



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

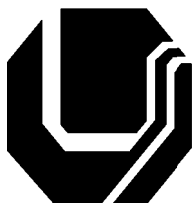
**ANÁLISE DO EFEITO MUTAGÊNICO E RECOMBINOGÊNICO DE
DIFERENTES FÁRMACOS ANTI-HIPERTENSIVOS EM CÉLULAS
SOMÁTICAS DE *Drosophila melanogaster***

Aluna: Rosiane Gomes Silva Oliveira

Orientador: Prof. Dr. Júlio César Nepomuceno

UBERLÂNDIA-MG

2016



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

**ANÁLISE DO EFEITO MUTAGÊNICO E RECOMBINOGÊNICO DE
DIFERENTES FÁRMACOS ANTI-HIPERTENSIVOS EM CÉLULAS
SOMÁTICAS DE *Drosophila melanogaster***

Aluna: Rosiane Gomes Silva Oliveira

Orientador: Prof. Dr. Júlio César Nepomuceno

**Tese apresentada à Universidade
Federal de Uberlândia como
parte dos requisitos para
obtenção do Título de Doutor em
Genética e Bioquímica (Área
Genética).**

UBERLÂNDIA-MG

2016

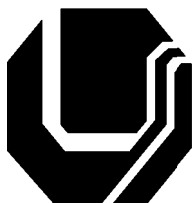
Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

O48a
2016 Oliveira, Rosiane Gomes Silva, 1984
 Análise do efeito mutagênico e recombinogênico de diferentes
 fármacos anti-hipertensivos em células somáticas de *Drosophila*
 melanogaster / Rosiane Gomes Silva Oliveira. - 2016.
 90 f. : il.

Orientador: Júlio César Nepomuceno.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa
de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.
Inclui bibliografia.

1. Genética - Teses. 2. *Drosophila melanogaster* - Teses. 3.
Doxorrubicina - Teses. 4. Inibidores enzimáticos. - Teses. I.
Nepomuceno, Júlio César. II. Universidade Federal de Uberlândia.
Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. III. Título.

CDU: 575



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

**ANÁLISE DO EFEITO MUTAGÊNICO E RECOMBINOGÊNICO DE
DIFERENTES FÁRMACOS ANTI-HIPERTENSIVOS EM CÉLULAS
SOMÁTICAS DE *Drosophila melanogaster***

Aluna: Rosiane Gomes Silva Oliveira

COMISSÃO EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Júlio César Nepomuceno

Presidente: Prof. Dr. Mário Antônio Spanó

Examinadores:

Prof. Dr. Rafael Rodrigues Dihl

Profa. Dra. Wanderlene Blanco Nunes

Prof. Dr. Alexandre Azenha Alves de Rezende

Profa. Dra. Ana Maria Bonetti

Data da Defesa: 29/10/2015

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

Prof. Dr. Júlio César Nepomuceno

"É melhor lançar-se à luta em busca do triunfo, mesmo expondo-se ao insucesso, que formar fila com os pobres de espírito, que nem gozam muito nem sofrem muito... E vivem nesta penumbra cinzenta sem conhecer vitória nem derrota!"

(Franklin D. Roosevelt, 1938)

*Dedico este trabalho ao meu esposo, Luiz Jr. e
à minha mãe, Maria Divina.*

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À **DEUS**, pelo dom da vida, pela saúde, disposição e inspiração. Agradeço, ainda, por permitir que mais este sonho se concretize.

Ao **Prof. Dr. JÚLIO CÉSAR NEPOMUCENO**, por todos anos de convivência, da graduação ao doutorado. Sua humildade, sua alegria de viver e a forma com que transmitia seus conhecimentos, fez de você um exemplo a ser seguido! Tenho certeza de que Deus quer ao Seu lado pessoas boas, mansas e humildes de coração, assim como você. Para nós que ficamos, resta-nos a dor da sua ausência, e a imensa saudade que cresce a cada dia!

Ao meu esposo, **LUIZ GONÇALVES DE OLIVEIRA JÚNIOR**, pela motivação e incentivo que me impulsionou a seguir em frente. Agradeço, ainda, por estar sempre comigo, por dividir os momentos de alegria e aflição vividos durante esses anos de doutorado. Te amo muito! Desejo que esteja sempre comigo e que possamos compartilhar muitos outros momentos juntos!

Agradeço à minha mãe, **MARIA DIVINA DA SILVA**, pelas orações e principalmente por ter me ensinado a ser uma pessoa persistente e a acreditar no futuro.

A minha amiga e colega de doutorado, **PRISCILA CAPELARI ORSOLIN**, pela amizade, pela ótima companhia e pela contribuição valiosa neste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Ao **Centro Universitário de Patos de Minas - UNIPAM** por ceder o Laboratório de Citogenética e Mutagênese para realização deste trabalho.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** pelo apoio financeiro.

Ao **Prof. Dr. Ulrich Graf** do Instituto de Toxicologia da Universidade de Zurich, Suíça, pelo fornecimento das linhagens mutantes de *Drosophila melanogaster*.

Aos **Professores** do curso de Pós-graduação em Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia pelos valiosos ensinamentos.

À secretária do Programa de Pós-graduação em Genética e Bioquímica, **Janaina de Souza Mota**, por sua presteza e cordialidade.

Ao **Prof. Dr. Mário Spanó** por ter me acolhido com tanto carinho, pela paciência e por todas orientações que permitiram a conclusão desta etapa da minha vida.

Aos meus amigos do Laboratório de Citogenética e Mutagênese do UNIPAM: **Adriana Cristina, Bethânia Cristhine, Geovane D'Alfonso, Hélio Bernardas, Jayson Césary, Mirley Vasconcelos, Nayane Moreira, Paula Marynella, Rosiane Soares, Victor Constante**, pela companhia, pelo incentivo e pelas boas conversas.

Aos meus **alunos do UNIPAM**, pelo carinho e pela torcida.

Aos meus irmãos **Glewton, Valmir, Maria Aparecida, Valdomiro, Neuton, Nelson, Delma e Rosiene**, pelo apoio e incentivo.

Aos meus **sobrinhos e afilhados** pela alegria e por me proporcionar bons momentos de distração.

Aos meus sogros **Maria Luzia e Luiz** e meus cunhados **Larisse e Frederico**, pelo carinho e pela atenção em todos momentos.

A todos que de alguma forma contribuíram para a execução deste trabalho e que não foram citados.

O meu muitíssimo **OBRIGADA!**

APOIO FINANCEIRO

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Citogenética e Mutagenese do Centro Universitário de Patos de Minas – UNIPAM - Patos de Minas, MG.

Recebemos o apoio financeiro dos seguintes órgãos:

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

Resumo

Distúrbios na formação de angiotensina II (Ang II) podem causar a hipertensão, problemas cardiovasculares, renais e até mesmo o câncer. Fármacos como inibidores da enzima conversora de angiotensina (ECA) e os antagonistas dos receptores de angiotensina (ARA) possuem propriedades em regular a formação da Ang II e, possivelmente, efeitos antiproliferativos e antioxidantes. O presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos mutagênicos/recombinogênicos de dois inibidores da ECA (Captopril e Perindopril) e de um antagonista do receptor de angiotensina (Losartana potássica), por meio do teste para detecção de mutação e recombinação somática em asas de *Drosophila melanogaster*, bem como os possíveis efeitos moduladores contra dos danos induzidos pelo cloridrato de doxorrubicina (DXR), um fármaco antitumoral cujo mecanismo de ação envolve intercalação ao DNA e formação de radicais livres. Para o tratamento, larvas trans-heterozigotas descendentes do cruzamento de alta bioativação (HB) e do cruzamento padrão (ST) foram submetidas a um tratamento crônico de 48h. Neste procedimento, foram utilizadas cinco concentrações de cada fármaco, isoladas ou associadas a DXR (0,125mg/mL). Os resultados revelaram que captopril não possui efeito mutagênico ou recombino g ê n c i o em ambos cruzamentos e, ainda, se mostrou incapaz de modular os efeitos induzidos pela DXR. Perindopril não apresentou efeito mutagênicos ou recombino g ê n c i o s nos descendentes ST, porém, tais efeitos se manifestaram nos descendentes HB. Losartana potássica não apresentou efeitos mutagênicos ou recombino g ê n c i o s em ambos os cruzamentos (ST e HB), porém, no co-tratamento com DXR apresentou efeito modulador, capaz de reduzir os danos induzidos pelo quimioterápico. Em conclusão, os resultados sugerem que os efeitos antioxidantes de captopril não foram observados neste experimento, pois captopril não foi capaz de reduzir os danos induzidos pela DXR; perindopril ao ser biometabolizado pelas enzimas citocromo P450 apresentou potencial em induzir eventos recombino g ê n c i o s; e o efeito modulador apresentado pela losartana potássica parece está relacionado a sua capacidade em alterar a permeabilidade da membrana e de ativar mecanismos antiproliferativos.

Palavras-chave: SMART. *Drosophila melanogaster*. Captopril. Perindopril. Losartana potássica. Doxorrubicina.

Abstract

Disturbances in the formation of angiotensin II (Ang II) can cause hypertension, cardiovascular, kidney problems and even cancer. Drugs such as inhibitors of angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitors and angiotensin receptor blockers (ARB) have properties in regular the formation of Ang II and, possibly, effects antiproliferative and antioxidant. This study aimed to evaluate the mutagenic effects / recombinogenic of two ACE inhibitors (captopril and perindopril) and of an angiotensin receptor blockers (losartan potassium), by testing for mutation detection and somatic recombination in wings *Drosophila melanogaster*, as well as possible modulating effects of these drugs against the damage induced by doxorubicin (DXR), an antitumor drug whose mechanism of action involves intercalation of DNA and formation of free radicals. For the treatment, the larvae trans-heterozygous descendants of crossing high bioactivation (HB) and standard crossing (ST) were subjected to chronic treatment 48h. In this procedure were used five concentrations of each drug, individually or associated DXR (0.125 mg/mL). The results showed that captopril has no mutagenic effect or recombinogenic on both junctions and also proved unable to modulate the effects induced by DXR. Perindopril showed no mutagenic or recombinogenic effect on ST descendants, however, these effects was expressed in HB descendants. Losartan potassium did not show mutagenic effects or recombinogenic in both crosses (ST and HB), however, in the co-treatment with DXR showed modulating effect, able to reduce the damages induced by chemotherapy. In conclusion, the results suggest that the antioxidant effects of captopril were not observed in this experiment, because captopril was not able to reduce the damage induced by DXR; while perindopril to be biometabolized by cytochrome P450 enzymes showed potential to induce recombinogenic events; and the modulating effect presented by losartan potassium seems is related to its ability to alter the permeability of the membrane and activate antiproliferative mechanisms.

keywords: SMART. *Drosophila melanogaster*. Captopril. Perindopril. Losartan potassium. Doxorubicin.

Sumário

CAPÍTULO I: Fundamentação Teórica

1. Sistema Renina-Angiotensina	5
2. Inibidores da Enzima Conversora de Angiotensina.....	7
2.1. Captopril.....	10
2.2. Perindopril.....	12
3. Antagonistas dos receptores de Angiotensina II (ARA).....	14
3.1. Losartana potássica	15
4. Sistema Renina - Angiotensina em <i>Drosophila melanogaster</i>	17
5. Doxorubicina (DXR)	18
6. Somatic Mutation and Recombination Test – SMART	20
7. Referências	24

CAPÍTULO II:

Assessment of the mutagenic and recombinagenic potential of anti-hypertensive drugs in the somatic cells of *Drosophila melanogaster*

Abstract	33
1. Introduction.....	34
2. Material and Methods.....	35
2.1. Chemical agents	35
2.2. Test for detection of mutation and somatic recombination (SMART) in cells of <i>Drosophila melanogaster</i>	36
2.2.1 Stock lineages and cross.....	36
2.2.2 Treatments.....	37
2.2.3. Preparation of slides and microscopic analysis	38

2.2.4. Statistical analysis	38
3. Results	39
4. Discussion	41
5. References	45

CAPÍTULO III:

Efeito modulador da losartana potássica contra a mutagenicidade e recombino-genicidade da doxorubicina em células somáticas de *Drosophila melanogaster*

Resumo	55
1. Introdução	56
2. Material e Métodos	57
2.1. Agentes químicos	57
2.2. Teste para detecção de mutação e recombinação somática em células de <i>Drosophila melanogaster</i> – SMART	58
2.2.1 Linhagens	58
2.2.2. Cruzamentos	58
2.2.3. Tratamentos, preparação para análise microscópica	59
2.2.4. Análise estatística	60
3. Resultados	61
4. Discussão	63
5. Referências	66
ANEXO	72

Lista de Figuras

CAPÍTULO I:

Fundamentação Teórica

Figura 1: Representação esquemática do sistema renina-angiotensina	6
Figura 2: Mecanismo de ação dos inibidores da ECA.....	9
Figura 3: Estrutura química do captopril.....	10
Figura 4: Estrutura química do perindopril. A estrutura incluídas no retângulo vermelho será removida por esterase e substituída por um átomo de hidrogênio para formar a molécula ativa <i>in vivo</i> (perindopril em perindoprilato)	12
Figura 5: Bloqueio do receptor de angiotensina II (AT ₁), pela ação dos ARA.....	14
Figura 6: Estrutura química do losartana potássica	15
Figura 7: Estrutura química da doxorrubicina.....	18
Figura 8: Os potenciais mecanismos de morte celular mediada por doxorrubicina..	19
Figura 9: Casal de <i>Drosophila melanogaster</i> , à esquerda a fêmea e à direita o macho	21
Figura 10: Imagens da asa da <i>Drosophila melanogaster</i> vistas ao microscópio óptico objetiva de 40X: A) Pelos normais; B) Pelo <i>multiple wing hairs</i> ; C) Pelo <i>flare</i>	22
Figura 11: Imagens da asa da <i>Drosophila melanogaster</i> vistas ao microscópio óptico objetiva de 10X: (A) Fenótipo da asa dos descendentes Trans-heterozigotos marcados. (B) Fenótipo da asa dos descendentes Heterozigotos balanceados	23
Figura 12: Imagens da asa da <i>Drosophila melanogaster</i> vistas ao microscópio óptico objetiva de 40X: A) Mancha simples; B) Mancha gêmea	24

CAPÍTULO II:

Assessment of the Mutagenic and recombinagenic potential of anti-hypertensive drugs in the somatic cells of *Drosophila melanogaster*

Figure 1: Chemical structure of the compounds	36
--	----

Figure 2: Relative survival rate of *D. melanogaster* in different concentrations of captopril emerging the crossing standard (ST) and the crossing of high bioactivation (HB)..... 39

Figure 3: Relative survival rate of *D. melanogaster* at different concentrations of perindopril emerging from the crossing standard (ST) and the crossing of high bioactivation (HB)..... 40

CAPÍTULO III:

Efeito modulador da losartana potássica contra a mutagenicidade e recombino-genicidade da doxorubicina em células somáticas de *Drosophila melanogaster*

Figura 1: Estrutura química dos compostos utilizados utilizados no estudo..... 58

Figura 2: Taxa de sobrevivência de *D. melanogaster* em diferentes concentrações de losartana potássica isoladas ou em associação a doxorubicina 61

Lista de Tabelas

CAPÍTULO I:

Fundamentação Teórica

Tabela 1: Características dos inibidores da enzima conversora da angiotensina 8

CAPÍTULO II:

Assessment of the Mutagenic and recombinagenic potential of anti-hypertensive drugs in the somatic cells of *Drosophila melanogaster*

Table 1: Summary of results obtained in the marked trans-heterozygous descendants (MH) of *Drosophila melanogaster* derived from the standard cross (ST) and high bioactivation cross (HB) treated with different concentrations of the captopril (separately and in combination with DXR), positive control (DXR125 µg/mL) and negative control (water)..... 51

Table 2: Summary of results obtained in the marked trans-heterozygous descendants (MH) and balancer-heterozygous (BH) of *Drosophila melanogaster* derived from the standard cross (ST) and high bioactivation cross (HB) treated with different concentrations of the perindopril, positive control (DXR125 µg/mL) and negative control (water)..... 52

CAPÍTULO III:

Efeito modulador da losartana potássica contra a mutagenicidade e recombinação da doxorubicina em células somáticas de *Drosophila melanogaster*

Tabela 1: Resultados obtidos nos descendentes trans-heterozigotos marcadas (MH) e nos heterozigotos balanceados (BH) de *Drosophila melanogaster* derivados do cruzamento padrão (ST), tratados com diferentes concentrações de losartana potássica (isolados ou em associação com DXR), controlo positivo (DXR 0,125 mg / mL) e controle negativo (água)..... 71

Tabela 2: Resultados obtidos nos descendentes trans-heterozigotos marcadas (MH) e nos heterozigotos balanceados (BH) de *Drosophila melanogaster* derivados do cruzamento de alta bioativação (HB), tratados com diferentes concentrações de losartana potássica (isolados ou em associação com DXR), controle positivo (DXR 0,125 mg / mL) e controle negativo (água)..... 72

Lista de Abreviações

Ang I - Angiotensina I

Ang II - Angiotensina II

ARA - Antagonista do Receptor de Angiotensina

AT₁ - Receptor 1 de Angiotensina II

AT₂ - Receptor 2 de Angiotensina II

BH - Balanceador Heterozigoto

COX-2 - Cicloxigenases 2

DDT - Diclorodifeniltricloroetano

DNA - Ácido Desoxirribonucléico

DXR - Doxorubicina

ECA - Enzima Conversora de Angiotensina

flr³ - *flare³*

HB - *High bioactivation*

IL-1 - Interleucina 1

IL-6 - Interleucina 6

MH – Trans-heterozigoto marcado

mwh - *multiple wing hairs*

NADP - Fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina

O₂⁻ - Superóxido

ORR - *Oregon R*

PPAR-gama - Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gama

RNA_m - Ácido ribonucléico mensageiro

SMART - *Somatic Mutation and Recombination Test*

SRA - Sistema Renina Angiotensina

ST - *Standard Cross*

TM3 Bd^s - *Third Multiple3 Beadle Serrate*

TNF-alfa - Tumor Necrosis Factor alpha

VEGF - Vascular Endothelial Growth Factor

APRESENTAÇÃO

O sistema renina-angiotensina (SRA) é responsável pela produção da angiotensina II (Ang II), um importante peptídeo que possui dois receptores específicos (AT₁ e AT₂), aos quais a angiotensina deve se ligar para exercer suas funções biológicas. Ao se ligar com o receptor do tipo 1 (AT₁) promove a vasoconstrição, secreção de aldosterona, crescimento e proliferação celular. Ao se ligar com o receptor do tipo 2 (AT₂) promove a vasodilatação, antiproliferação, apoptose e diferenciação.

Distúrbios na formação de Ang II podem causar a hipertensão, problemas cardiovasculares, renais e até mesmo o câncer. Contudo, alguns fármacos são capazes de regular a formação de Ang II com eficácia e tolerância; tais como os inibidores da enzima conversora de angiotensina e os antagonistas dos receptores de angiotensina II.

Os inibidores da enzima conversora de angiotensina (ECA) atuam impedindo a formação da Ang II, resultando em uma diminuição dos níveis circulantes de Ang II e de aldosterona que, em consequência, reduzem a resistência vascular sistêmica. Os inibidores da ECA provocam, ainda, inibição de enzimas cinases que aumentam os níveis de bradicinina com consequente vasodilatação. Nos últimos anos uma série de potentes e ativos inibidores da ECA, por via oral, foram desenvolvidos e são usados no tratamento da hipertensão e de outras doenças cardiovasculares, tais como o Captopril e o Perindopril.

Outra classe de fármacos anti-hipertensivos com bom perfil de tolerabilidade são os antagonistas dos receptores de angiotensina (ARA) que atuam bloqueando a ligação da Ang II com o receptor AT₁, impedindo a vasoconstrição das arteríolas. Estes são medicamentos de escolha de pacientes que apresentam tosse induzida pelos inibidores ECA, o principal representante dessa classe é a Losartana potássica.

Atualmente, os medicamentos anti-hipertensivos tem sido alvo de pesquisas por apresentarem propriedades protetoras contra o câncer e, ainda, capacidade em reduzirem os efeitos colaterais causados pela quimioterapia com doxorubicina.

A doxorubicina (DXR) é um quimioterápico com a ação citotóxica, eficiente no tratamento de carcinomas da mama, sarcomas pediátricos e de adultos, incluindo sarcomas osteogênicos, Ewing e dos tecidos moles. Apesar de sua eficiência, a cardiotoxicidade é o principal fator limitante para o uso na clínica médica. Neste sentido, acredita-se que os inibidores ECA e antagonistas do receptor de angiotensina II, sejam fármacos com potencial de reduzir efeitos colaterais da DXR e ainda atuar na prevenção do câncer.

No entanto, as propriedades anticâncer, atribuídas a estas classes de anti-hipertensivos, são controversas, pois vários autores relacionam o captopril, perindopril e losartana à gênese do câncer. Desse modo, este trabalho enquanto pesquisa básica faz-se necessário para avaliar a mutagenicidade e recombinogenicidade destes fármacos em células somáticas de *Drosophila melanogaster*, bem como os possíveis efeitos moduladores dessas drogas quando associadas à DXR.

Para tanto, foi adotado o teste para detecção de mutação e recombinação somática (*Somatic Mutation and Recombination Test - SMART*) em asa de *Drosophila melanogaster*. Este teste *in vivo*, tem como finalidade avaliar atividade mutagênica /recombinogênica, a partir de concentrações isoladas de Captopril, Perindopril e Losartana potássica. Avaliar a atividade antimutagênica /antirecombinogênica, a partir de concentrações de cada fármaco associada ao quimioterápico doxorubicina.

A apresentação deste trabalho foi dividida nos seguintes capítulos:

Capítulo I: fundamentação teórica que apresenta uma breve introdução sobre o Sistema Renina-Angiotensina (SRA) e descrições do mecanismo de ação e a importância do Captopril, Perindopril e Losartana potássica. O ensaio SMART (*Somatic Mutation and Recombination Test*) foi descrito e usado, também, neste estudo, para avaliar os possíveis efeitos dos compostos em estudo sobre a mutagenicidade e recombinogenicidade induzida pela doxorubicina.

Capítulo II: consiste no manuscrito intitulado “Assessment of the mutagenic and recombinagenic potential of anti-hypertensive drugs in the somatic cells of *Drosophila melanogaster*” que será enviado para publicação na revista Food Chemical and Toxicology.

Capítulo III: consiste no segundo manuscrito intitulado “Efeito modulador da losartana potássica contra a mutagenicidade e recombinação da doxorubicina” publicado na revista Food Chemical and Toxicology.

CAPÍTULO 1

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1. Sistema Renina-Angiotensina

O sistema renina-angiotensina (SRA) tem importante atuação na regulação da pressão arterial, equilíbrio hidroeletrólítico, estruturação e função cardiovascular (Ribeiro e Florêncio, 2000; Dinh et al., 2001; Turner e Hooper, 2002). O sistema é ativado quando a renina é secretada pelo aparelho justaglomerular do rim, em resposta a uma variedade de estímulos sistêmicos e/ou locais. A renina é uma enzima que age sobre o precursor circulante angiotensinogênio, uma glicoproteína secretada principalmente pelo fígado, para produzir o decapeptídeo, angiotensina I (Asp¹ -Arg² -Val³ -Tyr⁴ -Ile⁵ -His⁶ -Pro⁷ -Phe⁸ -His⁹ -Leu¹⁰) que, sob ação das enzimas conversoras de angiotensina, é convertido no octapéptido, angiotensina II (Asp¹ -Arg² -Val³ -Tyr⁴ -Ile⁵ -His⁶ -Pro⁷ -Phe⁸) (Andrade e Boim, 1998; Dinh et al., 2001; Turner e Hooper, 2002; Martelli, 2010; Maciel e Muzzi, 2013).

As enzimas conversoras de angiotensina (ECAs), envolvidas no processo de formação da angiotensina II (Ang II), são metalopeptidases de zinco de massa molecular de 180 kda, encontradas na forma solúvel no plasma e na membrana plasmática de vários tipos celulares, como células epiteliais do pulmão, células endoteliais do sistema cardiovascular, do sistema reprodutor e de todos os outros órgãos que possuem o SRA local. No SRA e no sistema cinina-caliceína, a ECA possui papel-chave, pois ao mesmo tempo em que remove dois aminoácidos da angiotensina I (Ang I), para formar Ang II, degrada a bradicinina bloqueando seus efeitos vasodilatadores (Akfi et al., 2010; Maldonado e Koike, 2011).

A Ang I tem pouco, ou nenhum, efeito sobre a pressão sanguínea, mas o aumento dos níveis plasmáticos de Ang II estimula a secreção de aldosterona pelas glândulas adrenais induzindo a reabsorção de sódio renal, que ao ser reabsorvido carrega água para os vasos sanguíneos elevando a pressão arterial (Guyton e Hall, 2006).

