



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

**Estudo da toxicidade genética de Efavirenz (EFV) e
Fumarato de Tenofovir Desoproxila (TDF) em células
somáticas de *Drosophila melanogaster***

Goiânia

2013

AROLDO VIEIRA DE MORAES FILHO

**Estudo da toxicidade genética de Efavirenz (EFV) e
Fumarato de Tenofovir Desoproxila (TDF) em células
somáticas de *Drosophila melanogaster***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia, da Universidade Federal de Goiás, como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Biologia. Área de concentração: Biologia Celular e Molecular.

Orientadora: Profa. Dra. Kênya Silva Cunha

Goiânia

2013

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

AROLDO VIEIRA DE MORAES FILHO

**Estudo da toxicidade genética de Efavirenz (EFV) e Fumarato de Tenofovir Desoproxila
(TDF) em células somáticas de *Drosophila melanogaster***

Dissertação DEFENDIDA em 06 de fevereiro de 2013, como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Biologia – área de concentração: Biologia Celular e Molecular, perante a Banca Examinadora constituída pelos membros:

.....
Profª. Dra. Heloisa Helena R. de Andrade
Membro Titular – HC/UFRGS

.....
Profª. Dra. Lee Chen Chen
Membro Titular – ICB/UFG

.....
Profª. Dra. Rosália Santos Amorim Jesuino
Membro Suplente – ICB/UFG

.....
Prof. Dr. Luiz Artur Mendes Bataus
Membro Suplente – ICB/UFG

.....
Profª. Dra. Kênya Silva Cunha
Orientadora/Presidente da banca – ICB/UFG

Avaliação: () Aprovado () Reprovado

Goiânia, Goiás

Brasil

Dedico esta dissertação à minha mãe, Leliane Viégas e à minha irmã, Ana Lara Viégas, por me darem força diariamente, acreditarem nos meus sonhos e depositarem confiança em mim. Amo vocês!

“Tudo o que um sonho precisa para ser realizado é alguém que acredite que ele possa ser realizado.”

(Roberto Shinyashiki)

AGRADECIMENTOS

À Deus, por iluminar meu caminho, me dar forças para prosseguir e por ter me proporcionado a vida, pela qual agradeço por ter conhecido tantas pessoas especiais.

À Leliane Viégas Muniz, mulher guerreira pela qual sinto imensurável orgulho de chamar de mãe, mas que, na verdade, é mãe, pai, amiga, irmã e conselheira. Agradeço a senhora pelo apoio, compreensão, incentivo, por compartilhar comigo todos os momentos da minha vida, enfim, sinto-me grato pelo fato da senhora existir. Lamento não poder te dar o céu, o mar, o mundo ou toda a felicidade que merece, mas ofereço como forma da minha gratidão o meu mais puro e sincero amor, respeito e admiração. Amo a senhora infinitamente!

À melhor irmã do mundo, Ana Lara Viégas Serbeto, pelos momentos que passamos juntos, por aguentar as minhas chatices, por compartilhar dos meus sonhos, por me fazer a pessoa mais feliz do mundo quando estamos juntos, por estar comigo sempre que precisei. Maninha, te amo e te agradeço por ser uma das pessoas mais importante da minha existência!

À minha família por ser a base de tudo. Vocês são especiais!

À minha orientadora, Profa. Dra. Kênya Silva Cunha, por compartilhar comigo seus grandiosos conhecimentos. Agradeço pelos ensinamentos, companheirismo, amizade, afetuosidade, disponibilidade que, mesmo em período de licença médica, sempre dispensou apoio fundamental para a realização desse trabalho. Um exemplo de perseverança e profissionalismo que muito contribuiu para o meu enriquecimento pessoal e profissional.

À minha amiga e professora da graduação Profa. Dra. Lílian Carla Carneiro, pelo incentivo inicial, por abrir os caminhos para que pudesse realizar o trabalho sob orientação de uma profissional tão competente, indicada por você. Agradeço pela amizade, pelas conversas, pelos conselhos, pela revisão antes de prestar a prova do mestrado que foram cruciais para minha formação profissional.

Às professoras da banca de qualificação, Profa. Dra. Lee Chen Chen e Profa. Dra. Rosália Santos Amorim Jesuino, suas valiosas sugestões guiaram a confecção final deste trabalho.

Aos membros titulares e suplentes da banca examinadora, primeiramente por aceitarem o convite e adicionalmente pelas imprescindíveis contribuições para o enriquecimento do trabalho e, conseqüentemente, do meu aprendizado.

À minha primeira orientadora de Iniciação Científica, Profa. Dra. Vanessa Delfino. À minha amiga e orientadora da monografia Profa. Dra. Débora de Jesus Pires e à minha co-orientadora da graduação Profa. Esp. Genáina Fernandes Guerra. Vocês me mostraram o quão

prazeroso é poder pesquisar. Não posso esquecer a colaboração de vocês para o meu crescimento profissional!

Aos meus companheiros e amigos do Laboratório de Genética Toxicológica, Nilza, Cláudia, Ana Clara, Laise, Joice, Igor e Karla que tornaram essa caminhada mais prazerosa. Agradeço pela amizade, pelas conversas, conselhos, colaboração e incentivo. Vocês foram indispensáveis na realização deste trabalho!

À Farmácia Ambulatorial do Hospital de Doenças Tropicais Dr. Anuar Auad, especialmente em nome da farmacêutica Ma. Janaína Bacellar Acioli Lins e da auxiliar de farmácia Sandra Maria Pires de Mendonça, pela presteza ao ceder as amostras dos antirretrovirais que foram testados neste trabalho.

Ao Prof. Robert Itamaraty de Melo Cordeiro (Ita) e Prof. Me. Tércio Fernandes de Sousa pelos esclarecimentos em relação às estruturas químicas dos antirretrovirais.

Aos meus amigos, nos quais encontrei a força necessária para persistir nessa caminhada.

Aos professores e colegas do Programa de Pós-Graduação em Biologia com os quais tive a honra de poder compartilhar de seus conhecimentos, seja durante as disciplinas que cursei ou mesmo nas conversas pelos corredores da Universidade Federal de Goiás.

À Secretária do Programa de Pós-Graduação em Biologia, Gleizilene Braz Pereira dos Santos, pela prontidão e dedicação para atender as minhas solicitações.

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

Enfim, agradeço a todos que contribuíram direta ou indiretamente para realização deste trabalho e torceram pelo sucesso desta etapa da minha realização pessoal e profissional. Sou o resultado da força e da confiança de cada um de vocês!

“Um sorriso e um abraço sinceros falam melhor que mil vezes “obrigado”. Terás sempre o meu sorriso, e receba agora o meu abraço.”

(Augusto Branco)

RESUMO

Os medicamentos antirretrovirais surgiram para impedir a multiplicação do vírus HIV no organismo, reduzindo a sua virulência, porém sem eliminá-lo das células infectadas. Estes medicamentos aumentaram o tempo e a qualidade de vida dos pacientes com AIDS. Dentro deste contexto, o Efavirenz (EFV) é inibidor da transcriptase reversa não-análogo de nucleosídeo. O Fumarato de Tenofovir Desoproxila (TDF), pró-fármaco oral de tenofovir, é análogo da adenosina 5`-monofosfato, pertencente à classe de inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleotídeos. Estes fármacos atuam nos mecanismos de replicação do HIV, inibindo a ação da transcriptase reversa e, conseqüentemente, impedindo a síntese de DNA viral. Com o intuito de avaliar o potencial tóxico e tóxico genético do EFV e do TDF, utilizou-se o Teste para Detecção de Mutação e Recombinação Somática (SMART) em *Drosophila melanogaster*. Larvas de 3º estágio oriundas do Cruzamento Padrão (ST – *standard cross*) entre machos *mwh* e fêmeas *flr³*, foram tratadas com soluções de EFV e TDF, assim como com água destilada (controle negativo), por aproximadamente 48 h (tratamento crônico), isto é, até atingirem o estágio de pupa. Essas linhagens são portadoras de genes marcadores específicos, localizados no braço esquerdo do cromossomo 3, que permitem monitorar eventos relacionados com mutação gênica, aberrações cromossômicas e recombinação mitótica. O diagnóstico estatístico foi obtido pelo teste binomial condicional. Os resultados demonstraram que o EFV foi tóxico em altas concentrações, mas não induziu eventos tóxico genéticos. Inversamente, o TDF não apresentou toxicidade nas concentrações testadas, porém apresentou indução de efeitos tóxico genéticos em todas as concentrações, com prevalência dos eventos recombinogênicos. Então, torna-se fundamental analisar constantemente o risco/benefício de medicamentos isolados e identificar a atividade tóxica e tóxico-genética de cada fármaco com o intuito de assegurar qualidade de vida aos pacientes que fazem uso de monoterapias e oferecer suporte para as investigações com as terapias que utilizam combinações de antirretrovirais.

Palavras-chave: Efavirenz, fumarato de tenofovir desoproxila, SMART.

ABSTRACT

The antiretroviral drugs appeared to prevent the multiplying HIV virus in the body, reducing its virulence, but not eliminate it from infected cells. These drugs increase the length and the quality of life of AIDS patients. In this context, Efavirenz (EFV) is non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors. The Tenofovir Disoproxil Fumarate (TDF), oral prodrug of tenofovir, is analogue of adenosine 5 'monophosphate, belonging to the class of nucleotide reverse transcriptase inhibitors. These drugs act on the mechanisms of HIV replication by inhibiting the action of reverse transcriptase and thus preventing viral DNA synthesis. In order to assess the toxic and toxic-genetic potential of EFV and TDF, the present study used the Test for Detection of Somatic Mutation and Recombination (SMART) in *Drosophila melanogaster*. 3rd stage larvae originating from standard cross (ST) between males *mwh* and females *flr³*, were treated with solution of EFV and TDF and distilled water (negative control), for approximately 48 hours (chronic treatment) until they reach the pupal stage. These strains are carriers of specific gene markers, located on the left arm of chromosome 3, which allow you to monitor events related to mutation, mitotic recombination and chromosome aberrations. The statistical diagnosis was obtained by conditional binomial test. In this work, the results demonstrated that the EFV was toxic in high concentrations, but showed no induction of toxic genetic events. Inversely, the TDF showed no toxicity at the concentrations tested, but was showed induction of toxic genetic events at all concentrations, with a prevalence of recombinogenic events. Then, it is essential to analyze constantly the effects risk/benefit of isolated drugs and identify toxic and toxic genetic activity of each drug in order to ensure the quality of life for patients who use monotherapies and offers support for investigations with therapies that use combinations of antiretroviral drugs.

Keywords: Efavirenz, tenofovir disoproxil fumarate, SMART.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
1.1 Medicamentos antirretrovirais	10
1.2 Efavirenz (EFV)	12
1.3 Fumarato de tenofovir desoproxila (TDF)	17
1.4 Genética Toxicológica	21
1.5 Teste para Detecção de Mutação e Recombinação Somática (SMART)	22
2. OBJETIVOS	24
3. MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1 Agentes antirretrovirais	25
3.2 Teste para Detecção de Mutação e Recombinação Somática (SMART)	25
3.3 Linhagens teste de <i>Drosophila melanogaster</i>	26
3.4 Procedimento experimental e tipos de larvas	26
3.5 Montagem e análise microscópica das lâminas	27
3.6 Bases genéticas e classificação dos clones	28
3.7 Análise estatística	28
4. RESULTADOS	29
4.1 Efeito tóxico	29
4.2 Toxicidade genética	30
5. DISCUSSÃO	34
6. CONCLUSÃO	37
7. PERSPECTIVAS	38
8. REFERÊNCIAS	39
9. ANEXOS	46
9.1 Comprovante de submissão do paper	46
9.2 Paper submetido	47

INTRODUÇÃO

1.1. Medicamentos antirretrovirais

A Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) é uma doença, causada pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), que acomete o sistema imunológico. Esse vírus ataca os linfócitos T CD4⁺ e, conseqüentemente, o organismo fica mais suscetível a “doenças oportunistas”, que variam desde resfriados até infecções mais graves (Ministério da Saúde, 2012a). A detecção da doença iniciou-se em 1980 e até junho de 2011 o Brasil registrou 608.230 casos de AIDS, de acordo com o último boletim epidemiológico do Ministério da Saúde. Em 2010, foram notificados 34.218 casos e a taxa de incidência de AIDS no Brasil foi de 17,9 casos por 100 mil habitantes (Ministério da Saúde, 2012a; Ministério da Saúde, 2012b).

O RNA genômico do HIV é constituído por duas monofitas que existem na forma de ribonucleoproteína, contendo as enzimas transcriptase reversa (TR), integrase, protease e a proteína p7 de ligação ao RNA. O vírus tem afinidade com as células do sistema imune, causando repressão de células que expressam as proteínas CD4 e CD8, pois a infecção inicia-se com a ligação das subunidades da proteína do vírus com as moléculas de CD4 (Peter & Gambertoglio, 1998; Pecanha et al., 2002; Abbas et al., 2003).

