capsulatum, Sporothrix schenckii, Coccidioides immitis, Paracoccidioides braziliensis, Aspergillus spp, Penicilium marneffei.* Apesar do desenvolvimento de novos agentes terapêuticos, a Anf B continua tendo uma grande importância na terapia antifúngica, principalmente nas infecções sistêmicas e em alguns casos de Leishmaniose (KNODERER e KNODERER, 2011).

Além do efeito antifúngico, o fármaco também apresenta um potente efeito imunoestimulante, tanto sobre a imunidade humoral quanto sobre a

imunidade celular. Além de atuar sobre os microrganismos, a Anf B também aumenta a resistência do paciente à infecção, potencializando o efeito dos macrófagos. Esta ação da Anf B é de grande importância clínica já que a maioria dos pacientes com infecções fúngicas sistêmicas apresenta diminuição da imunidade celular (PINTO, 2006).

Mesmo sendo a Anf B, atualmente, o antifúngico mais eficaz disponível, seu uso é restrito pela sua toxicidade sistêmica e local. A disfunção renal é o mais importante efeito tóxico e ocorre na grande maioria dos pacientes. Usualmente as disfunções renais são reversíveis quando interrompida a administração do fármaco, porém reduções permanentes na filtração glomerular podem permanecer (CASTRO *et al.*, 2006). limitando sua utilização devido a sua elevada toxicidade (KNODERER, KNODERER 2011).

A Anf B pode também causar outros efeitos colaterais como neurotoxicidade e erupção cutânea, dependendo da via de administração (RANG *et al*., 2007). Em muitos casos uma alteração na dose pode atingir outros alvos que não eram esperados, resultando em efeitos colaterais ainda mais graves (ERTUGRUL *et al.,* 2010). Esse resultado inesperado pode acontecer também devido a um resíduo intermediário ou a um subproduto resultante do processo de síntese e eliminação deste fármaco (RANG, 2007).

A administração por via endovenosa, ocorre a partir da diluição da ampola contendo 50 mg de Anf B mais desoxicolato de sódio em 10 mL de diluente (água para injeção). A solução é adicionada ao soro glicosado para obter uma concentração de 0,1 mg/mL, e o tempo de infusão pode variar de 2 a 4 horas. O medicamento circula pelo corpo, ligada a lipoproteínas e se distribui através de ligações às membranas (PINTO, 2006). A aplicação deve ser por via endovenosa, em fusão lenta, para obtenção de níveis adequados no sangue e tecidos. A dose diária única para humanos é de 1 mg/Kg de peso corporal e estima-se a sua meia-vida inicial em 24 a 48 horas, sendo que a Anf B convencional alcança maiores concentrações no fígado, baço, rins e pulmões (MARTINEZ et al., 2006).

O principal mecanismo de ação da Anf B ocorre pela ligação do fármaco aos esteróis das membranas celulares interferindo nas funções de permeabilidade e transporte. Esta ligação desencadeia a formação de poros na membrana, onde o centro hidrofílico da molécula de Anf B cria um canal iônico

transmembrana. Uma das repercussões mais importantes deste processo é a perda de íons intracelulares. A Anf B possui uma ação seletiva, ligando-se avidamente às membranas de fungos e alguns protozoários tendo menor afinidade para ligação a células de mamíferos, e não se ligando às bactérias (FILIPPIN e SOUZA, 2006).

Em pequenas concentrações esta ligação entre a membrana e a Anf B é reversível e não envolve gasto de energia. Porém, em concentrações mais elevadas esta reação se torna irreversível, passando a envolver gasto energético. Em virtude desta interação, os agentes poliênicos formam poros ou canais que aumentam a permeabilidade da membrana (Figura 6). A formação destes canais causa uma alteração da permeabilidade celular e, consequentemente, o escape de pequenos íons e metabólitos, principalmente íons potássio, levando eventualmente à morte celular (GILMAN *et al.,* 2006).

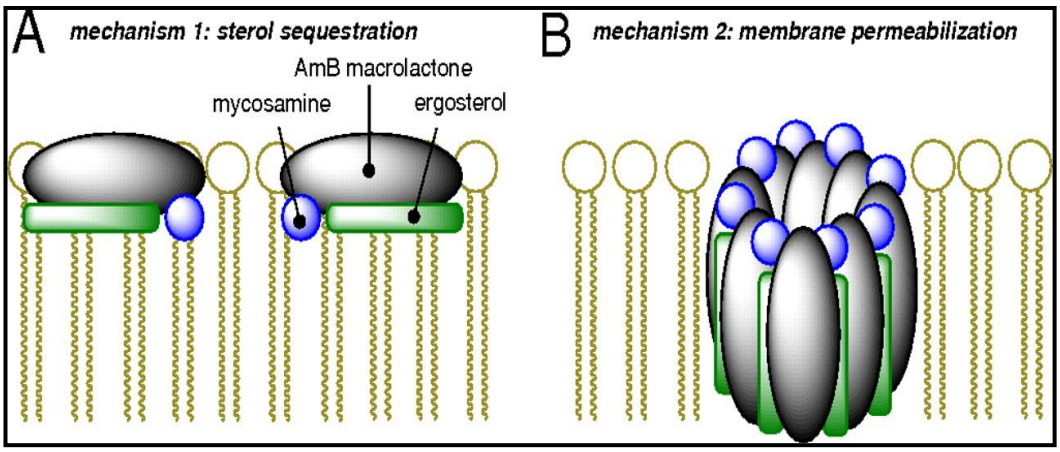

Figura 6- Mecanismo de ação da Anfotericina B, mostrando a interação da droga com o ergosterol (A), e os poros formados na membrana (B) e consequentemente a perda de sua seletividade com influxo de íons. Fonte: Palacios *et al*. (2011).

Embora a Anf B possua maior afinidade por ergosterol, também pode se ligar ao colesterol e causar efeitos tóxicos (PEIXOTO *et al.,* 2009). Um estudo desenvolvido com o objetivo de avaliar o potencial genotóxico da Anf B, utilizando linfócitos de sangue periférico humano, detectou que a Anf B, dependendo da concentração, pode induzir aberrações cromossômicas e diminuição do índice mitótico (EGITO *et al.,* 2004).

Contudo, desde que a Anf B existe no mercado não se registraram relatos relacionados com o fármaco, de carcinogênese, mutagênese, teratogênese ou reações adversas na fertilidade (ALVES *et al.*, 2009).

4 Controles positivos

4.1 Doxorrubicina (DXR)

Alguns antibióticos, derivados do gênero *Streptomyces*, apresentam propriedades quimioterápicas por terem atividade citotóxica e capacidade de interferir no crescimento celular. Dentre estes antibióticos pode-se destacar a doxorrubicina (Figura 7), um potente quimioterápico do grupo das antraciclinas, que é amplamente utilizado em vários tipos de neoplasias (GILMAN *et al.,* 2006).

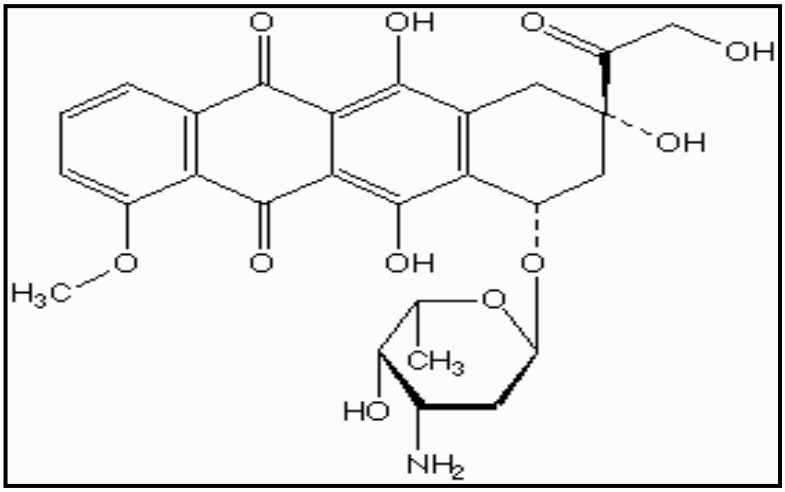

Figura 7 - Fórmula estrutural da Doxorrubicina.
Fonte: Gilman *et al.* (2006).

A DXR é frequentemente utilizada no tratamento para regressão de neoplasias como: carcinoma da mama, pulmão, bexiga, tireóide, ovário; sarcomas ósseos e dos tecidos moles; linfomas de Hodgkin e não-Hodgkin; neuroblastoma; tumor de Wilms; leucemia linfoblástica aguda e leucemia mieloblástica aguda (GARNIS *et al.,* 2004). É administrado por infusão intravenosa e o extravasamento no local da injeção pode causar necrose. Os efeitos colaterais mais importantes são mielossupressão e cardiotoxicidade. Agudamente, a doxorrubicina pode

causar arritmias cardíacas e depressão da função miocárdica (VALDIVIESO *et al*., 2012).

Este fármaco apresenta em sua estrutura um anel de antraciclina que se intercala entre os pares de nucleotídeos da dupla fita de DNA nas fases de transcrição e replicação, produzindo radicais livres altamente reativos, que, consequentemente, lesam a membrana celular e o DNA**.** A intercalação entre pares de bases adjacentes inibe todas as formas de síntese dependentes de RNA e DNA, sendo a formação de RNA ribossômico mais sensível à ação do fármaco (KATZUNG, 2006).

Entre as diversas ações citotóxicas da doxorrubicina a principal parece ser mediada por um efeito na topoisomerase II que, em presença do antineoplásico, não consegue separar os filamentos do DNA, e subsequentemente, fechar as rupturas, para que o DNA gire em torno do próprio eixo. Portanto, a replicação é consideravelmente afetada, prejudicando as células em proliferação (RANG *et al.*, 2007). As propriedades citotóxicas da doxorrubicina sobre as células malignas e os efeitos tóxicos em vários órgãos parecem estar relacionadas, também, à ligação da droga à membrana celular lipídica, que afeta uma variedade de funções celulares (VALDIVIESO *et al.*, 2012). O uso da DXR pode, portanto, alterar uma série de funções do DNA, a síntese de RNA, e pode ainda causar quebras mono e bifilamentares, bem como a troca de cromátides irmãs (VALDIVIESO *et al.*, 2012). Esses efeitos culminam com a destruição da célula. Entretanto, apesar de apresentar diversos efeitos colaterais, a doxorrubicina é considerada muito efetiva no tratamento quimioterápico (GILMAN *et al.,* 2006).

As células tratadas com doxorrubicina manifestam alterações mutagênicas que pode ser comprovada em diversos estudos, tais como: Dutra *et al*. (2009), Costa *et al*. (2006) e Orsolin *et al.* (2012), sendo ideal como controle positivo em testes como o SMART.

4.2 Mitomicina C (MMC)

As Mitomicinas são potentes antibióticos pertencentes à família dos quinolones. Em 1956, Wakaki e colaboradores isolaram as mitomicinas A e B a

partir do caldo de *Streptomyces caespitosus* e, logo em seguida, a mitomicina C foi isolada deste mesmo fungo. No entanto, somente a Mitomicina C tem atividade antitumoral. Ela apresenta uma estrutura química complexa e um alto peso molecular, tem a forma de cristais azul-violeta, sendo solúvel em água e solventes orgânicos. Sua molécula possui três grupos reconhecidamente carcinostáticos: um anel de aziridina (z), o grupo quinona (x) e o grupo octano (y) (NETTO *et al.,* 2006). A Figura 8 traz a fórmula estrutural da Mitomicina C.

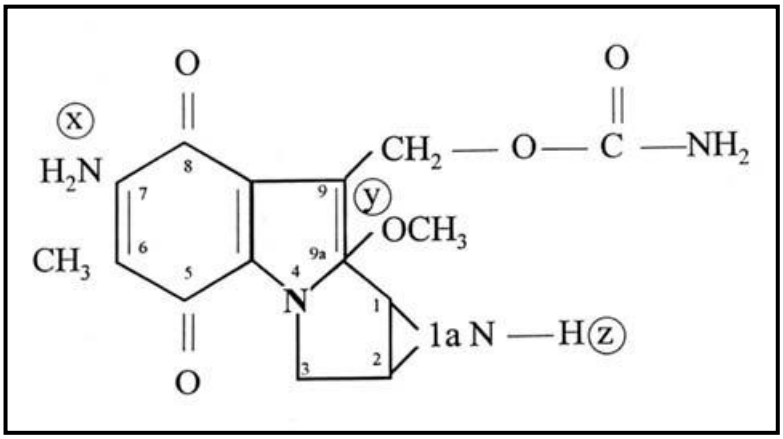

Figura 8- Fórmula estrutural da Mitomicina C
Fonte: Ribeiro *et al*. (2003).

A droga é administrada por via endovenosa, sendo usada principalmente no tratamento do câncer de células escamosas do ânus, do colo do útero e em adenocarcinomas do estômago, pâncreas e pulmão. Acredita-se que ela seja o melhor fármaco disponível para uso em associação com radioterapia para atacar células hipóxicas (SORENSEN *et al*., 2010). Entretanto, o seu uso é limitado em função de sua toxicidade. Além disso, efeitos colaterais como mielossupressão e danos gastrintestinais são frequentes. Portanto, vários análogos têm sido sintetizados buscando diminuir a toxicidade e aumentar a eficácia (MARTINEZ, 2011).