A Ang II possui receptores em um número grande de órgãos e sistemas incluindo coração, rins, gônadas, placenta, pituitária, glândula adrenal, vasculatura periférica e sistema nervoso central. Após a interação com o receptor, a Ang II exerce efeitos bastante diversos. Dentre as funções sistêmicas, destacam-se a manutenção e modulação da pressão arterial, o controle do volume extracelular e a regulação da circulação sistêmica e renal (Andrade e Boim, 1998).

Para exercer seus efeitos biológicos, a Ang II deve se ligar a receptores específicos. Ao se ligar com o receptor do tipo 1 (AT₁) a Ang II promove a vasoconstrição, secreção de aldosterona, crescimento e proliferação celular. Ao se ligar com o receptor do tipo 2 (AT₂) a Ang II promove a vasodilatação, antiproliferação, apoptose e diferenciação (Figura 1) (Dinh et al., 2001, Garcia et al., 2010; Maldonado e Koike, 2011).

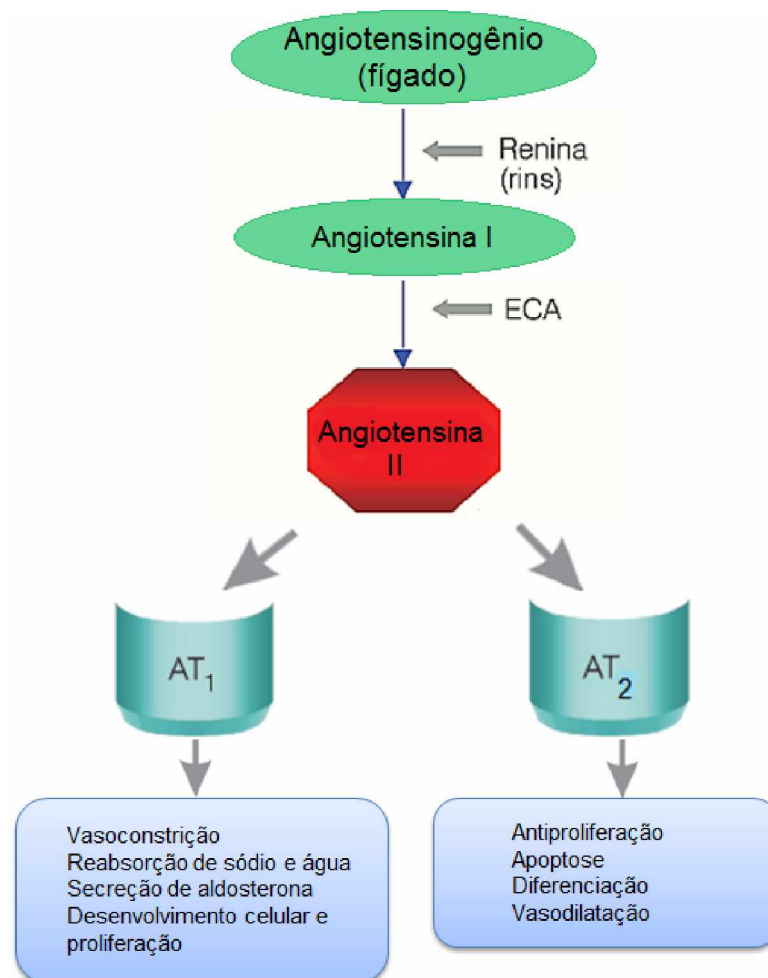


Figura 1: Representação esquemática do sistema renina-angiotensina.
Fonte: Adaptado de Paula et al. (2005).

Praticamente todas as ações biológicas conhecidas da Ang II, vasoconstrição, liberação de aldosterona, estimulação de transmissão simpática e crescimento celular, são exclusivamente mediadas pelo receptor AT₁. O papel funcional do receptor AT₂ não é totalmente compreendido, mas alguns estudos têm atribuído um possível papel de receptores AT₂ em mediar antiproliferação, apoptose, diferenciação e, possivelmente, a vasodilatação (Dinh et al., 2001; Botey, 2006).

Em doses suprafisiológicas, a ligação da Ang II com receptor AT₁ causa hipertensão arterial devido à reabsorção excessiva de sódio, além de promover outras doenças cardiovasculares e renais (Ribeiro e Florêncio, 2000; Turner e Hooper, 2002).

Segundo Trapp et al. (2009), há evidências que a Ang II é capaz de induzir resposta inflamatória na parede vascular por meio de mecanismos dependentes e independentes da pressão. De acordo com os autores, a Ang II induz interações entre os leucócitos e o endotélio, aumentando a quimiotaxia com posterior elevação da produção de citocinas, incluindo IL-1, IL-6 e TNF - α . Trapp et al. (2009) complementam que a Ang II pode, ainda, apresentar efeito na produção de radicais livres que geram a reação inflamatória vascular.

Cheng et al. (2005) afirmam que a formação de espécies reativas de oxigênio na parede vascular, a partir da Ang II, ocorre devido a ativação de NADP oxidase, principal molécula produtora de ânions superóxido (O₂⁻) na hipertensão.

Mansour et al. (2011) relatam que a conversão de Ang I em Ang II e a ligação da Ang II com receptor AT₁ estão relacionadas com o desenvolvimento de fibrose hepática, com capacidade de induzir neovascularização e, ainda, aumentar significativamente o fluxo sanguíneo em tumores de modelos animais. Mansour et al. (2011) complementam, ainda, que o complexo Ang II - AT₁ induz a angiogênese, e que este mecanismo auxilia no desenvolvimento de vários tipos tumores, tal como o carcinoma hepatocelular.

Como dito anteriormente, distúrbios na formação de Ang II podem levar ao surgimento de várias patologias. No entanto, alguns fármacos são capazes de regular a formação de Ang II com eficácia e tolerância, tais como os inibidores da enzima conversora de angiotensina e os antagonistas dos receptores de angiotensina II (Ribeiro e Florêncio, 2000; Turner e Hooper, 2002). Devido à sua importância e por serem tema central do presente trabalho serão discutidos nos tópicos a seguir.

2. Inibidores da Enzima Conversora de Angiotensina

A descoberta dos inibidores da ECA se deve, em grande parte, à pesquisa básica de Rocha e Silva e colaboradores que, em 1949, descobriram que o plasma, quando incubado com o veneno da *Bothrops jararaca*, gerava um novo fator

hipotensor e espasmogênico para musculatura lisa, que foi então denominado bradicinina. Os peptídeos presentes no veneno, responsáveis por tais efeitos, foram mais tarde demonstrados como bloqueadores da ECA capazes de promover efeitos benéficos no controle da hipertensão (Hawgood, 1997; Ferreira, 1998).

Desse modo, o reconhecimento do potencial terapêutico da inibição da ECA e de sua estrutura molecular, permitiram identificar o sítio ativo da enzima, e com isso, um modelo da enzima zinco-metaloprotéica foi preparado. Consequentemente, uma série de potentes e ativos inibidores da ECA, por via oral, foram desenvolvidos, e são usados no tratamento da hipertensão e de outras doenças cardiovasculares (Oigman e Fritsch, 1998).

Os inibidores ECA podem ser classificados em três grupos baseados em sua estrutura química. Um que contém radical sulfidril, formado basicamente pelo captopril, um segundo que contém radical carboxil, formado pela maioria dos compostos (perindopril, enalapril, lisinopril, benazepril, quinapril e outros), e um terceiro que contém um radical fósforo (fosinopril). As principais características dos inibidores ECA estão representadas na Tabela 1 (Oigman e Fritsch, 1998; Mano, 2008; Brunton et al., 2012).

Tabela 1: Características dos inibidores da enzima conversora da angiotensina.

Droga	Ligação ao zinco	Pró-droga	Via de eliminação	Duração da ação (horas)	Dose (mg)
Benazepril	Carboxila	Sim	Renal	24 +	10 – 40
Captopril	Sulfidril	Não	Renal	6 – 10	25 – 150
Cilazapril	Carboxila	Sim	Renal	24 +	2,5 – 5,0
Enalapril	Carboxila	Sim	Renal	18 – 24	5 – 40
Fosinopril	Fosforila	Sim	Renal- hepática	24 +	10 – 40
Lisinopril	Carboxila	Não	Renal	18 – 24	5 – 40
Perindopril	Carboxila	Sim	Renal	24 +	1 – 16
Quinapril	Carboxila	Sim	Renal	24 +	5 – 80
Ramipril	Carboxila	Sim	Renal	24 +	1,25 – 20
Spirapril	Carboxila	Sim	Hepática	24 +	12,5 – 50

Fonte: Oigman and Fritsch, 1998.

Apenas o captopril e o lisinopril são drogas ativas, os demais compostos são pró-drogas que necessitam metabolização para um composto di-ácido. Apesar da desvantagem da pró-droga possuir ação menor que 1/100 do metabólito ativo, a sua absorção é muito melhor, aumentando a biodisponibilidade em relação à

absorção da molécula ativa, como exemplo tem-se o enalaprilato, ramiprilato, perindoprilato, etc. (Paula et al., 2005; Mano, 2008).

O mecanismo de ação dos inibidores da ECA fundamenta-se no impedimento da conversão de Ang I em Ang II, resultando em uma diminuição dos níveis circulantes de Ang II e de aldosterona que, em consequência, reduzem a resistência vascular sistêmica. Ao diminuir os níveis de aldosterona, esses agentes também promovem a natriurese, o que reduz o volume intravascular (Golan et al., 2009).

Os inibidores ECA provocam, ainda, diminuição da degradação de bradicinina (Figura 2) a partir na inibição de enzimas cinases. Consequentemente, há um aumento nos níveis circulantes de bradicinina que estimula a biossíntese de prostaglandinas, onde ambas podem contribuir para os efeitos farmacológicos dos inibidores da ECA, induzindo a vasodilatação (Rang et al., 2007; Brunton et al., 2012).

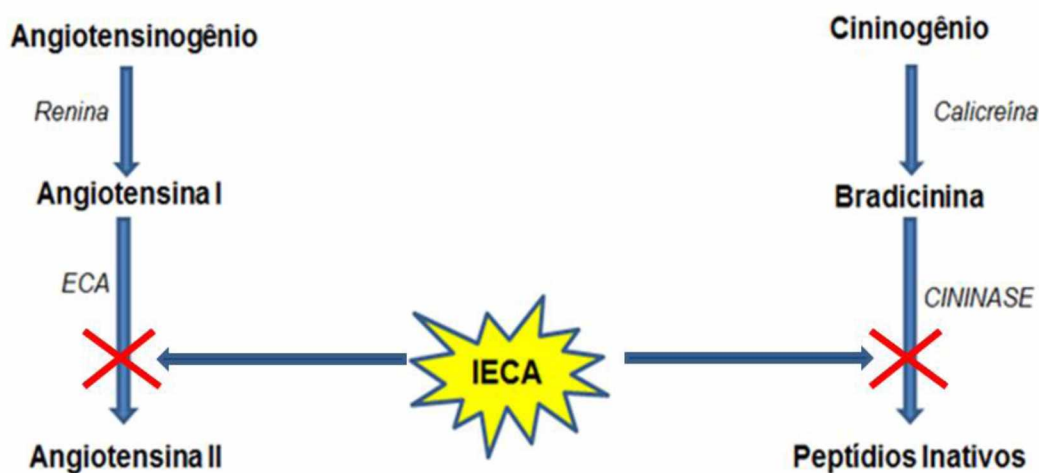


Figura 2: Mecanismo de ação dos inibidores da ECA.

Os inibidores da ECA são drogas com bom perfil de tolerabilidade, contudo, a tosse constitui o efeito adverso mais observado, podendo atingir de 5% a 18% dos hipertensos. A tosse resulta de um aumento dos níveis de bradicinina induzido por esses fármacos; com frequência, esse efeito colateral leva a não aderência do paciente ao tratamento ou à sua interrupção (Oigman e Fritsch, 1998; Golan et al., 2009).

2.1. Captopril

O captopril, $C_9H_{15}NO_3S$ (Figura 3), é um anti-hipertensivo clássico, que contém um grupo sulfidril de localização apropriada para ligar-se ao átomo de zinco, acoplado a um resíduo de prolina que se liga ao sítio da enzima conversora de angiotensina que, normalmente, acomoda a leucina terminal da angiotensina I. Dessa forma, a ação hipotensora se estabelece basicamente pela inibição competitiva do centro ativo da enzima conversora de angiotensina, levando à redução da angiotensina II (Rang et al., 2007; Lourenção et al., 2008; Brunton et al., 2012).

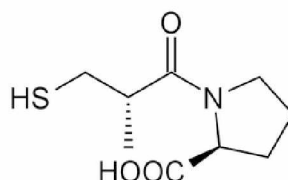


Figura 3: Estrutura química do Captopril.

Fonte: <https://blogdodaff.wordpress.com/2010/12/21/a-historia-do-captopril-efeito-colateral/>

Administrado via oral, o captopril sofre rápida absorção. A biodisponibilidade é de ~75%, sendo reduzida em 25-30% na presença de alimentos no trato digestivo, por isso, captopril deve ser administrado 1 hora antes das refeições. As concentrações plasmáticas máximas são alcançadas em 1 hora, e o fármaco é depurado rapidamente, com meia-vida de ~2 h. A maior parte é eliminada na urina, 40-50% na forma de captopril, e o restante na forma de dímeros de dissulfeto de captopril e dissulfeto de captopril-cisteína (Brunton et al., 2012).

A dose oral de captopril varia de 6,25 mg a 150 mg, 2-3 vezes/dia. As doses de 6,25 mg (3 vezes/dia) ou de 25 mg (2 vezes/dia), mostram-se apropriadas para o início da terapia no tratamento da insuficiência cardíaca ou da hipertensão, respectivamente. A dose diária máxima de 450 mg de captopril não deve ser excedida (Brunton et al., 2012; Captopril, 2013).

De acordo com Kim et al. (2013), o captopril possui propriedades antioxidantes, capazes de proteger o endotélio contra lesões causadas pelos radicais livres. Tal efeito protetor foi relacionado à eliminação de ânion superóxido em amostras de aorta abdominal de coelho.

Péron et al. (2002) complementam que este fármaco pode atuar como antioxidante, pela disponibilidade de grupos sulfidril, evitando os efeitos citotóxicos mediados pelo stress oxidativo, muitas vezes causado pela a eliminação de ânions superóxido. Péron et al. (2002) afirmam, ainda, que a presença do grupo sulfidril estimula a síntese de prostaglandinas cardioprotetoras.

Contudo, a inibição da ECA aumenta os níveis circulantes de bradicinina. De acordo com Chiang et al. (2007), em cultura de células renais, a bradicinina está relacionada com aumento na geração de espécies reativas de oxigênio e apoptose induzida pela depleção de ATP, efeito este que pode ser mediado pelas fosfolipases C. A via das fosfolipases C é capaz de ativar proteína quinase C com consequente ativação de NADPH oxidase, enzima responsável pela geração de espécies reativas de oxigênio, à exemplo, ânions superóxido (O_2^-) (Costa et al., 1997, Cheng et al., 2005).

Além do efeito benéfico na regulação da pressão arterial e das propriedades cardioprotetoras, o captopril possui também capacidade de inibir a proliferação de uma ampla variedade de linhagens de células (Li and Liu, 2009). Tal efeito pode ser confirmado com os achados de Attoub et al. (2008), que em seus experimentos, usando ratos enxertados com células altamente tumorigênicas de pulmão humano (LNM35). Os autores, demonstraram redução significativa do crescimento tumoral e de metástase nos linfonodos, após administração diária de captopril durante 3 semanas.

Com relação ao câncer, os inibidores ECA possuem propriedades anticâncer capazes de reduzir o crescimento tumoral por meio da inibição da angiogênese. A angiogênese, formação de novos vasos sanguíneos capilares, é reconhecida como um mecanismo importante para o desenvolvimento do tumor. Assim, a inibição da angiogênese limita a expansão do tumor. Entretanto, a inibição da angiogênese pelo captopril não é mediada através da inibição da ECA, mas pela supressão de atividades de metaloproteinases de matriz ou pela produção de angiostatinas atribuível ao grupo sulfidril livre (Yoshiji et al., 2001; Fujita et al., 2005).

Wysocki et al. (2006), complementam que o captopril possui potencial imunomodulador potente capaz de afetar as respostas imunitárias. De acordo com esses autores, o potencial anticâncer de captopril pode exibir dois efeitos farmacológicos diferentes: (a) a inibição de respostas de células T com potencial para promover o crescimento do tumor e (b) a atividade antitumoral, devido à

inibição da neoangiogênese do tumor. Assim, segundo Wysocki et al. (2006), na prática clínica, dependendo do tipo de tumor e do estado imunológico do paciente, o tratamento anti-tumoral baseado em captopril deve ser devidamente considerado.

2.2. Perindopril

O perindopril, $C_{19}H_{32}N_2O_5$ (Figura 4), é um anti-hipertensivo pertencente ao grupo de medicamentos inibidores da ECA. Possui radical dipeptídeo carboxialquil, que se liga ao zinco por uma de suas funções carboxílicas. É um pró-fármaco, onde cerca de 30-50% do composto absorvido é transformado por esterases hepáticas em perindoprilato, metabólito ativo (Paula et al., 2005; Curran et al., 2006; Brunton et al., 2012). Além do perindoprilato ativo, o perindopril produz cinco outros metabólitos, todos inativos que são excretados predominantemente pelos rins (Conversyl, 2014).

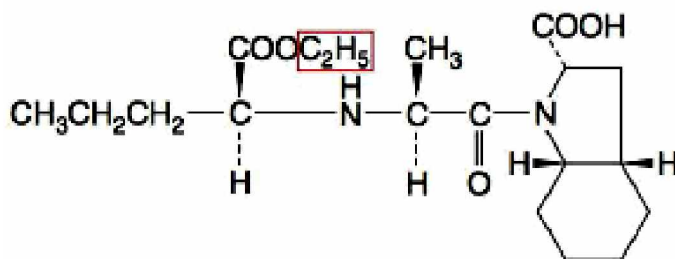


Figura 4: Estrutura química do Perindopril. A estrutura incluída no retângulo vermelho será removida por esterase e substituída por um átomo de hidrogênio para formar a molécula ativa *in vivo* (perindopril em perindoprilato). Fonte: Brunton et al. (2012).

A ingestão de alimentos reduz a conversão em perindoprilato, consequentemente, diminui a sua biodisponibilidade. Desse modo, o perindopril deve ser administrado por via oral, em dose única diária, pela manhã, antes da refeição. Após administração oral, a absorção do perindopril é rápida e o pico de concentração plasmática é atingido em 1 hora, enquanto que a do perindoprilato ocorre em 3 a 4 horas. O perindopril é eficiente no tratamento da hipertensão arterial, da insuficiência cardíaca congestiva e também na prevenção da recorrência do acidente vascular cerebral (Curran et al., 2006; Brunton et al., 2012; Conversyl, 2014).

O perindopril está envolvido, também, no processo de melhoramento da disfunção endotelial e na redução dos marcadores de inflamação e de trombose. Atua de forma benéfica na atividade de óxido nítrico sintetase de células endoteliais, reduzindo os níveis de dímero-D e Fator von Willebrand, com consequente redução na taxa de apoptose endotelial. O Perindopril atua, ainda, aumentando significativamente os níveis plasmáticos de bradicinina (Pertinent, 2003; Curran et al., 2006).

A ação do perindopril sobre o dímero-D se faz importante, pois estas substâncias são consideradas marcadores fisiológicos de fibrinólise, cuja produção está aumentada em situações como câncer, inflamação, infecção, necrose, e doenças cardiovasculares, especialmente tromboembólicas. Deste modo, a dosagem deste marcador tem sido uma ferramenta para diagnóstico de muitas doenças (Monachini, 2002; Dusse et al., 2003; Moresco, 2005).

De acordo com Ceconi et al. (2009), o perindopril além de promover redução do biomarcador dímero-D é capaz de reduzir também a citocina pró-inflamatória, Fator de Necrose Tumoral-alfa (TNF-alfa). A redução no TNF-alfa é importante na preservação do endotélio. Contudo, concentrações significativas TNF são úteis nos tratamentos de neoplasias, tal como sarcoma de Kaposi, pois sua principal atividade biológica é uma acentuada citólise e citoestase, induzindo regressão neoplásica (Varella e Forte, 2001).

Com relação ao câncer, Yoshiji et al. (2001) afirmam que apesar de não haver radical sulfidril na estrutura do perindopril, este inibidor ECA também, possui propriedades anticâncer, já que, inibe significativamente o crescimento tumoral e angiogênese, através da supressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) no tumor. Yoshiji et al. (2001) afirmam, ainda, que o perindoprilato, sua forma ativa, *in vitro*, mostrou-se capaz de diminuir a expressão de RNAm de VEGF, o que pôde ser observado em células de carcinoma hepatocelular (BNL-HCC).

Assim como o captopril, o perindopril, também possui propriedades antioxidantes, evidenciadas por Richard et al. (2008). Em seus experimentos Richard et al. (2008) avaliaram a evolução do estresse oxidativo gerado pela doxorrubicina a partir de ratos tratados com perindopril. No que se refere ao estresse oxidativo, a análise do plasma mostrou uma diminuição na concentração de ascorbato, que indicou uma diminuição na defesa antioxidante quando tratados apenas com doxorrubicina; isso pôde ser explicado pela diminuição na produção de

ascorbato hepático e aumento de radical ascorbilo. Ao adicionar perindopril e doxorubicina foi possível observar aumento de ascorbato e diminuição de radical ascorbilo; isto suporta os efeitos benéficos antioxidantes de perindopril na redução da cardiotoxicidade da antraciclina.

3. Antagonistas dos receptores de Angiotensina II (ARA)

Os antagonistas do receptor de angiotensina II (ARA), também conhecidos como bloqueadores do receptor de angiotensina, são agentes anti-hipertensivos orais, cujo mecanismo de ação básico é o de antagonizar especificamente o receptor AT_1 , deixando livre o receptor AT_2 (Figura 5). Os antagonistas da angiotensina II apresentam perfil farmacodinâmico diferente dos inibidores da ECA, pois não bloqueiam a enzima conversora e, dessa maneira, não aumentam os níveis de bradicinina. Assim, a tosse não constitui um efeito colateral do tratamento com ARA (Oigman and Fritsch, 1998; Golan et al., 2009).

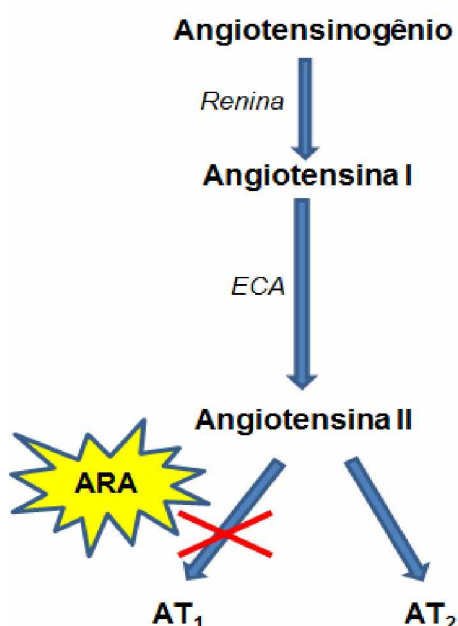


Figura 5: Bloqueio do receptor de angiotensina II (AT_1), pela ação dos ARAs.

Além de seu efeito anti-hipertensivo, esses fármacos também podem diminuir a proliferação reativa da íntima arteriolar. À semelhança dos inibidores da ECA, os antagonistas AT_1 mostram-se efetivos na redução da pressão arterial e,

algumas vezes, são medicamentos de escolha para pacientes com tosse induzida por inibidores da ECA (Golan et al., 2009).

Os ARAs são uma classe de drogas amplamente utilizados para o tratamento de hipertensão, insuficiência cardíaca, nefropatia diabética, e, mais recentemente, para a redução do risco cardiovascular. Alguns estudos experimentais implicam o sistema renina-angiotensina, particularmente a angiotensina II e seus receptores tipo 1 e tipo 2, na regulação da proliferação celular, angiogênese, e a progressão do tumor. Desse modo, o uso dos ARAs tem sido considerado como potencial agente anticâncer (Sipahi et al., 2010).

Os antagonistas dos receptores da Ang II, desenvolvidos nos anos 90, apresentam como mecanismo de ação a inibição da ligação da Ang II aos receptores AT₁, impedindo assim a vasoconstrição das arteríolas. O principal representante dessa classe é a losartana potássica (Paula et al., 2005).

3.1. Losartana Potássica

Losartana potássica, C₂₂H₂₂ClKN₆O, é um anti-hipertensivo sintético potente, ativo por via oral (Figura 6). Em bioensaios de ligação farmacológica, liga-se seletivamente ao receptor AT₁. Em estudos *in vitro* e *in vivo*, tanto losartana como seu metabólito ácido carboxílico (EXP-3174), farmacologicamente ativo, bloqueiam todas as ações fisiológicas relevantes da Ang II, ligando-se seletivamente ao receptor AT₁, sem elevar os níveis de bradicinina (Bonfilio et al., 2010; Losartana potássica, 2015).

