

Investigação da atividade mutagênica de dois agentes antibacterianos em células somáticas de Drosophila melanogaster

BIANCA REGINA RIBAS DE ABREU ¹

SIMONE THOMÉ ²

MAURICIO LEHMANN ³

RAFAEL RODRIGUES DIHL ⁴

RESUMO

O teste para detecção de mutação e recombinação somática (SMART) em *Drosophila melanogaster* foi empregado para avaliar o potencial genotóxico in vivo de duas fluoroquinolonas, Ciprofloxacina e Norfloxacina. Os dados obtidos indicaram que a Norfloxacina não induziu aumentos significativos nas frequências de clones mutantes quando comparado ao controle negativo (CN), indicando que este fármaco, não possui atividade genotóxica. Por outro lado, a Ciprofloxacina, nas duas maiores concentrações avaliadas, aumentou a frequência de manchas em relação ao CN, evidenciando o seu papel mutagênico.

Palavras-chave: genotoxicidade, fluoroquinolonas, SMART, recombinação homóloga, perda da heterozigose.

¹ Acadêmica do Curso de Ciências Biológicas/ULBRA – Bolsista PROBIC/FAPERGS

² Aluna do PPG Genética e Toxicologia Aplicada/ULBRA e Professora do Curso de Medicina Veterinária/ULBRA

³ Professor do Curso de Engenharia Ambiental/ULBRA e do PPG Genética e Toxicologia Aplicada/ULBRA

⁴ Professor-Orientador do Curso de Ciências Biológicas/ULBRA e do PPG Genética e Toxicologia Aplicada/ULBRA (rafael.rodrigues@ulbra.br)

ABSTRACT

The somatic mutation and recombination test (SMART) in *Drosophila melanogaster* was used to assess the in vivo genotoxic potential of two fluoroquinolones, Ciprofloxacin and Norfloxacin. The data obtained show that Norfloxacin did not induce significant increase in mutant clone frequencies, when compared to negative control (NC), revealing that the drug does not exert genotoxic activity. On the other hand, Ciprofloxacin increased spot frequencies in comparison to NC at all concentrations tested, underlining the mutagenic role it plays.

Key words: genotoxicity, fluoroquinolones, SMART, homologous recombination, loss of heterozygosity.

INTRODUÇÃO

Nos dias atuais, há uma constante preocupação com a exposição a diversos tipos de contaminantes que possam oferecer riscos à saúde da população e aos ecossistemas associados (DAUGHTON; TERNES, 1999). Dentre estes, os resíduos de fármacos presentes no ambiente têm sido pauta de muitas discussões na comunidade científica. Há uma grande preocupação principalmente com os antibióticos, em função de sua ampla utilização na Medicina Humana e Veterinária, exercendo um papel importante na ampliação e manutenção da resistência de patógenos (CAMPEAU et al., 1996).

Dentre as classes de agentes antimicrobianos com maior eficiência estão as quinolonas, sendo utilizadas no tratamento de uma variedade de infecções (BROWN, 2008). Na Medicina Veterinária as fluoroquinolonas são usadas em casos de enterite por *Escherichia coli* ou mastite aguda por *Staphylococcus aureus*, tanto em bovinos como em ovinos. Em caninos e felinos estes fármacos mostram-se efetivos no tratamento de infecções geniturinárias, dermatites cutâneas, infecções do trato respiratório e digestório (MANDELL; PETRI JR., 1996; BRO-

WN, 2008). Na medicina humana as quinolonas vêm sendo utilizadas para o tratamento de infecções respiratórias, osteomielite e dermatites bacterianas (BALL, 2000).

As quinolonas são fármacos antimicrobianos que tem como unidade básica o ácido nalidíxico (Figura 1). A estrutura no ácido nalidíxico é formada por uma base estrutural com o anel 4-quinolona, que possui um ácido carboxílico na posição C-3. Essa estrutura está diretamente relacionada com a sua atividade antimicrobiana (WOLFSON; HOOPER, 1985).