A mitomicina C (MMC) é um antimetabólito alquilante que sofre ativação metabólica mediada por enzimas e se une ao DNA através de ligações cruzadas (CRONEMBERGER *et al*., 2004; KATZUNG, 2006). Inibe a síntese do DNA, do RNA e de proteínas, atuando ainda sobre a proliferação fibroblástica, na degradação do DNA pré-formado e na lise do núcleo celular (OLIVEIRA; ALVES;

2002). Acredita-se que a Mitomicina C seja capaz de provocar apoptose e inibir a proliferação celular (OLIVEIRA; ALVES; 2002).

Segundo Ribeiro *et al*. (2003), vários trabalhos na literatura demonstram a eficácia da MMC como inibidor do crescimento tumoral, pela sua ação direta sobre o DNA. Trabalhos *in vitro* demonstram também uma importante capacidade de inibição de fibroblastos, fatores esses que justificam sua ampla utilização.

5 Organismo Teste: *Drosophila melanogaster*

Testes genéticos em *Drosophila melanogaster* têm sido utilizados por mais de 50 anos na identificação dos produtos mutagênicos e no estudo de seus mecanismos de ação. No entanto, testes de antigenotoxicidade datam da última década (IDAOMAR *et al*., 2002).

A *D. melanogaster*, conhecida popularmente como mosca-da-fruta, é um organismo eucarionte, da ordem Díptera, com 2n=8 cromossomos, sendo 3 pares de autossomos e 1 par sexual. É um organismo teste muito utilizado pelos pesquisadores, por ser de fácil manutenção em laboratório, ter um ciclo reprodutivo curto, fornecer um grande número de indivíduos por progênie e apresentar reações metabólicas semelhantes às dos mamíferos, o que permite certo grau de extrapolação para humanos (GRAF, 1994). Além disso, possui um sistema versátil para o metabolismo de agentes xenobióticos (CYP450), capaz de ativar promutágenos e procarcinógenos (GRAF; VAN SCHAIK, 1992).

A *D. melanogaster* é um inseto de pequenas dimensões, com cerca de 3 milímetros de comprimento e que exibe acentuado dimorfismo sexual, sendo as fêmeas mais longas do que os machos. Por outro lado, os machos possuem uma zona pilosa denominada de “pente sexual”, situada no primeiro par de patas, estrutura esta que não existe nas fêmeas (REEVE, 2001), sinalizado pela seta na Figura 9.

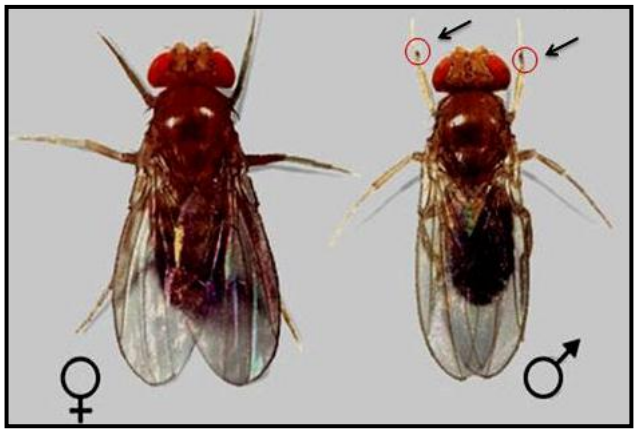

Figura 9- Casal de *Drosophila melanogaster,* à esquerda a fêmea, que é maior e não apresenta pente sexual e à direita o macho, que é menor e apresenta o abdome mais segmentado e pente sexual (indicado pela seta).
Fonte: www.arrogantscientist.wordpress.com

A *D. melanogaster* é o organismo teste utilizado para realização do teste SMART (*Somatic Mutation and Recombination Test*), utilizado para a detecção de mutações e recombinações somáticas (GRAF, 1984) e também do *WTS* (Teste para Detecção de Tumores Epiteliais).

6 Testes Utilizados

6.1 Teste para Detecção de Mutação e Recombinação (SMART)

O SMART foi desenvolvido por Graf *et al*. (1984) para detecção de agentes mutagênicos e recombinogênicos, entretanto, também é um teste eficaz para antimutagenicidade. Este teste detecta um amplo espectro de eventos mutagênicos, tais como mutações pontuais, deleções ou tipos específicos de translocação, assim como recombinação mitótica (GRAF *et al*., 1984).

O SMART utiliza três linhagens mutantes de *D. melanogaster*:

- *mwh/mwh (mwh – multiple wing hairs);*
- *flr^3/In(3LR)TM3, ri p^p sep I(3)89Aa bx^{34e} e Bd^s (flr^3 – $flare^3$);*
- *ORR/ORR; flr3/In(3LR)TM3, ri p^p sep I(3)89Aa bx^{34e} e Bd^s (Oregon R – $flare^3$);*

A linhagem *mwh* possui um gene marcador no cromossomo 3 (3-0,3) numa posição distal, que se caracteriza por expressar três ou mais pelos em cada célula. A linhagem é mantida em homozigose, já que esta é uma mutação viável. Já os indivíduos *$flare^3$* possuem o gene *flr^3* numa posição mais proximal, também

no cromossomo 3 (3-38,8). Neste caso, o pelo mal formado é caracterizado por se assemelhar a uma chama de vela. O gene marcador *flr*^{3} é letal em homozigose (GRAF *et al.*, 1984; GUZMÁN-RINCÓN; GRAF, 1995), portanto, foi desenvolvido um cromossomo homólogo balanceador *TM3*, *Bd*^{s} (*Third Multiple 3, Beaded-serrate*) que mantém a heterozigose da linhagem e permite que ela seja viável (LINDSLEY; ZIMM, 1992).

A linhagem *Oregon R; flare*^{3} foi construída por Frölich e Wurgler (1989) e, apesar de apresentar o marcador *flr*^{3}, é diferente dos indivíduos dessa linhagem, pois os cromossomos 1 e 2 das linhagens originais *(mwh e flr*^{3}*)* foram substituídos pelos da linhagem Oregon R (R), resistente ao DDT, e que possui alta atividade de enzimas citocromo P450 (FREI; WÜRGLER, 1995). A inserção dessa linhagem tornou o teste SMART mais sensível à ativação de promutágenos via citocromo (HALLSTRÖM; BLANK,1985).

Com estas linhagens são realizados dois cruzamentos: o Cruzamento Padrão (*ST- Standard Cross*), onde fêmeas virgens *flr*^{3}/In(3LR)TM3 são cruzadas com machos *mwh/mwh* (GRAF *et al.*, 1989), e o Cruzamento de Alta Bioativação (*HB- High Bioactivation Cross*), onde fêmeas virgens *ORR*;*flr*^{3}/In(3LR)TM3 são cruzadas com machos *mwh/mwh* (GRAF; VAN SCHAIK, 1992).

Desses cruzamentos nascem dois tipos de descendentes: transheterozigotos para os genes marcadores *mwh* e *flr*^{3} (MH) e heterozigotos para o cromossomo *TM3* (BH). Esses descendentes são distintos fenotipicamente, com base no marcador *TM3, Bd*^{s}. Os indivíduos MH (*mwh*+/+*flr*^{3}) apresentam os cromossomos estruturalmente normais, enquanto que os indivíduos BH (*mwh*+/+*TM3,Bd*^{s}) apresentam um cromossomo com um balanceador gênico com múltiplas inversões (*TM3,Bd*^{s}). O fenótipo dos descendentes MH é de asa selvagem, com borda lisa, enquanto que nos descendentes BH as asas são mal formadas, com aparência picotada ou serrilhada, resultado da expressão do gene *Bd*^{S}, como pode ser observado na Figura 10 (GUZMÁN-RINCÓN; GRAF, 1994).

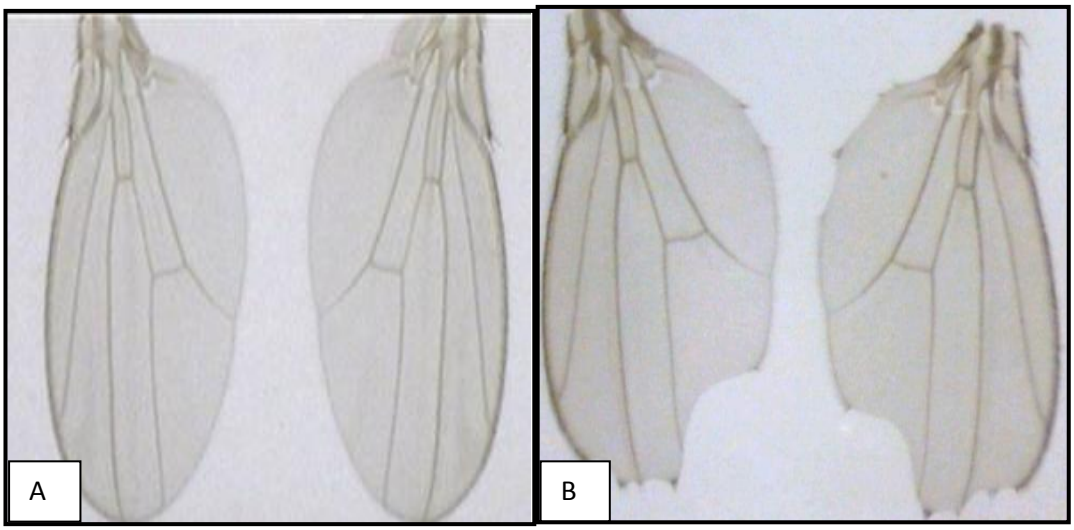

Figura 10- Fenótipo das asas dos descendentes de *D. melanogaster*. (A) trans-heterozigotos *mwh+/+flr*^{3}, MH; (B) heterozigotos para o cromossomo *TM3, mww+/+TM3, Bd*^{S}, BH.
Fonte: Fotos (microscópio óptico) do Laboratório de Citogenética e Mutagênese, UNIPAM, Patos de Minas, MG.

Durante o processo embrionário da *Drosophila*, há a proliferação de grupos de células, chamados discos imaginais, que se diferenciam e, posteriormente, formam as estruturas do corpo da mosca, inclusive as asas. Quando ocorrem mutações neste período de desenvolvimento, as células do disco imaginal da asa afetadas pela mutação perdem a heterozigose dos genes marcadores recessivos, que se manifestam na mosca adulta através de pelos mutantes em suas asas (ANDRADE; LEHMANN, 2003).

As asas dos indivíduos MH expressam pelos mutantes originados de alterações mutagênicas e recombinogênicas, ocorridas nos *loci* gênicos *mwh e flr*^{3}. Já os descendentes BH, devido à presença do cromossomo balanceador *TM3/Bd*^{S}, que possui múltiplas inversões e, por isso, inviabiliza a recombinação, expressam apenas eventos mutagênicos. Então, esses pelos mutantes são classificados em manchas: (1) simples, quando expressam apenas um dos marcadores, *mwh* (que se caracteriza por apresentar 3 pelos por célula) ou *flr*^{3}, (que se caracteriza por apresentar um pelo mal formado em formato de chama de vela) originadas por mutação, aberração cromossômica (deleção) ou recombinação distal; e (2) gêmeas, quando expressam os dois marcadores *mwh* e *flr*^{3} na mesma mancha (GRAF *et al.,* 1984), conforme mostra a Figura 11.

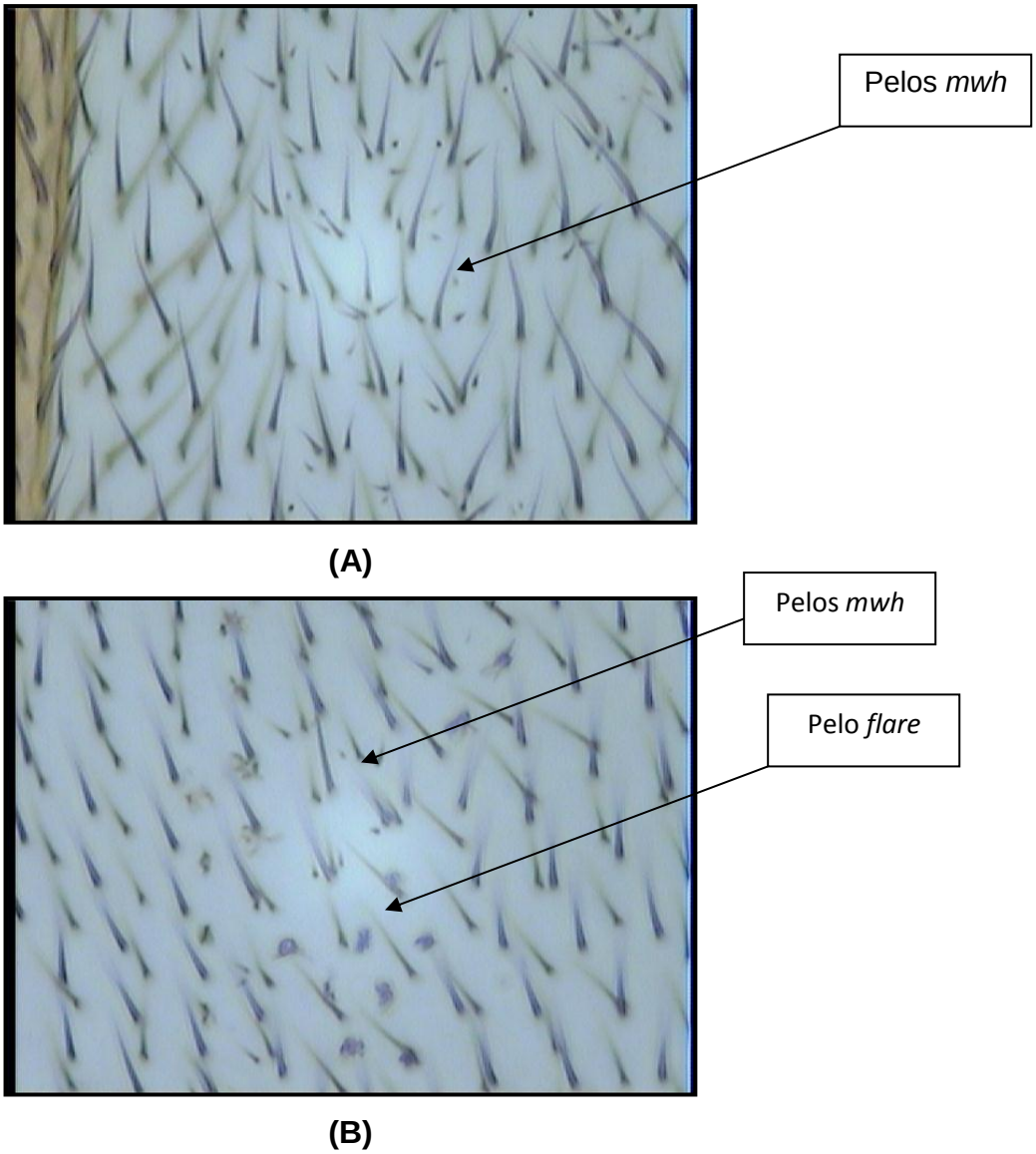

Figura 11- Tipos de manchas mutantes observadas em asas de *Drosophila melanogaster*. (A) Mancha simples; (B) Mancha gêmea.
Fonte: Fotos (microscópio óptico) do Laboratório de Citogenética e Mutagênese, UNIPAM, Patos de Minas, MG.