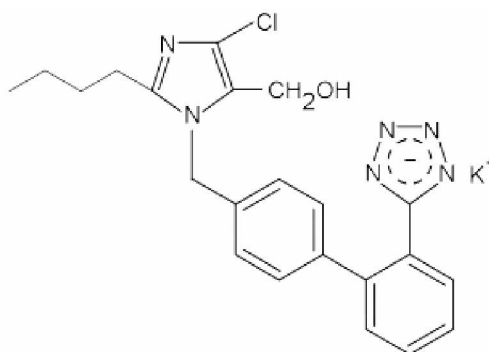


Figura 6: Estrutura química do losartana potássica. Fonte: Bonfilio et al. (2010)

A losartana potássica deve ser administrada por via oral, uma ou duas vezes/dia, até uma dose diária total de 25-100 mg. Aproximadamente, 14% de uma dose oral são convertidos no metabólito ácido 5-carboxílico, EXP-3174, que é mais potente do que a losartana como antagonista dos receptores AT₁. O metabolismo da losartana a EXP-3174 e metabólitos inativos é mediado pelas enzimas de citocromo CYP2C9 e CYP3A4. Os níveis plasmáticos máximos de losartana e EXP-3174 são alcançados dentro de cerca de 1-3 h após a administração oral, respectivamente, e as meias-vidas plasmáticas são, respectivamente, de 2,5 e de 6-9 h. A depuração plasmática da losartana e do EXP-3174 ocorrem pelos rins e fígado (metabolismo e excreção biliar). Contudo, a depuração plasmática é afetada pela presença de insuficiência hepática, mas não pela renal (Brunton et al., 2012).

Além de atuar como ARA, losartana é um antagonista competitivo do receptor de tromboxano A₂, atenuando a agregação plaquetária. Além disso, o EXP-3179, um metabólito ativo da losartana, sem efeitos no receptor da angiotensina, reduz a suprarregulação do RNAm da cicloxigenase-2 (COX-2) e a geração de prostaglandinas dependente da COX (Brunton et al., 2012).

De acordo com Mazhar et al. (2006), a isoenzima COX-2 indutiva é pró-inflamatória, sendo expressa apenas em respostas a certos estímulos, tais como mitógenos, citocinas e fator de crescimento. Nesse contexto, há evidências que tumores colorretais, gástricos e esofágicos, tanto em animais de experimentação como também em humanos, expressam altos níveis de COX-2. Tais achados levantam a hipótese do envolvimento da COX-2 na progressão e disseminação do câncer nestes órgãos. Assim, substâncias capazes de reduzir a expressão COX-2 são possíveis agentes anticâncer (Kummer et al., 2002).

Com relação ao câncer, Rhodes et al. (2009) afirmam que o receptor de Ang II, o AT₁, possui um dos genes mais sobre-expressos em cânceres da mama, cerca de 10-20%. Sabe-se que a interação Ang II - AT₁ pode levar ao estresse oxidativo, e este é uma das principais causas do câncer. Assim, o bloqueio do receptor AT₁ pelos ARAs, tal como a losartana, tem importância clínica na prevenção do câncer, visto que em sistema modelo de câncer de próstata e de ovários já foi evidenciado efeitos antitumorigênicos (Uemura et al., 2005; Suganuma et al., 2005).

Entretanto, no estudo de meta-análise de Sipahi et al. (2010), cujo objetivo foi avaliar efeitos dos ARA na ocorrência de novos casos de câncer em

geral, foi verificado que essa classe de medicamentos está associada a um risco moderadamente aumentado de um novo diagnóstico de câncer.

Todavia, acredita-se que a angiotensina II, a qual pode ser produzida pelo epitélio do ducto da mama por um SRA de tecidos locais, tem tanto ações benéficas como prejudiciais no câncer da mama. Por um lado, estimula a proliferação celular, mas, por outro lado, inibe a adesão celular e migração através de membranas revestidas com proteínas de matriz extracelular, processos que estão associados com metástases. Devido a esta dualidade, bloqueadores do receptor AT₁ convencionais, tais como losartana, pode-se esperar que inibam tanto ação benéfica, bem como aspectos prejudiciais de ações da Ang II (Redondo-Müller et al., 2008).

4. Sistema Renina - Angiotensina em *Drosophila melanogaster*

A *Drosophila melanogaster* possui a enzima conversora de angiotensina, homóloga a ECA de humanos, que é conhecida como *Ance* (Taylor et al., 1996; Isaac et al., 2007).

A enzima *Ance* da *Drosophila* é encontrada na hemolinfa e nos tecidos reprodutivos (ovários, testículos e glândula acessória) de machos e fêmeas (Isaac et al., 2007). *Ance* possui papel importante na embriogênese da *Drosophila*, pois está presente na amnioserosa, membrana extra-embriônica do lado dorsal do embrião, permitindo o desenvolvimento do vaso dorsal, do intestino anterior e posterior, além de estar presente nas células do coração em desenvolvimento (Taylor et al., 1996; Houard et al., 1998).

Ance pode apresentar muitas propriedades enzimáticas descritas para a enzima humana. Estudos *in vitro* mostraram que *Ance* é capaz de converter Ang I em Ang II e de hidrolisar bradicinina, podendo ainda ser inibida por inibidores ECA humanos tais como captopril e otrandolaprilato (cuja forma ativa é quimicamente semelhante ao perindoprilato). *Ance* apresenta aproximadamente 93% de identidade com a enzima ECA humana, de forma que os resultados de inibição enzimática podem ser comparados (Taylor et al., 1996; Akif et al., 2010; Tavares et al., 2015).

Em *Drosophila melanogaster*, até o momento, não foi identificado homólogo do receptor AT₁ de angiotensina, e os peptídeos hormonais que estão estruturalmente relacionadas com angiotensina e bradicinina de mamíferos não

estão presentes em insetos. No entanto, o sistema renina-angiotensina (SRA) tem sua existência comprovada em invertebrados, e a ECA, presente na hemolinfa, pode ter um papel indireto na regulação da contração de órgãos musculares da *Drosophila* (Salzet et al., 2001; Siviter et al., 2002).

5. Doxorrubicina (DXR)

A doxorrubicina, $C_{27}H_{29}NO_{11}$ (Figura 7) é um fármaco anticâncer da classe das antraciclinas, cujo princípio ativo foi primeiramente extraído de cepas de *Streptomyces peucetius* var. *caesius* na década de 1970. Atualmente, é rotineiramente utilizado no tratamento de vários tipos de cânceres, incluindo o da mama, do pulmão, gástrico, do ovário, da tireoide, linfoma de não-Hodgkin e linfoma de Hodgkin, mieloma múltiplo, sarcomas e cânceres pediátricos (Thorn et al., 2011; Yang et al., 2014).

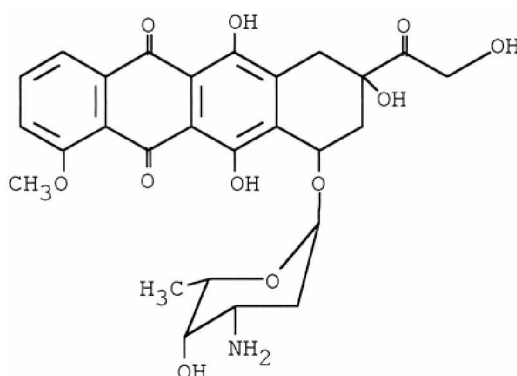


Figura 7: Estrutura química da doxorrubicina. Fonte: Patel et al. (1997).

O metabolismo da DXR ocorre essencialmente no fígado. O seu principal metabólito é o doxorrubicinol, que possui certo grau de atividade antitumoral. Após a administração, os níveis plasmáticos de DXR seguem um declínio multifásico, com uma meia-vida terminal de 20 a 48 horas, onde a meia-vida terminal do doxorrubicinol é similar à da DXR. A depuração plasmática varia de 8 a 20 mL/min/kg e se deve principalmente ao metabolismo e à excreção biliar. Aproximadamente 40% da dose administrada é recuperada na bile ou fezes em cinco dias. Cerca de 5% a 12% do fármaco e seus metabólitos aparecem na urina durante o mesmo período (Doxorrubicina, 2013).

Em células de mamíferos, a DXR é oxidada para semiquinonas, um metabolito instável, o qual é convertido de volta à doxorubicina num processo que libera espécies reativas de oxigênio, as quais podem levar a peroxidação lipídica gerando danos na membrana, danos no DNA, stress oxidativo, e ainda, desencadear vias de morte celular por apoptose. A via de apoptose é ativada quando a tentativa de reparar as quebras no DNA falha e o crescimento celular é inibido em fases G1 e G2 (Patel et al. 1997; Golan et al., 2009; Tacar et al., 2013; Thorn et al., 2011). Outro modo de ação da doxorubicina se dá pela formação de ligações interfilamentares com o DNA, o que leva ao bloqueio da síntese do DNA e RNA e diminuição da atividade da topoisomerase II, promovendo a ruptura dos filamentos da macromolécula (DNA), e consequente morte celular (Almeida et al., 2005).

A doxorubicina, também é conhecida por intercalar ao DNA, com inibição de DNA e de RNA-polimerase, em última análise, cessando a replicação do DNA e a transcrição do RNA. A DXR pode, ainda, promover outros efeitos biológicos, tais como autofagia e necrose (Tacar et al., 2013).

Embora, usualmente este antibiótico seja classificado como agente intercalante do DNA, estudos recentes evidenciaram que, além da intercalação, há a formação de adutos por ligações covalentes com o DNA (Almeida et al., 2005). A formação de adutos de DNA-doxorubicina são capazes de ativar respostas de danos no DNA que induzem a morte celular independente da topoisomerase II. A interação entre a doxorubicina e o DNA pode ser estabilizada por uma ligação covalente mediada por um formaldeído celular (Figura 8), gerada por reações de radicais livres a partir de fontes de carbono como lípidos e espermina. Assim, alguns compostos que liberam formaldeído, por hidrólise, a exemplo do butirato de pivaloiloimetilo (AN-9), do fosfato butyroyloxymethyl-dietil (AN-7), e do hexametenotetramina (HMTA), têm sido desenvolvidos e utilizados em combinação com doxorubicina com intuito de melhorar sua atividade anticâncer (Yang et al., 2014).

Apesar de sua eficácia no tratamento antineoplásico, a cardiotoxicidade é o principal fator limitante para o uso da doxorubicina na clínica médica. Embora o dano cardíaco induzido pela DXR pareça ser multifatorial, uma das hipóteses mais prevalentes é a de que o dano celular seja induzido por radicais livres. Esse dano oxidativo pode ser potencialmente limitado com o uso de antioxidantes (Rocha,

2010). Neste sentido, acredita-se que os inibidores ECA e antagonistas do receptor de angiotensina II, com propriedades antioxidantes, sejam fármacos com potencial de reduzir efeitos colaterais da DXR e ainda atuar na prevenção do câncer.

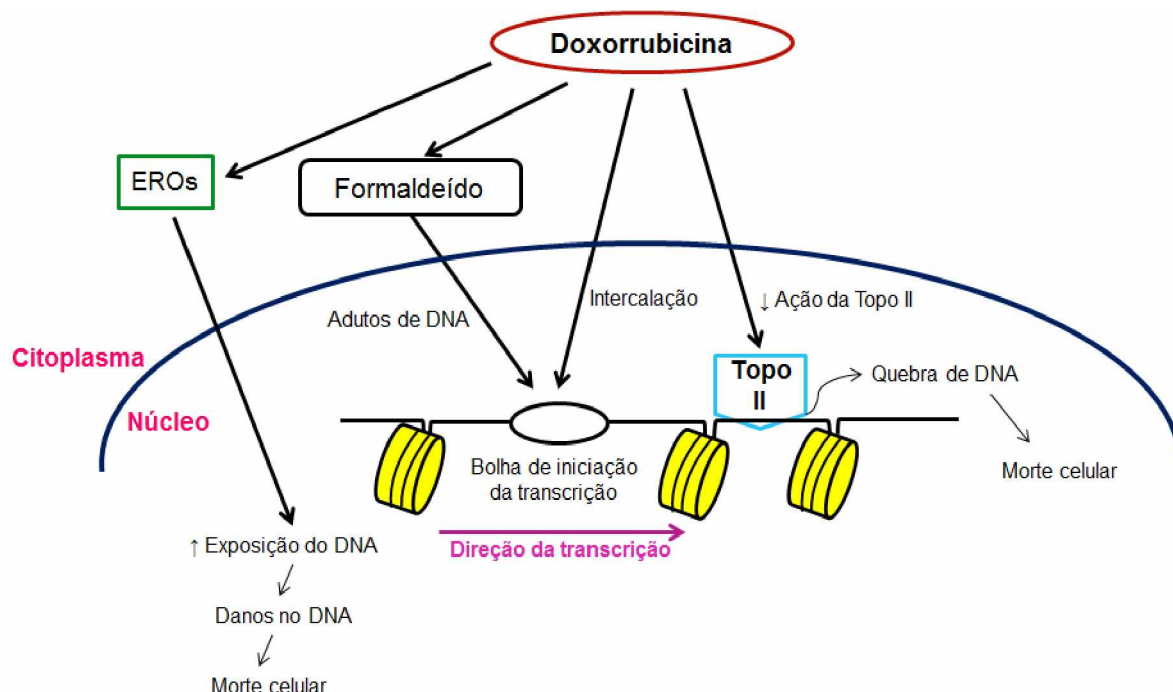


Figura 8: Os potenciais mecanismos de morte celular mediada por doxorubicina.
Fonte: Adaptado de Yang et al. (2014).

6. Somatic Mutation and Recombination Test - SMART

O teste para detecção de mutação e recombinação somática (SMART) foi desenvolvido para detectar alterações genéticas de forma rápida e barata. É um sistema *in vivo* que utiliza como organismo modelo a mosca da fruta, *Drosophila melanogaster* (Figura 9), um organismo eucarioto que possui maquinaria metabólica semelhante ao encontrado em células de mamíferos (Rincón et al., 1998).

O ensaio SMART foi desenvolvido por Graf et al. (1984) e faz uso de marcadores genéticos recessivos adequados, que permitem verificar a perda da heterozigose dos marcadores que podem ser detectados pelo aparecimento de fenótipos diferentes nas asas das moscas (Graf et al., 1998). Este teste permite detectar um amplo espectro de eventos mutacionais que dão origem às manchas de pelos mutantes; tais como, deleções, mutações pontuais, certos tipos de aberrações cromossômicas, bem como recombinação mitótica e possivelmente a conversão gênica (Frölich e Würigler, 1989; Graf e Schaik, 1992; Graf e Würigler, 1996).



Figura 9: Casal de *Drosophila melanogaster*, à esquerda a fêmea e à direita o macho, cujo pente sexual está indicado pela seta. Fonte: Laboratório de Citogenética e Mutagênese do Centro Universitário de Patos de Minas – UNIPAM.

O ensaio SMART baseia-se na perda da heterozigose induzida por substâncias mutagênicas que afetam as células dos discos imaginais presentes nas larvas. Durante o desenvolvimento embrionário, as células dos discos imaginais separam-se e proliferam-se mitoticamente. Isso ocorre durante todo o período larval até a diferenciação para as distintas estruturas da mosca adulta. Entretanto, se uma alteração genética ocorre em uma das células do disco imaginal, durante proliferação mitótica, ela vai formar um clone de células mutantes. Se alteração causar um dano visível no fenótipo, será detectado como uma mancha de células mutantes (pelos mutantes) sobre os tricomas das asas da mosca adulta (Graf et al. 1984; Rincón et al., 1998).

O ensaio de mancha em asa *Drosophila*, tem sido utilizado em vários estudos sobre mutagenicidade e antimutagenicidade de vários compostos e misturas. Além de ser um teste de baixo custo, outra vantagem de utilização do SMART é a rápida obtenção de resultados, em que apenas uma única geração é necessária para executar o teste. O teste permite a utilização de tecido somático bem desenvolvido, a asa, que possui um grande número de células a serem analisadas em uma única mosca (ou seja, cerca de 25.000 células em uma asa). A análise é simples e fácil, e os marcadores presente nas células são confiáveis (Graf e Würzler, 1996).

No SMART são utilizadas três linhagens mutantes de *D. melanogaster*. A linhagem *Multiple wing hairs (mwh)*, em que os indivíduos possuem o gene marcador recessivo localizado na extremidade do braço esquerdo do cromossomo 3

(3-0, 3). Este marcador na condição de homozigose expressa três ou mais pelos dentro de uma única célula, ao contrário do gene selvagem que expressa apenas um único pelo (Figura 10A e 10B) (Graf et al., 1984).

Na linhagem *Flare*³ (*flr*³) o gene marcador também é um gene recessivo localizado no braço esquerdo do cromossomo 3, porém, localizado em uma porção proximal (3-38, 8). Este gene altera a forma do pelo gerando um pelo mal formado com aspecto de chama (Figura 10C). Devido sua letalidade em homozigose, esta linhagem possui um balanceador cromossômico (*TM3, Bd^s*), que se caracteriza por múltiplas inversões (Graf et al., 1984).

Já a linhagem *Oregon R flare*³ (*ORR, flr*³) possui constituição genética semelhante à linhagem *flr*³. Porém, nesta linhagem os cromossomos 1 e 2 são provenientes da linhagem *Oregon R* resistente ao DDT e se caracterizam pela alta expressividade de enzimas citocromo P450. Esta enzima tem a capacidade de metabolizar uma ampla variedade de substratos, isso permite que o sistema metabólico da *Drosophila* assemelha-se aos sistemas de mamíferos, embora as atividades metabólicas não sejam tão elevadas como no fígado de mamífero (Frölich e Würigler, 1989).

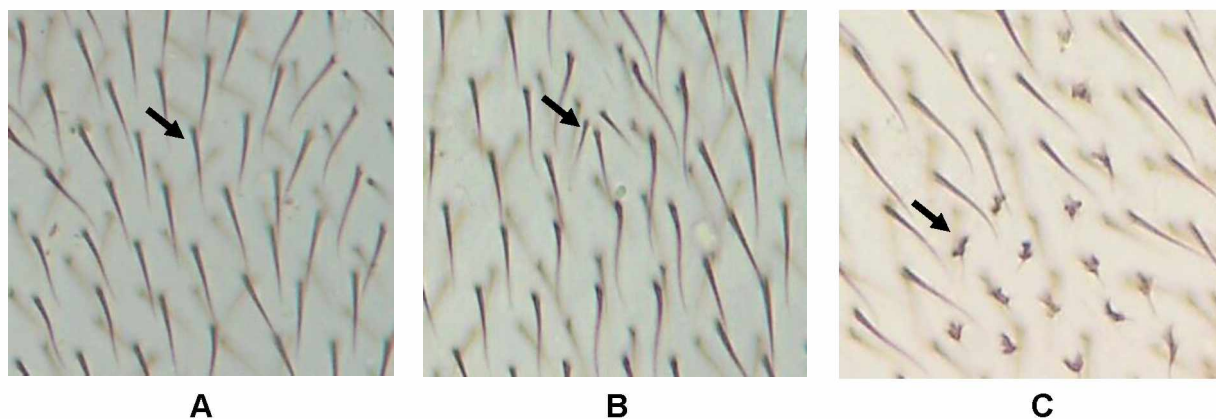


Figura 10: Imagens da asa da *Drosophila melanogaster* vistas ao microscópio óptico objetiva de 40X: **A)** Pelos normais; **B)** Pelo *multiple wing hairs*; **C)** Pelo *flare*. Fonte: Laboratório de Citogenética e Mutagenese do Centro Universitário de Patos de Minas – UNIPAM.

No SMART são realizados dois cruzamentos, o cruzamento padrão (ST-*Standard cross*) onde são cruzadas fêmeas virgens (*flr*³ / *ln(3LR)TM3, ri p^p sep l(3)89Aabx^{34e} and Bd^s*) com machos (*mwh/mwh*), cujos efeitos manifestam-se de forma direta, pois as substâncias testadas possuem baixa biometabolização devido

a diminuta expressividade das enzimas de citocromo P450. O segundo cruzamento é o de alta bioativação (HB - *High Bioactivation Cross*) onde são cruzadas fêmeas virgens (ORR; *flr*³/*ln*(3LR)TM3, *ri* *p^p* *sep* *l*(3)89Aabx^{34e} and *Bd^s*) como machos (*mwh/mwh*); neste cruzamento os efeitos manifestam-se de forma indireta, uma vez que a linhagem ORR; *flr*³ possui um nível expressivo de enzimas de citocromo P450 responsável pela biometabolização de compostos (Graf et al., 1989; Graf e Schaik, 1992).

A partir dos dois tipos de cruzamentos, padrão e de alta bioativação, nascem dois tipos de descendentes: trans-heterozigotos marcados (MH) e heterozigotos balanceados (BH). Estes descendentes são fenotipicamente distintos com base no marcador TM3, *Bd^s*. Os MH (*mwh* +/+ *flr*³) apresentam os cromossomos estruturalmente normais e desenvolvem asas normais, com borda lisa. Já os BH (*mwh* +/+ TM3, *Bd^s*) apresentam um cromossomo balanceador (TM3/*Bd^s*) e as asas são mal formadas, com aparência picotada, "serrilhada" (Figura 11) (Graf et al., 1984; Rincón e Graf, 1995).

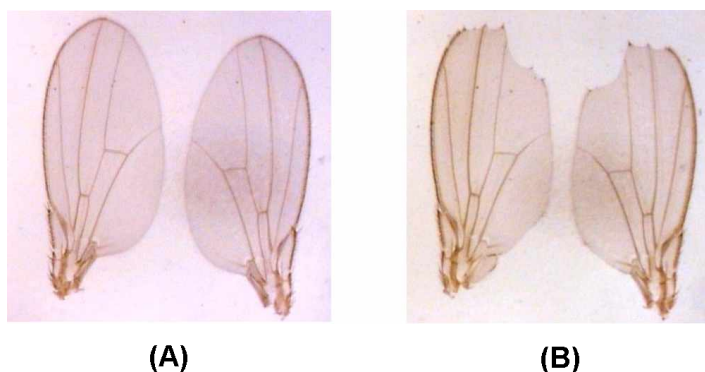


Figura 11: Imagens da asa da *Drosophila melanogaster* vistas ao microscópio óptico objetiva de 10X: **(A)** Fenótipo da asa dos descendentes Trans-heterozigotos marcados. **(B)** Fenótipo da asa dos descendentes Heterozigotos balanceados. Fonte: Laboratório de Citogenética e Mutagênese do Centro Universitário de Patos de Minas – UNIPAM.

Os indivíduos MH expressam eventos mutacionais e recombinogênicos, pois nestes indivíduos é possível encontrar manchas contendo apenas pelos *mwh* ou apenas pelos *flr*³ (mancha simples – Figura 12A) e ainda, manchas contendo tanto pelos *mwh* como *flr*³ (mancha gêmea – Figura 12B), onde a presença de manchas gêmeas indica a possibilidade de o evento ser causado por recombinação. Já os indivíduos BH, expressam somente eventos mutacionais, pois nestes indivíduos são encontrados apenas manchas simples, devido às inversões múltiplas

presentes no cromossomo balanceador *TM3/Bd^s* todos os eventos de recombinação são eliminados (Graf et al., 1984; Graf e Würigler, 1996).

Desse modo, a possibilidade de detecção de atividade recombinogênica, de produtos químicos que provocam a perda de heterozigose, é uma característica vantajosa do ensaio SMART, em virtude do papel deste mecanismo na origem de certos tipos de cânceres (Graf e Würigler, 1996).

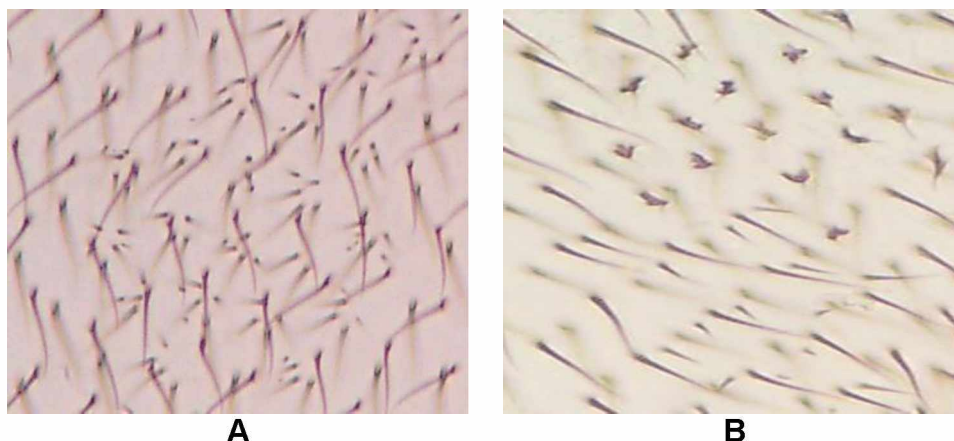


Figura 12: Imagens da asa da *Drosophila melanogaster* vistas ao microscópio óptico objetiva de 40X: **A)** Mancha simples; **B)** Mancha gêmea. Fonte: Laboratório de Citogenética e Mutagênese do Centro Universitário de Patos de Minas – UNIPAM.