Em 1981 a AIDS foi identificada como uma doença e dois anos após iniciou-se uma intensa busca por compostos que inibissem a infectividade e a replicação do vírus. O primeiro composto capaz de inibir a replicação do HIV tanto *in vitro* quanto *in vivo* foi a suramina, mas o primeiro agente anti-HIV a ser licenciado para uso clínico, em 1987, foi a zidovudina (AZT) (De Clercq, 2009).

Os medicamentos antirretrovirais surgiram para impedir a multiplicação do vírus no organismo, reduzindo assim, a virulência do HIV sem eliminá-lo das células infectadas. Então, o uso desses medicamentos tornou-se fundamental para aumentar o tempo e a qualidade de vida dos portadores de AIDS, por evitarem o enfraquecimento do sistema imunológico e, conseqüentemente, reduzirem os riscos de serem acometidos por “doenças oportunistas” (Ministério da Saúde, 2012c). Desde 1996, o Brasil distribui

gratuitamente o coquetel anti-AIDS para todos que necessitam do tratamento. Segundo dados do Ministério da Saúde, cerca de 200 mil pessoas recebem regularmente os remédios para tratar a doença (Ministério da Saúde, 2012c).

As drogas antirretrovirais são divididas em diferentes categorias, de acordo com o alvo de sua interação no ciclo replicativo do HIV. Essas categorias são: (i) os inibidores de proteases (IPs) que atuam nessa enzima, bloqueando sua ação e impedindo a produção de novas cópias de células infectadas com HIV; (ii) inibidores de fusão (FIs) que impedem a entrada e, conseqüentemente, a reprodução do vírus na célula; (iii) inibidores de correceptores (CRIs) que interagem com os receptores CCR5 ou CXCR4, impedindo a entrada do vírus nas células; (iv) inibidores de integrase, que bloqueiam a atividade desta enzima, responsável pela inserção do DNA do HIV no genoma humano; (v) inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleosídeos (NRTIs); (vi) inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleotídeo (NtRTIs); (vii) inibidores da transcriptase reversa não-análogos de nucleosídeos (NNRTIs). As drogas pertencentes às categorias NRTIs e NtRTIs interagem com o sítio catalítico da enzima transcriptase reversa (TR), enquanto as NNRTIs interagem com sítios alostéricos da enzima. A TR é a enzima responsável pela conversão do RNA viral em DNA, antes que o material genético do vírus se integre ao genoma da célula infectada (De Clercq, 2009; Ferreira et al. 2010).

Nos últimos anos houve pouco progresso em relação ao desenvolvimento da vacina contra o HIV, obtendo-se eficácia máxima de 31,2% (Rerks-Ngarm et al., 2009). Contrariamente, a terapia de combinação de drogas para combater a infecção por HIV, surge como um avanço promissor no tratamento da AIDS. Entretanto, essa terapia é limitada pelo seu custo, pela exigência de adesão ao longo da vida e pelos efeitos adversos ao longo do tratamento (Rerks-Ngarm et al., 2009; Richman et al., 2009).

1.2. Efavirenz (EFV)

A classe dos NNRTIs consiste de moléculas estruturalmente diversas, inibidoras alostéricas que se ligam a um local na RT distante do sítio ativo, com a finalidade de alterar a configuração da enzima e anular a sua capacidade catalítica. São moléculas não competitivas em relação a desoxirribonucleotídeos fosfatados (dNTP's) e, portanto, não tem qualquer efeito direto sobre o ácido nucleico de ligação à TR (Iyidogan e Anderson, 2012).

Dentro desta classe há um fármaco muito utilizado na terapia antirretroviral, o efavirenz (CAS 154598-52-4; EFV), (4S)-6-cloro-4-(ciclopropiletinil)-1, 4-dihidro-4-(trifluorometil) 2-H-3, 1-benzoxazina 2-1 (Raju e Begon, 2008) (Figura1), aprovado pela *Food and Drugs Administration* (FDA) em 1998 (Wu et al., 2012). É um pó cristalino branco a ligeiramente rosa, com massa molecular de 315,68, praticamente insolúvel em água (Sustiva, 2009).

O EFV foi o primeiro agente antirretroviral aprovado pela FDA para ser tomado apenas uma vez ao dia. Esse fármaco apresenta alta eficiência e tolerabilidade a longo prazo, o que fez com que os esquemas antirretrovirais contendo EFV apresentem as respostas mais satisfatórias. No entanto, o fármaco não deve ser administrado como monoterapia, mas sim associado a esquemas antirretrovirais (Goodman e Gilman, 2006).

Em todo o mundo, o EFV é um dos componentes de escolha no regime de primeira linha para o tratamento da infecção pelo HIV, por ser a primeira geração de NNRTIs. Levando em consideração o aumento do acesso a terapia antirretroviral, a potencial exposição da população mundial ao EFV é muito grande (Rakhmanina e Anker, 2010).

O governo brasileiro publicou no dia 07 de maio de 2012, o decreto 7.723/2012 para renovar por cinco anos o licenciamento compulsório do EFV, visto que atualmente cerca de 104 mil pessoas no país utilizam o fármaco nos seus esquemas terapêuticos, ou seja, quase 50% das pessoas em tratamento no Brasil fazem uso do EFV. Em 2007, o governo decretou o licenciamento compulsório para que o Ministério da Saúde possa

importar da Índia medicamentos genéricos pré-qualificados pela Organização Mundial da Saúde (OMS), possibilitando uma economia de US\$ 31,5 milhões para o país. Visando uma economia maior, foi iniciado o desenvolvimento do EFV no Brasil, para tanto, o governo federal investiu no desenvolvimento da formulação do medicamento e na produção do princípio ativo que passaram a ser produzidos no Brasil desde 2009, na forma de genérico. No entanto, laboratórios indianos forneceram o medicamento até 2010 e o estoque durou até 2011. Atualmente a produção é inteiramente nacional e em 2012 a Farmaguinhos fabricou 57 milhões de comprimidos de EFV que custaram ao Ministério da Saúde R\$ 76,9 milhões, assegurando a viabilidade do tratamento fornecido pelo Sistema Único de Saúde (SUS) (Ministério da Saúde, 2012d).

O EFV é metabolizado principalmente por via hepática pelo citocromo P450, isoenzima CYP2B6. O gene CYP2B6 foi mapeado no cromossomo 19 e apresenta polimorfismos, podendo, portanto, influenciar no metabolismo do fármaco, como no caso da variante alélica 516G>T que está associada com uma menor atividade da isoenzima CYP2B6 e consequente aumento da concentração plasmática do EFV, causando maior incidência de toxicidade neuropsicológica associada ao fármaco. Ainda na metabolização do EFV, há o envolvimento parcial de CYP3A4 e CYP2A6 para metabólitos hidroxilados inativos que incluem 8-hidroxi-efavirenz e 7-hidroxi-efavirenz. O 8-hidroxi-efavirenz é o principal metabólito do EFV *in vitro* e *in vivo*, e a contribuição de 7-hidroxi-efavirenz à depuração total de EFV é considerada pequena. Estudos recentes sugerem que o CYP2A6 é o principal responsável pela 7-hidroxi-efavirenz e catalisa a segunda etapa de hidroxilação do 8-hidroxi-efavirenz para 8,14-dihidroxi-efavirenz. Estima-se que aproximadamente 17% de 8-hidroxi-efavirenz é ainda oxidado a 8,14-dihidroxi-efavirenz *in vitro*. Os metabólitos hidroxilados de EFV sofrem excreção biliar e urinária subsequentemente após conjugação (Ogburn et al., 2010; Gounden et al., 2010).

Células de câncer de próstata (LNCaP) foram tratadas com o EFV para estudar seus efeitos sobre a expressão de CYP2J2 e CYP2R1. EFV suprimiu significativamente os níveis de CYP2J2. Em fibroblastos tratados com EFV, para estudar o seu efeito sobre a expressão de CYP2R1 e CYP27A1, foi demonstrado que esse antirretroviral suprimiu significativamente CYP2R1, mas CYP27A1 não respondeu a este tratamento. Tais achados permitiram concluir que o EFV suprime a expressão de CYP2R1 em

fibroblastos, mas não em células LNCaP. Esta diferença de regulação por EFV em CYP2R1 está correlacionada com a expressão do receptor nuclear PXR em fibroblastos, mas não em células LNCaP (Elfolk et al., 2009).

Jamaluddin et al. (2010) confirmaram que o EFV aumenta a permeabilidade endotelial, causando a disfunção das células endoteliais da artéria coronária humana (HCAECs) de uma maneira concentração-dependente, que pode ser devida à diminuição de proteínas de junção (claudina e ocludina, por exemplo) e o aumento do ânion superóxido. Além disso, a ação do EFV nas HCAECs causa a ativação da JNK e NF-B que podem estar diretamente envolvidas na transdução de sinal.

A mutação de resistência mais comum relacionada a diminuição de sensibilidade ao EFV ocorre no códon 103 da transcriptase reversa (K103N), porém foram relatadas mutações de resistência nos códons 100, 106, 108, 181, 188, 190 e 225. Contudo, o EFV é bem absorvido pelo trato gastrointestinal e atinge concentrações plasmáticas máximas dentro de cinco horas (Goodman e Gilman, 2006). Nos dados coletados por Lisón et al. (2011) sobre mutações genotípicas resistentes aos antirretrovirais, as mais frequentes para o EFV e para a nevirapina (fármaco da mesma classe do EFV) foram: K103N/R (23,98%), V179D/E/I/M/T (10,82%), A98E/G/S (10,53%) e K101E/P/Q/R (9,06%).

A atividade antirretroviral do EFV é equivalente ou superior a todos os agentes antirretrovirais comparados até a presente data (Rakhmanina e Anker, 2010). Este fármaco é administrado uma vez ao dia devido a uma meia vida longa e por demonstrar ser um seguro, conveniente e potente esquema antirretroviral no combate ao HIV-1. O EFV é atualmente o único agente antirretroviral disponível em uma combinação de dose fixa com mais dois antirretrovirais em um único comprimido administrado uma vez ao dia como uma Terapia Antirretroviral Altamente Ativa (HAART, do inglês, *Highly Active Antiretroviral Therapy*), que tem o potencial de preservar as taxas de alta aderência necessária para atingir a supressão viral das células infectadas (Rakhmanina e Anker, 2010).

No entanto, os efeitos adversos do EFV incluem: erupções cutâneas, raros relatos de ocorrência da síndrome de Stevens-Johnson (erupções cutâneas fatais); efeitos tóxicos que envolvem o sistema nervoso central (SNC), como tontura,

comprometimento da concentração, disforia, insônia, sonhos vívidos ou anormais, psicose franca (depressão, alucinação e/ou manias), cefaléia, aumento das transaminases hepáticas e níveis séricos elevados de colesterol. Além disso, o EFV é o único antirretroviral teratogênico em primatas, pois quando o EFV foi administrado a fêmeas grávidas de macacos, 25% dos fetos apresentaram malformações e em seis casos de mulheres grávidas que fizeram uso do fármaco, o feto ou lactente apresentaram malformações do cérebro e da medula espinhal (Goodman e Gilman, 2006).

Nos dados coletados por Adjene e Igbigbi (2010), o EFV pode ter atuado como uma toxina para as células do colículo inferior de ratos adultos Wistar. O EFV afetou a integridade celular, causou defeitos na permeabilidade da membrana e interferiu na homeostase da célula, tendo como consequências, alterações celulares degenerativas tais como uma população celular esparsa, hipertrofia, alterações microcísticas e vacuolização no estroma do colículo inferior dos ratos.

Estudos realizados em ratos Wistar sobre o efeito da administração de EFV para os rins demonstraram que o fármaco causou distorção e ruptura da citoarquitetura renal, glomerulonefrite, congestão celular (aumento do volume sanguíneo devido a diminuição da drenagem venosa) e decréscimo significativo do peso do rim (indicando provável morte celular programada), comprovando que a administração de EFV causa citotoxicidade renal, comprometendo a função renal (Adjene et al., 2011).

Ao analisar os efeitos do EFV na diferenciação, expressão gênica e liberação de proteínas reguladoras da adipogênese humana, determinou-se que o EFV causou uma repressão dose-dependente na diferenciação dos adipócitos, que foi associado com a baixa regulação dos genes reguladores da formação de adipócitos SREBP-1, PPARC e C/EBPa, e seus genes-alvo na codificação das lipoproteínas (lipase, leptina e adiponectina), que são proteínas chave na função dos adipócitos. O EFV causou um aumento significativo da liberação de citocinas pró-inflamatórias (interleucina [IL] -8, IL-6, proteína quimiotática de monócitos-1), inibidor do ativador do plasminogênio tipo-1 e fator de crescimento de hepatócitos (HGF); reprimiu a liberação de adiponectina. Portanto, o EFV apresentou resposta anti-adipogênica e pró-inflamatória, sugerindo que pode contribuir para alteração de tecido adiposo, de acordo com a sua

capacidade de prejudicar a diferenciação de culturas de células de adipócitos (Díaz-Delfín, 2011).