Quanto ao tamanho, as manchas podem ser classificadas em pequenas, quando possuem 1 ou 2 pelos mutantes, ou grandes, se houver mais de 2 pelos mutantes por segmento de asa. A posição da mancha é determinada de acordo com o setor da asa, que é dividida para efeito de observações em 7 regiões: A, B, C', C, D, D' e E.

As linhagens de *D. melanogaster* existentes no Laboratório de Citogenética e Mutagênese foram cedidas pelo Dr. Ulrich Graf (Physiology and

Animal Husbandry, Institute of Animal Science, ETH Zurich, Schwerzenbach, Switzerland). Os estoques são mantidos à temperatura de 25º C, em frascos de 250 mL, contendo um meio preparado com 820 mL de água, 11g de ágar, 156 g de banana, 1 g de nipagim (metil parabeno) e 25 g de fermento biológico (*Sacharomyces cerevisiae*) que, depois de aquecido, é distribuído de maneira uniforme pelos frascos e servirá de meio de cultura para o desenvolvimento das larvas.

6.2-Teste para detecção de clones de tumor epitelial em *D. melanogaster (wts)*

Alguns genomas tão distantes na escala evolutiva como de *Drosophila* e humanos ainda apresentam grande homologia entre diversos genes, inclusive alguns supressores de tumor, como o gene *wts*. Essa conservação evolutiva tem sido de grande importância para a compreensão dos processos envolvidos no desenvolvimento do câncer em humanos (SIDOROV *et al.*, 2001).

O gene *wts* encontrado em *D. melanogaster* está ligado à supressão de tumor e apresenta grande importância no controle da morfogênese e na proliferação celular (NISHIYAMA *et al.*,1999). Este gene codifica uma proteína denominada serina treonina quinase que, juntamente como as ciclinas, participam do processo de regulação do ciclo de divisão celular (EEKEN *et al.*, 2002). Os mamíferos apresentam um homólogo ao gene *wts*, o gene *LATS1* que, também, tem papel de regulação no ciclo celular. Assim como o *wts*, o *LAST1* é responsável pela produção da serina treonina quinase e, portanto, mutações nestes genes, estão ligadas ao desenvolvimento de tumores (SIAM *et al.*, 2009).

Normalmente, quando um agente cancerígeno causa uma alteração no material genético, as vias de sinalização do chamado *checkpoint* são ativadas para garantir o controle celular (KEMP *et al*., 2011). O ciclo celular é controlado por uma família de proteínas quinases que reagem às atividades metabólicas da célula com a finalidade de uma divisão ordenada. Essas quinases são heterodímeros, e possuem uma unidade regulatória, as ciclinas, e uma catalítica, a proteína quinase dependente de ciclina (CDK). Nas células existem pelo menos

quatro tipos de ciclinas (A, B, C e D) e pelo menos oito tipos de CDKs (CDK1 ao CDK8). Estas agem em diversas combinações em pontos específicos no ciclo celular (SIAM *et al.*, 2009).

Durante a metamorfose da *Drosophila* é formado o chamado disco imaginal, que corresponde a um grupo de células na larva que vão originar as estruturas presentes na epiderme da mosca adulta. As células do disco imaginal da *Drosophila* se assemelham muito as células somáticas dos humanos (JUSTICE *et al*., 1995;. XU *et al.*, 1995). Se ocorrerem mutações durante a formação das células desse disco imaginal estas se manifestarão como tumores na mosca adulta (SIDOROV *et al.*, 2001).

O gene marcador *wts* é letal em homozigose (EEKEN et al, 2002), portanto foi desenvolvido um cromossomo homologo balanceador *TM3* Sb^1 caracterizado por múltiplas inversões e marcado por um alelo dominante *stubble* (Sb^1) que mantém a heterozigose da linhagem e permite que ela seja viável. Entretanto, a sua deleção em grupos de células é viável, levando a formação de verrugas (*warts*), arredondadas e potencialmente invasivas, que tem a capacidade de se desenvolver por todo o corpo da mosca (JUSTICE *et al.*, 1995), como pode ser observado na Figura 12.

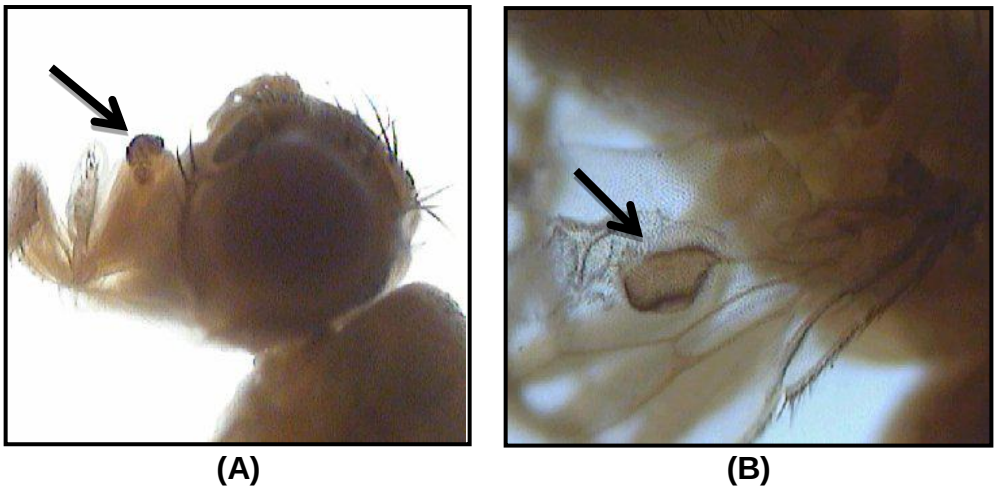

Figura 12. Tumores. (A) Tumor na cabeça; (B) Tumor na asa.

Fonte: Fotos (microscópio estereoscópico) do Laboratório de Citogenética e Mutagênese, UNIPAM, Patos de Minas, MG.

Para a realização do teste *WTS* são utilizadas duas linhagens mutantes de *D. melanogaster (wts e mwh),* que são portadoras dos marcadores genéticos

warts (wts, 3-100) e *multiple wing hairs (mwh, 3-0,3)*. A linhagem st^{1} in^{1} kni^{ri-1} p^{p} wts^{3-17}/*TM3,* Sb^{1} foi gentilmente cedida pelo *Bloomington Drosophila Stock Center*, da Universidade de Indiana, USA, com o número de registro: Bloomington/7052. Os estoques são mantidos em frascos de ¼ de litro contendo meio de cultura de *D. melanogaster* (820 mL de água; 25g de fermento- *Sacchoromyces cerevisiae*; 11g de ágar; 156g de banana e 1g de nipagin), à temperatura de 25º C e 60% de umidade.

REFERÊNCIAS

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Biologia Molecular da Célula**. 4 ed. p. 1313-1362, 2004.

ALMEIDA, V. L.; LEITÃO, A.; REINA L. C. B.; MONTANARI, C. A.; DONNICI, C. L.; LOPES, M. T. P. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo celular não específicos que interagem como DNA: uma introdução. **Química Nova**, v. 28, n.1, p. 118-129, 2005.

ALVES, A. S.; LIBERAL, J.; OLIVEIRA, M. 2009. **Anfotericina B**. Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas. Universidade do Porto, Portugal, 2009.

ANDRADE, H. H. R. de; LEHMANN, M. Teste para detecção de mutação e recombinação somática em *Drosophila melanogaster*. In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. **Mutagênese ambiental**. Canoas: Ulbra, Cap.11. p. 281-307, 2003.

CASTRO, T. L.; COUTINHO, H. D. M.; GEDEON, C. C.; SANTOS, J. M.; SANTANA, W. J.; SOUZ, L. B. S. Mecanismos de resistência da *Candida sp* WWA antifúngicos. **Infarma**, v. 18, n.9, p. 30-35, 2006.

CATELANI, A.L.P.M. 2010. 155f. **Variações no número de cópias de segmentos de DNA em pacientes com surdez sindrômica**. Tese de Doutorado em Ciências. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

CHEN, Q.; ZHANG, T.; WANG, J. F.; WEI, D. Q. Advances in human cytochrome p450 and personalized medicine. **Curr. Drug Metab**., v. 12, n.5, p.436-444, 2011.

COSTA, W.F; NEPOMUCENO, J.C. Protective effects of a mixture of antioxidant vitamins and mineral on the genotoxicity of doxorubicin in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Environ. Mol. Mutagen,** v.47, p. 18-24, 2006.

CRONEMBERGER, S.; SANTOS, D. V. de V.; RAMOS, L. F. F.; OLIVEIRA, A. C. M.; MAESTRINI, H. A.; CALIXTO, N. Trabeculectomia com mitomicina C em pacientes com glaucoma congênito refratário. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 67, p. 475-479, 2004.

CAll, M.L.S, Cell Mol. **Life Sci.** v.59, p.241-257. 2002.

DALKIC, E.; WANG, X.; WRIGHT, N.; CHAN, C. Cancer-Drug associations: a complex system. **Plos One**, v. 5, 2010.

DANTAS, E. L. R.; LIMA S. A. F. H. de; CARVALHO, S. F. de; ARRUDA, A. P.; RIBEIRO, E. M.; RIBEIRO, E. M. Genética do Câncer Hereditário. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 55, n. 3, p. 263-269, 2009.

DUTRA, E. S.; DIAS, C. D., ARAÚJO, B. C.; CASTRO, A. J. S.; NEPOMUCENO, J. C. Effect of organic tomato (Lycopersicon esculentum) extract on the genotoxicity of doxorubicin in the Drosophila wing spot test. **Genet Mol Biol.**, v. 32, p. 133–137, 2009.

EEKEN, J. C.; KLINK, I.; VAN VEEN, B. L.; PASTINK, A. Induction of epithelial tumors in *Drosophila melanogaster* heterozygous for the tumor suppressor gene *wts*. **Environ. Mol. Mutagen***.* v. 40, p. 277-282, 2002.

EGITO, L. C.; MEDEIROS, S.R; MEDEIROS, M.G. PRICE, J.C.; EGITO, E.S. Evaluation of the relationship of the molecular aggregation state of amphotericin B in medium to its genotoxic potential. **J. Pharm. Sci.**, v. 93. n. 6, p. 1557-65, 2004.

ERTUGRUL D., XUEWEI W., NEIL W. Cancer-drug associations: a complex system. In **Plos One.** n.5 v.4. 2010.

FERNANDES, I. C.; MELLO, A. A. Entendendo e combatendo o câncer. **Revista Tema**, v. 7, n. 10/11, p. 2-11, 2008.

FILIPPIN, F. B.; SOUZA, L. C. Eficiência terapêutica das formulações lipídicas de anfotericina B. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 42, n. 2, 2006.

FREI, H.; WURGLER, F. E. Optimal experimental design and sample size for the statistical evaluation of data from Somatic Mutation and Recombination Test (SMART) in *Drosophila*. **Mutation Res**., v. 334, n. 2, p. 235-247, 1995.

FRÖLICH, A.; WURGLER, F. E. New tester strains with improved bioactivation capacity for the *Drosophila* wing spot test. **Mutation Res,** v. 222, p. 99-104, 1989.

GAO, F.; LIN, Y.; ZHANG R. RNA-DNA differences are rarer in proto-oncogenes than in tumor suppressor genes. **Nature**, v. 2, n. 2, 2012.

GARNIS, C., BUYS, T. P. H.; LAM, W. L. Genetic alteration and gene expression modulation during cancer progression. **Mol. Cancer**, v. 3, 2004.

GATES, R. A. e FINK, R. M. **Segredos em enfermagem Oncológica**: Respostas necessárias ao dia-a-dia. 3. ed. São Paulo: Artmed. p. 31-41, 2008.

GILMAN, A. G. **Goodman & Gilman:** As bases farmacológicas da terapêutica. 11. ed. Rio de Janeiro: Graw Hill, p. 1103-1223, 2006.