7. REFERÊNCIAS

- Akif, M.; Georgiadis, D.; Mahajan, A.; Dive, V.; Sturrock, E. D.; Isaac, R. E.; Acharya, K.R. High-Resolution Crystal Structures of *Drosophila melanogaster* Angiotensin-Converting Enzyme in Complex with Novel Inhibitors and Antihypertensive Drugs. **J. Mol. Biol.**, 400: 502-517, 2010.
- Almeida, V.L.; Leitão, A.; Reina, L.C.B.; Montanari, A.; Donnici, C.L. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Quím. Nova**, 28 (1):118-129, 2005.
- Andrade, A.Q. and Boim, M.A.J. Fisiologia e Fisiopatologia Renal: Papel do sistema renina-angiotensina (SRA) na função da célula mensangial (CM). **Bras. Nefrol.**, 20 (3), 1998.
- Attoub, S.; Gabem, A.M.; Al-Salam, S.; Al-Sultan, M.A.; John, A.; Nicholls, M.G.; Mester, J.; Petroianu, G. Captopril as a Potential Inhibitor of Lung Tumor Growth and Metastasis. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, 1138: 65-72, 2008.
- Bonfilio, R.; Favoretto, L.B.; Pereira, G.R.; Azevedo, R.C.P.; Benjamim, M.A. Comparative study of analytical methods by direct and first-derivative UV spectrophotometry for evaluation of losartan potassium in capsules. **Braz. J. Pharm. Sci.**, 46 (1): 147-155, 2010.

Botey, A. Sistema renina-angiotensina aldosterona: Sua utilidade clínica. **Endocrinol. Nutr.**, 53 (4):270-8, 2006.

Brunton, L.L., Chabner, B.A., Knollmann, B.C. **As bases farmacológicas da terapêutica de Goodman & Gilman**. 12. ed. Porto Alegre: AMGH, 2012. 2079 p.

Captopril. Responsável técnico: Maria Geisa P. de Lima e Silva. São Paulo: Germed Farmacêutica Ltda, 2013. **Bula de remédio**.

Ceconi, C., Francolini, G., Bastianon, D., Gitti, G.L., Comini, L., Ferrari, R. Differences in the Effect of Angiotensin-converting Enzyme Inhibitors on the Rate of Endothelial Cell Apoptosis: In Vitro and In Vivo Studies. **Cardiovasc Drugs Ther.**, 21: 423-429, 2007.

Cheng, Z. J.; Vapaatalo, H.; Mervaala, E. Angiotensin II and vascular inflammation. **Med. Sci. Monit.**, 11 (6): 194-205, 2005.

Chiang, W.-C.; Chen, Y.-M.; Lin, S.-L.; Wu, K.-D.; Tsai, T.-J. Bradykinin enhances reactive oxygen species generation, mitochondrial injury, and cell death induced by ATP depletion—A role of the phospholipase C-Ca²⁺ pathway. **Free Rad. Biol. Med.**, 43: 702–710, 2007.

Conversyl: Perindopril. Responsável Técnico: Patrícia Kasesky de Avellar. Rio de Janeiro: Laboratórios Servier do Brasil Ltda., 2014. **Bula de remédio**.

Costa, E.A.S.; Luna Fº, B.; Póvoa, R.; Ferreira Fº, C.; Murad, N.; Ferreira, M.; Ferreira, C. Enalaprilato na Prevenção da Hipertrofia Ventricular Esquerda Induzida pelo Isoproterenol. **Arq. Bras. Cardiol.**, 69 (1): 35-39,1997.

Curran, M.P., McCormack, P.L., Simoson, D. Perindopril: A Review of its use in patients with or at risk of developing coronary artery disease. **Drugs** 66 (2): 235-255, 2006.

Dinh, D.T.; Frauman, A.G.; Johnston, C.I.; Fabiani, M.E. Angiotensin receptors: distribution, signalling and function. **Clinic. Scien.**, 100: 481-492, 2001.

Doxorrubicina: Responsável técnico: Luciana Righetto. São Paulo: Glenmark Farmacêutica Ltda., 2013. **Bula de remédio**.

Dusse, L.M.S.; Vieira, L.M.; Carvalho, M.G. Avaliação do dímero D (D-Di) na doença hipertensiva específica da gravidez (DHEG). **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, 39 (3): 199-202, 2003.

Ferreira, S. H. Aspectos históricos da Hipertensão: Do fator de potenciação da bradicinina (BPF) aos inibidores da ECA. **HiperAtivo**, 5(6), 1998.

Flöllich, A. and Würigler, F.E. New tester strains with improved bioactivation capacity for the Drosophila wing-spot test. **Mutat. Res.**, 216: 179-187, 1989.

Fujita, M.; Hayashi, I.; Yamashina, S.; Fukamizu, a.; Itoman, M.; Majima, M. Angiotensin type 1a receptor signaling-dependent induction of vascular endothelial growth factor in stroma is relevant to tumor-associated angiogenesis and tumor growth. **Carcinogenesis**, 26 (2): 271-279, 2005.

Garcia, P., Schwenzer, S., Slotta, J.E., Scheuer, C., Tami, A.E., Holstein, J.H., Histing, T., Burkhardt, M., Pohlemann, T., Menger, M.D. Inhibition of angiotensin-converting enzyme stimulates fracture healing and periosteal callus formation – role of a local renin-angiotensin system. **Br. J. Pharmacol.**, 159 (8): 1672-1680, 2010.

Golan, D. E.; Tashjian Jr., A.H.; Armstrong, E.J.; Armstrong, A.W. **Princípios de Farmacologia: A Base Fisiopatológica da Farmacoterapia**. 2. ed. Rio De Janeiro: Guanabara Koogan, 2009. 871 p.

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*. **Eviron. Mutagen.**, 6 (2): 153-188, 1984.

Graf, U.; Frei, H.; Kägi, A.; Katz, A.J.; Würgler, F.E. Thirty compounds tested in the *Drosophila* wing spot test. **Mutat. Res.**, 222, 359–373, 1989.

Graf, U. e Schaik, N. Improved high bioactivation cross for the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. **Mutat. Res.**, 271 (1): 59-67, 1992.

Graf, U. e Würgler, F.E. The somatic white-ivory eye spot test does not detect the same spectrum of genotoxic events as the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. **Environ. Mol. Mutagen.**, 27 (3):219-226, 1996.

Graf, U.; Abraham, S.K; Rincón, J.G.; Würgler, F.E. Antigenotoxicity studies in *Drosophila melanogaster*. **Mutat. Res.**, 402: 203-209, 1998.

Guyton, A.C.; Hall, J.E. **Tratado de fisiologia médica**. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. 1216 p.

Hawgood, B. J. Maurício Rocha E Silva MD: Snake venom, bradykinin and the rise of autopharmacology. **Toxicon**, 35 (11): 1569-1580, 1997.

Houard, X., Williams, T.A., Michaud, A., Dani, P., Isaac, E., Shirras, A.D., Coates, D., Corvol, P. The *Drosophila melanogaster*-related angiotensin-I-converting enzymes Acer and Ance: Distinct enzymic characteristics and alternative expression during pupal development. **Eur. J. Biochem.**, 257: 599-606, 1998.

Isaac, R.E., Lamango, N.S., Ekbote, U., Taylor, C.A., Hurst, D., Weaver, R.J., Carhan, A., Burnham, S., Shirras, A.D. Angiotensin-converting enzyme as a target for the development of novel insect growth regulators. **Peptides**, 28: 153-162, 2007.

Kim, J.H.; Kim, H.; Kim, Y.H.; Chung, W.-S.; Suh, J.K.; Kim, S.J. Antioxidant Effect of Captopril and Enalapril on Reactive Oxygen Species-Induced Endothelial Dysfunction in the Rabbit Abdominal Aorta. **Korean J. Thorac. Cardiovasc. Surg.**, 46:14-21, 2013.

Kummer, C. L. and Coelho, T.C.R.B. Antiinflamatórios Não Esteróides Inibidores da Ciclooxigenase-2 (COX-2): Aspectos Atuais. **Rev. Bras. Anesthesiol.**, 52 (4): 498 – 512, 2002.

Li, G.-X. and Liu, Z.-Q. Captopril and 6-mercaptopurine: Whose SH possesses higher antioxidant ability? **Europ. J. Med. Chem.**, 44: 4841-4847, 2009.

Losartana potássica. Responsável técnico: Maria Geisa P. de Lima e Silva. São Paulo: Germed Farmacêutica Ltda. 2015. **Bula de Remédio**.

Lourenção, B.C., Marcolino-Junior, L.H., Fatibello-Filho, O. Determinação conutométrica de captopril em formulações farmacêuticas utilizando sulfato de cobre (II) como titulante. **Quím. Nova**, 31: 349-352, 2008.

Mazhar, D.; Ang, R.; Waxman, J. COX inhibitors and breast cancer. **Br. J. Cancer**, 94 (3): 346-350,, 2006.

Maciel, R.P. e Muzzi, R.A.L. A presença do sistema renina Angiotensina em vários órgãos – Revisão da literatura. **Rev. Cien. Elet. Med. Vet.**, ano XI, n. 20, 2013.

Maldonado, J. S.; Koike, M. K. Role of renin-angiotensin-aldosterone system in cardiac remodeling after experimental myocardial infarct. **Scien. in Health**, 2(1): 40-54, 2011.

Mano, R. **Inibidores da Enzima conversora de Angiotensina (IECA)**. Manuais de Cardiologia, 2008.

Martelli, A. Sistema Renina Angiotensina Aldosterona e Homeostase Cardiovascular. **UNOPAR Cient. Ciênc. Biol. Saúde**;12(4):51-5, 2010.

Mansour, M. A.; Al-Ismaeel, H; Al-Riksbi, A. C.; Al-Shabanah, O. A. Comparison of angiotensin converting enzyme inhibitors and angiotensin II type 1 receptor blockade for the prevention of premalignant changes in the liver. **Life Scien.**, 89: 188-194. 2011.

Monachini, M. Qual o valor do dímero-D no diagnóstico do tromboembolismo pulmonar? **Rev. Assoc. Med. Bras.**, 48 (3): 189-189, 2002.

Moresco, R. N. **Associação entre os níveis de D-dímero, produtos de degradação da fibrina/fibrinogênio (PDF) e troponina cardíaca T na investigação dos distúrbios tromboembólicos**. 2005. 92f. Tese (Doutorado em Ciências Médicas) – Programa de Pós-graduação Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

Oigman, W. and Fritsch, M. T. Drogas que intervêm no sistema renina-angiotensina. **HiperAtivo**, 2: 84-90, 1998.

Paula, W.X., Sinisterra, R.D, Santos, R.A.S., Beraldo, H. Cadernos Temáticos QNEsc: Química Inorgânica e Medicina: A química inorgânica no planejamento de fármacos usados no controle da hipertensão. **SBQ** 6,2005.

Patel, S., Sprung, A.U., Keller, B.A., Heaton, V.J., Fisher, L.M. Identification of Yeast DNA Topoisomerase II Mutants Resistant to the Antitumor Drug Doxorubicin: Implications for the Mechanisms of Doxorubicin Action and Cytotoxicity. **Mol. Pharmacol.**, 52 (4): 658-666, 1997.

Perón, J.M.R.; Gutierrez, J. R.V.; Cabrera, E.B. A.; Moreno, U. L., Mora, R.S. Presente y futuro de los antioxidantes en el tratamiento de la hipertensión arterial esencial. **Rev. Cub. Med. Mil**, 31 (4), 2002.

PERTINENT Investigators. PERTINENT-perindopril-thrombosis, inflammation, endothelial dysfunction and neurohormonal activation trial: a sub-study of the EUROPA study. **Cardiovasc. Drugs Ther.**, 17 (1): 83-91, 2003.

Rang, H.P., Dale, M.M., Ritter, J.M., Hower, R. J. **Farmacologia**. 6 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.

Redondo-Müller, M.A.; Stevanovic-Walker, M.; Barker, S.; Puddefoot, J.R.; Vinson, G.P. Anti-cancer actions of a recombinant antibody (R6313/G2) against the angiotensin II AT1 receptor. **Endocr. Relat. Cancer**, 15: 277-288, 2008.

Ribeiro, J.M. e Florêncio, L.P. Bloqueio farmacológico do sistema renina-angiotensina-aldosterona: inibição da enzima de conversão e antagonista do receptor AT1. **Rev. Bras. Hipert.**, 3: 293-302, 2000.

Richard, C.; Lauzier, B.; Delemasure, S.; Talbot, S.; Ghibu, S.; Collin, b; Sénécal, J.; Menetrier, F.; Vergely, C.; Couture, R.; Rochette, L. Effects of angiotensin-1 converting enzyme inhibition on oxidative stress and bradykinin receptor expression during doxorubicin-induced cardiomyopathy in rats. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, 52: 278-285, 2008.

Rincón, J.G. and Graf, U. *Drosophila melanogaster* somatic mutation and recombination test as a biomonitor. In: Butterwoeth, FM, Corkum, LD, Guzmán-Rincón, J. Biomonitoring and biomarkers as indicators of environmental change. New York: Plenum Press p 169-181, 1995.

Rincón, J.G.; Espinosa, J.; Graf, U. Analysis of the in vivo nitrosation capacity of the larvae used in the wing somatic mutation and recombination test of *Drosophila melanogaster*. **Mutat. Res.**, 412: 69-81, 1998.

Rhodes, D.R.; Ateeq, B.; Cao, Q.; Tomlins, S.A.; Mehra, R.; Laxman, B.; Kalyana-Sundaram, Lonigro, R.J.; Helgeson, b.E.; Bhojani, M.S.; Rehemrulla, A.; Kleer, C.G.; Hayes, D.F.; Lucas, P.C.; Varambally, S.; Chinnaiyan, A.M. AGTR1 overexpression

defines a subset of breast cancer and confers sensitivity to losartan, an AGTR1 antagonist. **PNAS**, 106 (25): 10284–10289, 2009.

ROCHA, V.C.J. **Estratégia para reduzir a cardiotoxocidade da doxorubicina (DOX) sem afetar sua atividade antineoplásica**. 2010. 73 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) - Fundação Oswaldo Cruz. Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2010.

Salzet, M., Deloffre, L., Breton, C., Vieau, D., Schoofs, L. The angiotensin system elements in invertebrates. **Brain. Res. Rev.**, 36 (1): 35-45, 2001.

Sipahi, I.; Debanne, S.M.; Rowland, D.Y.; Simon, D.I.; Fang, J.C. Angiotensin-receptor blockade and risk of cancer: meta-analysis of randomised controlled trials. **Lancet. Oncol.**, 11 (7): 627-36, 2010.

Siviter, R J; Taylor, C A M; Cottam, D M; Denton, A; Dani, M P; Milner, M J; Shirras, A D; Isaac, R E. Ance a *Drosophila* angiotensin-converting enzyme homologue, is expressed in imaginal cells during metamorphosis and is regulated by the steroid, 20-hydroxyecdysone. **Biochem. J.**, 367: 187-193, 2002.

Suganuma, T.; Ino, K.; Shibata, K.; Kajiyama, H.; nagasaka, T.; Mizutani, S.; Kikkawa, F. Functional Expression of the Angiotensin II Type1 Receptor in Human Ovarian Carcinoma Cells and Its Blockade Therapy Resulting in Suppression of Tumor Invasion, Angiogenesis, and Peritoneal Dissemination. **Clin. Cancer Res.**, 11(7): 2686-2694, 2005

Tacar, O.; Sriamornsak, P.; Dass, C.R. Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems. **J. Pharm. Pharmacol.**, 65 (2):157-170, 2013.

Tavares, M. T.; Primi, M. C.; Polli, M.C.; Ferreira, E.I; Parise-Filho. Interações fármaco-receptor: aplicações de técnicas computacionais em aula prática sobre a evolução dos inibidores da enzima conversora de angiotensina. **Quim. Nova**, XY: 1-8, 2015.

Taylor, C.A.M., Coats, D., Shirras, A.D. The *Acer* gene of *Drosophila* codes for an angiotensin-converting enzyme homologue. **Gene** 181: 191-197, 1996.

Thorn, C.F., Oshiro, C., Marsh, S., Hernandez-Boussard, T., McLeod, H., Klein, T.E., Altman, R. B. Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects. **Pharmacogenet. Genomics**, 21(7), 440, 2011.

Trapp, S. M.; Vailati, M. C. F.; Matsubara, B. B.; Schwartz, D. S. Efeitos da Angiotensina II no sistema cardiovascular. **Arch. Veter. Scien.**, 14 (4): 233-243, 2009.

Turner, A. e Hooper, N. M. The angiotensin-converting enzyme gene family: genomics and pharmacology. **TRENDS in Pharmacol. Scien.**, 23 (4), 2002.

Uemura, H.; Nakaigawa, N.; Ishiguro, H.; Kubota, Y. Antiproliferative efficacy of angiotensin II receptor blockers in prostate cancer. **Curr. Cancer Drug Targets**, 5 (50): 307-23, 2005.

Varella, P.P.V e Forte, W.C.N. Citocinas: Revisão. **Rev. Bras. Alerg. Immunopatol.**, 24(4):146-154, 2001.

Wysocki, P.J.; Kwiatkowska, E.P.; Kazimierczak, U.; Suchorska, W.; Kowalczyk, D.W.; Mackiewicz, A. Captopril, an angiotensin-converting enzyme inhibitor, promotes growth of immunogenic tumors in mice. **Clin Cancer Res.**, 12(13):4095-4102, 2006.

Yang, F., Teves, S.S., Kemp, C.J., Henikoff, S. Doxorubicin, DNA torsion, and chromatin dynamics. **Biochim. Biophys. Acta**, 1845 (1): 84-89, 2014.

Yoshiji, H.; Kuriyama, S.; Kawata, M.; Yoshii, J.; Ikenaka, Y.; Noguchi, R.; Nakatani, T.; Tsujinoue, H.; Fukui, H. The angiotensin-I-converting enzyme inhibitor perindopril suppresses tumor growth and angiogenesis: possible role of the vascular endothelial growth factor. **Clin. Cancer Res.**, 7(4):1073-1078, 2001.

CAPÍTULO 2

**Assessment of the mutagenic and
recombinagenic potential of anti-
hypertensive drugs in the somatic cells
of *Drosophila melanogaster***

Research Article

Assessment of the mutagenic and recombinagenic potential of anti-hypertensive drugs in the somatic cells of *Drosophila melanogaster*

R.G. Silva-Oliveira ^a, P. C. Orsolin ^a, J. C. Nepomuceno ^{a,b}

^a *Federal University of Uberlandia, Institute of Genetics and Biochemistry, Block 2E, Umuarama Campus, Uberlândia, Minas Gerais, Brazil*

^b *University Center of Patos de Minas, Laboratory of Cytogenetics and Mutagenesis, Patos de Minas, Minas Gerais, Brazil*

*Corresponding author: E-mail: nepomuceno@ufu.br. Tel, +55 34 38230169; Email: nepomuceno@ufu.br (J.C. Nepomuceno)

ABSTRACT

Captopril and perindopril are anti-hypertensive drugs from the angiotensin-converting enzyme (ACE) class of inhibitors, which have been evaluated as potential chemopreventive agents for cancer. The aim of this study was to evaluate the genotoxic potential of captopril and perindopril by means of somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster* cells. The results showed no increase in mutant spots for concentrations of captopril in the ST and HB crosses and no significant decrease in the frequency of spots in the concentrations of the association captopril plus doxorubicin (DXR). Also an increase in mutant spots was not found in descendants of ST cross treated with perindopril isolated. While a weak positive increase in mutant spots was found for concentrations of perindopril, in the HB cross. These results suggest that captopril is not genotoxic, and that perindopril presents slight genotoxicity in *Drosophila melanogaster*.

Keywords: SMART; *Drosophila melanogaster*; Perindopril; Captopril; Doxorubicin

1. INTRODUCTION

Angiotensin converting enzymes (ACE) are zinc metallopeptidases that act as key molecules in the rennin-angiotensin system (RAS). This system plays an important role in regulating blood pressure and hydroelectrolytic homeostasis (Ribeiro and Florêncio, 2000; Siviter et al., 2002; Akif et al., 2010; Garcia et al., 2010). The hyperactivity of the RAS has been linked to the development of hypertension and other cardiovascular and renal diseases; however, there are some well tolerated drugs that can effectively regulate this system, such as the angiotensin-converting enzyme inhibitors (ACE inhibitors) (Ribeiro and Florêncio, 2000; Turner and Hooper, 2002).

ACE inhibitors act by blocking a reversible form of the angiotensin-converting enzyme, thereby reducing the formation of angiotensin II (Ang II) and directly promoting a hypotensive effect caused by the inhibition of vasoconstriction effects and stimulants of aldosterone secretion. For this reason, they are clinically used as antihypertensive agents and in the treatment of ischemic heart disease, arteriosclerosis, diabetic nephropathy and left ventricular hypertrophy (Barretto, 1999; Turner and Hooper, 2002; Carhan et al., 2011). There are about twenty ACE inhibitors currently available on the market, classified according to the presence of the chemical group sulfhydryl, carboxyl or phosphorilates, and even by affinity with the molecule of zinc present in the structure of the ACE (Ribeiro and Florêncio, 2000; Paula et al., 2005; Savioli-Neto, 2007). Among the available ACE inhibitors are captopril and perindopril.

Captopril is an active drug that possesses the functional group sulfhydryl (-SH) and stands out for having been the first ACE inhibitor to be used clinically in the treatment of arterial hypertension (Paula et al., 2005; Lourenção et al., 2008). While perindopril stands out for presenting a prolonged half-life of 30-120 hours, which reflects the slow dissociation of the ACE binding sites. It contains a carboxyl group (-COOH) and as a prodrug, it requires diesterification to produce perindoprilat, a metabolite that actively inhibits ACE (Paula et al., 2005; Curran et al., 2006).

In addition to the beneficial effects described for regulation of blood pressure, of the ACE inhibitors are being evaluated as potential chemopreventive agents for cancer (Lever, 1998; Yasumaru et al., 2003; Gallagher and Tallant, 2004). This chemopreventive action is attributed to the possible antioxidant effect of these

drugs. However, the chemical structure can generate different antioxidant effects, for example, perindopril is capable of reducing layers of superoxide radicals (Chirkov et al., 2004). While captopril has a free sulfhydryl group, which allows it to act as a powerful inhibitor of free radicals (Volpert et al., 1996; and Lourenção et al., 2008) thus forming complexes of copper, important mechanisms for antimutagenic activity (Ward et al., 1993; Sharma et al., 2011).

A study conducted by Blaes et al. (2010) shows that the concomitant use of ACE inhibitors and chemotherapy with doxorubicin (DXR) may promote chemopreventive activity and decrease cardiac complications. However, chemopreventive activity attributed to ACE inhibitors is a controversial topic, because some authors raise the question about the overall risk of cancer from treatment with ACE inhibitors (Coleman et al., 2008; Bangalore et al., 2010; Yoon et al., 2011; Singh and Bangalore, 2012).

Doxorubicin (DXR) is a potent chemical therapy with cytotoxic action, effective in the treatment of breast carcinomas and pediatric, adult, osteogenic, Ewing and soft tissue sarcomas (Martins et al., 2011; Chabner et al., 2012), whose therapeutic activity occurs by DNA intercalation and linking with topoisomerase II (Rang et al., 2007). Among the side effects are cardiotoxicity and nephrotoxicity (Blaes et al., 2010; Ali, 2012).

Thus, the objective of this study was to evaluate the possible mutagenic effects and / or recombinogenic of the captopril and perindopril through the test for detection somatic mutation and recombination (SMART) in the *Drosophila melanogaster* cells. This test can detect the loss of heterozygosity of specific marker genes that are phenotypically expressed on the wings of these insects (Graf et al., 1984; Graf et al., 1989). From the *D. melanogaster*, it is possible to assess damage that involves gene mutations, chromosomal aberrations and homologous recombination, allowing the quantification of this last event to determine the genotoxicity of the total compound (Graf et al., 1984). *Drosophila* is considered an excellent model organism due to the high similarity of its genes with humans, the ease of maintenance in the laboratory, short generation time and large number of progeny (Ribeiro and Gaivão, 2010; Graf and Van Schaik, 1992).

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Chemical agents

In this study, the following chemical compounds were used: Captopril 50 mg (CAS 62571-86-2), Lot nº. 11031749, Medley S. A. Pharmaceutical Industry, São Paulo, Brazil; Perindopril under the commercial name Conversyl® 8 mg (CAS 82834-16 -0), Lot nº. 3000456, Laboratory Servier Brasil Ltda., Rio de Janeiro, Brazil; Doxorubicin under the commercial name Doxolem® 50 mg (CAS 25316-40 -9), Lot nº. 83520, manufactured by Eurofarma Laboratories Ltda. and distributed by Zodiac Pharmaceutical Products, São Paulo, Brazil. The chemical structures of the compounds are shown in Figure 1.