Os estudos de Gomez-Sucerquia et al. (2012) demonstraram que EFV alterou a função mitocondrial e causou estresse oxidativo com consequente indução de danos nas células hepáticas, sugerindo que o EFV pode estar associado a toxicidade hepática. Porém, segundo Pineda et al. (2012) a tolerabilidade destas células quando expostas a EFV foi boa em pacientes co-infectados com HIV / HCV que apresentavam fibrose hepática avançada, já que a taxa de interrupção do tratamento atribuível à piora desta doença foi baixa.

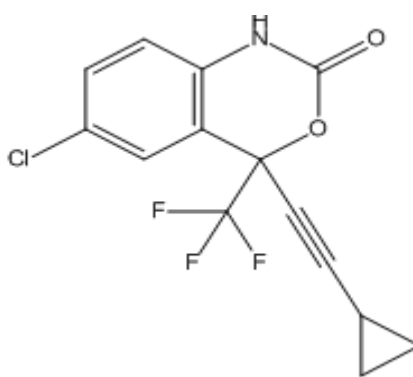


Figura 1. Estrutura química do efavirenz

Fonte: (Chemfinder, 2012 – a)

1.3. Fumarato de tenofovir desoproxila (TDF)

A classe dos NtRTIs é constituída por pró-fármacos que necessitam de ativação metabólica por meio de vias de fosforilação que produzem respectivamente os derivados difosfato e trifosfato. Estes derivados servem como substratos alternativos para a síntese do DNA viral, catalisada pela TR do HIV-1, enquanto competem com os substratos naturais, os desoxiribonucleosídeos trifosfatos (dNTP), para interromper a formação da cadeia de DNA viral após a sua incorporação (Iyidogan e Anderson, 2012).

Dentro deste contexto, o tenofovir é um NtRTIs que não apresenta uma hidroxila no carbono 3 da desoxirribose. Portanto, a incorporação de tenofovir no alongamento do DNA viral interrompe a sequência da transcrição, pois impede a ligação do próximo nucleotídeo (Johnson et al., 2010).

O fumarato de tenofovir desoproxila (CAS 202138-50-9; TDF); 9-((R)-2-((Bis(((isopropoxicarbonil)oxi) metoxi) fosfonil) metoxi) propil) adenina fumarato (Figura 2), é o pró-fármaco oral de tenofovir, com atividade antiviral contra o vírus da hepatite B (HBV) e o HIV (Raju e Begon, 2008). O tenofovir é um análogo da 5'-monofosfato de adenosina, e tem o potencial de inibir a ação da DNA polimerase de HBV e HIV por competir com o substrato natural da enzima. Desta forma, induz a terminação do alongamento da cadeia de DNA e, conseqüentemente, cessa a replicação do genoma viral. Adicionalmente, o TDF possui um perfil de citotoxicidade favorável, por ser um inibidor muito fraco das DNA polimerases α e β em mamíferos e da DNA polimerase mitocondrial γ (Delaney et al., 2006; DeClercq e Holly, 2005; Lee et al., 2003).

O TDF foi aprovado pela FDA em 2001 para o tratamento da AIDS e, dois anos após sua descoberta como um agente antirretroviral, foi provado que esse fármaco inibe completamente a infecção pelo SIV (vírus da imunodeficiência símia), equivalente ao HIV em macacos - quando administrado por via subcutânea, 48 horas antes ou 4 ou 24 horas após a inoculação intravenosa do SIV. A sua eficácia contra o SIV também foi testada por inoculação intravaginal e em macacos recém-nascidos. O fármaco foi eficiente contra infecções retrovirais independentemente da via de transmissão (parenteral, sexual ou perinatal) (DeClercq, 2012).

O TDF possui potente atividade contra o HIV, sendo um dos medicamentos recomendados no uso inicial da terapia anti-HIV, pois geralmente apresenta poucos efeitos colaterais ou toxicidade. Os eventos adversos mais comuns incluem: erupções cutâneas, náuseas, flatulência, diarreia e dor de cabeça (Duarte-Rojo e Heathcote, 2010).

Este fármaco apresenta vantagens sobre os NRTIs utilizados para tratar a infecção pelo HIV, visto que o TDF é monofosforilado, reduzindo os passos de fosforilação intracelular para uma conversão mais rápida e completa do pró-fármaco à droga ativa. Além disso, o TDF apresenta toxicidade celular e mitocondrial menor em relação aos NRTIs. Devido a essas características, a ativação intracelular do TDF é rápida, pois ele sofre hidrólise do diéster, sendo convertido em tenofovir, que por sua vez, é fosforilado pela monofosfato de adenosina cinase (AMP cinase) em tenofovir monofosfato (TFV-MP) e, este é fosforilado pela nucleosídeo difosfato cinase (NDP cinase), sendo convertido em difosfato de tenofovir (metabólito ativo). Portanto, como o fármaco é monofosforilado, após essas duas fosforilações, o componente ativo torna-se um composto trifosfatado (Grigsby et al., 2010b; Goodman e Gilman, 2006).

Além disso, o TDF tem um grupo lábil lipofílico para facilitar a penetração através das membranas da célula alvo. Este fármaco, não é um indutor ou inibidor das enzimas citocromo P450 humano, tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Tem alta potência e resposta excepcionalmente durável quando avaliado como o único agente terapêutico. Também, o metabólito ativo, difosfato de tenofovir, exibe uma meia-vida intracelular longa em células mononucleares do sangue periférico, que permite a dosagem única diária (Grigsby et al., 2010a).

Na fase III de ensaios utilizando pacientes infectados somente pelo HBV nenhuma evidência de resistência ao TDF foi demonstrada até 72 semanas de tratamento. Apenas dois pacientes HIV-HBV co-infectados, apresentando a mutação A194T relacionada com resistência a lamivudina (3TC), demonstraram ser resistentes ao TDF. No entanto, a associação entre esta mutação e a resistência ao TDF ainda não foi confirmada em outro estudo (Vries-Sluijs et al., 2010). Quatro indivíduos tiveram avanço virológico, porém apenas um destes apresentou mutações rt194T no gene da polimerase do HBV, assim como resistência ao 3TC e ao adefovir. Outros dois avanços ocorreram em associação com o desenvolvimento de carcinoma hepatocelular. Há

relatos que demonstram uma associação entre o desenvolvimento de resistência e o risco de carcinoma hepatocelular, explicado em grande parte pela recorrência de replicação viral. No entanto, houve apenas um relato de correlação entre aumento na incidência de carcinomas hepatocelulares e resistência ao 3TC (Vries-Sluijs et al., 2010; Andreone et al., 2004).

Este NtRTI de segunda geração melhorou a atividade antiviral contra infecções que contêm mutações nos análogos da timidina (TAMs) [D67N, K70R e T215Y] e mutações nos análogos de nucleosídeos (NAMs) [Q151M]. Além disso, o TDF exerce atividade antiviral em células CD4⁺ ativas e em repouso, visto que, por exigir menos vias de fosforilação, o fármaco mantém elevadas concentrações intracelulares. Porém, a resistência ao TDF é causada pela mutação pontual K65R (AAA →AGA) na TR que tem uma barreira genética muito baixa, exigindo uma única transição, visto que, essas transições (substituições A-G) são 2,5 vezes mais frequentes do que transversões (substituição A-C). Por outro lado, a mutação K65R é mais rara (1,7-4%) em comparação com a alta incidência (>40%) de TAMs associadas com AZT e d4T (Brenner e Coutsinos, 2009).

Um outro efeito secundário demonstrado pelo tratamento com TDF relaciona-se com a perda de densidade mineral óssea (DMO), particularmente em crianças, jovens e adolescentes, mas pouco se sabe sobre o mecanismo associado à perda óssea em indivíduos infectados pelo HIV (Grigsby et al., 2010b).

O TDF é principalmente eliminado por via renal, portanto há relatos de toxicidade renal grave, incluindo insuficiência renal aguda e síndrome de Fanconi. Nos estudos de Vries-Sluijs et al. (2010), as investigações sobre o risco de toxicidade renal em pacientes que fazem uso do TDF foram realizadas e um aumento pequeno no soro, mas significativo, dos níveis de creatinina foi observado após cinco anos de tratamento. No entanto, apenas 3% dos pacientes apresentaram aumento de creatinina sérica que exigiu a interrupção do TDF. Portanto, recomenda-se que a depuração da creatinina deve ser calculada antes de iniciar o uso desta droga, bem como o monitoramento de rotina de creatinina sérica e fósforo deva ser realizado (Duarte-Rojo e Heathcote, 2010; Winston et al., 2010). Porém, os aumentos na creatinina sérica ocorrem, geralmente, no início do tratamento, sugerindo que o monitoramento frequente da insuficiência renal é

necessário pouco depois do início do tratamento com TDF, mas que, em seguida provavelmente pode ser diminuído. Em geral, há segurança renal do TDF como parte da terapia antirretroviral através de cinco anos de tratamento (Vries-Sluijs et al., 2010).

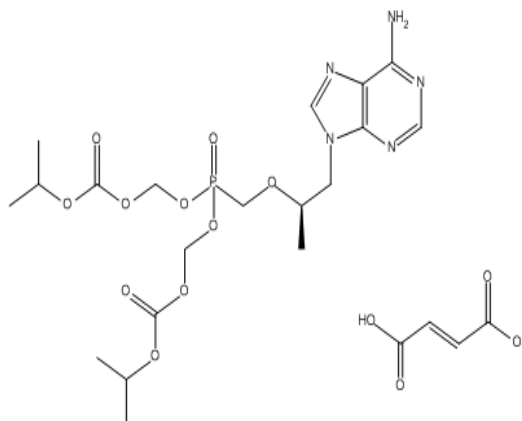


Figura 2 – Estrutura química do fumarato de tenofovir desopoxila

Fonte:(Chemfinder, 2012 - b)

1.4. Genética Toxicológica

O câncer é o resultado de alterações genéticas que trabalham em conjunto para substituir os mecanismos de controle que impedem a proliferação celular, portanto se desenvolve quando as células não seguem seu padrão normal de crescimento controlado, em consequência de alterações genéticas. Na falta dessa regulação, essas células crescem demasiadamente, expandindo-se em clones pré-cancerígenos. Enquanto os tecidos normais controlam a produção e liberação de sinais de promoção do crescimento que instruem a entrada e a progressão através da célula, as células cancerosas sustentam a proliferação crônica (Hanahan e Weinberg, 2000; Hanahan e Weinberg, 2011).

Alguns processos estão comprovadamente relacionados com a carcinogênese, destacando-se (i) as mutações, seja por danos na replicação ou deficiência no mecanismo de reparo; (ii) a recombinação homóloga (RH), devido a perda de heterozigose (LOH) de genes envolvidos na regulação do ciclo celular (Bishop e Schiestl, 2003).

Outras evidências que relacionam a RH com a carcinogênese são (i) o fato dos pacientes portadores de síndromes indutoras de câncer apresentarem um aumento na frequência de recombinação e (ii) a atuação da RH na manutenção dos telômeros, processo relacionado com a conservação de células tumorais. Adicionalmente, a RH é induzida por uma ampla variedade de agentes cancerígenos (Bishop e Schiestl, 2003).

A genética toxicológica avalia os efeitos genotóxicos que são considerados como precursores para o desenvolvimento de neoplasias, como o câncer. Para isso, vários testes estão disponíveis para avaliar mutação gênica e dano cromossômico (Ribeiro e Marques, 2003). Porém, nem todos os sistemas testes analisam a recombinação mitótica, que é um dos principais processos que está envolvido com a carcinogênese, mediada por agentes genotóxicos (Andrade e Lehmann, 2003).

1.5. Teste para Detecção de Mutação e Recombinação Somática (SMART)

A *Drosophila melanogaster* é o organismo modelo do bioensaio SMART. Devido às similaridades com mamíferos, a *Drosophila* tornou-se um excelente modelo para estudos que envolvam a detecção de agentes genotóxicos, antigenotóxicos e os mecanismos moleculares envolvidos nos processos de mutagênese e carcinogênese, podendo fornecer respostas relevantes, que podem ser extrapoladas para mamíferos superiores (Andrade e Lehmann, 2003; Andrade et al., 2004).

Apesar da *Drosophila* possuir aproximadamente 17.000 genes a menos que os humanos, ambas espécies apresentam similaridades genéticas e bioquímicas, já que as rotas bioquímicas e funções regulatórias entre as duas espécies são muito conservadas e, vários genes estudados na *D. melanogaster* provaram ser homólogos dos genes supressores de tumor e oncogenes humanos (Miklos e Rubin, 1996; St. John e Xu, 1997).

As linhagens mutantes de *Drosophila* são bem caracterizadas e possuem uma variedade de marcadores que permitiram a criação de vários sistemas-teste capazes de detectar os mais variados tipos de eventos genéticos. Como, a recombinação tem sido considerada um evento que contribui para carcinogênese torna-se importante a aplicação do bioensaio SMART, que realiza a detecção simultânea dos eventos mutacionais e recombinação mitótica, por possibilitar a quantificação desses eventos com o intuito de avaliar a contribuição de cada um deles para a genotoxicidade total dos compostos em estudos (Graf et al., 1984; Andrade e Lehmann, 2003; Andrade et al., 2004).