GRAF, U. WÜRGLER, F. E.; KATZ, A. J.; FREI, H.; JUON, H.; HALL, C. B.; KALE, P. G. Somatic Mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. **Environmental mutagenesis**, v. 6, p. 153-188, 1984.

GRAF, U.; FREI, H.; KÄGI, A.; KATZ, A. J.; WÜRGLER, F. E. Antigenotoxicity studies in *Drosophila melanogaster*. **Environmental mutagenesis**, v. 222, p. 153-188, 1989.

GRAF, U; VAN SCHAIK, N. Improved high bioactivation cross for the wing somatic and recombination test in *Drosophila melanogaster*. **Mutation Res.,** v. 271, p. 59-67, 1992.

GRAF, U. The Actual Situation of SMART (Somatic Mutation and Recombination Test) in *D. melanogaster* . **Contam. Ambient,** v.10, n.1, p.5-7, 1994.

GUENGERICH, R. Cytocrome P450 and chemical toxicology. **Chem. Res. Toxicol.,** v. 21, p. 70-83, 2008.

GUZMÁN-RICON, J.; GRAF, U. *Drosophila melanogaster* somatic mutation and recombination test as a biomonitor. In**: Biomonitors and Biomarkers a Indicators of Environmental Change.** New York: Edit by F. M. Butterworth et al., Phenunm Press, v.402, p 169-181, 1995.

HALLSTRÖM, I; BLANK, A. Genetic regulation of the cytochrome P-450: dependent reactions. **Chem.Biol.Interact**., v. 56, p.157-171, 1985.

IDAOMAR, M.; HAMSS, R. E.; BAKKALI, F.; MEZZOUG, N.; ZHIRI, A.; BAUDOUX, D.; MUNOZ-SERRANO, A.; LIEMANS, V.; ALONSO-MORAGA, A. Genotoxicity and antigenotoxicity of some essential oils evaluated by wing spot test of *Drosophila melanogaster.* **Mutation Research**, v. 513, p. 61-68, 2002.

INCA. Ministério da Saúde. Ações de enfermagem para o controle do câncer: Uma proposta de integração ensino-serviço. Rio de Janeiro: **Instituto Nacional do Câncer,** 3 ed. p. 58, 2008.

JUSTICE, R. W.; ZILIAN, O.; WOODS, D. F.; NOLL, M.; BRYANT, P. J. The Drosophila tumor suppressor gene warts encodes a homolog of human myotonic dystrophy kinase and is required for the control of cell shape and proliferation. **Genes Dev**., v. 9, p. 534–546, 1995.

KATZUNG, B. G**. Farmacologia:** básica e clínica. 9 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p. 763, 2006.

KEMP, M. G; LINDSEY-BOLTZ, L. A.; SANCAR, A. The DNA Damage Response Kinases DNA-dependent Protein Kinase (DNA-PK) and Ataxia Telangiectasia Mutated (ATM) Are Stimulated by Bulky Adduct-containing DNA**. J. Biol. Chem**, v.3, n. 286, 2011.

KNODERER, C. A.; KNODERER. H. M. Hyperphosphatemia in Pediatric Oncology Patients Receiving Liposomal Amphotericin B. J. **Pediatr Pharmacol. Ther**., v. 16, n. 2, 2011.

LESTNER, J. M.; SUSAN J. H., GOODWIN. J, GREGSON, L.; MAJITHIYA, J.; WALSH, T. J., JENSEN, G. M.; HOPE, W. W. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Amphotericin B Deoxycholate, Liposomal Amphotericin B, and Amphotericin B Lipid Complex in an In Vitro Model of Invasive Pulmonary Aspergillosis. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 54, n. 8, 2010.

LINDSLEY, D. L; ZIMM, G. G. **The genome of *Drosophila melanogaster*.** San Diego: Academic Press, p. 1133, 1992.

LOURO, I.D.; Lerena, Jr. J.C.; Melo, M.S.V.; Ashton-Prolla, P.;. Conforti-Froes, N. **Genética Molecular do Câncer.** 2 ed. São Paulo: MSG Produção Editorial. p.35, 2002.

LUMAR, S. H. Engineering Cytochrome P450 Biocatalysts for Biotechnology, Medicine, and Bioremediation. **Expert Opin Drug Metab. Toxicol**., v. 1, n. 5, p. 359-366, 2010.

MARTINEZ, M. A. R.; FRANCISCO, G.; CABRAL, L. S.; RUIZ, I. R. G.; FESTA Neto, C. Genética molecular aplicada ao câncer cutâneo não melanoma. **An. Bras Dermatol**., v. 81, n. 5, p. 405-419, 2011.

MICHAUD V.; FRAPPIER, M.; DUMAS, M.C.; TURGEON, J. Metabolic Activity and mRNA Levels of Human CardiacCYP450s Involved in Drug Metabolism. **Plos One**, v. 5, 2010.

NETTO, M. V.; MOHAN, R. R.; SINHA, S.; SHARMA, A.; GUPTA, P. C.; WILSON, S. E.. Effect of Prophylactic and Therapeutic Mitomycin C on Corneal Apoptosis, Cellular Proliferation, Haze, and Long-term Keratocyte Density in Rabbits. **J. Refract. Surg.**, v. 22, n. 6, p. 562–574, 2006.

NISHIYAMA, Y.; HIROTA, T.; MORISAKI, T.; HARA, T.; MARUMOTO, T.; IADA, S.; MAKINO, K.; YAMAMOTO, H.; HIRAOKA, T.; KITAMURA, N.; SAYA, H. A human homolog of Drosophila warts supressor, h-warts, localized to mitotic apparatus and specifically phosphorylated during mitosos. **Febs Letters**, v. 459, p. 159-165, 1999.

OLIVEIRA R. B.; ALVES, J. R. Agentes Antineoplásicos Biorredutíveis: uma Nova Alternativa para o Tratamento de Tumores Sólidos. **Química Nova**, v. 25, n. 6, 2002.

ORSOLIN, P.C.; SILVA-OLIVEIRA, R.G.; NEPOMUCENO,J.C. Assessment of the mutagenic, recombinagenic and carcinogenic potential of orlistat in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, p. 2598-2604, 2012.

PALACIOS, D. S. ; DAILEY, I. ; SIEBERT, D. M.; WILCOCK, B. C.; BURKE, M. D. Synthesis-enabled functional group deletions reveal key underpinnings of amphotericin B ion channel and antifungal activities. **PNAS**, v. 17, p. 6733-6738, 2011.

PARKINSON, A. **Biotransformation of xenobiotics**. The basic Science of poisons. McGraw-Hill, v. 12, p. 106-304, 2008.

PEIXOTO, D. L. G**.** 2009**. Avaliação da biocompatibilidade da Anfotericina B em duas formulações: livre e associada com nanopartículas magnéticas**. Dissertação de Mestrado em Patologia Molecular. Universidade de Brasília, Brasília, 2009.

PENILDON, S. **Farmacologia.** 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p. 1369, 2006.

PIAZZA, M. J.; URBANETZ, A. A.; CARVALHO, N. S. Biologia molecular: aspectos básicos da genética: parte I. **Femina**, v. 38, n. 11, 2010.

PINTO, O. M. F. C. 2006. **Influencia in vitro da Vancomicina e Anfotericina B sobre a ação fagocitária**. Dissertação de Mestrado em Ciências, Universidade de Brasília, Brasília, 2006.

RANG, H. P*.* **Rang e Dale Farmacologia.** 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier. p.718, 2007.

REEVE, E. C. *Drosophila Melanogaster*: The Fruit Fly. **Encyclopedia of Genetics**. USA: Fitzroy Dearborn Publishers, v. 6, p. 157, 2001.

RIBEIRO, F. A.Q.; BORGES, J. P.; SILVA, ZACCHI ,F. F.; GUARALDO, L. O comportamento clínico e histológico da pele do rato submetida ao uso tópico e injetável de Mitomicina C. **Ver. Bras. Otorrinolaringol.,** v. 69, n. 2, p. 151-8, 2003.

RIBEIRO, L. R.; MARQUES, E. K. A. importância da mutagênese ambiental na carcinogênese humana. In: **Mutagênese Ambiental.** Canoas: ULBRA, cap. 1. p. 21-27, 2003.

RIVOIRE, W. A.; CAPP, E.; CORLETA, H. V. E.; SILVA, I. S. B. da. Bases biomoleculares da oncogênese cervical. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 47, n. 2, p.179-184, 2001.

SAKAKI, T.; INOUYE, K. Practical application of mammalian cytochrome P450. **J. Biosci. Bioeng.**, v. 90, n. 6, p. 583–590, 2000.

SANTIAGO, C.; BANDRÉS, F. GÓMEZ-GALLEGO, F. Polimorfismos de citocromo p450: papel como marcador biológico. **Medicina del Trabajo**, v. 11, 2002.

SCHNEIDER, S.; GIACOMAZZI, J.; ASHTON-PROLLA, P.; CAMEY, S. A. Estimação da probabilidade de mutação germinativa através da história familiar. **Rev. HCPA**., v.53, n. 1, p. 99-110, 2011.

SIAM, R. Transcriptional activation of the *Lats1* tumor suppressor gene in tumors of CUX1 transgenic mice. **Molecular Cancer**, v. 5, n. 8, 2009.

SIDOROV, R. A; UGNIVENKO, E. G.; KHOVANOVA, E. M.; BELITSKY, G. A. Induction of tumor clones in Drosophila melanogaster wts/+ heterozygotes with chemical carcinogenes. **Mutation Research**, v. 498, p. 181-191, 2001.

SORENSEN, O.; ANDERSEN A; OLSEN, H, ALEXANDRE, K.; EKSTROM, P. O.; GIERCKSKY, K.E.; FLATMARK, K. Validation and use of microdialysis for determination of pharmacokinetic properties of the chemotherapeutic agent mitomycin C - an experimental study. **BMC Cancer, v.10, p. 469- 471,** 2010.

SUZUKI, D. A.; GRIFFITHS, J.F.; WESSLER, S. R; LEWONTIN, R. C.; GELBART, W. M. **Introdução a Genética.** 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.

VALDIVIESO, M.; KUJAWA, A. M.; JONES, T.; BAKER, L. H. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. **J Med Sci**., v. 9, n. 2, p.163-173, 2012.

VERMEULEN, K.; VAN BOCKSTAELE, D. R.; BERNEMAN, Z. N. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. **Cell Prolif.**, v.36, n. 3, p. 131-149, 2003.

XU, T.; W. WANG, S.; ZHANG, R. A.; STEWART, Y. U. W. Identifying tumor suppressors in genetic mosaics: the Drosophila lats gene encodes a putative protein kinase. **Development**, v. 12, p. 1053-1063, 1995.

WARD, L. S. Entendendo o Processo Molecular da Tumorigênese. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v. 46, n.4, 2002.

YOO, C. B.; JONES, B. A. Epigenetic Therapy of Cancer: Past, Presente and Future. **Nat. Rev. Drug Discover**, v. 5, n. 32, p. 37-50, 2006.

CAPÍTULO II

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL MUTAGÊNICO E CARCINOGÊNICO DA ANFOTERICINA B EM CÉLULAS SOMÁTICAS DE *Drosophila melanogaster*

RESUMO

A Anfotericina B (Anf B) é um antifúngico extraído de *Streptomyces nodosus*, que possui atividade antibiótica efetiva contra diversas espécies de fungos patogênicos. Devido à toxicidade desta droga, o presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de avaliar sua atividade mutagênica, recombinogênica e carcinogênica. Para tanto, foram utilizados os testes para Detecção de Mutação e Recombinação Somática (SMART) e o Teste para Detecção de Tumores Epiteliais (*wts*), ambos realizados em *Drosophila melanogaster*. No SMART foram utilizadas larvas de 4 horas provenientes do cruzamento padrão (ST) e de alta capacidade de bioativação metabólica (HB). As larvas provenientes de ambos os cruzamentos foram tratadas com diferentes concentrações de Anfotericina B (0,01; 0,02 e 0,04 mg/mL). Os resultados revelaram que a Anf B causou aumento significativo no número de manchas nos indivíduos provenientes do cruzamento HB, o que sugere que esse fármaco atua como um prómutageno, manifestando tal efeito após a biotransformação pelo sistema citocromo P450. Os resultados indicam, também, que a recombinogenicidade é o principal evento induzido pela Anf B. A recombinação homóloga pode ter função determinante nos diferentes estágios da carcinogênese. Para esta verificação, larvas provenientes do teste *wts,* descendentes do cruzamento de fêmeas virgens *wts/TM3* com machos *mwh/mwh*, foram tratadas com as mesmas concentrações de Anf B isoladas e em associação com a mitomicina C (0,1 mM). Os resultados não revelaram atividade carcinogênica para a Anf B.

Palavras-chave**: Anfotericina B, SMART, *wts*, Recombinação, *Drosophila melanogaster.***

ABSTRACT

Amphotericin B (AmB) is an antifungal extracted from *Streptomyces nodosus*. Its fungicidal activity depends primarily on its binding to the sterol group, present in the membrane of fungi. Due to the toxicity of this drug this study aimed to evaluate their mutagenic, carcinogenic and recombinogenic activity. To do so, we used Somatic Mutation and Recombination Test (SMART) and the test for the detection of Epithelial Tumors (*wts*), both in *Drosophila melanogaster*. In the assessment using SMART, larvae from 72 h, descendants from the standard (ST) cross and the high bioactivation (HB) cross were treated with different concentrations of Amphotericin B (0.01; 0.02 e 0.04 mg/mL). The results revealed that the AmB is a promutagen exhibiting increase in the number of spots on individuals from high bioactivation (HB) cross with a high level of the cytochrome P450. The results also indicate that recombinogenicity is the main genotoxic event induced by AmB. Homologous recombination can function as a determinant at different stages of carcinogenesis. For verification, larvae from the *wts* test, descendants from the *wts/TM3* virgin female and *mwh/mwh* male cross, were treated with the same three AmB concentrations separately and in association with mitomicin C (0.1 mM). The results did not, however, provide evidence that AmB has carcinogenic potential.