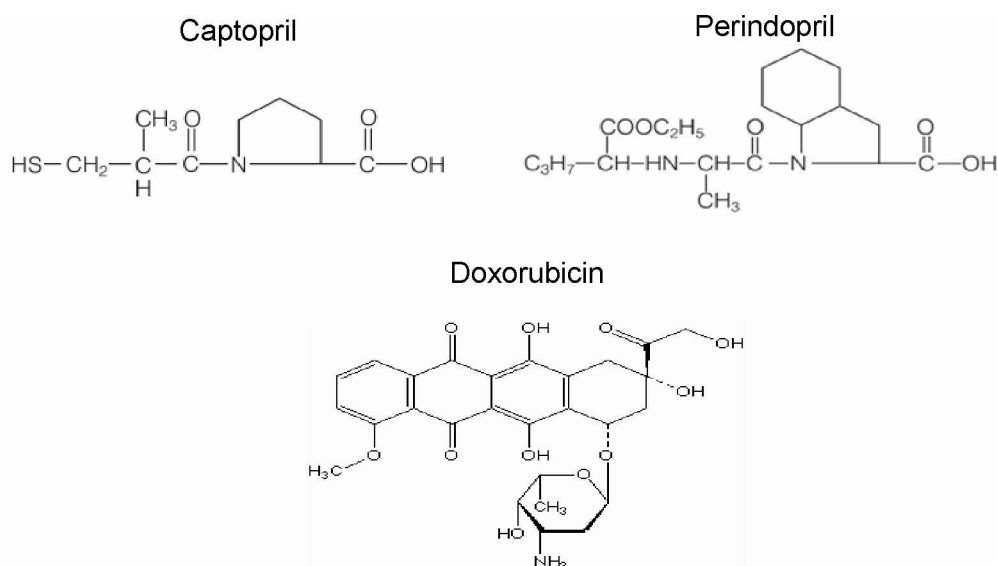


Figure 1: Chemical structure of the compounds. *Source:* Katzung (2001); Paula et al.(2005).

Instant mashed potatoes were used (Yoki Alimentos S. A. brand, São Paulo, Brazil) as an alternative medium for *Drosophila*, which were moistened with the concentrations of the compounds tested. All concentrations were prepared immediately before use from dilution in water obtained by reverse osmosis.

2.2. Test for detection of mutation and somatic recombination (SMART) in cells of *Drosophila melanogaster*

2.2.1 Stock lineages and cross

Three mutant lineages of *D. melanogaster* were used in the SMART assay: *multiple wing hairs (mwh)*, *flare³* and *Oregon R flare³*, stored in ¼ liter flasks containing culture medium for *D. melanogaster* (820 mL of water, 25 g biological yeast - *Saccharomyces cerevisiae*, 11 g of agar, 156 g of banana and 1 g of methylparaben).

In this study two types of crosses were carried out: Standard (ST - *Standard Cross* = female virgins *flr³/ln(3LR)TM3, ri p^p sep l(3)89Aabx^{34e} and Bd^s* with males *mwh*) whose effects arise in a direct manner, due to low metabolism of the compound; and High Bioactivation (HB - *High Bioactivation Cross* = female virgins *ORR; flr³/ln(3LR)TM3, ri p^p sep l(3)89Aabx^{34e} and Bd^s* with males *mwh*) whose effects are manifested in an indirect manner, since the strain *ORR; flr³* has a significant level of cytochrome P450 enzymes, which are responsible for the high biometabolization of compounds (Graf et al., 1989; Graf and Van Schaik, 1992).

After the crosses, the flies were transferred to a flask containing hatching medium, a solid base of agar (4% agar in water) and a layer of yeast (*S. cerevisiae*) supplemented with sugar. The eggs were collected over a period of 8 hours.

2.2.2 Treatments

Third instar larvae of offspring of the crosses *flr³ x mwh* (ST) and *ORR x mwh* (HB) were collected after 72 h (\pm 4 h) and washed with water obtained from reverse osmosis in a fine mesh stainless steel sieve and subjected to chronic treatment for 48 hours, because after this period the larvae transform into pupae and no longer feed from the medium of culture.

Two treatments were performed: one using Captopril 500, 250, 125, 62.5 and 31.25 µg/mL; and another using Perindopril 80, 40, 20, 10 and 5 µg/mL. The chronic treatment was performed in duplicate, where, for each glass vials, containing 1.5 g of instant mashed potatoes, was used 5 mL of each concentration isolated compound. However, just captopril was tested in concentrations associated with DXR 0,125 mg/mL, due the negative results in genotoxicity test was held o antigenotoxicity testing. In both experiments two controls were included: a positive control using DXR 125 µg/mL and negative control, using water obtained from reverse osmosis.

For the toxicity test, 100 larvae were counted before being distributed into vials. Thus, the number of flies that hatched was used to calculate survival rates after

the exposure. The adult individuals, after undergoing metamorphosis, were stored in 70% ethanol for later assembly of slides.

2.2.3. Preparation of slides and microscopic analysis

The *Drosophila* descendants of crosses ST and HB, preserved in ethanol 70%, had their wings detached and pairs fixed on slides with a solution of Faure (30 g of arabic gum, 20 mL of glycerol, 1.5 g of chloral hydrate and 50 mL of distilled water). The slides were then taken to dry for 1 hour on a hotplate (60°C).

The analysis of the wings was performed using an optical microscope (40x objective) registering the number and types of spots found (single or twin), and also the position in which they follow the orientation of the wing sectors (A, B, C', C, D, D', E).

Analysis of the trichomes, present on the dorsal and ventral surfaces of the wings, permitted the identification of wing spots and mutant hairs that could be classified as simple (*mwh* or *flr*³) or twin (*mwh* and *flr*³). The wings of BH (*mwh/TM3*) flies were assembled and analyzed after checking that there were positive responses in the MH offspring, because these flies expressed only mutagenic events, so they were analyzed to determine the proportion of recombinogenic and mutagenic events (Graf et al., 1984; Guzmán- Rincón and Graf, 1995).

2.2.4. Statistical analysis

The statistical analysis was performed as described by Frei and Würigler (1988), which allows for four different diagnoses: positive, weak positive, negative or inconclusive. The spots from the mutants were grouped into three different categories: (1) small single spots (1-2 cells), (2) large single spots (3 or more cells) and (3) twin spots. The frequency of each type of spot and the total frequency of spots per fly for each treatment were compared to pairs (compound isolated with negative control and compound associated with positive control) using the binomial conditional test according to Kastenbaum and Bowman (1970) and Frei and Würigler (1995) with significance levels of $P \leq 0.05$.

However, since false positive results can occur, all final weak positive results were analyzed with the non-parametric *U* test by Mann, Whitney e Wilcoxon (Frei e Würigler, 1995).

3. RESULTS

The concentrations of captopril and perindopril were established from a pilot test whose concentrations were established on the basis of protocols of concentrations from Rooprai et al. (2001), using cell lines derived from human brain tumors, and Xiang-jian et al. (2001) using the cultured cardiomyocytes of rats. From this test it was possible to define the five concentrations of each compound to be used in this experiment. Defined by the concentrations, the larvae descendants from ST and HB crosses were subjected to chronic treatment for 48 hours. The number adults emerging from each concentration were recorded, and from these values it was possible to trace the survival curve of each cross, as shown in Figures 2 and 3. The concentrations were tested in isolation and captopril was also tested in association with DXR chemotherapy. All compounds were tested in two different experiments. The data were combined following verification that the two independent experiments produced acceptable reproducibility.

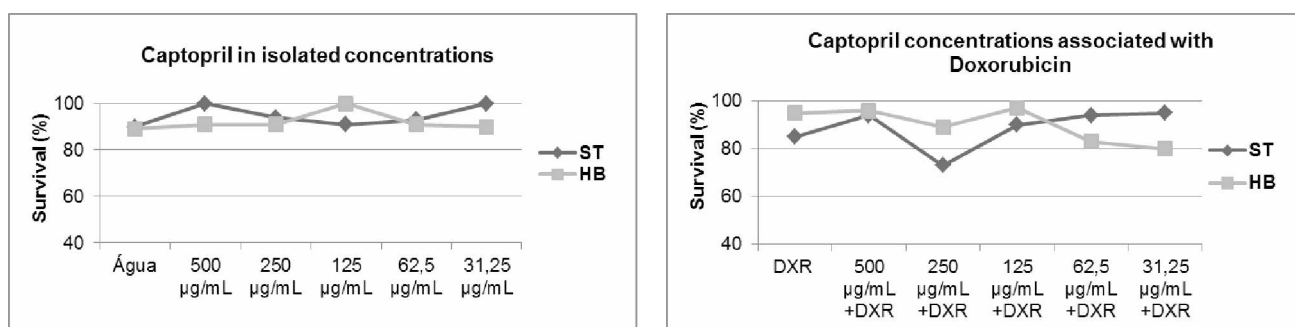


Figure 2: Relative survival rate of *D. melanogaster* in different concentrations of captopril emerging the standard crossing (ST) and the crossing of high bioactivation (HB).

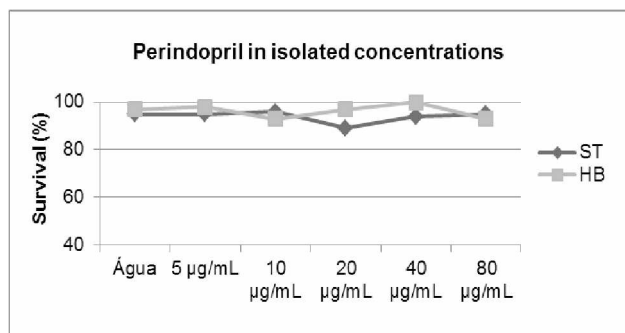


Figure 3: Relative survival rate of *D. melanogaster* at different concentrations of perindopril emerging from the standard crossing (ST) and the crossing of high bioactivation (HB).

Figures 2 and 3 show the numbers of adult individuals found in ST and HB crosses treated with captopril (alone and in combination with DXR) and perindopril (alone). Note that in both crosses, the survival rate was higher than 70%, indicating the viability of concentrations.

Table 1 presents the results relating to MH descendants from ST and HB crosses, treated with concentrations of captopril alone or in association with DXR. In the ST e HB crosses, in isolated concentrations, it was observed that the captopril had no genotoxic activity, when compared to the negative control.

In the associated concentrations of both crosses, the results showed that there was no significant increase in the number of mutant spots in the total spot category for captopril when compared to the positive control. Thus, captopril was not unable to modulate the effect of DXR chemotherapy.

Table 2 presents the results for MH descendants of the ST and HB crosses treated with concentrations of perindopril alone. In the ST cross, perindopril showed no statistically significant difference in the overall category of spots in the five concentrations tested when compared to the negative control. However, in the HB cross, the results show that individuals treated with five concentrations of isolated perindopril showed significant increases for the categories small simple spots and total spots, when compared to the negative control. This result indicates that in these experimental conditions, perindopril, when suffer biometabolization by the enzyme cytochrome P450, showed a slight genotoxic effect.

The analysis of the BH individuals from the HB cross treated with perindopril (Table 2), results show that all concentrations of isolated perindopril were recombinogenic, ranging from 57.51% to 73.37%.

4. DISCUSSION

The SMART test is considered an excellent test because of the genetic similarity between *Drosophila* and mammals. In addition to the homology found between tumor suppressor genes and human oncogenes (Alte et al., 2012), *D. melanogaster* also has the angiotensin-converting enzyme (ACE), homologous to the human enzyme, which is known as *Ance* (Taylor et al., 1996; Isaac et al., 2007).

The *Ance* enzyme of *Drosophila* is found in the hemolymph and reproductive tissues (ovaries, testes and accessory gland) of both male and female insects (Isaac et al., 2007). *Ance* plays an important role in the embryogenesis of the *Drosophila*, because it is present in amnioserosa, participates in the development of the dorsal vessel, anterior and posterior intestine in addition to being present in the cells of the developing heart (Taylor et al., 1996; Houard et al., 1998; Salzet et al., 2001). *Ance* presents many enzymatic properties described in the human enzyme. *In vitro* studies showed that *Ance* is able to convert Ang I to Ang II and hydrolyze bradykinin, which may still be inhibited by human ACE inhibitors such as captopril and trandolapril (whose active form is chemically similar to perindoprilat) (Taylor et al., 1996; Akif et al., 2010). Thereby assuming the existence of the renin-angiotensin system, in *Drosophila*, was performed SMART assay to evaluate the genotoxicity of ACE inhibitors captopril and perindopril, was evaluated also, the possible antigenotoxic effect of captopril against damage induced by DXR.

According to some authors (Coleman et al., 2008; Blaes et al., 2010; Bangalore et al., 2010; Yoon et al., 2011; Singh and Bangalore, 2012), ACE inhibitors display anticancer properties. Nevertheless, the results of this study show that although both compounds tested have the same mechanism of action, the differences in chemical structure, absorption and the half-life were evident in the various genetic parameters detected by SMART.

Some studies have reported the beneficial effect of captopril in cancer, for example, according Attoub et al (2008), in immunohistochemical analysis of treatment with captopril showed significantly reduce cell number in proliferation. Yoshiji et al.(2001) and Fujita et al. (2005) reports that captopril has effect in inhibiting angiogenesis, capable of reducing tumor growth. Péron et al. (2002) complements that this drug can also act as an antioxidant, the from availability of sulfhydryl groups, preventing the cytotoxic effects mediated by oxidative stress often

caused by eliminating superoxide anions. Péron et al. (2002) further argue, that the presence of sulfhydryl group stimulates the synthesis of prostaglandins cardioprotective. However, in this study with *Drosophila*, we found no effect of treatment with captopril, because in both treatments (captopril alone or combined with DXR) the results were not significant.

Perindopril alone showed no genotoxic effect, in the ST cross. It is believed that, since it is a pro-drug, biometabolization is necessary for the active metabolite, perindoprilat. According to Curran et al. (2006) the metabolism of perindopril in perindoprilat occurs by hydrolysis mainly in the liver (hepatic esterase), but can also occur in the plasma and in the intestinal wall. The biotransformation reaction is performed by cytochrome P450 enzymes that are found throughout the body, with higher expressivity in the liver (Chaudhary et al., 2009). As the ST cross descendants have low expression of cytochrome P450 enzymes, and as there was an increase in the number of mutant spots in the HB cross at all tested concentrations, it is suggested that this is the reason why the perindopril isolate presented recombinogenic effect only in HB, showing then the need for biometabolization of the compound. The increase in the number of mutant spots in HB, although some of them with weak positive diagnosis, is probably related to the increase in the toxic effect of perindopril to be biometabolized, because the main function of the cytochrome P450 enzymes is the transformation of toxic substances into less toxic substances that can be eliminated by the body. However, the drugs are not always inactivated; on the contrary, some metabolites may present increased activity or toxic properties including mutagenicity, teratogenicity and carcinogenicity (Oshima-Franco and Franco, 2003).

Another important finding concerns the type of spot in the HB cross; perindopril presented a significant diagnosis in the category simple small spots for all five concentrations tested, indicating that perindopril operates in the final metamorphosis stages of the *Drosophila*. According to Graf (1995) and Graf et al. (1998) the simple small spots are formed during the last and penultimate cycles of mitotic division that occur in the pupal stage. While simple large spots are formed during larval development, at the start of mitosis.

SMART enables recombination percentages to be estimated from mutation events expressed in the BH individuals. According to Graf et al. (1984) these individuals express only mutation events, because the *TM3* balancer present in

this strain, has multiple inversions, which, in the event of recombination, make the cells non-viable. As well as the basis for the analysis of BH individuals, we can say that perindopril showed significantly greater potential for recombination than mutation. In the individual HB cross descendants treated with perindopril, the recombinogenic effect was observed in five isolated concentrations ranging from 57.51% in the lower to 73.37% in the higher concentration.

Although mutations are frequently related to the carcinogenic process, homologous recombination can also play an important role in carcinogenesis. Homologous recombination consists of a repair drifter mechanism in the DNA that can lead to a loss of heterozygosity or genetic rearrangements and is crucial to the genesis of numerous genetic diseases such as cancer (Orsolin et al., 2012). According to Bishop and Schiestl (2001) homologous recombination is induced by a wide range of carcinogenic substances, many of which are classically considered efficient in many repair pathways, although patients whose cells exhibit an increased frequency of recombination also have an elevated frequency of cancer.

The recombinogenic effect found for DXR, used as the positive control in this experiment, remains around 80%. Previous studies have reported that mutation spots induced by DXR are predominantly allocated to recombination (Lehmann et al., 2003; Rezende et al., 2011; 2013). With regard to the perindopril, even with a low genotoxic activity, the result showed that increase in mutants stains were predominantly recombinogenic.

As previously mentioned, several studies have reported that ACE inhibitors, among them captopril and perindopril, are excellent free radical scavengers with antioxidant action (Volpert et al., 1996; Chirkov et al., 2004; Lourenção et al., 2008). In this context, studies reveal that ACE inhibitors are able to alleviate the side effects caused by DXR, mainly cardiotoxicity, while maintaining its antioxidant effects (Sacco et al., 2009; Blaes et al.; 2010). However, our study showed that free radical scavenging activity by captopril was inefficient in *Drosophila*, since there was no reduction in the number of mutant spots when captopril was associated with DXR.

Mansour et al. (1999) affirms that the possibility of ACE inhibitors protecting cells against the toxic effects caused by DXR is uncertain, because in their study using pure chemical systems, captopril in millimolar concentrations was not able to remove superoxide radicals. Shi et al. (2011) add that the widely accepted

theory that reactive oxygen species and iron are the doxorubicin's main mechanism of cardiotoxicity, up until now the use of antioxidants has not been effective in relieving the cardiotoxicity of anthracyclines in clinically relevant animal models and in clinical trials.

Another probable mechanism, responsible for the increase in mutant spots in perindopril, is the anti-apoptotic activity of that compound. Disturbances in formation of Angiotensin II (Ang II) is related to the promotion of apoptosis in pulmonary cells, by induce the accumulation of neutrophils in the tissue, is related also with potentialization of the apoptosis by activation of tumor necrosis factor alpha (TNF- α) and by anoxia-reoxygenation in endothelial cell of cultures of human coronary artery (Filippatos et al., 2001; Morka et al., 2013). In *Drosophila*, the cell that appears to fulfill equivalent functions to neutrophils and macrophages is the hemocyte, which patrols tissues, recognizing and engulfing apoptotic corpses in the embryo and pathogens in the larval and adult fly (Stramer et al., 2005). Thus, the use of angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitors, such a perindopril, possibly inhibit pro-inflammatory and pro-apoptotic processes which probably triggered an increase in the number of spots noticed mutant in this experiment.

According to Morka et al. (2013), ACE inhibitors have been used to suppress the apoptosis process and to reduce inflammation in lungs injured by Meconium Aspiration Syndrome. Zagariya et al. (2006) add that in animal models this syndrome causes an accumulation of inflammatory cells, release of cytokines and massive cell death in pulmonary tissue. However, newborn rabbits pre-treated with captopril, before the onset of meconium, showed a reduction in the levels of endothelin 1 and pro-inflammatory cytokines besides a reduction of the apoptotic process. Ceconi et al. (2007) reported that in *in vivo* mouse models subjected to endotoxin shock induced by bacterial lipopolysaccharide in order to increase the apoptosis rate in aortic endothelial cells, perindopril was the only one, among the ACE inhibitors tested able to significantly reduce the apoptosis rate. According to Ferrari (2008) this favorable effect in relation to other ACE inhibitors, found in perindopril, is attributable to greater selectivity for binding sites with bradykinin than with angiotensin I. Perindopril was also able to reduce the pro-apoptotic proteins Bax and Bcl-XS without changes in the levels of the anti-apoptotic protein Bcl- XL in the cardiac cells of rats (Gálvez et al., 2005).

In summary, we demonstrated that captopril is not genotoxic or antigenotoxic, when analyzed separately and in association with DXR. Therefore, captopril does not have chemopreventive activity against DXR action, in the wing somatic assay of *D. melanogaster*. Perindopril has subtle effect of genotoxic with mutant stains predominantly recombinogenic. Thus, further studies are needed to better assess the effects of ACE inhibitors in promoting or chemoprevention of cancer.

5. REFERENCES

- Ali, N.H.M. 2012. Protective effect of captopril against 5-fluorouracil-induced hepato and nephrotoxicity in male albino rats. *J Am Sci* 8, 680-685.
- Akif, M., Georgiadis, D., Mahajan, A., Dive, V., Sturrock, E.D., Isaac, R.E., Acharya. K.R., 2010. High-Resolution Crystal Structures of *Drosophila melanogaster* Angiotensin-Converting Enzyme in Complex with Novel Inhibitors and Antihypertensive Drugs. *J Mol Biol* 400, 502–517.
- Alte, M.A., Thomé, S., Abreu, B.R.R., Lehmann, M., Dihl, R.R., 2012. Avaliação da atividade tóxico-genética da enrofloxacin. *Rev Inc Cien ULBRA* 10, 21-26.
- Attoub, S.; Gabem, A.M.; Al-Salam, S.; Al-Sultan, M.A.; John, A.; Nicholls, M.G.; Mester, J.; Petroianu, G., 2008. Captopril as a Potential Inhibitor of Lung Tumor Growth and Metastasis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1138: 65-72,.
- Bangalore, S., Kumar, S., Kjeldsen, S.E., Makani, H., Grossman, E., Wetterslev, J., Gupta, A.K., Sever, P.S., Gluud, C., Messerli, F.H., 2010. Antihypertensive drugs and risk of cancer: network meta-analyses and trial sequential analyses of 324168 participants from randomised trials. *Lancet Oncol* 12, 65-82.
- Barretto, A.C.P., 1999. Da fisiopatologia à prática clínica. *Rev Soc Cardiol Est São Paulo* 9, 35-44.
- Bishop. A.J.R. and Schiestl, R.H., 2001. Homologous recombination as a mechanism of carcinogenesis. *Biochim Biophys Acta* 1471, M109-21.
- Blaes, A.H., Gaillard, P., Peterson, B.A., Yee, D., Virnig, B., 2010. Angiotensin converting enzyme inhibitors may be protective against cardiac complications following anthracycline chemotherapy. *Breast Cancer Treat* 122, 585–590.
- Carhan, A., Tang, K., Shirras, C.A., Shirras, A.D., Isaac, R.E., 2011. Loss of Angiotensin-converting enzyme-related (ACER) peptidase disrupts night-time sleep in adult *Drosophila melanogaster*. *J Exp Biol* 214, 680-686.
- Ceconi, C., Francolini, G., Bastianon, D., Gitti, G.L., Comini, L., Ferrari, R., 2007. Differences in the Effect of Angiotensin-converting Enzyme Inhibitors on the Rate of Endothelial Cell Apoptosis: In Vitro and In Vivo Studies. *Cardiovasc Drugs Ther* 21, 423-429.

Chabner, B.A., Bertino, J.C., Ortiz, T., Lane, A., Supko, J.G., Ryan, D., 2012. Quimioterapia das doenças neoplásicas. In: Brunton LL, Chabner BA, Knollmann BC, editors. As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman and Gilman. 12th edition. Rio de Janeiro: McGraw-Hill p 1664-1669.

Chaudhary, K.R., Batchu, S.N., Seubert, J.M., 2009. Cytochrome P450 enzymes and the heart. IUBMB Life 61, 954-960.

Chirkov, Y.Y., Holmes, A.S., Martelli, J.D., Horowitz, J.D., 2004. Effect of perindopril on platelet nitric oxide resistance in patients with chronic heart failure secondary to ischemic left ventricular dysfunction. Am J Cardiol 93, 1438-1440.

Coleman, C., Baker, W., Kluger, J., White, C., 2008. Antihypertensive medication and their impact on cancer incidence: a mixed treatment comparison meta-analysis of randomized controlled trials. J Hypertens 26, 622–629.

Curran, M.P., McCormack, P.L., Simoson, D., 2006. Perindopril: A Review of its use in patients with or at risk of developing coronary artery disease. Drugs 66, 235-255.

Ferrari, R., 2008. Treatment with angiotensin-converting enzyme inhibitors: insight into perindopril cardiovascular protection. Eur Heart J Suppl 10, G13-G20.

Filippatos, G.S., Gangopadhyay, N., Lalude, O., Parameswaram, N., Said, S.I., Spielman, W., Uhal, B.D., 2001. Regulation of apoptosis by vasoactive peptides. Am J Lung Cell Mol Physiol 281, 749-761.

Frei, H. and Würigler, F.E., 1988. Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assay indicate a positive, negative, or inconclusive result. Mutat Res 203, 297-308.

Frei, H. and Würigler, F.E., 1995. Optimal experimental design and sample size for the evaluation of data from somatic mutation and recombination test (SMART) in *Drosophila*. Mutat Res 334, 247-258.