O SMART se baseia no conceito de que durante o desenvolvimento embrionário de *D. melanogaster*, um grupo de células - disco imaginal – se proliferam mitoticamente para formar o corpo da mosca adulto. A perda de heterozigose de dois genes marcadores recessivos (*mwh* e *flr³*) pode levar à formação de clones de células mutantes que são expressas fenotipicamente como manchas contendo pelos mutantes, presentes nas células das asas de moscas adultas (Graf et al., 1984; Andrade e Lehmann, 2003; Andrade et al., 2004).

Entretanto, não há estudos que comprovem a indução de recombinações mitóticas no DNA causadas pelo EFV e TDF, enfatizando a importância da aplicação de

testes que avalia este parâmetro. O SMART destaca-se como um teste capaz de fornecer informações seguras acerca do potencial recombinogênico destes medicamentos, contribuindo para ampliar as análises de possíveis efeitos colaterais induzidos por eles.

O nosso grupo tem analisado vários antirretrovirais que demonstram ou não a indução de recombinação mitótica, utilizando o SMART. Em estudo realizado em nosso laboratório foi demonstrado que, no total de eventos tóxicos genéticos induzidos, a zidovudina (AZT) apresentou 85% de eventos recombinacionais, enquanto a didanosina (ddI) foi 100% recombinogênica (Guimarães et al. 2008). Em outro estudo, desenvolvido por Franchi et al. (2009), aproximadamente 86% dos clones induzidos pela lamivudina (3TC) e 76% dos clones induzidos pela estavudina (d4T) foram relacionados com a recombinação mitótica. Estes dados sugerem que, devido ao alto índice de recombinação mitótica a exposição aos fármacos pode provocar instabilidade genômica e perda de heterozigose, processo relacionado com a carcinogênese. Considerando que a AIDS é uma doença de alta incidência, estudos sobre os efeitos tóxicos genéticos causados pelos antirretrovirais, tornam-se fundamentais para garantir a segurança dos pacientes que utilizam esses medicamentos (Guimarães et al., 2010).

As conclusões geradas a partir dos resultados dos experimentos realizados em *D. melanogaster* contribuem para um melhor conhecimento sobre possíveis atividades mutagênica e/ou recombinogênica das drogas investigadas, por meio da comparação dos resultados obtidos em dois diferentes genótipos que permitem acompanhar alterações genéticas específicas, como descrito por Graf et al., (1984); Andrade e Lehmann, (2003); Andrade et al., (2004): (i) genótipo trans heterozigoto - que evidencia a ocorrência de eventos mutagênicos e/ou recombinogênicos e (ii) genótipo heterozigoto para o cromossomo balanceador TM3 - que expressa, exclusivamente, lesões do tipo mutação gênica e mutação cromossômica.

O presente estudo visa contribuir para que se faça uma projeção do risco-benefício da utilização do EFV e TDF nas terapias antirretrovirais, com o intuito de fornecer novas possibilidades de terapias que ofereçam menos efeitos colaterais e, conseqüentemente, melhore a qualidade de vida dos pacientes a elas submetidos.

OBJETIVOS

Com base nesses pressupostos teóricos e no intuito de oferecer informação a respeito da segurança para a saúde humana, o presente trabalho apresenta os seguintes objetivos:

- I) Avaliar o potencial tóxico, mutagênico e recombinogênico dos antirretrovirais, EFV e TDF quando administrados isoladamente em diferentes concentrações por meio do cruzamento padrão (ST, do inglês *standard cross*) do SMART.
- II) Quantificar a frequência de recombinação induzida pelo EFV e TDF, nas larvas provenientes do cruzamento ST, quando administrados isoladamente.
- III) Avaliar comparativamente os possíveis efeitos tóxico genéticos, induzidos nas larvas provenientes do cruzamento ST pelos agentes antirretrovirais em estudo.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Agentes antirretrovirais

Foram utilizados neste trabalho os medicamentos ESTIVA-600[®] e VIREAD[®], ambos cedidos pelo Hospital de Doenças Tropicais Dr. Anuar Auad. Cada comprimido de ESTIVA-600 contém 600 mg de EFV e cada comprimido de VIREAD[®] contém 300 mg de TDF.

À hora do tratamento, diluiu-se três comprimidos de ESTIVA-600 (totalizando 1800 mg de EFV) em 18 mL de água destilada. Para obter a diluição total do comprimido, a solução foi sonicada por 6 minutos, utilizando-se o sonicador Thornton – INPEC (40 watts; 60 Hz) Eletrônica S/A. Com a solução-mãe na concentração de 100 mg/mL, foram diluídas as demais concentrações (0,78125; 1,5625; 3,125; 6,25; 12,5; 25 e 50 mg/mL). Também à hora do tratamento, diluiu-se um comprimido de VIREAD (300 mg) em 30 mL de água destilada, fazendo uso do mesmo sonicador do experimento anterior por 2 minutos. A partir da solução-mãe (10 mg/mL) foram obtidas as demais concentrações: 0,15625; 0,3125; 0,625; 1,25; 2,5 e 5,0 mg/mL.

Em todos os experimentos, o solvente (água destilada) foi utilizado como controle negativo.

3.2. Teste para Detecção de Mutação e Recombinação Somática (SMART)

O SMART investiga a ocorrência de lesões em nível de DNA, por meio da análise e quantificação de pelos mutantes presentes nas asas de *D. melanogaster*. Essas alterações ocorrem nas células dos discos imaginais que, por sucessivas divisões mitóticas, darão origem às asas dos adultos de *D. melanogaster*, ocasionando a perda de heterozigose de dois genes marcadores para forma dos pelos presentes nas asas: os genes *mwh* e *flr*³ (Graf et al., 1984; Andrade e Lehmann, 2003; Andrade et al., 2004).

O gene selvagem origina um pelo por célula (Figura 3a). O gene *mwh* origina pelos múltiplos (Figura 3b) e o gene *flr*³, pelos geralmente com formato de chama de vela (Figura 3c), indicando a ocorrência de lesões mutacionais e/ou recombinacionais.

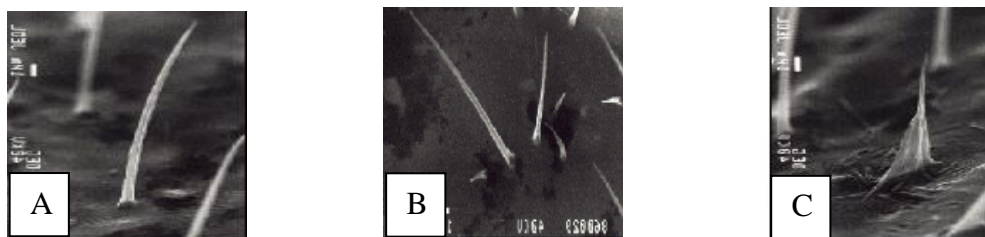


Figura 3. Visualização em microscopia eletrônica dos fenótipos de: (A) pelo normal, (B) pelos múltiplos e (C) pelo *flare*.

3.3. Linhagens teste de *Drosophila melanogaster*

No presente trabalho foram utilizadas as linhagens com as seguintes características genótípicas: (i) *flr³ - flr³/In(3LR)TM3,rip^p sep l(3)89Aa bx^{34e}* (Figura 4a) e *Bd^S* e (ii) *mwh - mwh/mwh* (Figura 4b). Essas linhagens são portadoras de genes marcadores específicos, localizados no braço esquerdo do cromossomo 3, que permitem monitorar eventos relacionados com mutação gênica, aberrações cromossômicas e recombinação mitótica (Graf et al., 1984).

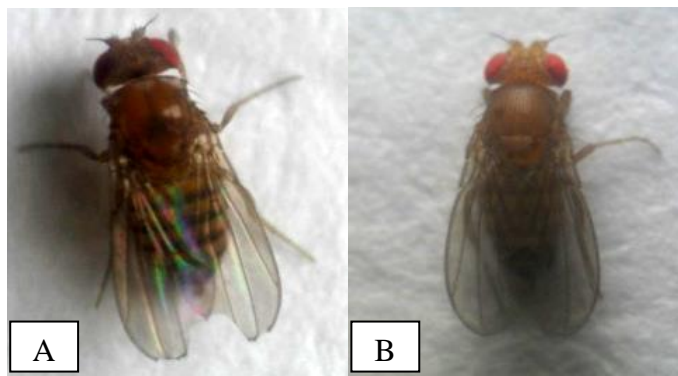


Figura 4. Linhagens teste de *D. melanogaster*: (A) *flr³*, (B) *mwh*.

3.4. Procedimento experimental e tipos de larvas

Para a realização do SMART, larvas de 3º estágio oriundas do cruzamento padrão (ST – *standard cross*) entre 40 machos *mwh* e 80 fêmeas *flr³*, foram distribuídas em frascos contendo 0,9 g de meio sintético e 3 mL das soluções de tratamento e permaneceram até atingirem o estágio de pupa (tratamento crônico). As larvas foram distribuídas em dois frascos de cada concentração, inclusive em frascos somente com água destilada (controle negativo). Em um dos frascos foram colocadas exatamente 100

larvas e os adultos sobreviventes foram contados para a determinação da curva de sobrevivência. Enquanto que, no outro frasco, foram colocadas aproximadamente 100 larvas e, todos os adultos que nasceram dos dois frascos de cada concentração, em 10-12 dias após a postura dos ovos, foram conservados em etanol 70% para posterior montagem das lâminas das asas e análise dos tricomas. Por meio deste procedimento experimental, as células dos discos imaginais ficaram expostas às diferentes soluções de tratamento por 5 a 6 ciclos de divisão mitótica - o que corresponde a 95% de todas as divisões celulares que ocorrem desde o desenvolvimento do embrião até o início da pupação (Frei e Würigler, 1988).

As larvas provenientes desse cruzamento deram origem a indivíduos adultos de duas constituições genótípicas: (i) MH – trans-heterozigotos ($mwh +/+ flr^3$) para os marcadores recessivos mwh e flr^3 , e (ii) BH - heterozigotos para o cromossomo balanceador TM3 ($mwh +/TM3, Bd^S$). O cromossomo TM3 é indispensável para manter a heterozigose do gene marcador *flare* (flr^3) na linhagem parental e contém múltiplas inversões, tornando inviáveis os produtos de recombinação. Dessa forma, esses indivíduos expressam somente mutações gênicas e aberrações cromossômicas. A relação entre o total de manchas da progênie trans-heterozigota e o total de manchas da progênie TM3 possibilita avaliar o potencial recombinôgenico dos compostos. O gene marcador Bd^S determina uma forma recortada das asas das moscas adultas, permitindo facilmente a sua diferenciação em relação ao genótipo trans-heterozigoto que determina forma normal, arredondada (Graf et al., 1984; Andrade e Lehmann, 2003; Andrade et al., 2004).

3.5. Montagem e análise microscópica das lâminas

Os adultos conservados em etanol 70% tiveram suas asas retiradas do corpo com o auxílio de duas pinças de relojoeiro (n. 5), e em seguida, embebidas em solução de Faure (30 g de goma arábica, 20 mL de glicerol, 50 mL de água e 50 mL de hidrato de cloral) para a montagem das lâminas com 5 pares de asas de fêmeas e 5 pares de asas de machos. Após ficarem na temperatura ambiente por 24 horas, foram colocados lamínulas (24x32 mm) e cubos de metal de aproximadamente 400 g para auxiliar na fixação das asas sobre a lâmina. Após 24 horas, o peso foi retirado e a lamínula fixada por uma base de esmalte para evitar o seu deslocamento durante a análise microscópica (Andrade et al., 2004).

A superfície dorsal e ventral das asas dos adultos, contendo aproximadamente 24.400 pelos, foram analisadas em microscópio óptico de luz com aumento de 400x para a classificação e quantificação das manchas (Andrade e Lehmann, 2003).

3.6. Bases genéticas e classificação dos clones

As manchas foram classificadas em: mancha simples (ocorrem somente fenótipos *mwh* ou *flr³*), originadas por mutação pontual, alteração cromossômica ou recombinação mitótica e manchas gêmeas (ocorrem os fenótipos *mwh* e *flr³* simultaneamente), indicando, exclusivamente, a ocorrência de recombinação mitótica. As manchas simples foram divididas em pequena (uma ou duas células mutantes) e grande (três ou mais células mutantes). São consideradas como manchas distintas, aquelas que são separadas por três ou mais pelos normais. O número total de clones induzidos em um grupo tratado fornece dados quantitativos sobre a atividade genotóxica do composto (Andrade et al., 2004).