KEYWORDS: Amphotericin B, SMART, *wts*, Recombination, *Drosophila melanogaster.*

1 INTRODUÇÃO

A anfotericina B (Anf B) é um antibiótico natural poliênico, obtido a partir de culturas do actinomiceto *Streptomyces nodosus* (MICELI; CHANDRASEKAR, 2012), que se caracteriza por apresentar um amplo anel contendo um grupo funcional lactona e uma sequência de duplas ligações conjugadas (MANZONI et al., 2012). Esta droga apresenta grande importância para a saúde pública por ser amplamente utilizada no tratamento de infecções fúngicas sistêmicas graves (ALSAAD, GRAY, OSTROUMOVA; 2012), inclusive em pacientes imunocomprometidos e em tratamento quimioterápico (OGITA et al., 2012).

O mecanismo de ação deste fármaco consiste em sua ligação ao grupo esterol, principalmente ergosterol, presente na membrana celular de fungos (VIRAG et al., 2012). Esta ligação causa extravazamento de íons intracelulares, resultando em ruptura osmótica (MICELI e CHANDRASEKAR, 2012). Consequentemente, há despolarização e aumento da permeabilidade, culminando na morte celular (VAN DE VEN et al., 2012). Entretanto, a formação de canais na membrana celular não parece ser o único mecanismo de atividade da Anf B, já que esta também provoca estresse oxidativo que é mediado por radicais de superóxido (KIM et al., 2012). O dano na função oxidativa celular e a ligação ao ergosterol da membrana estão ligados ao efeito tóxico deste fármaco (FAUVEL et al., 2012).

Atualmente, a anfotericina B, é o antifúngico de maior eficácia disponível. Todavia, a sua utilização é limitada em função de sua elevada toxicidade sistêmica e local. A disfunção renal é o mais importante efeito tóxico e ocorre na grande maioria dos pacientes. Usualmente as disfunções renais são reversíveis quando cessada a terapia, porém, reduções permanentes na filtração glomerular podem permanecer (CASTRO et al., 2008; KNODERER, 2011; SIVAK et al., 2011).

Apesar de inúmeros relatos dos efeitos tóxicos da Anf B pouco se sabe sobre seus efeitos sobre o DNA celular. Poucos estudos tem demonstrado o

potencial carcinogênico e mutagênico da Anf B (EGITO et al., 2004; PEIXOTO et al., 2009).

Embora a recombinação homóloga seja um processo importante para a reparação de DNA, há cada vez mais evidências de que rearranjos genômicos deletérios podem resultar de recombinação homóloga, o que significa que os eventos de recombinação homóloga podem ser determinantes na carcinogênese (AROSSI et al., 2009). A transformação de células normais em células cancerosas é um processo de múltiplos passos. Recombinação mitótica é um mecanismo envolvido na determinação de tal transformação (NOWELL, 1976; BARRETT, 1993). Em células heterozigotas, tendo ambos os alelos mutantes e normais para um gene supressor de tumor, a recombinação somática pode ser um promotor de neoplasias por induzir homozigose do alelo supressor de tumor mutante (MAHER et al., 1993; SENGSTAG, 1994).

Portanto, justifica-se a importância de um estudo que avalie os possíveis danos ao DNA causados por esta droga. Neste contexto, a Genética Toxicológica tem contribuído ao centrar suas investigações no uso de diferentes bioensaios capazes de detectar mutações pontuais e aberrações cromossômicas, produzidas por agentes físicos, químicos e biológicos presentes no meio, inclusive fármacos (CUENCA e RAMIREZ, 2004). Dentre esses bioensaios destacam-se o teste para detecção de mutação e recombinação somática (SMART) e o teste para detecção de clones de tumor epitelial *WTS.*

O SMART avalia o potencial mutagênico e recombinogênico dos compostos através das linhagens mutantes, de *D. melanogaster*, denominadas *multiple wing hairs (mwh), flare (flr^3)* e ORR (GRAF, 1989). Dos cruzamentos entre estas três linhagens obtêm-se moscas que apresentam os genes marcadores *mwh e flr^3* (MORAGA e GRAF, 1989; FREI et al., 1992). Estes marcadores possibilitam avaliar a atividade mutagênica das substâncias, uma vez que mutações nestes genes causam perda da heterozigose, gerando alterações na formação do disco imaginal, que se manifestam na mosca adulta através de manchas de pelos mutantes em suas asas (GUZMÁN-RINCÓN e GRAF, 1992).

Já o teste para detecção de clones de tumor epitelial (*wts*) é utilizado para avaliar o potencial carcinogênico de substâncias, através de alterações no gene *warts.* Este gene é extremamente importante no controle da morfogênese e

proliferação celular (EEKEN et al., 2002), atuando como supressor de tumor em *Drosophila* (NISHIYAMA, et al. 1999). Deleções neste gene levam à formação de clones de células arredondadas, chamados de verrugas, que se distribuem por todo o corpo da mosca (JUSTICE et al., 1995).

Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial mutagênico, recombinogênico e carcinogênico da Anf B por meio dos testes para a Detecção de Mutação e Recombinação Somática (SMART) e para a Detecção de clones de tumores epiteliais (*wts*), ambos realizados em *D. melanogaster*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Agentes Químicos

Anfotericina B (Anf B), de nome comercial Anfotericin B (CAS 1397-89-3), fabricada pelo laboratório Cristália, São Paulo, Brasil, com peso molecular 924,084 gramas/mol, fórmula $C_{47}H_{73}NO_{17}$ e lote de número 09085992, contendo um frasco ampola com pó liofilizado injetável e uma ampola com 10 mL de diluente, foi gentilmente cedida pela Farmácia do Hospital Regional Antônio Dias, da cidade de Patos de Minas. A Figura 1 mostra a estrutura química do composto testado.

Cloridrato de Doxorrubicina (DXR), de nome comercial Doxolen, lote número 83520, fabricado por Eurofarma Laboratórios e distribuído pela Zodiac Produtos Farmacêuticos S. A., São Paulo, Brasil, foi utilizado neste estudo na concentração de 0,125 mg/mL. Cada frasco de Doxolen contém 10mg de DXR liofilizada. Este medicamento possui peso molecular de 580,0 e fórmula molecular $C_{27}H_{29}NO_{11}.HCl$ (CAS 23214-92-8).

Mitomicina C de nome comercial Mitocin®, um pó lifolizado para solução injetável, com lote número 948931, fabricado por Kyowa Hakko Kirin, Japão e importado por Bristol-Myers Squibb Farmacêutica, São Paulo, Brasil, foi utilizada na concentração de 0,1 mM Cada frasco-ampola contém 5 mg de mitomicina. A mitomicina C tem fórmula molecular, $C_{15}H_{18}N_4O_5$ (CAS 50-07-7). Este composto foi utilizado como controle positivo na indução de tumor.

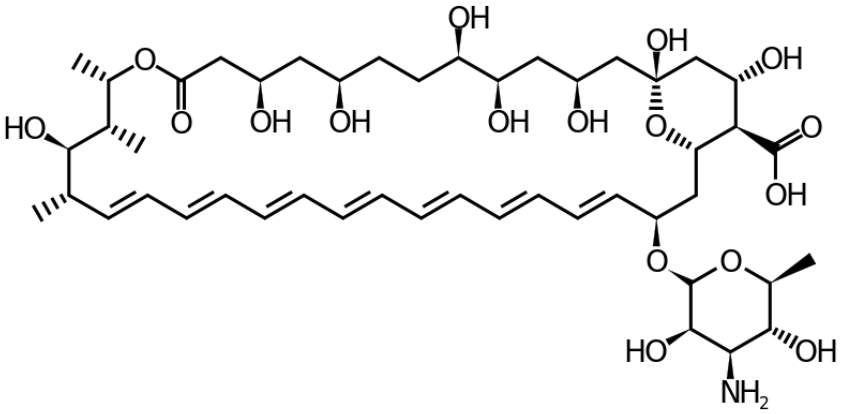

Fig. 1 Estrutura química da Anfotericina B.

2.2 Teste para a Detecção de Mutação e Recombinação Somática (SMART) em células somáticas de *Drosophila melanogaster*

2.2.1 Linhagens Estoques, cruzamentos e tratamentos

As linhagens de *D. melanogaster* existentes no Laboratório de Citogenética e Mutagênese do Centro Universitário de Patos de Minas são mantidas à temperatura de 25º C em frascos de 250 mL contendo um meio preparado com 820 mL de água, 11g de ágar, 156 g de banana, 1 g de nipagim e 25 g de fermento biológico (*Sacharomyces cerevisiae*).

Três linhagens de *D. Melanogaster* mutantes foram utilizadas neste experimento: *mwh*, flr^3 e *ORR*.

A linhagem *mwh* possui um gene marcador no cromossomo 3 (3-0,3) numa posição distal, caracterizado por expressar três ou mais pelos em cada célula; a linhagem é mantida em homozigose por ser esta uma mutação viável. Já os indivíduos $flare^3$ possuem o gene flr^3 numa posição proximal, também no cromossomo 3 (3-38,8); neste caso, o pelo malformado é caracterizado por se assemelhar a uma chama. O gene marcador flr^3 é letal em homozigose (GRAF et al*.,* 1984; GUZMÁN-RINCÓN e GRAF, 1995), no entanto, foi desenvolvido um cromossomo homólogo balanceador *TM3*, Bd^s que mantém a heterozigose da linhagem, a tornando viável (LINDSLEY e ZIMM, 1992).

A linhagem *Oregon R; flare*^{3} foi construída por Frölich e Würgler (1989) e apesar de apresentar o marcador *flr*^{3}, se difere desta linhagem por apresentar os cromossomos 1 e 2 provenientes da linhagem Oregon R resistente ao DDT que apresenta alta atividade de enzimas do citocromo P450. A introdução desta linhagem tornou o teste SMART mais sensível à ativação de promutágenos via citocromo P450 (HALLSTRÖM e BLANK,1985).

Dois tipos de cruzamentos foram feitos: 1) Cruzamento padrão (ST- *Standard Cross*): fêmeas virgens *flr*^{3}*/In(3LR)TM3, ri p*^{p} *sep I(3)89Aa bx*^{34e} *e Bd*^{s} cruzadas com machos *mwh/mwh* (GRAF et al., 1989); e 2) Cruzamento de alta bioativação (HB- *High Bioactivation Cross*): fêmeas virgens *ORR; flr*^{3}*/In(3LR)TM3, ri p*^{p} *sep I(3)89Aa bx*^{34e} *e Bd*^{s} cruzadas com machos *mwh/mwh* (GRAF; VAN SCHAIK, 1992).

Desses cruzamentos nascem dois tipos de descendentes: trans heterozigotos para os genes marcadores mwh e *flr*^{3} (MH) e heterozigotos para o cormossomo *TM3* (BH). Esses descendentes são distintos genotipicamente e fenotipicamente, pois os indivíduos MH (*mwh+/+ flr*^{3}) apresentam os cromossomos estruturalmente normais, enquanto os indivíduos BH (*mwh+/+TM3/Bd*^{s}) apresentam um cromossomo com um balanceador gênico com múltiplas inversões (*TM3/Bd*^{s}). Os descendentes MH apresentam um fenótipo caracterizado por asas com borda lisa; as alterações nesses indivíduos são decorrentes de eventos mutagênicos e recombinogênicos ocorridos nos lócus gênicos *mwh e flr*^{3}. Já nos descendentes BH as asas são mal formadas, com aparência picotada ou serrilhada e, devido à presença de um cromossomo balanceador *TM3/Bd*^{s}*,* que inviabiliza a recombinação e, portanto, expressam apenas eventos mutagênicos (GUZMÁN-RINCÓN e GRAF, 1995).

Os ovos foram recolhidos a partir dos descendentes dos cruzamentos ST e HB, durante um período de oito horas, em frascos contendo uma base de ágar sólido (ágar a 3% em água) e uma camada de levedura biológica suplementada com sacarose. Depois de 72 ± 4 horas, as larvas foram lavadas com água osmose reversa (equipamento Gehaka) e recolhidas utilizando uma peneira de malha fina.

As larvas coletadas foram colocadas em frascos de vidro contendo 1,5 g de purê de batatas instantâneo (HIKARI®, São Paulo, Brasil). 5 mL de

anfotericina B foram adicionados a cada frasco, em concentrações diferentes(0,01 mg/mL; 0,02 mg/mL e 0,04mg/mL), diluídos em água estéril. Para controle negativo foi utilizado 5 mL de água osmose reversa, para o controle positivo DXR a 0,125 mg/mL. As concentrações testadas de Anf B foram de: 0,01mg/mL; 0,02 mg/mL e 0,04 mg/mL. Estas doses foram definidas com bases em concentrações utilizadas em outros estudos *in vivo* (EGITO et al.,2004).

Larvas de terceiro estágio foram submetidas a um tratamento crônico, por cerca de 48 horas.