Fujita, M.; Hayashi, I.; Yamashina, S.; Fukamizu, a.; Itoman, M.; Majima, M., 2005. Angiotensin type 1a receptor signaling-dependent induction of vascular endothelial growth factor in stroma is relevant to tumor-associated angiogenesis and tumor growth. Carcinogenesis, 26 (2): 271-279.

Gallagher, P.E. and Tallant, E.A., 2004. Inhibition of human lung cancer cell growth by angiotensin-(1-7). Carcinogenesis 25, 2045 – 2052.

Gálvez, A.S., Fiedler, J.L., Ocaranza, M.P., Jalil, J.E., Lavandero, S., Díaz, A.G., 2005. Perindopril regulates beta-agonist-induced cardiac apoptosis. J Cardiovasc Pharmacol 46, 255-261.

Garcia, P., Schwenzer, S., Slotta, J.E., Scheuer, C., Tami, A.E., Holstein, J.H., Histing, T., Burkhardt, M., Pohlemann, T., Menger, M.D., 2010. Inhibition of angiotensin-converting enzyme stimulates fracture healing and periosteal callus formation – role of a local renin-angiotensin system. Br J Pharmacol 159, 1672-1680.

Graf, U., Würigler, F.E., Katz, A.J., Frei, H., Juon, H., Hall, C.B., Kale, P.G., 1984. Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. Environ Mutagen 6, 153-88.

Graf, U. Kägi, A., Katz, A.J., Würgler, F.E., 1989. Thirty compounds in the *Drosophila* wing spot test. *Mutat Res* 222, 359–373.

Graf, U. and Van, Schaik, N., 1992. Improved high bio activations cross for the wing somatic mutations and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Mutat Res* 271, 59-67.

Graf, U., 1995. Analysis of the relationship between age of larvae at mutagen treatment and frequency and size of spots in the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Experientia* 51, 168-173.

Graf, U., Abraham, S.K., Guzmán-Rincón, J., Würgler, F.E., 1998. Antigenotoxicity studies in *Drosophila melanogaster*. *Mutat Res* 402, 203-209.

Guzmán-Rincón, J. and Graf, U., 1995. *Drosophila melanogaster* somatic mutation and recombination test as a biomonitor. In: Butterwoeth, FM, Corkum, LD, Guzmán-Rincón, J. Biomonitoring and biomarkers as indicators of environmental change. New York: Plenum Press p 169-181.

Houard, X., Williams, T.A., Michaud, A., Dani, P., Isaac, E., Shirras, A.D., Coates, D., Corvol, P., 1998. The *Drosophila melanogaster*-related angiotensin-I-converting enzymes Acer and Ance: Distinct enzymic characteristics and alternative expression during pupal development. *Eur J Biochem* 257, 599-606.

Isaac, R.E., Lamango, N.S., Ekbote, U., Taylor, C.A., Hurst, D., Weaver, R.J., Carhan, A., Burnham, S., Shirras, AD., 2007. Angiotensin-converting enzyme as a target for the development of novel insect growth regulators. *Peptides* 28, 153-162.

Katzung, B. *Farmacologia Básica e Clínica*. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

Kastenbaum, M.A. and Bowman, K.O., 1970. Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies. *Mutat Res* 9, 527-549.

Lehmann, M., Franco, A., Vilar, K.S.P., Reguly, M.L., de Andrade, H.H.R., 2003. Doxorubicin and two of its analogues are preferential inducers of homologous recombination compared with mutational events in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.* 539, 167–175.

Lever, A.F., Hole, D.J., Gillis, C.R., McCallum, I.R., McLnnes, G.T., Mackinnon, P.L., Meredith, P.A., Murray, L.S., Red, J.L., Robertson, J.W.K., 1998. Do inhibitors of angiotensin-I-converting enzyme protect against risk of cancer? *The Lancet* 352, 179-184.

Lourenção, B.C., Marcolino-Junior, L.H., Fatibello-Filho, O., 2008. Determinação conotométrica de captopril em formulações farmacêuticas utilizando sulfato de cobre (II) como titulante. *Quím Nova* 31, 349-352.

Martins, W.A., Souza, B.V., Rocha, L.F.C., Villacorta-Junior, H., 2011. Cardiomiopatia por doxorubicina em pacientes com câncer de mama – A propósito de dois casos. *Rev Bras Cardiol* 24, 196-198.

Mansour, M.A., El-Kashef, H.A., Al-Shabanah, O.A., 1999. Effect of captopril on doxorubicin-induced nephrotoxicity in normal rats. *Pharmacol Res* 39, 233-237.

- Morka, D., Mokry, J., Tonhajzerova, I., 2013. Anti-inflammatory treatment of meconium aspiration syndrome: Benefits and risks. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 187, 52-57.
- Orsolin, P.C., Silva-Oliveira, R.G., Nepomuceno, J.C., 2012. Assessment of the mutagenic, recombinogenic and carcinogenic potential of orlistat in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Food Chem. Toxicol.* 50, 2598–2604.
- Oshima-Franco, Y. and Franco, L.M., 2003. Biotransformação: importância e toxicidade. *Saúde Ver.* 5, 69-76.
- Paula, W.X., Sinisterra, R.D., Santos, R.A.S., Beraldo, H., 2005. Cadernos Temáticos QNEsc: Química Inorgânica e Medicina: A química inorgânica no planejamento de fármacos usados no controle da hipertensão. *SBQ* 6, 19-23.
- Perón, J.M.R.; Gutierrez, J. R.V.; Cabrera, E.B. A.; Moreno, U. L., Mora, R.S., 2002. Presente y futuro de los antioxidantes en el tratamiento de la hipertensión arterial esencial. *Rev Cub Med Mil*, 31 (4).
- Rang, H.P., Dale, M.M., Ritter, J.M., Hower, R.J., 2007. *Farmacologia*. 6th edition. Rio de Janeiro: Elsevier 830 p.
- Rezende, A.A.A., Silva, M.L.A., Tavares, D.C., Cunha, W.R., Rezende, K.C.S., Bastos, J.K., Lehmann, M., de Andrade, H.H.R., Guterres, Z.R., Silva, L.P., Spanó, M.A., 2011. The effect of the dibenzylbutyrolactolic lignan (–)-cubebin on doxorubicin mutagenicity and recombinogenicity in wing somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Food Chem. Toxicol.* 49, 1235–1241.
- Rezende, A.A.A., Munari, C.C., Oliveira, P.F., Ferreira, N.H., Tavares, D.C., Silva, M.L.A., Rezende, K.C.S., Spanó, M.A., 2013. A comparative study of the modulatory effects of (–)-cubebin on the mutagenicity/recombinogenicity induced by different chemical agents. *Food Chem. Toxicol.* 55, 645-652.
- Ribeiro, J.M. and Florêncio, L.P., 2000. Bloqueio farmacológico do sistema renina-angiotensina-aldosterona: inibição da enzima de conversão e antagonista do receptor AT1. *Ver. Bras. Hipert.* 3, 293-302.
- Ribeiro, I.P. and Gaivão, I., 2010. Efeito genotóxico do etanol em neuroblastos de *Drosophila melanogaster*. *Rev. Port. Saúde Pública* 28, 199-204.
- Rooprai, H.K., Kandaneeratchi, A., Maidment, S.L., Christidou, M., Trillo-Pazos, G., Dexter, D.T., Rucklidge, G.J., Pilkington, G.J., 2001. Evaluation of the effects of swainsonine, captopril, tangeretin and nobiletin on the biological behaviour of brain tumour cells in vitro. *Neuropat. Appl. Neurob.* 27, 29-39.
- Sacco, G., Bigioni, M., Lopez, G., Evangelista, S., Manzini, S., Maggi, C.A., 2009. ACE inhibition and protection from doxorubicin-induced cardiotoxicity in the rat. *Vascul. Pharmacol.* 50, 166-70.
- Salzet, M., Deloffre, L., Breton, C., Vieau, D., Schoofs, L., 2001. The angiotensin system elements in invertebrates. *Brain Res. Ver.* 36, 35-45.
- Savioli-Neto, F., 2007. Efeitos de diferentes doses de um inibidor da ECA nas concentrações plasmáticas do peptídeo natruiurético B, em idosos com insuficiência

cardíaca. Tese (Doutorado em Cardiologia). Universidade de São Paulo. Pós-graduação em Cardio-Pneumologia. São Paulo.

Sharma, S., Lakshmi, K.S., Chitra, I., Laksmi, A., Pharm, M., 2011. Anticarcinogenic Activity of Allylmercapto-captopril Against Aflatoxin-B1 Induced Liver Carcinoma in Rats. Eur. J. Gen. Med. 8, 46-52.

Shi, Y., Moon, Y.S., Dawood, B., McManus, B., Liu, PP., 2011. Mechanisms and management of doxorubicin cardiotoxicity. Herz 36, 296-305.

Singh, A. and Bangalore, S., 2012. Which, if any, antihypertensive agents cause cancer? Curr. Opin. Cardiol. 27, 374-380.

Siviter, R.J., Taylor, C.A.M., Cottam, D.M., Denton, A., Dani, M.P., Milner, M.J., Shirras, A.D., Isaac, R.E., 2002. Ance a *Drosophila* angiotensin-converting enzyme homologue, is expressed in imaginal cells during metamorphosis and is regulated by the steroid, 20-hydroxyecdysone. Biochem. J. 367, 187-193.

Stramer, B., Wood, W., Galko, M.J., Redd, M.J., Jacinto, A., Parkhurst, S.M. and Martin, P., 2005. Live imaging of wound inflammation in *Drosophila* embryos reveals key roles for small GTPases during in vivo cell migration. The Journal of Cell Biology 168, 567-573.

Taylor, C.A.M., Coats, D., Shirras, A.D., 1996. The *Acer* gene of *Drosophila* codes for an angiotensin-converting enzyme homologue. Gene 181, 191-197.

Turner, A. and Hooper, N.M., 2002. The angiotensin-converting enzyme gene family: genomics and pharmacology. Trends Pharmacol. Sci. 23, 177-183.

Volpert, O.V., Ward, W.F., Lingen, M.W., Chesler, L., Solt, D.B., Johnson, M.D., Molteni, A., Polverini, P.J., Bouck, N.P., 1996. Captopril Inhibits Angiogenesis and Slows the Growth of Experimental Tumors in Rats. J Clin Invest 98, 671-679.

Ward, W.F., Molteni, A., Ts'ao, C., Hinz, J.M., 1993. Captopril as a cancer chemopreventive agent. United States Patent US 5192524.

Yasumaru, M., Tsuji, S., Tsujii, M., Irie, T., Komori, M., Kimura, A., Nishida, T., Kakiuchi, Y., Kawai, N., Murata, H., Horimoto, M., Sasaki, Y., Hayashi, N., Kawano, S., Hori, M., 2003. Inhibition of angiotensin II activity enhanced the antitumor effect of cyclooxygenase-2 inhibitors via insulin-like growth factor I receptor pathway. Cancer Res 63, 6726-6734.

Yoon, C., Yang, H., Jeon, I., Chang, Y., Park, S.M., 2011. Use of angiotensin-converting-enzyme inhibitors or angiotensin-receptor blockers and cancer risk: a meta-analysis of observational studies. CMAJ 183, 1073-1084.

Yoshiji, H.; Kuriyama, S., Kawata, M.; Yoshii, J.; Ikenaka, Y.; Noguchi, R.; Nakatani, T.; Tsujinoue, H.; Fukui, H., 2001. The angiotensin-I-converting enzyme inhibitor perindopril suppresses tumor growth and angiogenesis: possible role of the vascular endothelial growth factor. Clin Cancer Res, 7, 1073-1078.

Xiang-jian, C., Shu, L., Zhang, J., Ma, W., 2001. A comparative study on the therapeutic effect of Astragaloside () and Perindopril in treating CVB-infected cardiomyocytes in rats and Perindopril in treating CVB- infected cardiomyocytes in rats. Chin. J. Integr. Trad. West. Med. 7, 39-42.

Zagariya, A., Navale, S., Uhal, B., Zagariya, O., Vidyasagar, D., 2011. Angiotensin receptor type I blockade inhibits apoptosis in Meconium-Instilled rabbit lungs. J. Can. Ther. 2, 629-637.

Table 1: Summary of results obtained in the marked trans-heterozygous descendants (MH) of *Drosophila melanogaster* derived from the standard cross (ST) and high bioactivation cross (HB) treated with different concentrations of the captopril (separately and in combination with DXR), positive control (DXR125 µg/mL) and negative control (water).

Treatments		N ^o . of flies (<i>N</i>)	Spots per fly (n ^o . of spots) statiscal diagnosis ^a							Spots with		Mean clone size class ^{c,d} (<i>i</i>)	Frequency of formation / 10 ⁵ cells per cells division ^d	
DXR (μg/mL)	Captopril (μg/mL)		Small single (1-2 céls) ^b		Large single (>2 céls) ^b		Twin		Total spots		<i>mwh</i> clone ^c (<i>n</i>)		Observed	
			(<i>m</i> = 2)		(<i>m</i> = 5)		(<i>m</i> = 5)		(<i>m</i> = 2)					
<i>mwh/flr³</i>														
<i>Cross ST</i>														
0	0	60	0.43 (26)		0.12 (7)		0.00 (0)		0.55 (33)		32	1.75		1.09
0	31.25	60	0.48 (29)	-	0.10 (6)	i	0.00 (0)	i	0.58 (35)	-	34	1.74 {1.50}		1.16 {0.07}
0	62.5	60	0.55 (33)	i	0.10 (6)	i	0.03 (2)	i	0.68 (41)	-	41	1.98 {2.78}		1.40 {0.31}
0	125	60	0.42 (25)	-	0.03 (2)	-	0.02 (1)	i	0.47 (28)	-	28	1.68 {2.25}		0.96 {-0.14}
0	250	60	0.58 (35)	i	0.12 (7)	i	0.02 (1)	i	0.72 (43)	-	43	1.81 {2.00}		1.47 {0.38}
0	500	60	0.43 (26)	-	0.03 (2)	-	0.02 (1)	i	0.48 (29)	-	29	1.72 {2.00}		0.99 {-0.10}
125	0	60	0.98 (59)	+	1.73 (104)	+	1.03 (62)	+	3.75 (225)	+	216	3.63 {3.96}		7.38 {6.28}
125	31.25	60	1.17 (70)	-	1.73 (104)	-	1.47 (88)	f+	4.37 (262)	-	318	4.13 {4.40}		10.86 {9.77}
125	62.5	60	1.35 (81)	f+	1.75 (105)	-	1.22 (73)	-	4.32 (259)	-	248	3.48 {3.73}		8.47 {7.38}
125	125	60	1.07 (64)	-	1.72 (103)	-	1.48 (89)	f+	4.27 (256)	-	249	3.73 {4.03}		8.50 {7.41}
125	250	60	1.18 (71)	-	2.03 (122)	-	1.08 (65)	-	4.30 (258)	-	248	3.75 {4.04}		8.47 {7.38}
125	500	60	1.05 (63)	-	2.05 (123)	-	1.05 (63)	-	4.15 (249)	-	240	3.46 {3.73}		820 {7.10}
<i>Cross HB</i>														
0	0	60	1.17 (70)		0.23 (14)		0.02 (1)		1.42 (85)		85	1.95		2.90
0	31.25	60	1.12 (67)	-	0.23 (14)	i	0.02 (1)	i	1.37 (82)	-	81	1.85 {4.00}		2.77 {-0.14}
0	62.5	60	1.22 (73)	-	0.18 (11)	-	0.00 (0)	i	1.40 (84)	-	84	1.77 {17.00}		2.87 {-0.03}
0	125	60	1.23 (74)	-	0.12 (7)	-	0.02 (1)	i	1.37 (82)	-	81	1.58 {9.50}		2.77 {-0.14}
0	250	60	1.48 (89)	-	0.15 (9)	-	0.02 (1)	i	1.65 (99)	-	98	1.55 {-1.08}		3.35 {0.44}
0	500	60	1.23 (74)	-	0.10 (6)	-	0.02 (1)	i	1.35 (81)	-	81	1.57 {9.75}		2.77 {-0.14}
125	0	60	1.50 (90)	-	1.28 (77)	+	0.28 (17)	+	3.07 (184)	+	179	2.92 {3.80}		6.11 {3.21}
125	31.25	60	1.85 (111)	-	1.03 (62)	-	0.25 (15)	i	3.13 (188)	-	184	2.61 {3.17}		6.28 {3.38}
125	62.5	60	1.90 (114)	-	1.18 (71)	-	0.18 (11)	i	3.27 (196)	-	195	2.55 {3.02}		6.66 {3.76}
125	125	60	1.38 (83)	-	0.97 (58)	-	0.33 (20)	i	2.68 (161)	-	159	3.01 {4.22}		5.43 {2.53}
125	250	60	1.68 (101)	-	0.33 (20)	-	3.60 (216)	i	5.62 (337)	-	210	3.34 {4.28}		7.17 {4.27}
125	500	60	1.73 (104)	-	1.22 (73)	-	0.23 (14)	i	3.18 (191)	-	189	2.91 {3.69}		6.45 {3.55}

Marker-trans-heterozygous flies (*mwh/fir³*) and balancer-heterozygous flies (*mwh/TM3*) were evaluated.

^a Statistical diagnoses according to Frei and Würzler (1988, 1995): +, positive; -, negative; i, inconclusive. m = multiplication factor for significantly negative results. Level of significance $P \leq 0.05$.

^b Including rare *fir³* single spots.

^c Considering *mwh* clones from *mwh* single and twin spots.

^d Frequency of clone formation: clones/fly/48,800 cells (without size correction) Frei et al. (1992).

Table 2: Summary of results obtained in the marked trans-heterozygous descendants (MH) and balancer-heterozygous (BH) of *Drosophila melanogaster* derived from the standard cross (ST) and high bioactivation cross (HB) treated with different concentrations of the perindopril, positive control (DXR125 µg/mL) and negative control (water).

Treatments		Nº. of flies (N)	Spots per fly (nº. of spots) statiscal diagnosis ^a						Spots with <i>mwh</i> clone ^c (n)	Mean clone size class ^{c,d} (i)	Frequency of formation / 10 ⁵ cells per cells division ^d	Recombination (%)
DXR (µg/mL)	Perindopril (µg/mL)		Small single (1-2 céls) ^b		Large single (>2 céls) ^b		Twin <i>m</i> = 5	Total spots <i>m</i> = 2			Observed	
			<i>m</i> = 2	<i>m</i> = 5	<i>m</i> = 5	<i>m</i> = 2						
<i>mwh/fir</i> ³												
Cross ST												
0	0	60	0.37 (22)		0.00 (0)		0.00 (0)		22	1.18	0.75	
125	0	60	0.48 (29)	i	1.95 (117)	+	0.80 (48)	+	184	4.42 {4.86}	6.28 {5.53}	
0	5	60	0.33 (20)	-	0.05 (3)	-	0.02 (1)	i	21	1.81 -{12.00}	0.72 -{0.03}	
0	10	60	0.30 (18)	-	0.02 (1)	i	0.00 (0)	i	19	1.79 -{2.67}	0.65 -{0.10}	
0	20	60	0.43 (26)	-	0.00 (0)	i	0.00 (0)	i	26	1.46 {3.00}	0.89 {0.14}	
0	40	60	0.25 (15)	-	0.05 (3)	i	0.02 (1)		19	1.95 -{3.67}	0.65 -{0.10}	
0	80	60	0.40 (24)	-	0.03 (2)	i	0.00 (0)	i	26	1.81 {5.25}	0.89 {0.14}	
Cross HB												
0	0	60	1.17 (70)		0.13 (8)		0.00 (0)		78	1.67	2.66	
125	0	60	1.45 (87)	-	3.22 (193)	+	0.42 (25)	+	299	3.91 {4.70}	10.21 {7.55}	85.99
0	5	60	1.73 (104)	f+	0.17 (10)	i	0.00 (0)	i	113	1.70 {1.77}	3.86 {1.20}	57.51
0	10	60	2.02 (121)	+	0.08 (5)	-	0.02 (1)	i	126	1.37 {0.90}	4.30 {1.64}	65.12
0	20	60	1.65 (99)	f+	0.20 (12)	i	0.00 (0)	i	108	1.60 {1.43}	3.69 {1.02}	68.56
0	40	60	2.02 (121)	+	0.10 (6)	i	0.05 (3)	i	128	1.47 {1.16}	4.37 {1.71}	64.07
0	80	60	1.70 (102)	f+	0.17 (10)	i	0.02 (1)	i	112	1.69 {1.74}	3.83 {1.16}	73.37
<i>mwh/TM3</i>												
Cross HB												
0	0	30	0.60 (18)		0.00 (0)		^e		18	1,28	1.23	
125	0	30	0.63 (19)	-	0.07 (2)	i			21	1,33 {1.67}	1.43 {0.20}	
0	5	30	0.80 (24)	i	0.00 (0)	i			24	1,13 {0.67}	1.64 {0.41}	
0	10	30	0.70 (21)	i	0.03 (1)	i			22	1,55 {2.75}	1.50 {0.27}	
0	20	30	0.57 (17)	-	0.00 (0)	i			17	1.12 {4.00}	1.16 -{0.07}	
0	40	30	0.77 (23)	i	0.00 (0)	i			23	1.22 {1.00}	1.57 {0.34}	
0	80	30	0.50 (15)	-	0.00 (0)	i			15	1.20 {1.67}	1.02 -{0.20}	

Marker-trans-heterozygous flies (*mwh/fir³*) and balancer-heterozygous flies (*mwh/TM3*) were evaluated.

^a Statistical diagnoses according to Frei and Würzler (1988, 1995): +, positive; -, negative; i, inconclusive. *m* = multiplication factor for significantly negative results. Level of significance *P* ≤ 0.05.

^b Including rare *fir³* single spots.

^c Considering *mwh* clones from *mwh* single and twin spots.

^d Frequency of clone formation: clones/flies/48,800 cells (without size correction) Frei et al. (1992).

^e Only *mwh* single spots can be observed in heterozygous individuals *mwh/TM3*, since the balancer chromosome TM3 does not contain the mutant gene *fir³*.

CAPÍTULO 3

Efeito modulador da losartana potássica contra a mutagenicidade e recombinogenicidade da doxorubicina em células somáticas de *Drosophila melanogaster*

Food Chemical Toxicology, v. 95, p. 211- 218, 2016.
(ANEXO)

Artigo de pesquisa

Efeito modulador da losartana potássica contra a mutagenicidade e recombinação da doxorubicina

R.G. Silva-Oliveira ^a, P. C. Orsolin ^a, J. C. Nepomuceno ^{† a,b}

^a *Universidade Federal de Uberlândia, Instituto de Genética e Bioquímica, Bloco 2E, Campus Umuarama, Uberlândia, Minas Gerais, Brasil*

^b *Centro Universitário de Patos de Minas, Laboratório de Citogenética e Mutagênese, Patos de Minas, Patos de Minas, Minas Gerais, Brasil*

[†] Falecido 01 de junho de 2016

E-mail: Rosiane Gomes Silva Oliveira, Universidade Feral de Uberlândia, Instituto de Genética e Bioquímica, Av. Pará 1720, Umuarama, Uberlândia, MG, 38400-902, Brasil.

E-mail: rosianegomes2003@yahoo.com.br. Tel, +55 34 38230169; E-mail: rosianegomes2003@yahoo.com.br (R.G. Silva-Oliveira)

Resumo

A losartana potássica é um medicamento anti-hipertensivo da classe de antagonistas do receptor de angiotensina II (ARA). Alguns estudos afirmam que além dos benefícios na regulação da pressão arterial, essa classe de fármacos possui propriedades anticâncer. Neste estudo objetivou-se avaliar o potencial genotóxico e antígenotóxico da losartana potássica por meio do ensaio SMART (Somatic Mutation and Recombination Test) em células somáticas de *Drosophila melanogaster*, bem como o possível efeito modulador desse fármaco, quando associado à doxorrubicina (DXR). As larvas de terceiro instar, descendentes dos cruzamentos padrão e de alta bioativação (ST e HB), foram tratadas cronicamente com diferentes concentrações de losartana potássica (0,25; 0,5; 1; 2; e 4 mM) isoladas ou associadas (co-tratamento) à doxorrubicina (DXR 0,125 mg/mL). Os resultados demonstraram ausência de efeito mutagênico da losartana potássica. No co-tratamento entre losartana e DXR os resultados demonstraram que a losartana é capaz de reduzir o número de manchas mutantes induzidas pela DXR, porém, sem alterar o efeito recombinogênico do quimioterápico. Ação antiproliferativa parecer ser o principal mecanismo envolvido na redução da frequência de manchas mutantes e consequente modulação da alteração induzida pela DXR.

Palavras - chave: Efeito modulador. *Drosophila melanogaster*. Losartana potássica. SMART.

1. INTRODUÇÃO

Os antagonistas dos receptores da angiotensina (ARA) são agentes anti-hipertensivos orais, cujo mecanismo de ação básico é a inibição da ligação da angiotensina II (Ang II) aos receptores de angiotensina do tipo AT₁, impedindo assim, a vasoconstrição das arteríolas (Paula et al., 2005).