3.7. Análise estatística

A avaliação dos efeitos tóxico genéticos foi realizada por meio da comparação entre a frequência de manchas mutantes dos grupos tratados e o controle negativo. O diagnóstico estatístico foi obtido através do teste binomial condicional de Kastenbaum e Bowman (1970), seguindo um procedimento de múltiplas escolhas proposto por Frei e Würzler (1988), testando as hipóteses: H_0 : não há diferença entre a frequência de mutação do grupo controle (frequência espontânea) e do grupo tratado; H_A : a frequência de mutações do grupo tratado é m vezes maior que a do grupo controle, visto que m é um fator de correção utilizado para minimizar a possibilidade de ocorrência de falso positivo, sendo $m=2$ para manchas simples pequena e total de manchas e $m=5$ para manchas simples grande e manchas gêmeas (devido a menor frequência) (Frei e Würzler, 1988; Graf et al., 1984).

Dependendo da avaliação das hipóteses (aceita ou rejeitada), há quatro possíveis diagnósticos: positivo – aceita-se H_A e rejeita-se H_0 ; negativo – aceita-se H_0 e rejeita-se H_A ; inconclusivo – aceita-se ambas hipóteses e fraco positivo – rejeita-se ambas hipóteses (Andrade e Lehmann, 2003).

4. RESULTADOS

4.1. Efeito tóxico

Partiu-se de 100 mg/mL do EFV para realizar um experimento piloto a fim de determinar as concentrações que seriam utilizadas para análise de toxicidade genética. Para isso, grupos de 100 larvas foram distribuídos em tubos de tratamento com diferentes concentrações de cada composto onde permaneceram por 48 horas. Nas três maiores concentrações, o número de adultos nascidos foi menor do que 30% em relação ao controle (Gráfico 1) e na concentração de 12,5 mg/mL o número de machos não foi suficiente para montagem de lâminas. Portanto, para avaliar a toxicidade genética do EFV foram utilizadas as concentrações de 0,78125; 1,5625; 3,125 e 6,25 mg/mL.

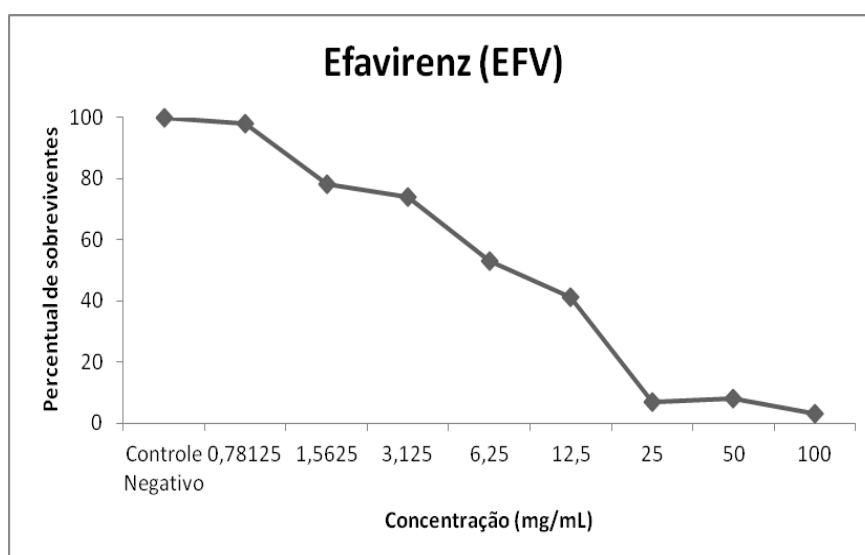


Gráfico 1. Percentual de sobreviventes por concentração de EFV

O mesmo procedimento foi utilizado para obtenção das concentrações que seriam analisadas na avaliação da toxicidade genética do TDF. Porém, como a solubilidade máxima deste fármaco encontrada na literatura é de 13,4 mg/mL (<<http://dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/lookup.cfm?setid=33FD6418-FBDC-42CA-A50D-CE2A476A5418#nlm34089-3>>), para esses experimentos partiu-se de 10 mg/mL e diluiu-se as demais concentrações. Como o número de moscas adultas nascidas foi superior a 97% em todas as concentrações (Gráfico 2), para análise de toxicidade genética induzida pelo TDF foram utilizadas apenas as quatro maiores concentrações (1,25; 2,5; 5,0 e 10,0 mg/mL).

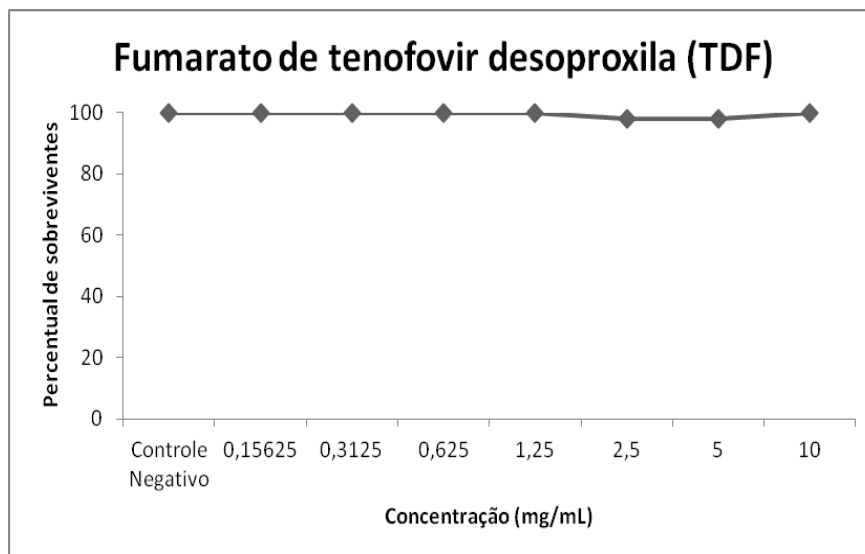


Gráfico 2. Percentual de sobreviventes por concentração do TDF

4.2. Toxicidade genética

Para a análise dos resultados, a frequência de manchas mutantes de cada grupo tratado foi comparada com o seu respectivo controle negativo (água destilada). Os indivíduos trans-heterozigotos tratados com EFV não apresentaram aumento estatisticamente significativo ($P > 0,05$) nas frequências do total de manchas mutantes em relação ao controle negativo, indicando a ausência de efeitos tóxico genéticos (Tabela 1). Desta forma, as análises dos indivíduos do genótipo BH não foram necessárias.

A Tabela 2 apresenta os dados obtidos pela análise dos indivíduos tratados com TDF. Em todas as concentrações, o fármaco foi capaz de promover danos no DNA, indicados pelo aumento dose-resposta na frequência total de manchas mutantes nos indivíduos trans-heterozigotos, inferindo-se que o TDF é capaz de produzir toxicidade genética por indução de eventos mutacionais e/ou recombinacionais. Como a frequência de indução de manchas simples pequena foi maior em relação aos demais tipos de manchas, sugere-se que o composto tenha efeitos tardios, gerando danos genéticos somente nos últimos estágios do desenvolvimento larval (Andrade et al., 2004).

A análise dos indivíduos heterozigotos para o cromossomo TM3 demonstrou que as frequências de indução de manchas são menores ou próximas aos valores encontrados no controle negativo, ou seja, não houve diferença significativa entre as

séries tratadas e o controle negativo. Estes resultados caracterizam a ausência de indução de mutações causadas pelo TDF.

Em sequência, calculou-se o potencial recombinogênico do fármaco por meio da relação entre o total de manchas da progênie MH e BH. Na maioria das concentrações a contribuição da recombinação no total de eventos tóxico genéticos induzidos foi praticamente 100%, indicando que este é o principal evento induzido pelo fármaco. Os dados acima de 100% ocorrem porque na progênie BH o diagnóstico foi negativo e, ao utilizarmos a fórmula que faz a relação entre a frequência de manchas da progênie MH a com a progênie BH ($R = 1 - [(n/NC \text{ em indivíduos BH}) / (n/NC \text{ em indivíduos MH})] * 100$), resulta nesses valores.

TABELA 1

Avaliação dos efeitos mutagênicos e/ou recombinogênicos do efavirenz (EFV) em células somáticas de larvas de terceiro estágio provenientes de cruzamento padrão

Genótipo e Concentrações (mg.mL ⁻¹)	N. de indivíduos (N)	Manchas por indivíduo (no. de manchas) diag. estatístico ^a				Total manchas <i>mwh</i> ^c (n)
		Manchas simples pequena (1-2 células) ^b m = 2	Manchas simples grande (> 2 células) ^b m = 5	Manchas gêmeas m = 5	Total de manchas m = 2	
EFV <i>mwh/flr</i> ³						
Controle Negativo	60	0,50 (30)	0,07 (04)	0,02 (01)	0,58 (35)	35
0,78125	60	0,47 (28) -	0,07 (04) i	0,00 (00) i	0,53 (32) -	32
1,5625	60	0,47 (28) -	0,02 (01) -	0,00 (00) i	0,48 (29) -	29
3,125	60	0,38 (23) -	0,08 (05) i	0,03 (02) i	0,50 (30) -	29
6,25	60	0,53 (32) -	0,03 (02) i	0,07 (04) i	0,63 (38) -	36

^a Diagnóstico 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 a = b = 0,05. ^b Incluindo manchas simples *flr*³ raras. ^c Considerando os clones *mwh* para as manchas simples *mwh* e para as manchas gêmeas.

TABELA 2

Avaliação dos efeitos mutagênicos e/ou recombinogênicos do fumarato de tenofovir desoproxila (TDF) em células somáticas de larvas provenientes do cruzamento padrão

Genótipos e Concentrações (mg.mL ⁻¹)	N. de indivíduos (N)	Manchas por indivíduo (no. de manchas) diag. estatístico ^a				Total manchas <i>mwh</i> ^c (n)	Frequencia de indução de manchas (por 10 ⁵ células por divisão celular) ^d n/NC ^e		Recombinação (%) ^g
		Manchas simples pequena (1-2 células) ^b m = 2	Manchas simples grande (> 2 células) ^b m = 5	Manchas gêmeas m = 5	Total de manchas m = 2		Observada	Corrigida pelo controle	
TDF									
<i>mwh/flr</i> ³									
Controle	40	0,55 (22)	0,05 (02)	0,10 (04)	0,70 (28)	28	1,43		
Negativo									
1,25	40	0,95 (38) +	0,10 (04) i	0,10 (04) i	1,15 (46) +	46	2,36	0,92	150
2,5	40	0,73 (29) i	0,35 (14) +	0,15 (06) i	1,23 (49) +	48	2,46	1,02	140,20
5	40	1,08 (43) +	0,48 (19) +	0,33 (13) +	1,88 (75) +	75	3,84	2,41	104,15
10	40	1,78 (71) +	1,03 (41) +	0,75 (30) +	3,55 (142) +	134	6,86	5,43	96,32
<i>mwh/TM3</i>									
Controle	40	0,63 (25)	0,00 (00)		0,63 (25)	25	1,28		
negativo									
1,25	40	0,38 (15) -	0,03 (01) i	F	0,40 (16) -	16	0,82	- 0,46	
2,5	40	0,43 (17) -	0,00 (00) i		0,43 (17) -	17	0,87	- 0,41	
5	40	0,53 (21) -	0,05 (02) i		0,58 (23) -	23	1,18	- 0,10	
10	40	0,65 (26) -	0,08 (03) i		0,73 (29) -	29	1,49	- 0,20	

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

^b Incluindo manchas simples *flr*³ raras. ^c Considerando os clones *mwh* para as manchas simples *mwh* e para as manchas gêmeas. ^d Calculado de acordo com Frei et al. (1992). ^e $C = 48.000$, isto é, número aproximado de células examinadas por indivíduo. ^f Apenas manchas simples *mwh* podem ser observadas nos indivíduos heterozigotos *mwh/TM3*, já que o cromossomo balanceador *TM3* não contém o gene mutante *flr*³. ^g Porcentagem de recombinação calculada de acordo com a fórmula $R = 1 - [(n/NC \text{ em indivíduos } mwh/TM3) / (n/NC \text{ em indivíduos } mwh/flr^3)] * 100$.

5. DISCUSSÃO

O bioensaio SMART, desenvolvido por Graf et al. (1984), é considerado um teste barato, rápido e confiável. O organismo teste, *D. melanogaster*, apresenta um ciclo de vida curto, pequeno número de cromossomos ($2n=8$) e linhagens geneticamente bem caracterizadas. Adicionalmente, os genes de *D. melanogaster* apresentam aproximadamente 80% de homologia aos genes humanos. O sistema enzimático relacionado ao citocromo P450 é semelhante ao dos mamíferos, permitindo a análise de compostos que precisam ser metabolizados para causar efeitos tóxico genéticos. O SMART auxilia na detecção de compostos que causam danos ao DNA, incluindo a recombinação somática, uma das principais alterações genéticas relacionada à carcinogênese.

Além disso, a enzima desoxirribonucleosídeo quinase (Dm-dNK) de *D. melanogaster* que fosforila os quatro desoxirribonucleosídeos naturais, embora demonstre preferência por nucleosídeos de pirimidina, apresenta similaridades com enzimas de células de mamíferos, visto que, o nível mais elevado de semelhança no sequenciamento, foi com a enzima mitocondrial humana timidina quinase 2 com a qual compartilha muitos substratos (Johansson et al., 1999; Munch-Petersen et al., 1998; Solaroli, 2003).