O aumento da resistência aos medicamentos antibacterianos tem desencadeado a procura por novos agentes com tais propriedades (FOROUMAI et al., 2003). Assim, foram sendo criados análogos de quinolonas com modificações estruturais, como a adição de uma molécula de flúor na posição C7, originando então as fluoroquinolonas (BALL, 2000). Dentre estas, a ciprofloxacina e a norfloxacina (Figura 2), objetos deste estudo, são classificadas como membros da segunda geração de quinolonas, comercializadas para humanos, com aplicação em animais (PAPICH; RIVIERE, 2001).

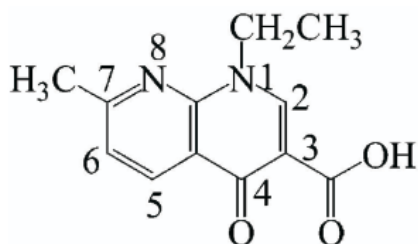


Figura 1. Estrutura Química do Ácido Nalidíxico (HU et al., 2007)

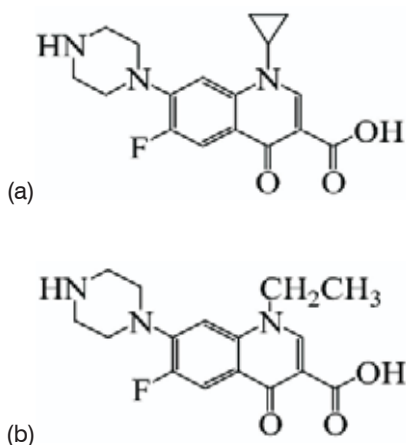


Figura 2. Estrutura Química da Ciprofloxacina (a) e da Norfloxacina (b) (HU et al., 2007)

As Fluoroquinolonas atuam sobre as DNAs topoisomerases tipo II procarióticas, que são: a DNA girase, que introduz superespirais negativas no DNA e a Topoisomerase IV que faz a separação das cadeias recém sintetizadas após a replicação (WANG, 1996). Nas bactérias Gram negativas, como *E. coli*, o principal alvo das fluoroquinolonas é a Girase e nas Gram positivas como *S. aureus*, a Topoisomerase IV (TAKEI et al., 2001).

A DNA Topoisomerase tipo II eucariótica atua na mitose, estando envolvida na condensação dos

cromossomos, na segregação das duplas hélices do DNA e na manutenção da cromatina. Atua também sobre o mecanismo de reparo por recombinação (LARSEN et al., 1988).

Em função da similaridade estrutural e funcional entre a topo II eucariótica com a girase e a topoisomerase IV bacteriana, as fluoroquinolonas podem ser capazes de inibir a ação da topo II de eucariotos através de uma reação cruzada, podendo então exercer um papel potencialmente genotóxico e carcinogênico (FORT et al., 1992; MUKHERJEE et al., 1993; ITOH et al., 2006).

Nesse sentido, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade genotóxica de duas fluoroquinolonas, através do Teste para Detecção de Mutação e Recombinação Somática (SMART) em *Drosophila melanogaster*.

MATERIAL E MÉTODOS

Agentes antibacterianos

No presente estudo, foram utilizados dois medicamentos antimicrobianos, Ciprofloxacina (Cipro200) adquirido da Bayer S. A., São Paulo, SP, Brasil e Norfloxacina (Norfloxacina) adquirido da União Química Farmacêutica Nacional S. A., São Paulo, SP, Brasil. Como controle positivo foi utilizado o Etilmetanosulfonato (EMS, CAS 62-50-0) obtido da Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA. As soluções de Ciprofloxacina foram preparadas utilizando água destilada e foram utilizadas as seguintes concentrações: 0,75, 1,5 3,0 e 6,0 mM. Para a Norfloxacina, o ácido acético a 1% foi utilizado como controle negativo e diluente, sendo testadas as seguintes concentrações: 2,5, 5,0, 10,0 e 20,0mM.