2.2.2 Preparação e Análise de Lâminas

Após se alimentarem do meio e completar a metamorfose, os adultos emergentes de ambos os cruzamentos (ST e HB), portadores dos genótipos trans-heterozigoto MH (*mwh +/+ flr*^{3}) e heterozigoto *TM3* (*mwh +/+ TM3, Bd*^{S}), foram coletados e preservados em etanol 70%. Para a montagem de lâminas as asas foram destacadas do corpo da *Drosophila,* por meio da utilização de pinças, e colocadas aos pares nas lâminas. Para fixação das asas foi utilizada solução de Faure (30g de goma arábica; 20 mL de glicerol; 50g de hidrato de cloral e 50 mL de água) e transferidas para a placa aquecedora (60° C), por um período de 1h. A análise das lâminas foi feita em microscópio óptico com aumento de 400X. O número de manchas, o tipo (simples ou gêmea) e a posição das mesmas, encontradas nas asas, foram registradas.

2.2.3 Análise Estatística

A análise estatística do experimento foi realizada por meio do teste Binominal Condicional de Kastenbaum e Bowman (1970) descrito por Frei e Würgler (1995). O teste *U*, não paramétrico, de Mann, Whitney e Wilcoxon foi utilizado para excluir falsos resultados positivos (Frei e Würgler, 1995), com nível de significância $\alpha = 0,05$. Com base no número de clones *mwh*, foi possível calcular a frequência de indução por célula. Para tratamento crônico Frei e Würgler (1988) estimaram uma frequência de indução integrada por célula e por divisão celular. Esta frequência é o número de clones *mwh* dividido pelo número

de células examinadas por mosca (48.000). A ação recombinogênica da droga foi calculada comparando a frequência padrão de clones por 10^5 células, obtido dos genótipos *mwh/flr*^{3} e *mwh/TM3* (FREI et al., 1992).

2.3 Teste para a detecção de clones de tumor epitelial (*wts)* em *Drosophila melanogaster*

2.3.1 Linhagens Estoques, Cruzamentos e Tratamento

Neste teste foram utilizadas duas linhagens mutantes de *D. melanogaster*, a linhagem *wts* e a linhagem *mwh*, portadoras dos marcadores genéticos *warts* (*wts*, 3-100) e *multiple wing hairs* (*mwh*, 3-0,3), respectivamente. Os estoques foram mantidos em recipientes de vidro com capacidade para ¼ de litro, contendo meio de cultura de *D. melanogaster* com 820 mL de água; 25g de fermento (*Sacchoromyces cerevisae*); 11 g de ágar; 156 g de banana e 1g de nipagin, a uma temperatura de 25° C e 60% de umidade. A linhagem *wts/TM3, sb*^{1} foi gentilmente cedida pelo Bloomington *Drosophila* Stock Center, da Universidade de Indiana, USA, com o número de registro: Bloomington/7052.

Foi realizado o cruzamento entre fêmeas virgens *wts/TM3 Sb*^{1} com machos *mwh/mwh*. Deste cruzamento, obtivemos larvas heterozigotas *wts* +/+ *mwh* que foram tratadas com os agentes químicos testados. A coleta dos ovos dos descendentes dos cruzamentos entre fêmeas virgens *wts/TM3, Sb*^{1} com machos *mwh/mwh*, ocorreu durante um período de 8 horas, em frascos contendo uma base sólida de ágar (3% de ágar em água) e uma camada de fermento biológico (*Saccharomyces cerevisiae*) suplementado com sacarose. Após 72 ± 4 horas as larvas foram lavadas com água destilada e coletadas com o auxílio de uma peneira de malha fina. As larvas de 3º estágio, provenientes desse cruzamento, foram colocadas em recipientes de vidro contendo 1,5 g de meio de purê de batatas instantâneo (YOKI, São Paulo, Brasil). Um dos frascos foi utilizado para controle positivo, sendo adicionada mitomicina C à 0,1 mM; em outro frasco, o do controle negativo, foram adicionados 5 mL de água osmose reversa; os demais frascos receberam Anf B em diferentes concentrações (0,01 mg/mL; 0,02 mg/mL e

0,04 mg/ mL) isoladas e em associação com mitomicina C. As larvas expostas à mitomicina C, em associação ou não, foram pré-tratadas por um período de 6 h. As larvas de 3º estágio foram submetidas a um tratamento crônico com a droga testada, por um período de 48 horas. Entretanto, analisamos somente as moscas que não apresentaram o balanceador cromossômico (*TM3, Sb*^{1}), moscas estas que fenotipicamente caracterizam-se pela presença de pelos longos e finos.

2.3.2 Análise das Moscas e Análise Estatística

Após completarem a metamorfose, as moscas foram transferidas para recipientes contendo etanol 70%, e, posteriormente analisamos os indivíduos que apresentavam o genótipo (*wts* +/+ *mwh*), ou seja, aqueles que apresentavam pelos longos e finos. Estes foram analisados individualmente, sem distinção de sexo, buscando em cada região do corpo destas moscas a presença de tumores, que se caracterizam como verrugas.

As observações foram feitas utilizando lupa estereoscópica, com o auxilio de pinças entomológicas e pincéis. Foram registrados somente tumores suficientemente grandes para serem identificados inequivocamente. A frequência do tumor foi calculada como o número de tumores / o número de moscas *wts* + / + *mwh* (Eeken et al., 2002).

Na análise estatística as diferenças entre as frequências de tumores nas concentrações testadas e nos controles (positivo e negativo), foram calculadas de acordo com o teste *U*, não paramétrico, de Mann-Whitney. O nível de significância adotado foi de $\alpha = 0,05$.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os compostos foram testados em dois experimentos diferentes. Os dados foram combinados depois de verificar que os dois experimentos, independentes, estavam de acordo com uma reprodutibilidade aceitável. Não foi verificada uma redução na taxa de sobrevivência das larvas, submetidas aos tratamentos, quando comparadas com o controle negativo. A DXR, utilizada como controle positivo neste teste, é uma droga amplamente prescrita na quimioterapia do câncer, e conhecida por ser altamente mutagênica, tendo capacidade de aumentar o número de manchas mutantes nos descendentes de ambos os cruzamentos, ST e HB (PEREIRA et al., 2008). Essa capacidade pode ser observada neste estudo já que a DXR foi capaz de aumentar significativamente o total de manchas mutantes em todas as categorias, nos descentes de ambos os cruzamentos, o que justifica sua utilização como controle positivo. Esse aumento também pode ser evidenciado em outros estudos tais como Costa e Nepomuceno (2006), Fragiorge et al. (2007), Castro et al. (2008), Dutra et al. (2009), Rezende et al. (2009) e Orsolin et al. (2012). Já a concentração utilizada neste experimento para a MMC foi baseada nos estudos de indução de clones de tumores epiteliais em *D. melanogaster*, induzidos por mitomicina C (ORSOLIN et al., 2012).

A Tabela 1 mostra a análise dos indivíduos MH do cruzamento ST tratados com diferentes concentrações de Anf B e a classificação das manchas em manchas simples pequenas, manchas simples grandes, manchas gêmeas assim como o total de manchas. Comparando o total de manchas nas concentrações testadas com o controle negativo observa-se que o aumento não foi significativo (α=0,05). Portanto, esse resultado sugere que a Anf B não apresenta efeito mutagênico e/ou recombinogênico nestes descendentes e, por isso, os indivíduos BH não foram analisados.

Como pode ser observado na Tabela 2, ao analisar os descendentes MH, o número de manchas aumentou significativamente em todas as concentrações testadas, quando comparado com o controle negativo, revelando que a Anf B apresenta atividade mutagênica nestes indivíduos. Este resultado justifica a análise dos indivíduos BH, realizada com o intuito de quantificar o percentual mutagênico e recombinogênico desta droga. Segundo Graf et al.

(1984), devido à presença do balanceador *TM3/Bd*^{S}, nos indivíduos BH é inviabilizada a ocorrência de eventos recombinogênicos e, por isso, apenas eventos mutacionais levam à formação de manchas mutantes nestes indivíduos.

A atividade mutagênica da Anf B nos indivíduos HB pode ser explicada pelo fato desses indivíduos apresentarem altos níveis de citocromo P450, sendo responsáveis pela detecção de compostos promutágenos, ou seja, compostos que após serem biometabolizados adquirem propriedades tóxicas, antes inexistentes. Segundo Frölich e Würgler (1989) e Graf e Van Schaik (1992) no cruzamento de alta bioativação (fêmeas ORR e machos *mwh*), muitos promutágenos tem a mutagenicidade aumentada, em comparação com o padrão (fêmeas *flr*^{3} e machos *mwh*).

O citocromo P450 é uma superfamília de oxidases de função mista que representa uma das principais classes de biotransformação (IM e WASKELL, 2011). O CYP 450 está envolvido no metabolismo de uma grande variedade de compostos endógenos e xenobióticos (NAKAMURA et al., 2012). Entretanto, ao passarem por essa via nem todas as drogas são inativadas, alguns metabólitos gerados nesse processo apresentam atividade aumentada ou propriedades tóxicas, incluindo a mutagenicidade, a teratogenicidade e a carcinogenicidade, que podem estar relacionadas à peroxidação lipídica, a produção de espécies reativas de oxigênio e a reações causadoras de alterações da concentração de glutationa e no grupo sulfidril (OSHIMA-FRANCO; FRANCO, 2003).

Na literatura existem poucos estudos que relatam a mutagenicidade da Anf B. De acordo com Peixoto (2009), o potencial citotóxico da Anf B pode ser constatado através de seu estudo com micronúcleos em eritrócitos humanos, que identificou um aumento significativo dos micronúcleos em relação ao controle negativo, que foi observado com 30 e 80 dias após o tratamento. O tratamento de maior duração, 80 dias, foi o que mais induziu citotoxicidade nos eritrócitos policromáticos. Também Egito et al. (2004), utilizando linfócitos humanos, com o objetivo de avaliar os possíveis efeitos genotóxicos da Anf B, verificaram que este fármaco é capaz de causar uma diminuição no índice mitótico e, em altas concentrações, induzir aberrações cromossômicas.

Os mecanismos pelos quais a Anf B induz danos ao DNA não foram avaliados diretamente nesta pesquisa. Acredita-se, porém, que possam estar, de

alguma forma, associados ao dano oxidativo gerado por essa droga. Estudos como o de Kim et al. (2011), Kim et al. (2012) e Fauvel et al. (2012) demonstram que a Anf B pode causar estresse oxidativo celular, mediado por radicais superóxido. Corroborando com o exposto, Suschek et al. (2000) afirmam que a Anf B pode gerar um aumento do RNA mensageiro e de proteínas que estão ligadas a produção de óxido nítrico, aumento esse que gera uma maior quantidade de radicais livres que poderão causar alterações no DNA.

Outra consideração que merece ser destacada relaciona-se à versatilidade do teste SMART ao propiciar a avaliação do efeito recombinogênico da substância testada, o que não é possível através da utilização de outros bioensaios de mutagenicidade. A maioria dos testes avalia apenas o potencial mutagênico de compostos, entretanto, outras alterações tais como a recombinação homóloga geram alterações significativas no material genético (Andrade; Lehmann, 2003).

Evidências sugerem que a recombinação homóloga é um dos principais processos de alterações genéticas (Andrade; Lehmann, 2003; Erdtmann, 2003). Trata-se de um mecanismo de reparação no DNA que pode levar a perda de heterozigose ou rearranjos genéticos sendo, portanto, crucial para a gênese de inúmeras doenças genéticas como o câncer (SINIGAGLIA et al., 2004). Nesse contexto, o SMART se destaca ao permitir tal análise.

Tendo em vista os resultados positivos para genotoxicidade da Anf B, nas três concentrações testadas, os descendentes BH (*mwh/TM3*), do cruzamento HB, tratados com as três concentrações, foram analisados para calcular a porcentagem de eventos recombinagênicos e mutagênicos. Portanto, podemos afirmar que as manchas mutantes encontradas nos descendentes do cruzamento HB foram causadas por recombinação. Dado que a Anfotericina B foi recombinogênica nos indivíduos MH do cruzamento de alta bioativação do SMART e que a recombinação homóloga está relacionada à formação de tumores, optamos por testar seu potencial carcinogênico, por meio do teste para detecção de clones de tumor em *D. melanogaster* (*wts*).

Os resultados do teste *wts*, apresentados na Tabela 4, revelam que a Anf B não apresentou atividade carcinogênica nas concentrações testadas, uma vez que, a frequência total de tumores, nos indivíduos tratados, não foi

estatisticamente diferente da frequência encontrada no controle negativo. Considerando que o efeito positivo encontrado no teste SMART foi dependente da biotransformação da Anf B pelo CYP450, o resultado do teste *WTS* pode estar associado ao fato de os indivíduos cruzados nesse teste (machos *mwh* e fêmeas *wts*) apresentarem apenas níveis basais de citocromo P450. Portanto, os indivíduos gerados a partir deste cruzamento não apresentam os altos níveis de citocromo P450, que as fêmeas ORR, do cruzamento de alta bioativação do SMART possuem. Deve-se considerar, também, que existem vários genes envolvidos na gênese e progressão do tumor. O fato de os resultados do presente estudo demonstrarem uma ausência dos efeitos carcinogênicos por Anf B em relação ao gene *wts* (supressor de tumor), não significa, necessariamente, que estes efeitos possam ser generalizados para outros genes envolvidos no processo.