A avaliação da relação risco carcinogênico e benefício da indução de resposta ao tratamento deve ser realizada sempre antes de prescrever um medicamento (Brambilla et al., 2011; Brambilla et al., 2012). Estudos de longo prazo sobre carcinogenicidade em animais demonstraram que o TDF pode causar adenomas hepáticos em camundongos fêmeas, quando administrado em altas doses. Também o EFV pode causar adenomas e carcinomas hepatocelulares e adenomas alveolares/bronquiolares pulmonares em camundongos fêmea, mas não em camundongos macho (Brasil, 2008; Wu et al., 2012). Neste trabalho, ao avaliar os efeitos mutagênicos e recombinogênicos do EFV e do TDF, os resultados mostraram que o EFV foi tóxico em concentrações maiores (50, 25 e 12,5 mg/mL) e não induziu eventos tóxico genéticos. Inversamente, o TDF não foi tóxico, porém induziu eventos tóxico genéticos em todas as concentrações testadas.

Nossos resultados de toxicidade corroboram o estudo de Díaz e Delfín (2011), que verificaram que, em baixas concentrações (0,5 e 4 μ M) o EFV não foi

significativamente citotóxico, mas a 20 μM causou morte celular extensa. Adicionalmente, os resultados de Adjene e Igbigbi (2010) sugerem que a administração do EFV por tempo prolongado apresentou efeitos tóxicos sobre células do colículo inferior de ratos Wistar observado por meio da diminuição das células, o que pode ser consequência de morte celular induzida pelo fármaco.

Porém, apesar das baixas taxas de toxicidade de muitos dos esquemas antirretrovirais mais recentes, o acúmulo de efeitos ao longo de décadas de tratamento é desconhecido (Richman et al., 2009).

Bumpus (2011) incubou hepatócitos humanos com EFV e 8-hidroxiefavirenz (8-OHEFV), metabólito principal do EFV. Os resultados indicaram morte celular, ativação de caspases-3, formação de espécies reativas de oxigênio, estímulo da fosforilação da via de sinalização JNK e da expressão da isoforma proapoptótica da proteína Bim (bcl-2, mediador de morte celular). Os dados sugerem que o metabólito oxidativo 8-OHEFV é um indutor mais potente da morte celular hepática do que o composto original do EFV.

Em estudos de revisão sobre genotoxicidade e carcinogenicidade de diversos medicamentos de uso frequente e longa duração realizados por Brambilla et al. (2011) e Wu et al. (2012), o EFV não apresentou efeitos genotóxicos em testes *in vitro* (cultura de células) e *in vivo* (micronúcleo, por exemplo) efetuados com diversos organismos e células, tais como *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, células do ovário de hamster chinês, camundongos.. A ausência de efeitos tóxico genéticos do EFV foi confirmada em nossos resultados com o teste SMART.

Brambilla et al. (2012) realizaram uma revisão sobre carcinogenicidade de medicamentos, pois segundo as orientações para testes de carcinogenicidade de produtos farmacêuticos um estudo de carcinogenicidade a curto, médio e longo prazo utilizando sistema *in vivo* deve ser realizada para todos os produtos farmacêuticos. Neste estudo, o EFV não apresentou efeitos carcinogênicos em nenhum dos testes, enquanto que, o tenofovir apresentou resultados positivos no ensaio de carcinogênese de longo prazo com camundongos fêmeas.

Segundo Brambilla et al. (2011), apesar de não apresentar genotoxicidade positiva em *S. typhimurim* e camundongos (micronúcleo), o tenofovir foi genotóxico em linhagem celular L5178Y de linfoma de camundongos. No estudo de revisão realizado

por Wu et al. (2012) o tenofovir foi genotóxico para cultura de células, confirmando assim, os resultados encontrados neste trabalho, utilizando o teste SMART.

Em um levantamento feito por Friedrich e Olejniczak (2011) sobre os dados de carcinogenicidade de medicamentos para uso humano autorizados na Europa entre 1995 e 2009, usando como fonte de pesquisa, Relatórios Europeus de Avaliação Pública (EPARs, do inglês *European Public Assessment Reports*), o Resumo das Características dos Medicamentos (SPCs - *Summary of Product Characteristics*) e o website da Agência Europeia de Medicamentos (EMA - *European Medicines Agency*), demonstrou que o EFV não foi relatado como um medicamento genotóxico e foi negativo para carcinogenicidade em ratos, porém foi carcinogênico para camundongos. Em contraste, o TDF foi relatado como genotóxico e carcinogênico para ratos e camundongos, sendo relacionado com lipoma, pólipos do útero, tumores duodenais e adenoma hepático em camundongos, apresentando, portanto, risco carcinogênico para humanos.

Então, torna-se fundamental analisar constantemente o risco-benefício de medicamentos isolados e identificar a atividade tóxica e tóxico-genética de cada fármaco com o intuito de assegurar qualidade de vida dos pacientes que fazem uso de monoterapias. Além disso, o estudo dos medicamentos isolados oferece suporte para que se realizem investigações com as terapias combinadas (HAART).

6. CONCLUSÃO

Foi proposta deste trabalho a investigação do potencial tóxico e tóxico genético do TDF e do EFV por meio do cruzamento padrão do SMART que avalia duas alterações genéticas relacionadas com a carcinogênese: a mutação e a recombinação somática. Concluiu-se que:

- I) o EFV foi tóxico nas maiores concentrações, enquanto o TDF não apresentou toxicidade nas concentrações utilizadas;
- II) o EFV não induziu efeito tóxico genético em nenhuma das concentrações, contrariamente ao TDF que induziu aumento na frequência total de manchas em todas as concentrações analisadas, prevalecendo a indução de recombinação mitótica sobre a mutação.

Este trabalho apresenta resultados sobre o delineamento tóxico e tóxico genético de dois antirretrovirais isolados e poderá contribuir para que se trace um panorama mais amplo no que se refere aos possíveis efeitos secundários produzidos pelas terapias combinadas (HAART) que fazem uso desses medicamentos.

7. PERSPECTIVAS

Em decorrência das diversas mutações do HIV e consequentes falhas nos tratamentos com apenas um fármaco, tornou-se fundamental a necessidade de combinar dois ou mais antirretrovirais para a realização de protocolos de tratamento da AIDS (Bossi et al., 1998; Duan et al., 2001; Re et al., 2003; Turner et al., 2004; Parikh et al., 2006; Entheshami et al., 2008; Walker et al., 2009). No entanto, os eventos adversos dessas terapias a longo prazo ainda são desconhecidos e estudos de toxicidade genética fornecem subsídios para avaliação risco/benefício, auxiliando assim, na escolha da prescrição médica para a melhor forma de tratamento. Portanto, este trabalho oferece suporte para analisar o efeito tóxico e tóxico genético de antirretrovirais administrados em combinações, envolvendo o EFV e o TDF.

8. REFERÊNCIA

ABBAS, A. K., LICHTMAN, A. H., POBER, J. S. **Imunologia celular e molecular**. 4a ed., Rio de Janeiro: Revinter, 2003.

ADJENE, J. O.; AJAKAYE, I. O.; NOSAKHARE, P. O. Morphological effects of chronic efavirenz administration on the kidney of adult Wistar rats. **Genomic Medicine, Biomarkers, and Health Sciences**, v. 3, p. 76-80 (2011).

ADJENE, J. O. e IGBIGBI, P. S. Effects of Chronic Administration of Efavirenz on the Inferior Colliculus of Adult Wistar Rats. **Fooyin J Health Sci**, v. 2, p. 105–108 (2010).

ANDRADE, H.H.R. e LEHMANN, M. Teste para detecção de mutação e recombinação somática (SMART) em *Drosophila melanogaster*. In RIBEIRO, L. R., SALVADORI, D. M. F., MARQUES, E. K. **Mutagênese ambiental**, Canoas: Editora ULBRA, Edição Única, p. 281-307 (2003).

ANDRADE, H.H.R.; REGULY, M.L.; LEHMANN, M. *Drosophila* Cytogenetics Protocols. Edited by: D. S. Henderson. **Methods in Molecular Biology**, v. 247, p. 389-409 (2004).

ANDREONE, P.; GRAMENZI, A.; CURSARO, C.; BISELLI, M.; CAMMA, C.; TREVISANI, F.; BERNARDI, M. High risk of hepatocellular carcinoma in anti-HBe positive liver cirrhosis patients developing lamivudine resistance. **Journal of Viral Hepatitis**, v. 11, p. 439-442 (2004).

BISHOP, A. J. R. e SCHIESTL, R. H. Role of homologous recombination in carcinogenesis. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 74, p. 94-105 (2003).

BOSSI, P.; YVON, A.; MOUROUX, M. HURAU, J. M.; AGUT, H.; CALVEZ, V. Mutations in the human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase gene observed in stavudine and didanosine strains obtained by in vitro passages. **Res Virol**. v. 149, p. 355-361 (1998).

BRAMBILLA, G.; MATTIOLI, F.; ROBBIANO, L.; MARTELLI, A. Studies on genotoxicity and carcinogenicity of antibacterial, antiviral, antimalarial and antifungal drugs. **Mutagenesis**, p. 1–27 (2011).

BRAMBILLA, G.; MATTIOLI, F.; ROBBIANO, L.; MARTELLI, A. Update of carcinogenicity studies in animals and humans of 535 marketed pharmaceuticals. **Mutation Research**, v. 750, p. 1-51 (2012).

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Programa Nacional de DST e AIDS: Recomendações para Terapia Anti-retroviral em Adultos Infectados pelo HIV**. Brasília, 2008. 136 p.

BRENNER, B. G. e COUTSINOS, D. The K65R mutation in HIV-1 reverse transcriptase: genetic barriers, resistance profile and clinical implications. **HIV Ther.**, v. 6, n. 3, p. 583-594 (2009).

BUMPUS, N. N. Efavirenz and 8-hydroxyefavirenz induce cell death via a JNK- and BimEL-dependent mechanism in primary human hepatocytes. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 257, p. 227-234 (2011).

CHEMFINDER. Disponível em: (<<http://www.chemfinder.com/chembiofinder/Forms/Search/ContentArea/ChemBioVizSearch.aspx?FormGroupId=8&AppName=CHEMBIOFINDER&AllowFullSearch=true&KeepRecordCountSynchronized=false&SearchCriteriaId=6&SearchCriteriaValue=efavirenz&CurrentIndex=0>>. Acesso em: 04/07/2012 às 16:45 h. (a)

CHEMFINDER. Disponível em: (<<http://www.chemfinder.com/chembiofinder/Forms/Search/ContentArea/ChemBioVizSearch.aspx?FormGroupId=8&AppName=CHEMBIOFINDER&AllowFullSearch=true&KeepRecordCountSynchronized=false&SearchCriteriaId=6&SearchCriteriaValue=tenofovir+disoproxil+fumarate&CurrentIndex=0>>. Acesso em: 04/07/2012 às 16:42 h. (b)

DE CLERCQ, E. Anti-HIV drugs: 25 compounds approved within 25 years after the discovery of HIV. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 33, p. 307-320 (2009).

DE CLERCQ, E. e HOLY, A. Acyclic nucleoside phosphonates: a key class of antiviral drugs. **Nature Publishing Group**, v. 4, p. 928-940 (2005).

DE CLERCQ, E. Pre-exposure chemoprophylaxis of HIV infection: Quo vadis? **Biochemical Pharmacology**, v. 83, p. 567-573 (2012).

DELANEY, W. E.; RAY, A. S.; YANG, H; QI, X.; XIONG, S., ZHU, Y e MILLER, M. M. Intracellular metabolism and in vitro activity of tenofovir against hepatitis B virus. **Antimicrob Agents Chemother.** v.50, p. 2471 – 2477 (2006).

DÍAZ-DELFIN, J.; GUTIÉRREZ, M. del M.; GALLEGO-ESCUREDO, J. M.; DOMINGO, J. C.; MATEO, M. G.; VILLARROYA, F.; DOMINGO, P.; GIRALT, M. Effects of nevirapine and efavirenz on human adipocyte differentiation, gene expression, and release of adipokines and cytokines. **Antiviral Research**, v. 91, p. 112-119 (2011).

Disponível em: (<<http://dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/lookup.cfm?setid=33FD6418-FBDC-42CA-A50D-CE2A476A5418#nlm34089-3>>. Acesso em: 05/01/2012 às 14:05 h.

DUAN, C.; POTICHA, D.; STOECKLI, T. C.; PETROPOULOS, C. J.; WHITCOMB, J. M.; MCHENRY, C. S.; KURITZKES, D. R. Inhibition of Purified Recombinant Reverse Transcriptase from Wild-Type and Zidovudine-Resistant Clinical Isolates of Human Immunodeficiency Virus Type 1 by Zidovudine, Stavudine, and Lamivudine Triphosphates. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 184, p. 1336-1340 (2001).