Teste para Detecção de Mutação e Recombinação Somática (SMART)

O teste SMART de asa possibilita a detecção simultânea de mutação gênica, aberrações cromossômicas – representadas por eventos aneugênicos e clastogênicos – e/ou recombinação somática (GRAF et al., 1984; WURGLER; VOGEL, 1986; VOGEL; ZIJLSTRA, 1987). Tais alterações são induzidas nas células dos discos imaginais que, após inúmeras divisões mitóticas, darão origem às asas dos adultos com seus pelos ou tricomas. A análise é realizada por meio da observação de grupos de células (clones mutantes) nas asas dos adultos que expressam fenotipicamente os genes marcadores *flr³* ou *mwh*, responsáveis pelas mudanças na forma dos pêlos. Estes fenótipos refletem a ocorrência de alterações genéticas originadas pela perda de heterozigose nas células larvais.

Cruzamentos e Tratamentos

Nesta abordagem experimental foi empregado o cruzamento padrão, que utiliza 2 linhagens de *Drosophila melanogaster*. Assim, fêmeas virgens *flr³* foram cruzadas com machos *mwh*, originando larvas portadoras de níveis basais de atividade metabólica dependente de citocromo P-450. Este cruzamento dá origem a larvas com duas constituições genotípicas, no que se refere aos genes marcadores localizados no cromossomo 3: Larvas *mwh +/+ flr³* - que são trans-heterozigotas para os marcadores recessivos *mwh* e *flr³* e larvas *mwh +/TM3,BdS* - heterozigotas para o cromossomo TM3, necessário para balancear o marcador *flr³*, já que este é letal em homozigose (GARCIA BELLIDO; DAPENA, 1974).

Os cruzamentos foram realizados utilizando 80 fêmeas para 40 machos, durante 3 dias, em vidros

contendo meio de cultura padrão. Após este período, os casais foram transferidos para vidros contendo meio de ovoposição, onde permaneceram por 8 h. Passado este tempo, os adultos foram descartados. Depois de 72 h do início do período de ovoposição, foram coletadas apenas as larvas de terceiro estágio por flotação em água corrente. Estas larvas foram, então, submetidas ao tratamento crônico com diferentes concentrações dos antibióticos por um período de 48 horas. Todos os adultos que nascerem 10-12 dias após a postura dos ovos foram conservados em etanol 70%. Posteriormente, foi realizada a montagem das asas dos indivíduos trans-heterozigotos em lâminas de vidro contendo 10 asas de fêmeas e 10 asas de machos que foram então analisados em microscópio óptico com aumento de 400 vezes.

Análise Estatística

Foi utilizado o teste binomial condicional de Kastembaum e Bowman (1970), seguindo o procedimento de decisões múltiplas de acordo com Frei e Würgler (1988). Com o objetivo de confirmar os resultados positivos e excluir *outliers* foi efetuado o teste U de Wilcoxon, Mann e Whitney (FREI; WURGLER, 1995).

RESULTADOS

A escolha das doses utilizadas neste estudo foi realizada em um ensaio piloto de toxicidade. Apenas as concentrações que permitiram a sobrevivência de no mínimo 70% dos indivíduos foram investigadas no teste SMART. A partir daí, foram realizados dois experimentos em triplicata para cada fluoroquinolona. Além disso, um total de 40 indivíduos foi avaliado por tratamento para cada um dos antibióticos.

As frequências de danos genéticos induzidos pela exposição crônica das larvas de terceiro estágio a Norfloxacin são representadas na Figura 3. Os resultados demonstraram que as concentrações avaliadas deste fármaco não induziram aumentos significativos nas frequências das diferentes classes de manchas analisadas, quando comparado ao seu respectivo controle negativo. Desta forma, a Norfloxacin, no SMART, não induziu danos no material genético.