Os resultados apresentados mostram, também, que a Anf B, quando associada com a mitomicina C, diminuiu significativamente a frequência total de tumores, em relação ao controle positivo (MMC). Esta ação anti-tumoral já foi verificada por outros pesquisadores. Cao e Zhen (1989) verificaram a potenciação da atividade anti-tumoral, *in vivo*, pela associação do antimetabólito dipiridamol e Anf B. Akiyama et al. (1980) verificaram, também, efeito anti-tumoral da Anf B, em ratos com leucemia, quando combinada com 6-metiltioinosina, um ribonucleosideo de purina contendo enxofre. Esses resultados podem ser explicados por um possível potencial apoptótico apresentado pela Anf B, independente da via de bioativação metabólica. Segundo Marklund et al. (2001) a Anf B induz a apoptose por gerar modificações nos canais de Na^+, $K^{+,}$ Cl^-. O mecanismo de ação de Anf B baseia-se na ligação da molécula de Anf B a membrana da célula, formando um canal transmembrana, permitindo que o conteúdo citoplasmático extravaze (LANIADO; VARGAS, 2009). Quando esses canais são formados há influxo de K^+, para dentro da célula, e esse aumento ativa enzimas que mediam a indução da apoptose. Marklund et al. (2001) afirmam, ainda, que a perda da homeostase dos íons Na^+, $K^{+,}$ $2Cl^-$ e de seus canais gera também citotoxicidade. Varlam et al. (2001) com o objetivo de investigar os efeitos citotóxicos da Anf B, avaliaram células intersticiais dos túbulos proximais de suínos, células tubulares de cães, células intersticiais medulares e mesequimais de ratos, e concluíram que as

células em estudo respondem com morte celular programada, causada por apoptose, quando tratados com doses terapêuticas da Anf B. Na concentração máxima utilizada (5,0 mg/mL), observou-se 90% de apoptose e necrose. Avaliando a fisiologia de *C. albicans* (mortas por exposição à Anf B), Phillips et al. (2003) também observaram que a Anf B produziu alterações celulares que apresentavam marcadores apoptóticos. Por outro lado, Okutomi et al. (1997) sugere que a Anf B pode provocar alguma atividade anti-tumoral, *in vivo*, ativando o sistema imunológico e desencadeando a produção endógena de fator de necrose tumoral (TNF).

Diante de tais considerações, concluimos que a Anf B pode causar morte celular por apoptose, ou mesmo ativar o sistema imunológico via TNF, o que poderia explicar a diminuição de tumores observada nos descendentes do teste para detecção de clones de tumor epitelial em *D. melanogaster*.

Finalmente, os testes SMART e *WTS* foram eficientes na avaliação da mutagenicidade, recombinogenicidade e carcinogenicidade da Anf B em células somáticas de *D. melanogaster*, uma vez que possibilitaram concluir que este antifúngico apresenta atividade recombinogênica quando interage com altos níveis de Citocromo P450. Portanto, este fármaco provavelmente é um prómutageno, tendo que ser metabolizado pelas enzimas do Citocromo P450 para adquirir esse potencial em *D. melanogaster*. Por outro lado, a Anf B também parece apresentar atividade apoptótica quando associada a MMC, efeito esse que pode estar associado às alterações nas concentrações de alguns íons de membrana celular. A confirmação da atividade recombinogênica da Anf B em *D. melanogaster* ressalta a necessidade de outros estudos que avaliem seus possíveis efeitos mutagênicos em humanos.

Tabela 1- Frequência de manchas mutantes nos descendentes transheterozigotos para os genes marcadores (*mwh/flr*^{3}) , do cruzamento padrão tratados com Anfotericina B

Genótipos **e Conc.** **(mg/mL)**	**N. de Indiv.** **(*N*)**	**Manchas por indivíduo (no. de manchas) diag. estatístico**[a] **MSP (1-2 céls)**[b] ***m* = 2**		**MSG (>2 céls)**[b] ***m* = 5**		**MG** ***m* = 5**		**TM** ***m* = 2**		**Total manchas mwh**[c] **(*n*)**	**Média das classes de tam. clones mwh**[c,d] **(*î*)**	**Frequência de indução de manchas (por 10^5 células por divisão celular)**[f] **S/ correção por tam.**[d,e] ***n/NC***	**C/ correção por tam.**[d,e] **($2^{î-2}$) X (*n/NC*)**
mwh/flr^{3}													
Controle Água	70	0,24 (17)		0,04 (3)		0,01 (1)		0,30 (21)		21	2,10	0,61	0,66
Controle DXR 0,125	70	0,57 (40)	+	0,46 (32)	+	0,43 (30)	+	1,46 (102)	+	99	3,38 {3,73}	2,90 {2,28}	7,56 {7,58}
Anf. B 0,01	70	0,27 (19)	i	0,04 (3)	i	0,03 (2)	i	0,34 (24)	-	23	1,91 {0,00}	0,67 {0,06}	0,63 {0,01}
Anf. B 0,02	70	0,31 (22)	i	0,01 (1)	i	0,00 (0)	i	0,33 (23)	-	23	1,70 -{2,50}	0,67 {0,06}	0,55 {0,00}
Anf. B 0,04	70	0,37 (26)	i	0,06 (4)	i	0,04 (3)	i	0,47 (33)	i	33	2,12 {2,17}	0,97 {0,35}	1,05 {0,39}

[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 *flr*^{3} raras.

[c]Considerando os clones mwh para as manchas simples mwh e para as manchas gêmeas.

[d]Números entre chaves são as frequências de indução corrigidas em relação a incidência espontânea estimada do controle negativo.

[e]*C* = 48.000, isto é, número aproximado de células examinadas por indivíduo.

[f]Calculado de acordo com Frei et al. (1992).

[g]Apenas manchas simples mwh podem ser observadas nos indivíduos heterozigotos *mwh/TM3*, já que o cromossomo balanceador *TM3* não contém o gene mutante *flr*^{3}.

Tabela 2- Frequência de manchas mutantes nos descendentes transheterozigotos para os genes marcadores (*mwh/flr*^{3}) e heterozigotos pra o cromossomo *TM3 (mwh/TM3*) do cruzamento de alta bioativação tratados com Anfotericina B

Genótipos e Conc. (mg/mL)	N. de Indiv. (*N*)	Manchas por indivíduo (no. de manchas) diag. estatístico[a] MSP (1-2 céls)[b] *m* = 2		MSG (>2 céls)[b] *m* = 5		MG *m* = 5		TM *m* = 2		Total manchas mwh[c] (*n*)	Média das classes de tam. clones mwh[c,d] (*î*)	Frequência de indução de manchas (por 10^5 células por divisão celular)[f] S/ correção por tam.[d,e] *n/NC*	C/ correção por tam.[d,e] ($2^{\hat{i}-2}$) X (*n/NC*)
mwh/flr^3													
Controle Água	60	0,35 (21)		0,05 (3)		0,00 (0)		0,40 (24)		24	1,63	0,82	0,63
Controle DXR 0,125	60	0,92 (55)	+	0,42 (25)	+	0,18 (11)	+	1,52 (91)	+	85	2,68 {3,10}	2,90 {2,08}	4,66 {4,46}
Anf. B 0,01	60	1,10 (66)	+	0,22 (13)	+	0,00 (0)	i	1,32 (79)	+	79	1,65 {1,65}	2,70 {1,88}	2,11 {1,48}
Anf. B 0,02	60	1,02 (61)	+	0,07 (4)	i	0,03 (2)	i	1,12 (67)	+	67	1,57 {1,53}	2,29 {1,47}	1,70 {1,06}
Anf. B 0,04	60	1,00 (60)	+	0,08 (5)	i	0,02 (1)	i	1,10 (66)	+	66	1,70 {1,74}	2,25 {1,43}	1,83 {1,20}
mwh/TM3													
Controle Água	30	0,17 (5)		0,00 (0)		[g]		0,17 (5)		5	1,20	0,34	0,20
Controle DXR 0,125	30	0,70 (21)	+	0,03 (1)	i			0,73 (22)	+	22	1,45 {1,53}	1,50 {1,16}	1,03 {0,84}
Anf. B 0,01	30	0,30 (9)	i	0,03 (1)	i			0,33 (10)	i	10	1,50 {1,80}	0,68 {0,34}	0,48 {0,30}
Anf. B 0,02	30	0,20 (6)	i	0,00 (0)	i			0,20 (6)	i	6	1,17 {1,00}	0,41 {0,07}	0,23 {0,03}
Anf. B 0,04	30	0,27 (8)	i	0,00 (0)	i			0,27 (8)	i	8	1,25 {1,33}	0,55 {0,20}	0,32 {0,13}

[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 $\alpha = \beta = 0,05$.

[b]Incluindo manchas simples *flr*^{3} raras.

[c]Considerando os clones mwh para as manchas simples mwh e para as manchas gêmeas.

[d]Números entre chaves são as freqüências de indução corrigidas em relação a incidência espontânea estimada do controle negativo.

[e]*C* = 48.000, isto é, número aproximado de células examinadas por indivíduo.

[f]Calculado de acordo com Frei et al. (1992).

[g]Apenas manchas simples mwh podem ser observadas nos indivíduos heterozigotos *mwh/TM3*, já que o cromossomo balanceador *TM3* não contém o gene mutante *flr*^{3}

Tabela 3- Frequência de clones de tumor observada em *Drosophila melanogaster*, heterozigota para o gene supressor de tumor *wts*, pré-tratada com mitomicina C (6 horas) e posteriormente tratada com anfotericina B.

Tratamentos		Número de moscas analisadas	Número de tumores por mosca (total de tumores)																						
Anfotericina B (Concentração) mg/mL	MMC mM		Olho			Cabeça			Asa			Corpo			Perna			Halteres			Total		
0	0	200	0,00	(00)		0,03	(05)		0,03	(05)		0,08	(15)		0,02	(04)		0,00	(00)		0,15	(29)	
0	0,1	200	0,62	(123)	*	1,08	(216)	*	2,63	(526)	*	2,55	(510)	*	2,08	(416)	*	0,33	(65)	*	9,28	(1856)	*
0,01	0	200	0,01	(02)		0,02	(03)		0,02	(03)		0,08	(15)		0,00	(00)		0,01	(01)		0,12	(24)	
0,02	0	200	0,01	(02)		0,03	(05)		0,07	(14)		0,07	(13)		0,00	(00)		0,00	(00)		0,17	(34)	
0,04	0	200	0,00	(00)		0,01	(02)		0,01	(02)		0,04	(07)		0,03	(06)		0,00	(00)		0,09	(17)	
0,01	0,1	200	0,53	(105)		0,72	(143)	**	2,41	(481)		1,76	(352)	**	2,07	(413)		0,37	(74)		7,84	(1568)	**
0,02	0,1	200	0,21	(41)	**	0,69	(137)	**	1,87	(374)	**	2,01	(401)	**	2,64	(527)	**	0,25	(49)		7,65	(1529)	**
0,04	0,1	200	0,47	(94)		0,50	(99)	**	2,01	(402)	**	2,13	(425)	**	2,57	(513)	**	0,18	(36)	**	7,85	(1569)	**

Diagnóstico estatístico de acordo com Mann-Whitney Teste. Nível de significância P = 0,05

* Valor considerado diferente do controle negativo (P < 0,05).

** Valor considerado diferente do controle positivo (MMC 0,1 mM) (P < 0.05).

MMC, mitomicina C.

REFERÊNCIAS

ALSAADI, M.; ITALIA, J.L.; MULLEN, A. B.; KUMAR M.N.V. RAVI, A. A CANDLISH R. A. M WILLIAMS, C.D SHAW, F. AL GAWHARI, G.H. COOMBS, M. WIESE, A.H. THOMSON, M. PUIG-SELLART, J. WALLACE, A. SHARP, L. WHEELER, P. WARN, K.C. CARTER. The efficacy of aerosol treatment with non-ionic surfactant vesicles containing amphotericin in rodent models of leishmaniasis and pulmonary aspergillosis infection. **Journal of Controlled Release**, v. 3, n. 160,. p. 685-691, 2012.

AKIYAMA SI, KUWANO M, KOMIYAMA S, SANEYOSHI M. Antitumor effect of a combination of 6-methylthioinosine and amphotericin B on mouse leukemia L1210. **Cancer Lett**.v.9 n.4. p.305-11. 1980.

ANDRADE, H. H. R.; LEHMANN, M. Teste para detecção de mutação e recombinação somática em *Drosophila melanogaster*; In: Mutagênese ambiental (Eds) Ribeiro L R, Salvadori D M F and Marques E K (Canoas: Ulbra), p 281-307. 2003.

AROSSI, G. A.; LEHMANN, M.; DIHL, R. R.; REGULY, M. L.; ANDRADE H., H, R. Induced DNA Damage by Dental Resin Monomers in Somatic Cells. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology.** v. 106, n. 2, p.124–129, 2010.

BARRETT, J.C.. Mechanisms of multistep carcinogenesis and carcinogen risk assessment. **Environ Health Perspect** v. 100, p. 9-12. 1993.

CASTRO, A. J. S.; GRISÓLIA, C. K.; ARAÚJO, B. C.; DIAS, C. D.; DUTRA, E. S.; NEPOMUCENO, J. C.. Recombinogenic effects of the aqueous extract of pulp from pequi fruit (*Caryocar brasiliense* Camb) on somatic cells of *Drosophila melanogaster*; **Genet. Mol. Biol.**, v. 7, p.1375-1383. 2008.

CAO SS, ZHEN YS. Potentiation of antimetabolite antitumor activity in vivo by dipyridamole and amphotericin B. Cancer Chemother Pharmacol. v.24, n. 3, p.1816. 1989.

COSTA, W. F.; NEPOMUCENO, J. C. Protective effects of a mixture of antioxidant vitamins and mineral on the genotoxicity of doxorubicin in somatic cells of *Drosophila melanogaster*; **Environ. Mol. Mutagen.**, v.47, p.18-24. 2006.