O principal representante dessa classe de medicamentos é a Losartana potássica, um anti-hipertensivo sintético, não peptídico, derivado do imidazol. A losartana é administrada na sua forma ativa, porém, cerca de 14% da dose sofre biometabolização no fígado pelas enzimas de citocromo P450 (CYP2C9 e CYP3A4), que o converte no metabólito ativo ácido 5-carboxílico (EXP-3174), responsável pelo o efeito prolongado do fármaco. Também são formados outros metabólitos, no entanto, sem efeitos no receptor AT₁ (Bonfilio et al., 2010; Bruton et al., 2012).

Estudos *in vitro* e *in vivo*, confirmam que tanto losartana como seu metabólito EXP-3174, farmacologicamente ativo, bloqueiam todas as ações fisiológicas relevantes da Ang II, ligando-se seletivamente ao receptor AT₁, promovendo redução da pressão arterial sem elevar os níveis de bradicinina. Assim, a tosse não constitui um efeito colateral do tratamento com losartana potássica (Golan et al., 2009; Bonfilio et al., 2010).

Além do efeito anti-hipertensivo, a losartana tem demonstrado ser eficiente no tratamento da insuficiência renal, da nefropatia diabética, da insuficiência cardíaca congestiva e, ainda, do câncer (Faria et al., 2002; Carvalho et al., 2005; Sipahi et al., 2010). No que diz respeito ao câncer, Kim et al. (2014) afirmam que a losartana é capaz de melhorar a sobrevida de ratos com câncer de pâncreas ortotópico, pela inibição da síntese do fator de crescimento endotelial vascular e por suprimir a proliferação de células cancerosas, através de bloqueio do receptor AT₁. A losartana, também, é capaz de inibir proliferação celular em células de câncer de endométrio e, ainda, possui efeitos antitumorígenicos em sistema modelo de câncer de próstata e de ovários (Suganuma et al., 2005; Uemura et al., 2005; Choi et al., 2012).

Entretanto, os efeitos benéficos contra o câncer, atribuídos a losartana potássica, são controversos, pois, alguns autores afirmam que o uso dessa classe de medicamento está associado a um risco moderadamente aumentado de um novo diagnóstico de câncer (Sipahi et al., 2010; Huang et al., 2011).

Sendo assim, este trabalho teve por objetivo avaliar o efeito genotóxico e antigenotóxico da losartana potássica, por meio do teste de mutação e recombinação somática (SMART). O teste utiliza como organismo modelo a mosca da fruta, *Drosophila melanogaster*, um indivíduo eucarioto que possui maquinaria metabólica semelhante à encontrada em células de mamíferos (Rincón et al., 1998).

O SMART é um ensaio sensível para investigar propriedades mutagênicas e recombinogênicas de vários compostos e misturas. O teste permite verificar a perda da heterozigose de marcadores genéticos recessivos, que podem ser detectados pelo aparecimento de fenótipos diferentes nas asas das moscas (Graf et al., 1984; Graf and Würgler, 1996; Graf et al., 1998). Os diferentes tipos de fenótipos podem ser causados por um amplo espectro de eventos mutacionais que dão origem às manchas de pelos mutantes; tais como, deleções, mutações pontuais, certos tipos de aberrações cromossômicas, bem como recombinação mitótica e, possivelmente, a conversão gênica. Do mesmo modo, o SMART é eficiente na detecção de agentes com propriedades antimutagênicas e antirecombinogênicas (Frölich and Würgler, 1989; Graf and Schaik, 1992; Graf and Würgler, 1996).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Agentes químicos

Para avaliação do efeito genotóxico, este estudo utilizou um medicamento anti-hipertensivo da classe dos antagonistas de receptores de angiotensina, a losartana potássica 100mg (CAS 12750-99-8), Lote nº: 276152, Eurofarma Laboratório S. A., São Paulo, Brasil (Figura 1A).

Como controle positivo utilizou-se o cloridrato de doxorubicina, nome comercial Adriblastina® RD 50mg (CAS 25316-40-9), Lote nº: 3PL0341, Laboratórios Pfizer Ltda, São Paulo, Brasil (Figura 1B). Como controle negativo utilizou-se água osmose reversa. Utilizou-se, ainda, purê de batatas instantâneo (marca Yoki Alimentos S. A., São Paulo, Brasil) como um meio de cultura alternativo para *Drosophila*, que foi acrescido de 5 mL das diferentes concentrações do composto testado. O uso da DXR como controle positivo na presente pesquisa, bem como, a concentração utilizada foi baseada em estudos prévios (Orsolin et al., 2012, 2015; Machado et al., 2013).

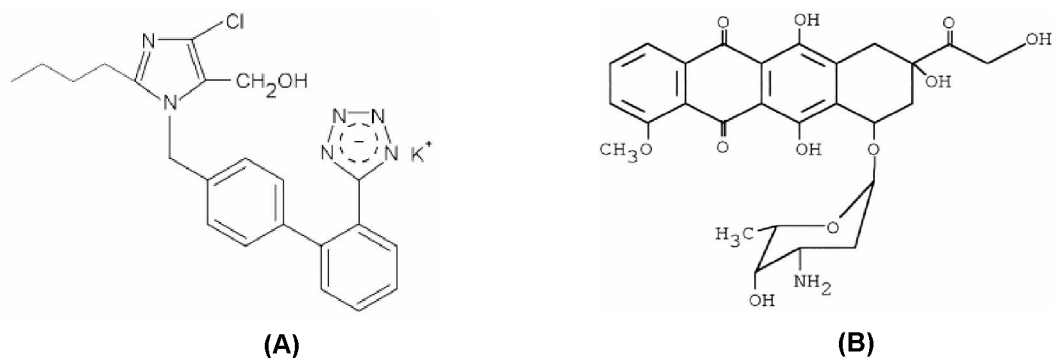


Figura 1: Estrutura química dos compostos utilizados no estudo. **(A)** Losartana potássica e **(B)** Doxorubicina. Fonte: Bonfilio et al. (2010); Patel et al. (1997).

2.2. Teste para detecção de mutação e recombinação em células somática de *Drosophila melanogaster* - SMART

2.2.1 Linhagens

No SMART são utilizadas três linhagens mutantes de *D. melanogaster*: *multiple wing hairs* (*mwh*), *flare*³ e *Oregon R flare*³. A linhagem *multiple wing hairs* (*mwh*), cujo marcador na condição de homozigose expressa três ou mais pelos dentro de uma única célula, ao contrário do gene selvagem que expressa um único pelo. A linhagem *flare*³ (*flr*³), cujo gene marcador altera a forma do pelo, desenvolvendo um pelo malformado, com aspecto de chama. Devido sua letalidade em homozigose, esta linhagem possui um balanceador cromossômico (*TM3, Bd*^s), que se caracteriza por múltiplas inversões (Graf et al., 1984). E a linhagem *Oregon R flare*³ (*ORR, flr*³) que possui constituição genética semelhante à linhagem *flr*³, porém, os cromossomos 1 e 2 são provenientes da linhagem *Oregon R* (resistente ao DDT), que se caracterizam pela alta expressividade de enzimas citocromo P450 (Frölich e Würigler, 1989).

As linhagens são mantidas em estoque em frascos de ¼ de litro contendo meio de cultura para *D. melanogaster* (820 mL de água, 25g de fermento biológico - *Saccharomyces cerevisiae*, 11g de ágar, 156g de banana e 1g de nipagin).

2.2.2. Cruzamentos

No SMART são realizados dois cruzamentos, o cruzamento padrão (ST-*Standard cross*) onde são cruzadas fêmeas virgens (*flr³ /In(3LR)TM3, ri p^p sep I(3)89Aa bx^{34e} and Bd^s*) com machos (*mwh/mwh*), os indivíduos provenientes deste cruzamento possuem níveis basais de enzimas citocromo P450. O segundo cruzamento é o de alta bioativação (HB - *High Bioactivation Cross*), onde são cruzadas fêmeas virgens (*ORR; flr³/In(3LR)TM3, ri p^p sep I(3)89Aa bx^{34e} and Bd^s*) com machos (*mwh/mwh*); a linhagem ORR; *flr³* possui um nível expressivo de enzimas de citocromo P450 que permite a maior biometabolização de compostos (Graf et al., 1989; Graf e Schaik, 1992).

A partir dos dois tipos de cruzamentos, padrão e de alta bioativação, nascem os descendentes: trans-heterozigotos marcados (MH) e heterozigotos balanceados (BH). Estes descendentes são fenotipicamente distintos com base no marcador *TM3, Bd^s*. Os MH (*mwh +/+ flr³*) apresentam os cromossomos estruturalmente normais e desenvolvem asas normais, com borda lisa. Já os BH (*mwh +/+ TM3, Bd^s*) apresentam um cromossomo balanceador (*TM3/Bd^s*) e as asas são malformadas, com aparência picotada, "serrilhada" (Graf et al., 1984; Rincón e Graf, 1995).

2.2.3. Tratamentos, preparação para análise microscópica

Após os cruzamentos, as moscas foram transferidas para frascos contendo meio de postura, uma base sólida de ágar (4% de ágar em água) e uma camada de fermento (*S. cerevisiae*) suplementado com açúcar. Os ovos foram coletados por um período de 8 horas. Após 72, +/- 4 horas, as larvas de terceiro instar foram lavadas com água osmose reversa e coletadas com auxílio de uma peneira de malha fina. Grupos de aproximadamente 200 larvas foram transferidas para tubos de vidro (2,5 cm de diâmetro e 8,0 cm de altura) contendo 1,5 g de meio de cultura para *Drosophila* (purê de batata) e 5,0 mL de diferentes concentrações de losartana potássica (0,25; 0,5; 1; 2 e 4 mM) isoladas ou em associação com DXR (0,125 mg/mL). Foram incluídos também um controle positivo usando DXR a 0,125 mg/mL e um controle negativo usando água osmose reversa. Todo experimento foi realizado em duplicata, sendo que, uma das séries foram utilizadas para avaliação da toxicidade do composto testado. Para tanto, grupos de 100 larvas foram tratadas

com cada concentração de losartana potássica, cujo o número de sobreviventes, por tratamento, forneceu um indicador da toxicidade do composto.

As moscas adultas emergentes desse tratamento foram coletadas e fixadas em etanol 70% para posterior montagem das lâminas.

Para montagem das lâminas, as asas das moscas foram destacadas e fixadas em lâminas histológicas com solução de Faure (30g de goma arábica, 20 mL de glicerol, 1,5g de hidrato de cloral e 50 mL de água destilada) e levadas para secar na placa aquecedora por 1 hora a uma temperatura média de 60° C.

A análise das asas foi realizada em microscópio óptico (objetiva 40x), registrando o número e os tipos de manchas encontradas (simples ou gêmeas), assim como o tamanho das mesmas, e a posição em que se encontram na asa.

2.2.4. Análise estatística

A análise estatística foi realizada conforme descrito por Frei e Würgler (1988), que resulta em quatro diagnósticos diferentes: positivo, fraco positivo, negativo ou inconclusivo. As manchas mutantes foram agrupadas em três categorias diferentes: manchas simples pequenas (1-2 células); manchas simples grandes (3 ou mais células) e manchas gêmeas.

As frequências de cada tipo de mancha e a frequência do total de manchas por mosca, para cada tratamento, foram comparadas aos pares (compostos isolados com controle negativo e composto associado à DXR com controle positivo) através do teste binomial condicional de acordo com Kastenbaum e Bowman (1970) e Frei e Würgler (1995), com níveis de significância de $p \leq 0,05$.

Todavia, resultados fracos positivos podem ocorrer, então para esse tipo de diagnóstico, em total de manchas, foi realizado o teste *U* não-paramétrico de Mann, Whitney e Wilcoxon (Frei e Würgler, 1995).

Conforme descrito por Abraham (1994), as percentagens de inibição da losartana potássica foram calculadas utilizando a frequência de clones por 10^5 células, corrigidas pelo controle, como se segue:

$$\text{Inibição} = \frac{[(DXR \text{ isolada} - \text{Losartana associada a DXR}) \times 100]}{DXR \text{ isolado}}$$

3. RESULTADOS

O presente estudo avaliou, por meio do teste SMART de asa de *D. melanogaster*, a genotoxicidade da losartana potássica utilizando os cruzamentos padrão e de alta bioativação. Todos os compostos foram testados em dois experimentos diferentes, e os resultados foram reunidos com a finalidade de análise estatística, após a verificação de que não havia nenhuma heterogeneidade nas amostras. Inicialmente foi realizado um teste piloto, com intuito de avaliar a toxicidade do fármaco a partir da taxa de sobrevivência dos indivíduos tratados com as diferentes concentrações do composto. As concentrações utilizadas no teste piloto foram estabelecidas com base no experimento de Momota et al. (2013), em que grupos de *Drosophila* foram tratadas com 1 mM de losartana. Assim, partindo da concentração de 1 mM foram estabelecidas duas concentrações superiores e duas inferiores (0,25; 0,5; 1; 2 e 4 mM).

Definidas as concentrações, estas foram submetidas ao teste de toxicidade, onde grupos de 100 larvas de 72h foram tratadas com diferentes concentrações de losartana potássica, isolada ou em associação com a doxorrubicina. Com base no número de indivíduos adultos emergentes deste tratamento foi possível construir a curva de sobrevivência (Figura 2), cujos resultados mostram que todas as concentrações testadas de losartana potássica, isoladas ou associadas à DXR, obtiveram percentual de sobrevivência superior a 80%.

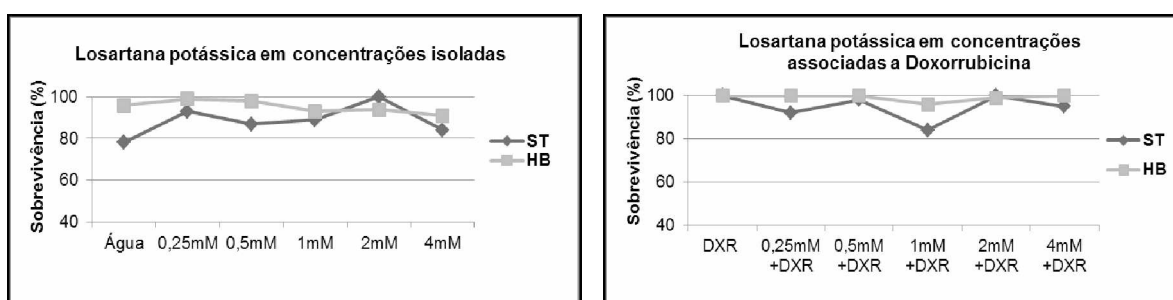


Figura 2: Taxa de sobrevivência de *D. melanogaster* em diferentes concentrações de losartana potássica isoladas ou em associação a doxorrubicina.

Diante da viabilidade das concentrações testadas, estas foram empregadas no ensaio SMART, cujos resultados estão apresentados na Tabela 1 e 2.

A Tabela 1 apresenta os resultados obtidos em indivíduos MH e BH, submentidos ao cruzamento padrão (ST). Nos indivíduos MH, os resultados mostram que a losartana potássica não possui efeito genotóxico, visto que, nenhuma das concentrações (0,25; 0,5; 1; 2 e 4 mM), testadas isoladamente, apresentaram aumentos estatisticamente significativos, para o total de manchas, quando comparados ao controle negativo ($p > 0,05$). Contudo, ao analisar os resultados das concentrações de losartana associadas ao quimioterápico DXR, é possível notar que nas concentrações de 1mM + DXR e 4mM + DXR houve uma redução, estatisticamente significativa, no total de manchas, quando comparados ao controle positivo ($p < 0,05$).

Com intuito de verificar se a redução no número de manchas mutantes observadas nos indivíduos MH foi de origem mutagênica ou recombinogênica, foram realizadas as análises dos indivíduos BH, pois esses indivíduos possuem múltiplas inversões no cromossomo balanceador *TM3/Bd^s* que inviabiliza o aparecimento de células com eventos de recombinação. Desse modo, a partir dos resultados dos indivíduos BH, presentes na Tabela 1, foi possível quantificar o potencial recombinogênico da DXR, cujo percentual foi de 65,97%. Ao associar losartana com DXR, o potencial recombinogênico manteve-se maior que o mutagênico, 78,07% na concentração de 1mM + DXR e 79,46% na concentração de 4mM + DXR. Com relação ao percentual de inibição de manchas mutantes, observou-se que a concentração de 1mM + DXR possui percentual de 41,04% a concentração de 4mM + DXR possui 43,54%. Apesar de ter havido uma redução de manchas mutantes, na associação DXR e losartana, é possível verificar um efeito sinérgico entre os dois compostos, aumentando a atividade recombinogênica desse quimioterápico. Esse resultado mostra que o principal mecanismo de ação do quimioterápico (DXR) não foi comprometido.

A Tabela 2 apresenta os resultados obtidos em indivíduos MH e BH, submentidos ao cruzamento de alta bioativação (HB). Nos indivíduos MH, os resultados mostram que a losartana potássica, ao sofrer biometabolização, não apresentou efeito genotóxico, pois não houve aumentos estatisticamente significativos no número de total de manchas mutantes, quando comparado ao controle negativo ($p > 0,05$). Entretanto, ao comparar os resultados, obtidos nas concentrações associadas a DXR com o controle positivo, é possível observar que nas concentrações de 1mM + DXR e 4mM + DXR a losartana potássica foi capaz de

reduzir, significativamente, o número de manchas mutantes induzidas pela DXR ($p < 0,05$).

Diante de resultados positivos encontrados nos indivíduos MH do cruzamento HB, analisou-se os indivíduos BH para verificar se as reduções no número de manchas mutantes, encontradas nos indivíduos MH, foram de origem mutagênica ou recombinogênica. Desse modo, os resultados da Tabela 2 foram utilizados para quantificar o potencial recombinogênico da DXR e observou-se que, o percentual foi de 89,38%. Ao associar losartana com a DXR, nas duas concentrações em que houve ação moduladora sobre o efeito da DXR, 1 e 4 mM, os percentuais de recombinação foram de 88,74% e 90,60%, respectivamente. Com relação ao percentual de inibição de manchas mutantes, observou-se que na concentração de 1mM + DXR o percentual foi de 41,30% e na concentração de 4mM + DXR foi de 53,13%. Mais uma vez, estes resultados mostram que, embora tenha ocorrido inibição sobre o aparecimento de manchas mutantes, a losartana potássica não modifica o perfil recombinogênico da DXR.

4. DISCUSSÃO

Em *Drosophila melanogaster*, até o momento, não foi identificado homólogo do receptor AT₁ de angiotensina, no entanto, o sistema renina-angiotensina (SRA) tem sua existência comprovada em invertebrados (Salzet et al., 2001; Momota et al., 2013). Desse modo, assumindo a existência da via SRA em *Drosophila*, este estudo avaliou o efeito genotóxico e antigenotóxico da losartana potássica, por meio do teste para detecção de mutação e recombinação somática (SMART). Este teste faz uso de três linhagens mutantes (*mwh*, *flr*³, *ORR/flr*³) que permite a realização de dois cruzamentos, o ST e o HB.

O cruzamento ST possui níveis basais de enzimas citocromo P450, de tal modo que, os resultados encontrados nesses indivíduos manifestam-se a partir de uma baixa biometabolização do composto. Já os indivíduos do cruzamento HB possuem alta expressividade de enzimas citocromo P450, que faz com que estes indivíduos sejam capazes de metabolizar uma ampla variedade de substratos e isso permite que o sistema metabólico da *Drosophila* seja similar aos sistemas de

mamíferos, embora as atividades metabólicas não sejam tão elevadas como no fígado de mamífero (Frölich e Würigler, 1989).

Nesse contexto, a análise dos indivíduos descendentes de ambos cruzamentos, revelaram que a losartana potássica em concentrações isoladas, não possui efeito genotóxico, pois nenhuma das concentrações testadas apresentaram diferenças, estatisticamente significativas ($p > 0,05$), para total de manchas, quando comparadas ao controle negativo (água).

Todavia, a análise de indivíduos ST tratados com as diferentes concentrações de losartana potássica associadas ao quimioterápico DXR mostraram que as concentrações de 1mM + DXR e 4mM + DXR foram capazes de modular o efeito da DXR, a partir da redução no número de manchas mutantes, quando comparado ao controle positivo (DXR). Esta redução no número de manchas mutantes também pode ser observada nos indivíduos HB, nas mesmas concentrações que reduziram manchas mutantes nos indivíduos ST.

Entretanto, os mecanismos pelos quais a losartana potássica reduziu a frequência de manchas mutantes, induzidas pela DXR, não foram diretamente avaliados neste estudo, porém, há evidências de que a losartana potássica é capaz de alterar a permeabilidade das membranas celulares, possibilitando um maior acúmulo intracelular de DXR (Delou et al., 2014). Tal efeito levanta a hipótese de que esse seja um dos prováveis mecanismos pelos quais a associação entre doxorubicina e losartana potássica promoveu redução no número de manchas mutantes. De tal modo que, a losartana, ao permitir uma maior entrada de DXR para o espaço intracelular, poderia desencadear maior quantidade eventos apoptóticos, pois, um dos modos de ação da DXR baseia-se na formação de ligações interfilamentares com o DNA, o que leva ao bloqueio da síntese do DNA e RNA e diminuição da atividade da topoisomerase II, promovendo a ruptura dos filamentos da macromolécula (DNA), e consequente morte celular (Almeida et al., 2005).

Tambelline et al. (2012), utilizando linhagens de células da musculatura lisa (A7r5), derivadas de aorta de ratos, complementam que a losartana possui, também, efeitos antiproliferativos e que o fato de ser uma substância hidrofóbica, permite que penetre livremente nas membranas celulares, sugerindo que esta seja uma das vias, pelas quais, exerce tais efeitos. De acordo com Cakmak et al. (2015) um dos efeitos antiproliferativos da losartana potássica baseia-se na capacidade em inibir angiogênese, por meio da supressão do fator de crescimento endotelial

vascular (VEGF), tanto em células normais como em células tumorais, e ainda, pela ativação do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α). É possível que tais efeitos antiproliferativos, exercidos pela losartana, possam ter contribuído no efeito modulador encontrado em nosso experimento, visto que, homólogos dos receptores de VEGFs e TNF- α foram identificados em vários invertebrados, inclusive na *Drosophila* (Holmes e Zachary, 2005; Dubnau, 2014; Shklover et al., 2015).

Uma outra hipótese, que poderia justificar a redução no número de manchas mutantes, é ação dos metabólitos da losartana potássica. De acordo com Ramos e Casali (2012), os metabólitos da losartana são capazes de ativar as proteínas PPAR-gama (*Peroxisome proliferator-activated receptor*). PPARs são um grupo de receptores nucleares que funcionam como fatores de transcrição que regulam a expressão de muitos genes envolvidos no metabolismo de lipídios e carboidratos (Berger e Moller, 2002; Ribeiro, 2007). Os PPAR-gama desempenham um papel essencial na regulação da diferenciação celular e apoptose, tanto em humanos como em *Drosophila*. No entanto, estão relacionados a várias doenças crônicas, tais como diabetes, obesidade e até mesmo, o câncer. Desse modo, a ativação PPAR-gama pelos metabólitos da losartana, EXP-3174 e EXP-3179, podem promover a inibição da proliferação celular ou indução de apoptose (Ribeiro, 2007; Elrod e Sun, 2008; Tachibana et al., 2008; Rossi, 2009; Joardar et al., 2015) reduzindo, assim, o número de manchas mutantes.

De acordo com Brunton et al. (2012), o EXP-3179 pode, ainda, reduzir a suprarregulação do RNAm da ciclooxigenase-2 (COX-2) e a geração de prostaglandinas dependente da COX. De acordo com Mazhar et al. (2006), a isoenzima COX-2 é pró-inflamatória, sendo expressa apenas em respostas a certos estímulos, tais como mitógenos, citocinas e fator de crescimento. Nesse contexto, é possível que a COX-2 esteja intimamente relacionada na progressão e disseminação do câncer. Assim, a inibição da expressão da COX-2 pelo metabólito da losartana, pode contribuir com efeitos antiproliferativos do composto (Kummer et al., 2002; Schupp et al., 2006).

Os resultados do nosso estudo demonstraram, ainda, que a DXR é notoriamente, recombinogênica. Tal efeito, foi também comprovado em vários estudos anteriores que fizeram uso do SMART (Costa e Nepomuceno, 2006; Rezende et al., 2009, 2011; Orsolin et al., 2012, 2015). Partindo do efeito recombinogênico da DXR, os resultados mostraram que o co-tratamento entre

losartana potássica e DXR produziram maior percentual de manchas mutantes de origem recombinogênica, indicando um potencial sinérgico entre os dois compostos. Assim, a inibição de manchas mutantes verificadas neste estudo foram, especificativamente, mutagênicas sugerindo que a losartana potássica possui efeito modulador, porém não afeta a recombinogenicidade da DXR.