Os resultados referentes a avaliação genotóxica da Ciprofloxacina são representados na Figura 4. Quando comparamos os diferentes tratamentos ao controle negativo, verificamos que nas duas maiores concentrações testadas – 3,0 e 6,0 mM - foram observados resultados positivos para o total de manchas, que representa a genotoxicidade total do agente testado. Portanto, a Ciprofloxacina pode exercer seu papel genotóxico em altas concentrações.

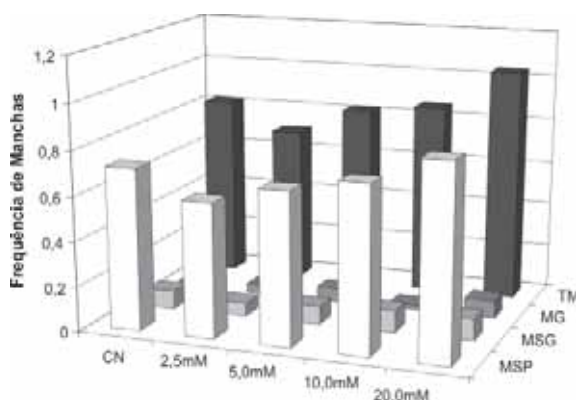


Figura 3. Frequência de indução de clones mutantes obtida no cruzamento padrão após exposição crônica das larvas de 3º estágio a diferentes concentrações de Norfloxacin. MSP: Manchas Simples Pequenas. MSG: Manchas Simples Grandes. MG: Manchas Gêmeas. TM: Total de Manchas. CN: Controle Negativo.

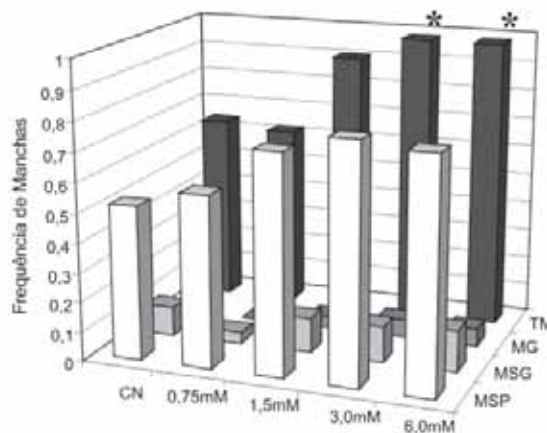


Figura 4. Frequência de indução de clones mutantes obtida no cruzamento padrão após exposição crônica das larvas de 3º estágio a diferentes concentrações de Ciprofloxacina. MSP: Manchas Simples Pequenas. MSG: Manchas Simples Grandes. MG: Manchas Gêmeas. TM: Total de Manchas. CN: Controle Negativo.

DISCUSSÃO

No presente trabalho foi investigada a ação genotóxica *in vivo* de dois agentes antibacterianos, utilizados na Medicina Humana e Veterinária, por meio do teste SMART em *Drosophila melanogaster*.

No que se refere aos resultados observados para a Norfloxacin, este agente não foi capaz de induzir aumentos significativos nas frequências de clones mutantes em nenhum dos tratamentos realizados. Portanto, não foram detectados danos relacionados a mutação gênica, cromossômica e recombinação somática, já que estes são os parâmetros genéticos detectados no SMART.

Hayasaki et al. (2006) demonstraram que a Norfloxacin, *in vitro*, induziu mutações gênicas em *Escherichia coli* na presença ou ausência da fração

de metabolização S9. Itoh et al. (2006) também demonstraram que a Norfloxacin pode exercer um papel potencialmente genotóxico promovendo quebras de fita simples de DNA e mutações cromossômicas em células WTK-1 humanas através dos testes cometa e CBMN, respectivamente.