DUARTE-ROJO, A. e HEATHCOTE, E. J. Efficacy and safety of tenofovir disoproxil fumarate in patients with chronic hepatitis B. **Therapeutic Advances in Gastroenterology**. v. 3, n. 2, p. 107-119 (2010).

ELFOLK, M.; NORLIN, M.; GYLLENSTEN, K.; WIKVALL, K. Regulation of Human Vitamin D3 25-Hydroxylases in Dermal Fibroblasts and Prostate Cancer LNCaP Cells. **Mol. Pharmacol.**, v. 75, p.1392–1399 (2009).

ENTESHAMI, M.; SCARTH, B. J.; TCHESNOKOV, E. P.; DASH, C.; GRICE, S. F. J. L.; HALLENBERGER, S.; JOCHMANS, D.; GOTTE, M. Mutations M184V and Y115F in HIV-1 Reverse Transcriptase Discriminate against “Nucleotide-competing Reverse Transcriptase Inhibitors”. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 283, p. 29904-29911 (2008).

FERREIRA, R. C. S.; RIFFEL, A.; SANT’ANA, A. E. G. HIV: mecanismo de replicação, alvos farmacológicos e inibição por produtos derivados de plantas. **Quim. Nova**, v. 33, n. 8, p. 1743-1755 (2010).

FRANCHI, L. P.; PENTIADO, N. H. G. R.; SILVA, R. N.; GUIMARÃES, N. N.; JESUÍNO, R. S. A.; ANDRADE, H. H. R. de; LEHMANN, M. e CUNHA, K. S. Mutagenic and recombinagenic effects of lamivudine and stavudine antiretrovirals in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Food and Chemical Toxicology**, (2009).

FREI, H. e WURGLER, F. E. Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assay indicate a positive, negative, or inconclusive result. **Mutation Research**, v. 203, p. 297-308 (1988).

FREI, H., CLEMENTS, J. HOWE, D. e WURGLER, F.E. The genotoxicity of the anti-cancer drug mitoxantrone in somatic and germ cells of *Drosophila melanogaster*. **Mutation Research/Genetic Toxicology**, v. 279, p. 21-33 (1992).

FRIEDRICH, A. e OLEJNICZAK, K. Evaluation of carcinogenicity studies of medicinal products for human use authorised via the European centralised procedure (1995–2009). **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 60, p. 225-248 (2011).

GOMEZ-SUCERQUIA, L. J.; BLAS-GARCIA, A. MARTI-CABRERA, M. ESPLUGUES, J. V.; APOSTOLOVA, N. Profile of stress and toxicity gene expression in human hepatic cells treated with Efavirenz. **Antiviral Research** (2012).

GOODMAN e GILMAN: As bases farmacológicas da terapêutica / [revisão de conteúdo Almir Lourenço da Fonseca], Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil, 2006.

GOUNDEN, V.; VAN NIEKERK, C.; SNYMAN, T.; GEORGE, J. A. Presence of the CYP2B6 516G> T polymorphism, increased plasma Efavirenz concentrations and early neuropsychiatric side effects in South African HIV-infected patients. **AIDS Research and Therapy**, v. 7, (2010).

GRAF, U.; WURGLER, F. E.; KATZ, A.J.; FREI, H.; JUON, H.; HALL, C.B.; KALE, P.G. Somatic Mutation and Recombination Test in *Drosophila melanogaster*. **Environmental Mutagenesis**, v. 6, p. 153-188 (1984).

GRIGSBY, I. F.; PHAMA, L.; MANSKYC, L. M.; GOPALAKRISHNAN, R.; CARLSON, E e MANSKYA, K. C. Tenofovir treatment of primary osteoblasts alters

gene expression profiles: implications for bone mineral density loss. **Biochem Biophys Res Commun.** v. 394, n. 1, p. 48–53 (2010) a.

GRIGSBY, I. F.; PHAMA, L.; GOPALAKRISHNAN, R.; MANSKYC, L. M. e MANSKYA, K. C. Downregulation of Gnas, Got2 and Snord32a following tenofovir exposure of primary osteoclasts. **Biochem Biophys Res Commun.** v. 391, n. 3, p. 1324–1329 (2010) b.

GUIMARÃES, N. N.; ANDRADE, H. H. R. de; LEHMANN, M.; DIHL, R. R. e CUNHA, K. S. The genetic toxicity effects of lamivudine and stavudine antiretroviral agents. **Expert Opin. Drug Saf.**, v. 9, n. 4, p. 1-11 (2010).

GUIMARÃES, N. N.; PEREIRA, K. C.; ANDRADE, H. H. R. de; LEHMANN, M. e CUNHA, K. S. Comparative Analysis of Genetic Toxicity of AZT and ddI Antiretrovirals in Somatic Cells of *Drosophila melanogaster*. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 49, p. 312-317 (2008).

HANAHAN, D. e WEINBERG, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, v. 144 (2011).

HANAHAN, D. e WEINBERG, R. A. The Hallmarks of Cancer. **Cell**, v. 100, p. 57–70 (2000).

IYIDOGAN, P. e ANDERSON, K. S. Understanding the molecular mechanism of sequence dependent Tenofovir removal by HIV-1 reverse transcriptase: Differences in primer binding site versus polypurine tract. **Antiviral Research** (2012).

JAMALUDDIN, M. S.; LIN, P. H.; YAO, Q.; CHEN, C. Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor efavirenz increases monolayer permeability of human coronary artery endothelial cells. **Atherosclerosis**, v. 208, p. 104-111 (2010).

JOHANSSON, M.; ROMPAY, A. R. V.; DEGRÈVE, B.; BALZARINI, J.; KARLSSON, A. Cloning and Characterization of the Multisubstrate Deoxyribonucleoside Kinase of *Drosophila melanogaster*. **The Journal of biological chemistry**, v. 274, p. 23814-23819 (1999).

JOHNSON, T. J.; GUPTA, K. M.; FABIAN, J.; ALBRIGHT, T. H. e KISER, P. F. Segmented polyurethane intravaginal rings for the sustained combined delivery of antiretroviral agents dapivirine and tenofovir. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 39, p. 203–212 (2010).

KASTENBAUM, M.A. e BOWMAN, K.O. Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies. **Mutation Research**, v. 9, p. 527–549 (1970).

LEE, H.; HANES, J; JOHNSON, K. A. Toxicity of Nucleoside Analogues Used to Treat AIDS and the Selectivity of the Mitochondrial DNA Polymerase. **Biochemistry**, v. 42, n. 50, p. 14712-14719 (2003).

LISÓN, L. C. F.; PEREIRA, L. M. F.; CHALA, S. R. Tasa de mutaciones genóticas y resistencia a antirretrovirales en un hospital general. **Farm Hosp.**, v. 35, n. 4, p. 191-196 (2011).

MIKLOS, G. L. G. e RUBIN, G. M. The Role of the Genome Project Review in Determining Gene Function: Insights from Model Organisms. **Cell**, v. 86, p. 521–529 (1996).

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Disponível em: <<http://www.aids.gov.br/pagina/aids-no-brasil>>. Acesso em: 04/07/2012 às 16:00h (2012a).

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Disponível em: <<http://www.aids.gov.br/pagina/o-que-e-aids>>. Acesso em: 04/07/2012 às 16:30h (2012b).

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Disponível em: < <http://www.aids.gov.br/pagina/quais-sao-os-antirretrovirais>> Acesso em: 04/07/2012 às 16:48h (2012c).

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Disponível em: <http://www.aids.gov.br/noticia/2012/brasil_renova_licenciamento_compulsorio_do_efavirenz>. Acesso em: 07/07/2012 às 15:32 h (2012d).

MUNCH-PETERSEN, B.; PISKUR, J.; SONDERGAAR, L. Four Deoxynucleoside Kinase Activities from *Drosophila melanogaster* Are Contained within a Single Monomeric Enzyme, a New Multifunctional Deoxynucleoside Kinase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 273, p. 3926-3931 (1998).

OGBURN, E. T.; JONES, D. R.; MASTERS, A. R.; XU, C.; GUO, Y. e DESTA, Z. Efavirenz Primary and Secondary Metabolism *In Vitro* and *In Vivo*: Identification of Novel Metabolic Pathways and Cytochrome P450 2A6 as the Principal Catalyst of Efavirenz 7-Hydroxylation. **Drug metabolism and disposition** . v. 38, n. 7, p.1218–1229 (2010).

PARIKH, U. M.; BACHELER, L.; KOONTZ, D.; MELLORS, J. W. The K65R Mutation in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Reverse Transcriptase Exhibits Bidirectional Phenotypic Antagonism with Thymidine Analog Mutations. **Journal of virology**, v. 80, p. 4971-4977 (2006).

PECANHA, E. P., ANTUNES, O. A., TANURI, A. Estratégias farmacológicas para a terapia anti-AIDS. **Química Nova**, v. 25, n. 6B, p.1108-1116 (2002).

PETER, K. & GAMBERTOGLIO, J. G. Intracellular phosphorylation of zidovudine (ZVD) and other nucleoside reverse transcriptase inhibitors (RTI) used for human immunodeficiency virus (HIV) infection. **Pharmaceutical Research**, v. 15, n. 6, p. 819-825 (1998).

PINEDA, J. A.; NEUKAM, K.; MALLOLAS, J.; LOPEZ-CORTES, L. F.; CARTÓN, J. A.; DOMINGO, P.; MORENO, S.; IRIBARREN, J. A. CLOTET, B.; CRESPO, M.; LOS SANTOS, I. de; ORTEGA, E.; KNOBEL, H.; JIMÉNEZ-EXPÓSITO, M. J. e MACÍAS, J. Hepatic safety of efavirenz in HIV/hepatitis C virus-coinfected patients with advanced liver fibrosis. **Journal of Infection**, v. 64, p. 204-211, (2012).

RAJU, N. A. e BEGON, S. Simultaneous RP-HPLC Method for the Estimation of the Emtricitabine, Tenofovir Disoproxil Fumarate and Efavirenz in Tablet Dosage Forms. **Research J. Pharm. and Tech.** v. 4, n.1, p. 522-525 (2008).

RAKHMANNINA, N. Y. e ANKER, J. N. Efavirenz in the Therapy of HIV Infection. **Expert Opin Drug Metab Toxicol.** v. 6, p. 95-103 (2010).

RE, M. C.; BON, I.; MONARI, P.; BORDERI, M.; GIBELLINI, D.; SCHIAVONE, P.; VITONE, F.; CHIODO, F.; LA PLACA, M. Mutation patterns of the reverse transcriptase genes in HIV-1 infected patients receiving combinations of nucleoside and non nucleoside inhibitors. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 22, p. 388-394 (2003).

RERKS-NGARM, S. PITISUTTITHUM, P.; NITAYAPHA, S.; KAEWKUNGWAL, J.; CHIU, J.; PARIS, R.; PREMSRI, N.; NANWAT, C.; SOUZA, M. de; ADAMS, E.; BENENSON, M.; GURUTHA, S.; TARTAGLIA, J.; MCNEIL, J. G.; FRANCIS, D. P.; STABLEIN, D.; BIRX, D. L.; CHUNSUTTIWAT, S.; KHAMBOONRUANG, C.; THONGCHAROEN, P.; ROBB, M. L.; MICHAEL, N. L.; KUNASOL, P.; KIM, J. H. Vaccination with ALVAC and AIDSVAX to Prevent HIV-1 Infection in Thailand. **N Engl J Med**, v. 361, p. 2209-2220 (2009).

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

RICHMAN, D. D.; MARGOLIS, D. M.; DELANEY, M.; GREENE, W. C.; HAZUDA, D.; POMERANTZ, R. J. The Challenge of Finding a Cure for HIV Infection. **Science**, v. 323, p. 1304-1307 (2009).

SOLAROLI, N.; BJERKE, M.; AMIRI, M. H.; JOHANSSON, M.; KARLSSON, A. Active site mutants of *Drosophila melanogaster* multisubstrate deoxyribonucleoside kinase. **Eur. J. Biochem.**, v. 270, p. 2879–2884 (2003).

ST. JOHN, M. A. R. e XU, T. INSIGHTS FROM MODEL SYSTEMS - Understanding Human Cancer in a Fly? **Am. J. Hum. Genet.**, v. 61, p. 1006–1010 (1997).

Sustiva® Prescribing Information. Bristol-Myers Squibb Company. March (2009). Disponível em: <http://packageinserts.bms.com/pi/pi_sustiva.pdf>. Acesso em: 04/07/2012 às 17:03 h.

TURNER, D.; BRENNER, B.; WAINBERG, M. A. Relationships among various nucleoside resistance-conferring mutations in the reverse transcriptase of HIV-1. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 53, p. 53-57 (2004).