Em conclusão, o presente estudo mostrou que, nessas condições experimentais, a losartana potássica apresentou um efeito modulador sobre a genotoxicidade da DXR em células somáticas de *D. melanogaster*, reduzindo, eventos mutagênicos. Tal efeito modulador pode estar relacionado à capacidade da losartana em entrar na célula e alterar a permeabilidade da membrana e, ainda, na capacidade de ativação de mecanismos antiproliferativos. Novos estudos devem ser conduzidos para elucidar os reais mecanismos envolvidos na modulação, com intuito de agregar maior confiabilidade no uso deste fármaco por pacientes em quimioterapia com DXR.

5. REFERÊNCIAS

Abraham, S.K., 1994. Antigenotoxicity of coffee in the *Drosophila* assay for somatic mutation and recombination. **Mutagenesis** 9, 383-386.

Almeida, V.L., Leitão, A., Reina, L.C.B., Montanari, A., Donnici, C.L., 2005. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Quim. Nova** 28,118-129.

Berger, J. and Moller, D.E., 2002. The mechanisms of action of PPARs. **Annu. Rev. Med.** 53, 409-35.

Bonfilio, R., Favoretto, L.B., Pereira, G.R., Azevedo, R.C.P., Benjamim, M.A., 2010. Comparative study of analytical methods by direct and first-derivative UV spectrophotometry for evaluation of losartan potassium in capsules. **Braz. J. Pharm. Sci.** 46, 147-155.

Brunton, L.L., Chabner, B. A., Knollmann, B. C., 2012. **As bases farmacológicas da terapêutica de Goodman & Gilman**. 12. ed. Porto Alegre: AMGH, 2079 p.

Cakmak, B., Cavusoglu, T., Ates, U., Meral, A., Nacar, M.C., Erbas, O., 2015. Regression of experimental endometriotic implants in a rat model with the angiotensin II receptor blocker losartan. **J. Obstet. Gynaecol. Res.** 41, 489-495.

Carvalho, M.H.C., Colaço, A.L., Silva, L.B.B., Salgado, M.C.O., 2005. Aspectos farmacológicos dos inibidores da ECA e dos receptores de angiotensina II. **Rev. Bras. Hipertens.** 12, 97-102.

Choi, C.H., Park, Y.A., Choi, J.J., Song, T., Song, S.Y., Lee, Y.Y., Lee, J.W., Kim, T.J., Kim, B.G., Bae, D.S., 2012. Angiotensin II type I receptor and miR-155 in endometrial cancers: Synergistic antiproliferative effects of anti-miR-155 and losartan on endometrial cancer cells. **Gynecol. Oncol.** 126, 124-131.

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

Delou, J.M.A., Lopes, A.G., Capella, M.A.M., 2014. Effects of Angiotensin, vasopressin and aldosterone on proliferation of mcf-7 cells and their sensitivity to Doxorubicin. **Anticancer Res.** 34, 1843-8.

Dubnau, J., 2014. **Behavioral Genetics of the Fly (*Drosophila Melanogaster*)**. Cambridge: Cambridge University Press, 291 p.

Elrod, H.A and Sun, S.Y., 2008. PPARgamma and Apoptosis in Cancer. **PPAR Res.** 2008, 704.165.

Faria, A.N., Zanella, M.T., Khlman, O., Ribeiro, A.B., 2002. Tratamento de Diabetes e Hipertensão no Paciente Obeso. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.** 46, 137-142.

Flölich, A. and Würgler, F.E., 1989. New tester strains with improved bioactivation capacity for the *Drosophila* wing-spot test. **Mutat. Res.** 216, 179-187.

Frei, H. and Würgler, F.E., 1988. Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assay indicate a positive, negative, or inconclusive result. **Mutat. Res.** 203, 297-308.

Frei, H. and Würgler, F.E., 1995. Optimal experimental design and sample size for the evaluation of data from somatic mutation and recombination test (SMART) in *Drosophila*. **Mutat. Res.** 334, 247-258.

Golan, D. E., Tashjian Jr., A. H., Armstrong, E. J., Armstrong, A. W., 2009. **Princípios de Farmacologia: A Base Fisiopatológica da Farmacoterapia**. 2. ed. Rio De Janeiro: Guanabara Koogan, 871 p.

Graf, U., Würgler, F.E., Katz, A.J., Frei, H., Juon, H., Hall, C.B., Kale, P.G., 1984. Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. **Environ. Mutagen.** 6, 153-188.

Graf, U., Frei, H., Kägi, A., Katz, A.J., Würgler, F.E., 1989. Thirty compounds tested in the *Drosophila* wing spot test. **Mutat. Res.** 222, 359–373.

Graf, U. and Schaik, N., 1992. Improved high bioactivation cross for the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. **Mutat. Res.** 271, 59-67.

Graf, U. and Würgler, F.E., 1996. The somatic white-ivory eye spot test does not detect the same spectrum of genotoxic events as the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. **Environ. Mol. Mutagen.** 27, 219-226.

Graf, U., Abraham, S.K, Rincón, J.G., Würgler, F.E., 1998. Antigenotoxicity studies in *Drosophila melanogaster*. **Mutat. Res.**, 402, 203-209.

Holmes, D.I.R. and Zachary, I. , 2005. The vascular endothelial growth factor (VEGF) family: angiogenic factors in health and disease. **Genome Biol.** 6, 209.

Huang, C.C., Chan, W.L., Chen, Y.C., Chen, T.J., Lin, S.J., Chen, J.W., Leu, H.B., 2011. Angiotensin II Receptor Blockers and Risk of Cancer in Patients With Systemic Hypertension. **Am. J. Cardiol.** 107, 1028-1033.

Joardar, A., Menzl, J., Podolsky, T.C., Manzo, E., Estes, P.S., Ashford, S., Zarnescu, D.C., 2015. PPAR gamma activation is neuroprotective in a *Drosophila* model of ALS based on TDP-43. **Hum. Mol. Genet.** 24, 1741-1754.

Kastenbaum, M.A. and Bowman, K.O. , 1970. Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies. **Mutat. Res.** 9, 527-549.

Kim, S., Toyokawa, H., Yamao, J.; Sato, S., Yanagimoto, H., Yamamoto, T., Hirooka, S., Yamaki, S., Inoue, K., Matsui, Y., Kwon, A.H., 2014. Antitumor effect of angiotensin II type 1 receptor blocker losartan for orthotopic rat pancreatic adenocarcinoma. **Pancreas** 43, 886-890.

Kummer, C.L. and Coelho, T.C.R.B., 2002. Antiinflamatórios não esteróides inibidores da ciclooxigenase-2 (COX-2): Aspectos atuais. **Rev. Bras. Anestesiol.** 52, 498-512.

Machado, N.M, Lopes, J.C., Saturnino, R.S, Fagan, E.B., Nepomuceno, J.C., 2013. Lack of mutagenic effect by multi-walled functionalized carbon nanotubes in the somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Food Chem. Toxicol.** 62, 355-360.

Mazhar, D., Ang, R., Waxman, J., 2006. COX inhibitors and breast cancer. **Br. J. Cancer** 94, 346-350.

Momota, R., Narasaki, M., Komiyama, T., Naito, I., Ninomiya, Y., Ohtsuka, A., 2013. *Drosophila* type XV/XVIII collagen mutants manifest integrin mediated mitochondrial dysfunction, which is improved by cyclosporin A and losartan. **Int. J. Biochem. Cell Biol.** 45, 1003-1011.

Orsolin, P.C., Silva-Oliveira, R.G., Nepomuceno, J.C., 2012. Assessment of the mutagenic, recombinagenic and carcinogenic potential of orlistat in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Food Chem. Toxicol.** 50, 2598-2604.

Orsolin, P.C., Silva-Oliveira, R.G., Nepomuceno, J.C., 2015. Modulating effect of synthetic statins against damage induced by doxorubicin in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Food Chem. Toxicol.** 81, 111-119.

Patel, S., Sprung, A.U., Keller, B.A., Heaton, V.J., Fisher, A.M., 1997. Identification of Yeast DNA Topoisomerase II Mutants Resistant to the Antitumor Drug Doxorubicin: Implications for the Mechanisms of Doxorubicin Action and Cytotoxicity. **Mol. Pharmacol.** 52, 658-666.

Paula, W.X., Sinisterra, R.D., Santos, R.A.S., Beraldo, H., 2005. A química inorgânica no planejamento de fármacos usados no controle da hipertensão. **Cadernos Temáticos QNEsc** 6, 19-23.

Ramos, D. C. and Casali, A.C.G., 2012. Antagonistas dos receptores da angiotensina II: uma revisão de classe. **Rev. Sau. Desenv.** 1, 80-94.

Rezende, A.A.A., Graf, U., Guterres, Z.R., Kerr, W.E., Spanó, M.A., 2009. Protective effects of proanthocyanidins of grape (*Vitisvinifera* L.) seeds on DNA damage induced by Doxorubicin in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Food Chem. Toxicol.** 47, 1466-1472.

Rezende, A.A.A., Silva, M.L., Tavares, D.C., Cunha, W.R., Rezende, K.C, Bastos, J.K., Lehmann, M., Andrade, H.H., Guterres, Z.R., Silva, L.P., Spanó, M.A., 2011. The effect of the dibenzylbutyrolactoliclignan (-)-cubebin on doxorubicin mutagenicity and recombinogenicity in wing somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Food Chem. Toxicol.** 49, 1235-1241.

Ribeiro, A.B., 2007. Efeito dos bloqueadores dos receptores AT1 da angiotensina II (BRAs) decorrente das suas estruturas moleculares: relevância clínica no tratamento da hipertensão arterial? **Rev. Bras. Hipertens.** 14, 182-184.

Rincón, J.G., Espinosa, J., Graf, U., 1998. Analysis of the in vivo nitrosation capacity of the larvae used in the wing somatic mutation and recombination test of *Drosophila melanogaster*. **Mutat. Res.** 412, 69-81.

Rincón, J.G. and Graf, U., 1995. *Drosophila melanogaster* somatic mutation and recombination test as a biomonitor. In: Butterwoeth, FM, Corkum, LD, Guzmán-Rincón, J. Biomonitoring and biomarkers as indicators of environmental change. New York: **Plenum Press** p 169-181.

Rossi, G.P., 2009. Losartan Metabolite EXP-3179 An AT1-Receptor–Independent Treatment Strategy for Patients With the Metabolic Syndrome? **Hypertension** 54, 710-712.

Salzet, M., Deloffre, L., Breton, C., Vieau, D., Schoofs, L., 2001. The angiotensin system elements in invertebrates. **Brain. Res. Rev.** 36, 35-45.

Schupp, M., Lee, L.D., Geada, N., Umbreen, S., Schmidt, B., Unger, T., Kintscher., 2006. Regulation of Peroxisome Proliferator–Activated Receptor γ Activity by Losartan Metabolites. **Hypertension** 47, 586-589.

Shklover, J., Levy-Adam, F., Kurant, E., 2015. The role of *Drosophila* TNF Eiger in developmental and damage-induced neuronal apoptosis. **FEBS Lett.** 589, 871-879.

Sipahi, I., Debanne, S.M., Rowland, D.Y., Simon, D.I., Fang, J.C., 2010. Angiotensin-receptor blockade and risk of cancer: meta-analysis of randomised controlled trials. **Lancet. Oncol.** 11, 627-36.

Suganuma, T., Ino, K., Shibata, K., Kajiyama, H., nagasaka, T., Mizutani, S., Kikkawa, F., 2005. Functional Expression of the Angiotensin II Type1 Receptor in Human Ovarian Carcinoma Cells and Its Blockade Therapy Resulting in Suppression of Tumor Invasion, Angiogenesis, and Peritoneal Dissemination. **Clin. Cancer Res.** 11, 2686-2694.

Tachibana, K., Yamasaki, D., Ishimoto, K., Doi, T., 2008. The Role of PPARs in Cancer. **PPAR Res.** 2008.

Tambelline, N., Oliveira, K., Olchanheski-Junior, L.R., Sordi, R., Otuki, M.F., Favero, G.M., Fernandes, D., 2012. The effect of losartan on angiotensin II-induced cell proliferation in a rat aorta smooth muscle cell line. **Braz. Arch. Biol. Technol.** 55, 263-268.

Uemura, H., Nakaigawa, N., Ishiguro, H., Kubota, Y., 2005. Antiproliferative efficacy of angiotensin II receptor blockers in prostate cancer. **Curr. Cancer Drug Targets** 5, 307-23.

Tabela 1: Resultados obtidos nos descendentes trans-heterozigotos marcadas (MH) e nos heterozigotos balanceados (BH) de *Drosophila melanogaster* derivados do cruzamento padrão (ST), tratados com diferentes concentrações de losartana potássica (isolados ou em associação com DXR), controle positivo (DXR 0,125 mg / mL) e controle negativo (água).

Tratamentos		Nº. de Indiv. (N)	Manchas por indivíduo (nº. de manchas) diag. estatístico ^a								Média das classes de tam. clones mwh ^{c,d} (î)	Frequência de formação de clone / 10 ⁵ células por divisão célular ^e Observado		Recomb. (%)	Inibição ^g (%)
Losartana potássica (mM)	DXR (mg/mL)		MSP (1-2 céls) ^b m = 2	MSG (>2 céls) ^b m = 5			MG m = 5			TM m = 2		Total manchas mwh ^c (n)			
<i>mwh/flr³</i>															
0	0	60	0,30 (18)		0,07 (4)		0,03 (2)		0,40 (24)		24	2,13	0,82		
0,25	0	60	0,42 (25)	i	0,02 (1)	-	0,03 (2)	i	0,47 (28)	-	27	1,59 -{2,67}	0,92 {0,10}		
0,5	0	60	0,43 (26)	i	0,00 (0)	-	0,00 (0)	i	0,43 (26)	-	26	1,38 -{7,50}	0,89 {0,07}		
1,0	0	60	0,43 (26)	i	0,05 (3)	i	0,00 (0)	i	0,48 (29)	-	29	1,66 -{0,60}	0,99 {0,17}		
2,0	0	60	0,37 (22)	i	0,00 (0)	-	0,00 (0)	i	0,37 (22)	-	22	1,27 {11,50}	0,75 -{0,07}		
4,0	0	60	0,37 (22)	i	0,05 (3)	i	0,00 (0)	i	0,42 (25)	-	22	1,41 {10,00}	0,75 -{0,07}		
0	0,125	60	0,50 (30)	i	1,38 (83)	+	0,92 (55)	+	2,80 (168)	+	153	4,36 {4,78}	5,23 {4,41}	65,97	
0,25	0,125	60	0,37 (22)	i	1,48 (89)	-	1,43 (86)	+	3,28 (197)	-	186	4,23 {4,54}	6,35 {5,53}		
0,5	0,125	60	0,57 (34)	-	1,17 (70)	-	1,00 (60)	-	2,73 (164)	-	155	4,17 {4,54}	5,29 {4,47}		
1,0	0,125	60	0,42 (25)	-	0,63 (38)	+	0,68 (41)	-	1,73 (104)	+	100	3,95 {4,53}	3,42 {2,60}	78,07	41,04
2,0	0,125	60	0,43 (26)	-	1,50 (90)	-	1,12 (67)	-	3,05 (183)	-	173	4,62 {5,02}	5,91 {5,09}		
4,0	0,125	60	0,52 (31)	-	0,77 (46)	+	0,48 (29)	+	1,77 (106)	+	97	3,88 {4,45}	3,31 {2,49}	79,46	43,54
<i>mwh/TM3</i>															
0	0	30	0,47 (14)		0,00 (0)		^f		0,47 (14)		14	1,14	0,96		
0	0,125	30	0,47 (14)	i	0,40 (12)	+			0,87 (26)	+	26	2,88 {4,92}	1,78 {0,82}		
1,0	0,125	30	0,33 (10)	i	0,03 (1)	+			0,37 (11)	+	11	1,27 {0,67}	0,75 -{0,20}		
4,0	0,125	30	0,27 (8)	i	0,07 (2)	+			0,33 (10)	+	10	1,80 -{0,50}	0,68 -{0,27}		

Foram avaliados descendentes trans- heterozigotos marcados (*mwh/flr³*) e heterozigotos balanceados (*mwh/TM3*).

^aDiagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würzler (1988): +, positivo; -, negativo; i, inconclusivo. *m*, fator de multiplicação para a avaliação de resultados significativamente negativos. Níveis de significância $p \leq 0,05$.

^bIncluindo manchas simples *flr³* raras.

^cConsiderando os clones *mwh* para as manchas simples *mwh* e para as manchas gêmeas.

^dNúmeros entre chaves são as frequências de indução corrigidas em relação a incidência espontânea estimada do controle negativo.

^eFrequência de formação de clone: número de clones / número de moscas / 48.800 células (sem correção tamanho), calculado de acordo com Frei et al. (1992).

^fApenas manchas simples *mwh* podem ser observadas nos indivíduos heterozigotos *mwh/TM3*, já que o cromossomo balanceador *TM3* não contém o gene mutante *flr³*.

^g Calculado pela fórmula: [(DXR isolada – losartana associado a DXR)x100] / DXR isolado, de acordo com Abraham (1994).

Tabela 2: Resultados obtidos nos descendentes trans-heterozigotos marcadas (MH) e nos heterozigotos balanceados (BH) de *Drosophila melanogaster* derivados do cruzamento de alta bioativação (HB), tratados com diferentes concentrações de losartana potássica (isolados ou em associação com DXR), controle positivo (DXR 0,125 mg / mL) e controle negativo (água).

Tratamentos		Nº. de Indiv. (N)	Manchas por indivíduo (nº. de manchas) diag. estatístico ^a								Média das classes de tam. clones mwh ^{c,d} (i)	Frequência de formação de clone / 10 ⁵ células por divisão celular ^e	Recomb. (%)	Inibição ^g (%)	
Losartana potássica (mM)	DXR (mg/mL)		MSP	MSG		MG		TM		Total manchas mwh ^c (n)		Observado			
			(1-2 céls) ^b m = 2	(>2 céls) ^b m = 5		m = 5		m = 2							
mwh/flr ³															
0	0	60	1,12 (67)		0,13 (8)		0,02 (1)		1,27 (76)		76	1,74	2,60		
0,25	0	60	1,33 (80)	-	0,15 (9)	i	0,03 (2)	i	1,52 (91)	-	91	1,77 {1,93}	3,11 {0,51}		
0,5	0	60	1,18 (71)	-	0,08 (5)	-	0,02 (1)	i	1,28 (77)	-	77	1,65 {5,00}	2,63 {0,03}		
1,0	0	60	1,25 (75)	-	0,10 (6)	i	0,02 (1)	i	1,37 (82)	-	82	1,61 {0,00}	2,80 {0,20}		
2,0	0	60	1,57 (94)	+	0,10 (6)	i	0,00 (0)	i	1,67 (100)	-	99	1,51 {0,74}	3,38 {0,79}		
4,0	0	60	1,45 (87)	-	0,20 (12)	i	0,02 (1)	i	1,67 (100)	-	99	1,73 {1,70}	3,38 {0,79}		
0	0,125	60	3,55 (213)	+	9,62 (577)	+	1,73 (104)	+	14,90 (894)	+	885	3,93 {4,14}	30,23 {27,63}	89,38	
0,25	0,125	60	5,45 (327)	f+	6,80 (408)	f+	2,38 (143)	f+	14,63 (878)	-	865	3,11 {3,24}	29,54 {26,95}		
0,5	0,125	60	2,50 (150)	f+	10,68 (641)	f+	2,33 (140)	f+	15,52 (931)	-	918	4,00 {4,21}	31,35 {28,76}		
1,0	0,125	60	2,47 (148)	f+	5,53 (332)	f+	1,25 (75)	f+	9,25 (555)	+	551	3,55 {3,84}	18,82 {16,22}	88,74	41,30
2,0	0,125	60	3,10 (186)	-	8,98 (539)	-	1,75 (105)	-	13,83 (830)	-	817	3,93 {4,16}	27,90 {25,31}		
4,0	0,125	60	3,05 (183)	-	3,43 (206)	+	0,85 (51)	+	7,33 (440)	+	431	2,94 {3,20}	14,72 {12,12}	90,69	56,13
mwh/TM3															
0	0	30	0,60 (18)		0,03 (1)		f		0,63 (19)		19	1,42	1,30		
0	0,125	30	1,30 (39)	+	0,27 (8)	+			1,57 (47)	+	47	1,77 {2,00}	3,21 {1,91}		
1,0	0,125	30	0,90 (27)	i	0,13 (4)	i			1,03 (31)	+	31	1,58 {1,83}	2,12 {2,12}		
4,0	0,125	30	0,63 (19)	+	0,03 (1)	+			0,67 (20)	+	20	1,45 {2,00}	1,37 {0,07}		

Foram avaliados descendentes trans- heterozigotos marcados (*mwh/flr³*) e heterozigotos balanceados (*mwh/TM3*).

^aDiagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würzler (1988): +, positivo; -, negativo; i, inconclusivo. m, fator de multiplicação para a avaliação de resultados significativamente negativos. Níveis de significância p ≤ 0,05.

^bIncluindo manchas simples *flr³* raras.

^cConsiderando os clones mwh para as manchas simples mwh e para as manchas gêmeas.

^dNúmeros entre chaves são as frequências de indução corrigidas em relação a incidência espontânea estimada do controle negativo.

^eFrequência de formação de clone: número de clones / número de moscas / 48.800 células (sem correção tamanho), calculado de acordo com Frei et al. (1992).

^fApenas manchas simples *mwh* podem ser observadas nos indivíduos heterozigotos *mwh/TM3*, já que o cromossomo balanceador *TM3* não contém o gene mutante *flr³*.

^g Calculado pela fórmula: [(DXR isolada – losartana associado a DXR)x100] / DXR isolado, de acordo com Abraham (1994).



Modulating effect of losartan potassium on the mutagenicity and recombinogenicity of doxorubicin in somatic cells of *Drosophila melanogaster*



R.G. Silva-Oliveira ^{a, b, *}, P.C. Orsolin ^{a, b}, J.C. Nepomuceno ^{a, b, †}

^a Universidade Federal de Uberlândia, Institute of Genetics and Biochemistry, Bloco 2E, Campus Umuarama, Uberlândia, Minas Gerais, Brazil

^b Centro Universitário de Patos de Minas, Laboratory for Cytogenetics and Mutagenesis, Patos de Minas, Minas Gerais, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 23 February 2016

Received in revised form

29 June 2016

Accepted 4 July 2016

Available online 7 July 2016

Keywords:

Modulating effect

Drosophila melanogaster

Losartan potassium

SMART

ABSTRACT

Losartan potassium is an antihypertensive drug in the angiotensin II receptor antagonist (ARA) class. Some studies claim that, in addition to regulating blood pressure, this class of drug has anticancer properties. The objective of this study was to evaluate the genotoxic and antigenotoxic potential of losartan potassium using the SMART (Somatic Mutation and Recombination Test) assay on the somatic cells of *Drosophila melanogaster*, as well as the possible modulating effects of this drug, when associated with doxorubicin (DXR). Third instar larvae, descendants of standard and high bioactivation (ST and HB) crosses, were chronically treated with different concentrations of losartan potassium (0.25; 0.5; 1; 2; and 4 mM) alone or in association (co-treatment) with doxorubicin (DXR 0.125 mg/mL). The results showed an absence of a mutagenic effect of losartan potassium. In the co-treatment of losartan with DXR, the results showed that losartan is capable of reducing the number of mutant spots induced by DXR without altering the recombinogenic effect of the chemotherapeutic agent. Antiproliferative action appears to be the main mechanism involved in reducing the frequency of mutant spots and consequent modulation of alterations induced by DXR, although this parameter has not been directly assessed in this study.

© 2016 Published by Elsevier Ltd.

1. Introduction

Angiotensin receptor antagonists (ARA) are oral antihypertensive agents, whose basic mechanism of action inhibits the bonding of angiotensin II (Ang II) with type AT₁ angiotensin receptors, thus impeding arterial vasoconstriction (Ramos and Casali, 2012). The main representative of this class of drugs is losartan potassium, a synthetic, non-peptide antihypertensive derived from imidazole (Bonfilio et al., 2010). Losartan is metabolized *in vivo* in rats, monkeys and humans (Stearns et al., 1995), by cytochrome P450 (CYP2C9 and CYP3A4) enzymes, which convert it into the active metabolite carboxylic acid (EXP-3174), responsible for the pro-

Hamedani et al., 2009).

In vitro and *in vivo* studies confirm that both losartan and its pharmacologically active metabolite, EXP-3174, block all the relevant physiological actions of Ang II, selectively bonding itself to the AT₁ receptor, promoting a decrease in arterial pressure without raising levels of bradykinin, therefore cough is not a frequent side effect (Bonfilio et al., 2010).

In addition to its antihypertensive effect, losartan has shown to be effective in the treatment of diabetic nephropathy (Faria et al., 2002; Carvalho et al., 2005), renal insufficiency, congestive cardiac insufficiency, left ventricular hypertrophy, post-myocardial infarction (Carvalho et al., 2005) and even cancer (Chauhan et al.,