Ao contrário do que ocorre com a DNA girase e a topoisomerase IV procariótica, altas concentrações de fluoroquinolonas são necessárias para inibir a Topo II de eucariotos (HEISIG, 2009). Assim, possivelmente as doses de Norfloxacin utilizadas no nosso ensaio *in vivo* não foram altas o suficiente para inibir a enzima eucariótica. Desta forma, quando não há processo inibitório, não podem ser observados eventos genotóxicos. Adicionalmente, Herbold et al. (2001) salientam que para algumas quinolonas, as concentrações necessária para inibir a topo II eucariótica podem ser obtidas *in vitro*, mas não *in vivo*.

Os resultados observados para a Ciprofloxacina no nosso sistema experimental apontaram para a ação genotóxica deste fármaco nas duas concentrações mais altas investigadas – 3,0 e 6,0mM. Em células V79 de hamster Chinês, a Ciprofloxacina aumentou significativamente os danos clastogênicos. Ela foi também capaz de aumentar as frequências de Micronúcleos em células WTK-1 e promover quebras de DNA nas mesmas células (ITOH et al., 2006). Com relação aos dados de genotoxicidade *in vivo*, a literatura aponta resultados conflitantes. Mukherjee et al. (1993) encontraram resultados positivos no teste de aberrações cromossômicas em medula óssea de camundongos. Entretanto, Herbold et al. (2001) utilizando o mesmo ensaio e condições semelhantes, demonstraram ausência de atividade genotóxica, mesmo quando altas concentrações foram utilizadas.

No nosso estudo *in vivo*, a ciprofloxacina foi genotóxica, entretanto, a toxicidade genética ob-

servada no teste SMART pode estar relacionada, preferencialmente, com eventos recombinogênicos, em função da alta sensibilidade do SMART na detecção deste evento genético. De fato, os demais trabalhos citados anteriormente, não avaliaram este parâmetro.

As fluoroquinolonas se ligam ao complexo DNA – topo II, impedindo o processo de fechamento das quebras duplas na molécula de DNA. Considerando que estas quebras contribuem de forma significativa para a ocorrência da recombinação homóloga, pode-se explicar a genotoxicidade observada para a Ciprofloxacina no presente estudo. Além disso, soma-se o fato de que a recombinação funciona como um mecanismo de reparo de DNA que pode resultar na perda da heterozigossidade de genes envolvidos na regulação do ciclo celular, o que pode desencadear o processo carcinogênico.

CONCLUSÃO

A constante presença de resíduos de fármacos no ambiente é preocupante. Esses resíduos podem causar danos tanto para a população quanto para os ecossistemas associados (HU et al., 2007). Assim, é de fundamental importância a utilização de ensaios com o objetivo de avaliar o perfil genotóxico associado a estes medicamentos.

Os dados obtidos a partir deste estudo indicam ausência de atividade genotóxica para a Norfloxacin e apontam para a ação mutagênica da Ciprofloxacina *in vivo*. Neste sentido, faz-se necessário avaliar o genótipo TM3, para que seja possível quantificar a real contribuição dos eventos recombinacionais para a genotoxicidade da Ciprofloxacina.