CUENCA, P.; RAMÍREZ, V. Mutagénesis ambiental y el uso de biomarcadores para predecir el riesgo de cancer. **Rev. Biol. Trop.** v.52, n.3, p. 585-590, 2004.

CUNHA, KÊNYA SILVA; REGULY, MARIA LUÍZA; GRAF, ULRICH ; ANDRADE HELOISA HELENA RODRIGUES. Somatic recombination: a major genotoxic effect of two pyrimidine antimetabolitic chemotherapeutic drugs. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**. v. 514, n.2, p. 95–103. 2002.

DUTRA, E. S.; DIAS, C. D., ARAÚJO, B. C.; CASTRO, A. J. S.; NEPOMUCENO, J. C. Effect of organic tomato *(Lycopersicon esculentum)* extract on the genotoxicity of doxorubicin in the Drosophila wing spot test. **Genet Mol Biol.,** v. 32. p. 133–137, 2009.

EEKEN, J. C.; KLINK, I.; VAN VEEN, B. L.; PASTINK, A. Induction of epithelial tumors in *Drosophila melanogaster* heterozygous for the tumor suppressor gene *wts*. **Environ. Mol. Mutagen***.* v. 40, p. 277-282, 2002.

EGITO, L. C.; MEDEIROS, S. R; MEDEIROS, M.G. PRICE, J.C.; EGITO, E.S. Evaluation of the relationship of the molecular aggregation state of amphotericin B in medium to its genotoxic potential. **J. Pharm. Sci.**, v.93. n. 6, p. 1557-65, 2004.

FAUVEL, M.; FARRUGIA, C.; TSAPIS, N.; GUEUTIN, C.; CABARET, O.; BORIES, C.; BRETAGNE S.; BARRATT, G.. Aerosolized liposomal amphotericin B:

prediction of lung deposition, in-vitro uptake and cytotoxicity**. Internacional Journal of Pharmaceutics**, v 435, n. 1, p. 106-110. 2012.

FRANCHI, L. P.; PENTIADO, N. H. G. R.; SILVA, R. N.; GUIMARÃES, N.N.; JESUINO, R. S. A.; ANDRADE, H. H. R.; LEHMANN, M.; CUNHA, K.S. Mutagenic and recombinagenic effects of lamivudine and stavudine antiretrovirals in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Food and Chemical Toxicology**. v. 47. p. 578-582, 2009.

FRAGIORGE, E. J.; SPANÓ, M. A.; ANTUNES, L. M. G. Modulatory effects of the antioxidant ascorbic acid on the direct genotoxicity of doxorubicin in somatic cells of *Drosophila melanogaster*; **Genet. Mol. Biol**., v. 30, p. 449-455. 2007.

FREI, H.; WURGLER, F. E. Optimal experimental design and sample size for the statistical evaluation of data from Somatic Mutation and Recombination Test (SMART) in *Drosophila*. **Mutation Res.,** v 203. p. 235-247, 1995.

FREI H. The genotoxicity of the anti-cancer drug mitoxantrone in somatic and germ cells of *Drosophila melanogaster*. **Mutat. Res.,** v. 203, p. 21-33, 1992.

FROLICH, A.; WÜRGLER F. E. New tester strains with improved bioactivation capacity for the *Drosophila* wing spot test. Mutat. Res., v. 216, p.179-187. 1989.

GRAF, U. WÜRGLER, F. E.; KATZ, A. J.; FREI, H.; JUON, H.; HALL, C. B.; KALE, P. G. Somatic Mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. **Environmental mutagenesis**, v 6, p. 153-188, 1984.

GRAF, U.; FREI, H.; KÄGI, A.; KATZ, A. J.; WÜRGLER, F. E. Antigenotoxicity studies in *Drosophila melanogaster*. **Environmental mutagenesis**, v. 222, p. 153-188, 1989.

GRAF, U; SINGER, D. Genotoxicity testing of promutagens in the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. Rev. Int. Contam. Ambient., v. 271, 15-27p. 1992.

GRAF, U; VAN SCHAIK, N. Improved high bioactivation cross for the wing somatic and recombination test in *Drosophila melanogaster*. **Mutation Res**, v. 271, p. 59-67. 1992.

GRAY, K. C.; PALACIOS, D. S.; DAILEY, I.; ENDO, M. M.; UNO, B. E.; WILCOCK, B. C.; BURKE, M. D. Amphotericin primarily kills yeast by simply binding ergosterol. **Proc. Natl. Acad. Sci.,** v.14, n.109, p. 2234-2239, 2012.

GUZMÁN-RICON, J.; GRAF, U. *Drosophila melanogaster* somatic mutation and recombination test as a biomonitor. In**:** Biomonitors and Biomarkers a Indicators of Environmental Change. New York: Edit by F. M. Butterworth et al., **Phenunm Press**.p 169-181, 1995.

HALLSTRÖM, I; BLANK, A. Genetic regulation of the cytochrome P – 450 – dependent reactions. **Chem. Biol. Interact**., v. 31, n 56, p.157-171, 1985.

IM, S.C.; WASKELL, L. The Interaction of Microsomal Cytochrome P450 2B4 with its Redox Partners, Cytochrome P450 Reductase and Cytochrome b5. Arch Biochem Biophys., v. 1, n. 507, p.144–153, 2011.

JUSTICE, R. W.; ZILIAN, O.; WOODS, D. F.; NOLL, M.; BRYANT, P. J. The *Drosophila* tumor suppressor gene warts encodes a homolog of human myotonic dystrophy kinase and is required for the control of cell shape and proliferation. **Genes Dev**., v. 9, p. 534–546, 1995.

KASTENBAUM, M. A.; BOWMAN, K. O. Tables for determining the statistical significance of mutation frequences. Mutat. Res., v. 9, p. 527-549, 1970.

KIM, J. H.; CHAN, K. L.; FARIA, N. C. G.; FRONT, M. M.; CAMPBELL, B. C. Microbiol.. Targeting the Oxidative Stress Response System of Fungi with Redox-Potent Chemosensitizing Agents. Microbiology, v.3, n. 88. 2012.

KIM, J. H.; CHAN, K. L.; MAHONEY, N.; CAMPBELL, B. C. Antifungal activity of redox-active benzaldehydes that target cellular antioxidation. **Ann Clin Microbiol Antimicrob.**, v. 10, n. 23, 2011.

KNODERER, C.A; KNODERER, H.M. Hyperphosphatemia in pediatric oncology patients receiving liposomal amphotericin B. **J Pediatr Pharmacol Ther**. v. 16, n. 2, p.87-91. 2011.

LANIADO, R. L.; VARGAS, M. N.C. Amphotericin B: side effects and toxicity. Rev Iberoam Micol., v.26, n.4, p. 223–227, 2009.

LINDSLEY, D.L; ZIMM, G.G. **The genome of *Drosophila melanogaster*.** San Diego: Academic Press, p.1133, 1992.

MAHER, V.M; BHATTACHARYYA, N.P.; MAH, M.C.; BOLDT, J.; YANG, J.L.; MCCORMICK, J.J. Mutations induced by 1-nitrosopyrene and related compounds during DNA replication in human cells and induction of homologous recombination by these compounds. **Res Rep Health Eff Inst**. v.40, p. 41-51. 1993.

MANZONI, P.; GALLETTO, S.; FRANCO, C.; RIZZOLLO P.; GALLO, E.; ANTONUCCI R.; FANOS, V.; FARINA, D.. Liposomal amphotericin B does not induce nephrotoxicity or renal function impairment in premature neonates. **Early Human Development**, v. 88, p. 86-91, 2012.

MICELI, M. H.; CHANDRASEKAR, P.. Safety and efficacy of liposomal amphotericin B for the empirical therapy of invasive fungal infections in immunocompromised patients. Infect Drug Resist., v.5, p.9–16, 2012.

MARKLUND, L.; BEHNAM-MOTLAGH P.; HENRIKSSON R.; GRANKVIST, K. Bumetanide annihilation of Amphotericin B-induced apoptosis cytotoxicity is due to its effect on cellular K^+ flux. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, v. 48, n. 6, p. 781- 786, 2001.

MORAGA, A, A. GRAF, U. Genotoxicity testing of antiparasitic nitrofurans in the *Drosophila* somatic mutation and recombination test. **Mutagenesis**. p.105-110, 1989.

NAKAMURA, R.; KONDO, R; SHEN, M. H.; OCHIAI, H.; HISAMATSU, S.; SONOKI, S. Identification of cytochrome P450 monooxygenase genes from the white-rot fungus *Phlebia brevispora*. **AMB Express**., v. 2., n. 8, 2012.

NISHIYAMA, Y; HIROTA, T; MORISAKI, T; HARA, T; MARUMOTO, T; IADA, S; MAKINO, K; YAMAMOTO, H; HIRAOKA T, KITAMURA, N; SAYA, H. A human homolog of *Drosophila* warts tumor suppressor, h-warts, localized to mitotic apparatus and specically phosphorylated during mitosis. **FEBS Letters**, v. 459. p. 159 -165, 1999.

NOWELL, P.C. The clonal evolution of tumor cell populations. **Science.**. v.1, n. 194, p.23-8. 1976.

OGITA, A., FUJITA, K.I., TANAKA, T. Enhancing Effects on Vacuole-Targeting Fungicidal Activity of Amphotericin B. **Front Microbiol**., v.3, n. 100, 2012.

OKUTOMI T, UBUKATA T, YAMAOKA K, ABE S, YAMAGUCHI H. Augmentation of production of TNF-alpha and anti-tumour activity by an amphotericin B preparation for clinical use in mice. **Br J Cancer**.v.75, n. 11, p.1613-6. 1997.

ORSOLIN, P. C.; SILVA-OLIVEIRA, R. G.; NEPOMUCENO, J. C. Assessment of the mutagenic, recombinagenic and carcinogenic potential of orlistat in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Food and Chemical Toxicology,** v. 50, p. 2598-2604, 2012.

OSHIMA-FRANCO, Y.; FRANCO, L. M. Biotransformação: importância e toxicidade. Rev. Saúde, Piracicaba. p. 69-76, 2003.

OSTROUMOVA, O. S.; EFIMOVA, S. S.; SCHAGINA, L. V. Probing Amphotericin B Single Channel Activity by Membrane Dipole Modifiers. **Plos One.** v.7, n.1. 2012.

PEIXOTO, D. L. G. 2009. **Avaliação da biocompatibilidade da Anfotericina B em duas formulações: livre e associada com nanopartículas magnéticas**. Dissertação de Mestrado em Patologia Molecular. Universidade de Brasília, 2009.

PEREIRA, D. G.; ANTUNES, L. M. G; GRAF, U.; SPANÓ, M. A. Protection by Panax ginseng C. A. Meyer against the genotoxicity of doxorubicin in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Genetics and Molecular Biology**, v.31, p. 947-955, 2008.

PHILLIPS, A. J. SUDBERY, I; RAMSDALE, M. Apoptosis induced by environmental stresses and amphotericin B in *Candida albicans*. **Microbiology**, v. 100, n. 24, 2003.

REZENDE, A. A., GRAF, U., GUTERRES, Z. D .A. R., KERR, W. E., SPANÓ, M. A. Protective effects of proanthocyanidins of grape (*Vitis vinifera* L.) seeds on DNA damage induced by Doxorubicin in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. Food Chem. Toxicol. v. 47, n. 7, p. 1466-1472, 2009.

SENGSTAG, C.; WÜRGLER, F. E. DNA recombination induced by aflatoxin B1 activated by cytochrome P450 1A enzymes. **Molecular Carcinogenesis**. v.11, n.4, p. 227–235, 1994.

SINIGAGLIA M, REGULY M L, ANDRADE H H R. Effect of vanillin ontoxicant-induced mutation and mitotic recombination in proliferating somatic cells of Drosophila melanogaster; **Environ. Mol. Mutagen**. v.44, p. 394-400. 2004.

SIVAK, O.; GERSHKOVICH, P.; LIN, M.; WASAN, E. K.; ZHAO, J; OWEN, D.; CLEMENT, J. G.; WASAN, K. M. Tropically stable novel oral lipid formulation of amphotericin B (iCo-010): biodistribution and toxicity in a mouse model. Lipids Health Dis., v.10, n. 135, 2011.

SUSCHEK, C.V; BONMANN, E.; KLEINERT, H.; WENZEL, M.; MAHOTKA, C.; KOLB, H; FÖRSTERMANN, U; GERHARZ, C.D.; KOLB-BACHOFEN. Amphotericin B severely affects expression and activity of the endothelial constitutive nitric oxide synthase involving altered mRNA stability. **V.Br J Pharmacol.** v.131, n.3, p. 473-81. 2000.

VIRÁG, E.; BELAGYI, J.; GAZDAG, Z.; VÁGVÖLGYI, C., PESTI, M. Direct in vivo interaction of the antibiotic primycin with the plasma membrane of *Candida albicans*: An EPR study. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - **Biomembranes**, v. 1818, p. 42-48, 2012.

VAN DE VEN, H.; PAULUSSEN, C.; FEIJENS, P.B.; MATHEEUSSEN, A. P.; ROMBAUT, P.; KAYAERT, G.; VAN, M., WEYENBERG, W.; COS, P.; MAES, L.; LUDWIG, A. PLGA nanoparticles and nanosuspensions with amphotericin B: Potent *in vitro* and *in vivo* alternatives to Fungizone and AmBisome. **Journal of Controlled Release**, v.161, p.795-803, 2012.

VARLAM, D. E., SIDDIQ, M. M. PARTON, L. A. RÜSSMANN, H. Apoptosis Contributes to Amphotericin B Induced Nephrotoxicity. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**., v. 44, n 3. p. 679–685, 2001.