REFERÊNCIAS

- BALL, P. Quinolone generations: natural history or natural selection? **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 46, p. 17-24, 2000.
- BROWN, S. A. Fluoroquinolones in animal health. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v.19, p. 1-14, 2008.
- CAMPEAU, R. C.; GULLI, L. F.; GRAVES, J. F. Drug resistance in Detroit river gram-negative bacilli. **Microbios**, v. 88, p. 205-212, 1996.
- DAUGHTON, C. G.; TERNES, T.A. Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change. **Environmental Health Perspectives**, v. 107, p. 907-938, 1999.
- FOROUMAI, A. et al. Synthesis and *in vitro* antibacterial evaluation on N-[5-(5-nitro-2-thienyl)-1,3,4-thiadiazole-2-yl] piperazinil quinolonas. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 38, p. 851-854, 2003.
- FORT, F.L. Mutagenicity of quinolone antibacterials. **Drug Safety**, v. 7, p.214-222, 1992.
- FREI, H.; WÜRGLER, F. E. Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative, or inconclusive result. **Mutation Research**, v. 203, p. 297-308, 1988.
- _____. Optimal experimental design and sample size for the statistical evaluation of data from somatic mutation and recombination tests (SMART) in *Drosophila*. **Mutation Research**, v. 334, p. 247-258,1995.
- GARCIA-BELLIDO, B. A.; DAPENA, J. Induction, deletion and characterization of cell differentiation mutants in *Drosophila melanogaster*. **Molecular and General Genetics**, v. 128, p. 117-130, 1974.
- GRAF, U. et al. Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. **Environmental Mutagenesis**, v. 6, p. 153-188, 1984.
- HAYASAKI, Y. et al. Mutagenesis induced by 12 quinolone antibacterial agents in *Escherichia coli* WP2uvrA/pKM101. **Toxicology in Vitro**. v. 20, p. 342-346, 2006.
- HEISIG, P. Type II topoisomerases--inhibitors, repair mechanisms and mutations. **Mutagenesis**, v. 24, p. 465-469, 2009.
- HERBOLD, B. A. et al. Ciprofloxacin: in vivo genotoxicity studies. **Mutation Research**, v. 498, p. 193-205, 2001.
- HU, J. et al. Quantitative structure-activity relationship model for prediction of genotoxic potential for quinolone antibacterials. **Environmental Science & Technology**, v. 41, p. 4806-4812, 2007.
- ITOH, T. et al. Genotoxic potential of quinolone antimicrobials in the in vitro comet assay and micronucleus test. **Mutation Research**, v. 603, p.135-144, 2006.
- KASTEMBAUM, M. A.; BOWMAN, K. O. Tables to determining the statistical significance of mutation frequencies. *Mutation Research*, v. 9, p. 527-549, 1970.
- LARSEN, A. K. et al. DNA topoisomerases as repair enzymes: mechanism(s) of action and regulation by p53. **Acta Biochimica**, v. 45, p. 535-544, 1988.

MANDELL, G. L.; PETRI Jr., W. A. Fármacos Antimicrobianos: Sulfonamidas, trimetopina-sulfametoxazol, quinolonas e agentes para infecções das vias urinárias. In: HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E. (Eds.). **Goodman & Gilman: As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 9.ed. México: McGraw-Hill Interamericana, 1996.

MUKHERJEE, A.; SEN, S.; AGARWAL, K. Ciprofloxacin: mammalian DNA topoisomerase type II poison in vivo. **Mutation Research**, v. 301, p. 87-92, 1993.

PAPICH, M. G.; RIVIERE, J. E. Fluorquinolone Antimicrobial Drug. In: ADAMS, R. H. **Veterinary Pharmacology and Therapeutics**. 8.ed. Oxford: Wiley-Blackwell, 2001.

TAKEI, M. et al. Target preference of 15 quinolones against *Staphylococcus aureus* based on antibacterial activities and target inhibition.

Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 45, p. 3544-3547, 2001.

VOGEL, E. W.; ZIJLSTRA, J. A. Mechanistic and methodological aspects of chemically induced somatic mutation and recombination in *Drosophila melanogaster*. **Mutation Research**, v. 182, p. 243-264, 1987.

WANG, J. C. DNA Topoisomerases. **Annual Review of Biochemistry**, v. 65, p. 635-692, 1996.

WOLFSON, J. S.; HOOPER, D. C. The fluoroquinolones: structures, mechanisms of action and resistance, and spectra of activity in vitro. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 28, p. 581-586, 1985.

WÜRGLER, F. E.; VOGEL, E. W. In vivo mutagenicity testing using somatic cells of *Drosophila melanogaster*. In: SERRES, F. J. (Ed.). **Chemical Mutagens**. New York: Plenum Press, 1986. p. 1- 59.