VRIES-SLUIJS, T. E. M. S. de; REIJNDERS, J. G. P.; HANSEN, B. E.; ZAAIJER, H. L.; PRINS, J. M.; PAS, S. D.; SCHUTTEN, M.; HOEPELMAN, A. I. M.; RICHTER, C.; MULDER, J. W.; MAN, R. A. de; JANSSEN, H. L. A. e ENDE, M. E. C. D. Long-term Therapy With Tenofovir Is Effective for Patients Co-Infected With Human Immunodeficiency Virus and Hepatitis B Virus. **Gastroenterology**, v. 139, p. 1934-1941 (2010).

WALKER, D. M.; KAJON, A. E.; TORRES, S. M.; CARTER, M. M.; MCCASH, C. L.; SWENBERG, J. A.; UPTON, P. B.; HARDY, A. W.; OLIVERO, O. A.; SHEARER, G. M.; POIRIER, M. C.; WLAKER, V. E. WR1065 Mitigates AZT-ddI-Induced Mutagenesis and Inhibits Viral Replication. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 50, p. 460-472 (2009).

WINSTON, A.; AMIN, J.; MALLON, P. W. G.; MARRIOTT, D.; CARR, A.; COOPER, D. A.; EMERY, S. Minor changes in calculated creatinine clearance and anion-gap are associated with tenofovir disoproxil fumarate-containing highly active antiretroviral therapy. **HIV Medicine**, v. 7, p. 105-111 (2010).

WU, K. M.; POWLEY, M. W. e GHANTOUS, H. Timing of carcinogenicity studies and predictability of genotoxicity for tumorigenicity in anti-HIV drug development. **International Journal of Toxicology**, v. 31, n.3, p. 211-221 (2012).

9. ANEXOS

9.1. Comprovante de submissão do *paper*

16-Dec-2012

Dear Mr. de Moraes Filho,

A manuscript titled Genetic toxicity evaluation of efavirenz (EFV) and tenofovir disoproxil fumarate (TDF) in somatic cells of *Drosophila melanogaster in vivo* (Mutage-12-197) has been submitted by Dr. Kenya Cunha to Mutagenesis. You are listed as a co-author for this manuscript. The online peer-review system, Manuscript Central, automatically creates a user account for you. Your USER ID and PASSWORD for your account is as follows:

Site URL: <http://mc.manuscriptcentral.com/mutage>

USER ID: aroldodemoraes@gmail.com

To enter your account, please do the following:

1. Go to: <http://mc.manuscriptcentral.com/mutage>
2. Log in using this information:

Your USER ID is aroldodemoraes@gmail.com

Your case-sensitive PASSWORD is *****

You can use the above USER ID and PASSWORD to log in to the site and check the status of papers you have authored/co-authored. This password is case-sensitive and temporary. Please log in to <http://mc.manuscriptcentral.com/mutage> to update your account information and change your password.

Thank you for your participation.

Yours sincerely,

Rosemary Wilkinson

Mutagenesis Editorial Office

9.2. *Paper submetido*

Genetic toxicity evaluation of efavirenz (EFV) and tenofovir disoproxil fumarate (TDF) in somatic cells of *Drosophila melanogaster in vivo*

A. V. de Moraes Filho¹; H. H. R. de Andrade², R. R. Dihl³, M. Lehmann³ and K. S. Cunha^{1*}

¹ Laboratório de Genética Toxicológica, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Campus Samambaia, Universidade Federal de Goiás (UFG), Caixa Postal 131, CEP 74001-970, Goiânia –GO – Brasil.

² Laboratório de Estomatologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil.

³ Laboratório da Toxicidade Genética, Universidade Luterana do Brasil (ULBRA), Canoas, RS, Brasil.

*Corresponding to kenya@icb.ufg.br

ABSTRACT

This study focused in two antiretrovirals: efavirenz (EFV), a non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors and tenofovir disoproxil fumarate (TDF), an oral prodrug of tenofovir that is analogue of adenosine 5'-monophosphate, belonging to the class of nucleotide reverse transcriptase inhibitors. These two compounds act on the mechanisms of HIV replication, inhibiting the action of reverse transcriptase and thus preventing viral DNA synthesis. In order to assess the toxic and toxic genetic potential of EFV and TDF, the present study used the Somatic Mutation and Recombination Test (SMART) in *Drosophila melanogaster*. Third-stage larvae originating from standard cross (ST) between mwh males and flr³ females, were treated for approximately 48 h (chronic treatment). These strains have specific marker genes, located on the left arm of chromosome 3, which allow the detection of events related to gene mutation, chromosomal aberrations and mitotic recombination. The larvae were distributed into two tubes for each treatment, including the negative control. To establish the survival curve, we fixed the number of flies (100 larvae) per tube per treatment and after eclosion the adults were counted. To proceed the toxic genetic analyses the wings of adults were mounted on slides to quantify the spots of mutant hairs. The negative control frequencies of mutant spots were compared with the frequency of clones induced in treated flies, using the conditional binomial test (U-test). The results indicated that the EFV was toxic in high concentrations and did not show induction of genetic toxicity. Inversely, TDF did not show toxicity in the concentrations tested, but induced genetic toxicity at all concentrations, with prevalence of recombinogenic events.

Keywords: SMART, mutagenic, recombinogenic.

Introduction

Antiretroviral drugs prevent the multiplication of human immunodeficiency virus (HIV), reducing its virulence without eliminating it from infected cells. Therefore, the use of these medicines has become critical to increase the length and quality of life of aids patients, to avoid depressing of immune system and to reduce the risk of appearance of "opportunistic diseases" (1,2).

Efavirenz (EFV) is one of the preferred components of the system of first-line treatment of HIV infection worldwide and belongs to first-generation of non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTI). Taking into account the increase in access to antiretroviral therapy, the potential exposure of the world population to EFV is expressive (3). However, EFV can cause hepatocellular adenomas and carcinomas and pulmonary alveolar/bronchiolar adenomas in female mice, but not in male mice (4).

Tenofovir disoproxil fumarate (TDF) is the oral prodrug of tenofovir, belonging to the class of nucleotide reverse transcriptase inhibitors. This compound has antiviral activity against hepatitis B virus (HBV) and HIV (5). Tenofovir is analogue of adenosine 5'-monophosphate, and has the potential to inhibit the action of DNA polymerase of HBV and HIV, competing with the natural substrate and interrupting the DNA chain elongation, stopping the replication of the viral genome. TDF has a cytotoxicity profile favorable to be a very weak inhibitor of DNA polymerases α and β in mammals and mitochondrial DNA polymerase (5-7). Carcinogenicity studies in animals showed that TDF can cause hepatic adenomas in female mice when administered in high doses (4).

Some processes are demonstrably related to carcinogenesis, especially: (i) mutations, either in replication damage or deficiencies in repair mechanism and (ii) homologous recombination (HR), due to loss of heterozygosity (LOH) of genes involved in cell cycle regulation (8).

In order to assess the toxic and toxic genetic potential of EFV and TDF, the present study used the Somatic Mutation and Recombination Test (SMART) (9,10).

Material and methods

Antiretroviral agents

Medicines VIREAD[®] and ESTIVA-600[®] were used in this study. Each tablet of ESTIVA-600 contains 600 mg of EFV (CAS 154598-52-4), (4S)-6-Chloro-4-(cyclopropylethynyl)-1,4-dihydro-4-(trifluoromethyl)-2H-3,1-benzoxazin-2-one and each tablet of VIREAD[®] contains 300 mg of TDF (CAS 202138-50-9) 9-((R)-2-((Bis (((isopropoxycarbonyl) oxy) methoxy) phosphinyl) methoxy) propyl) adenine fumarate (Figure 1).

Solutions and dilutions were prepared immediately before use. In all experiments, the solvent (distilled water) was used as negative control.

Somatic Mutation And Recombination Test (SMART)

SMART investigate the occurrence of DNA lesions, through analysis and quantification of mutant hairs present on the wings of *Drosophila melanogaster*. These alterations occur in the larval cells of imaginal discs that, by successive mitotic divisions, give rise to adult wing, causing LOH of two markers genes involved in the wing hair metabolism: *mwh* and *flr³* (9,10). The wild type gene produces a hair per cell while *mwh* originates multiple hairs per cell and *flr³* produces a hair with a flame shape. Both mutant expressions indicate the occurrence of mutational and/or recombination events. In the present study, we used strains with the following genotypes: (i) **flr³**- *flr³/In(3LR)TM3,rip^p sep l(3)89Aa bx^{34e} e Bd^S* and (ii) **mwh** - *mwh/mwh*. These strains are carriers of specific marker genes, located on the left arm

of chromosome 3, which allow monitoring events related to point mutation, chromosomal aberrations and mitotic recombination (9,10).

Experimental procedure

Third-stage larvae originated from standard cross (ST) between *mwh* males and *flr*³ females, were distributed in tubes containing 0.9 g of synthetic medium and 3 mL of treatment solution and distilled water (negative control), and remained for approximately 48 h (chronic treatment). The larvae were divided into two tubes for each treatment, including the negative control. In one tubes were placed 100 larvae and emerging adults were counted for analyses of survival rates. The adults were preserved in 70% ethanol for subsequent preparation of the slides.

The adults obtained from ST cross have two genotypic constitutions: (i) MH - trans-heterozygous (*mwh*^{+/+}*flr*³) for the recessive markers *mwh* and *flr*³, and (ii) BH - heterozygous for the balancer chromosome TM3 (*mwh*^{+/TM3}, *Bd*^S). The chromosome TM3 is essential to maintain the heterozygosity of *flr*³ gene in parental strain. This chromosome has multiple inversions that exclude recombination products. Thus, BH individuals express only point mutations and chromosomal aberrations. The ratio between mutant spots in MH and BH progeny allows evaluating the recombinogenic potential of compounds. The marker gene *Bd*^S determines a shape of the wings of adult flies allowing the differentiation between MH and BH flies (9,10).

Mutant spots scoring

The mutants hairs occur in spots or clones with characteristic phenotypes. These spots were classified into: single spots (only *mwh* or *flr*³ phenotypes) caused by point mutation, chromosomal alterations or mitotic recombination and twin spots (*mwh* and *flr*³ phenotypes

simultaneously) indicating, exclusively, the occurrence of mitotic recombination. Single spots were divided into small (one or two mutant cells) and large (three or more mutant cells). The total number of clones induced in a treated group provides quantitative data about the genetic toxicity activity of the compound (10).

Statistical analysis

Frequencies of each mutant spot per individual exposed to the different concentrations of EFV and TDF were compared with frequencies observed in respective negative controls. The statistical diagnosis was obtained by conditional binomial test of Kastenbaum and Bowman (11), according to the multiple decision proposed by Frei and Wurgler (12), resulting in four possible diagnoses: positive, negative, inconclusive and weakly positive.

Results

Toxic effects

To establish the toxic effects of EFV and TDF, a pilot experiment was carried out and the results are showing in Figure 2 and 3. In the three highest concentrations of EFV (25, 50 and 100 mg/mL) the number of survival adults was lower than 30% compared to controls (Figure 2) so all these concentrations were not used for analysis of genetic toxicity. Also the larvae exposed to 12,5 mg/mL of EFV could not be analysed, since the number of surviving flies was too low. In the toxicity analysis of TDF, the number of survival adults flies was higher than 97% at all concentrations (Figure 3), and only the four highest TDF concentrations (1.25, 2.5, 5.0 and 10.0 mg / mL) were used in genetic toxicity analysis.

Genetic toxicity

After the establishment of drugs concentrations, we proceed the analysis of induction of mutation and/or recombination. The data collected in the SMART with ST cross offspring

treated with EFV and TDF are shown in Tables 1 and 2, respectively. Results obtained for negative controls were within expected values (9,10).

Absence of significant increase (-) in small single spots and in total spots was observed in MH individuals treated with all EFV concentrations when compared with the respective negative controls. Inconclusive (i) results showing in large single and twin spots for the EFV highest concentrations had no influence in the negative results observed in total spots (Table 1).

→

Table 2 shows the data obtained by analysis of the individuals treated with TDF. In all concentrations TDF was able to promote DNA damage, indicated by dose-response increase in total spots frequencies mutants in MH individuals, inferring that the TDF is capable to produce genetic toxicity induced by mutational and/or recombinational events. The frequency of induction of small single spots was higher compared to other types of spots (Figure 4), suggesting that the compound induced genetic damages only in the later stages of larval development.

→

As TDF induced genetic toxicity in MH flies, we analyzed the BH flies in order to quantify the contribution of recombinogenic events. The analysis showed that the frequencies of induced spots are too close to the values found in the negative control. So no statically significant difference was observed between treated series and negative control. These results characterize the absence of mutation induced by TDF.

In sequence, we calculated the recombinogenic potential of TDF comparing the results of clone induction frequencies obtained in MH and BH progenies. In all concentrations the recombination contribution in total toxic genetic events induced were almost 100%. These

data indicate that TDF is an predominantly recombinagenic drug although does not able to induce toxic effects in SMART assay.

Discussion

SMART allows us to evaluate simultaneously two process especially related to carcinogenesis: mutation and homologue recombination (9,10). Furthermore, the enzyme desoxyribonucleoside kinase (Dm-DNK) of *D. melanogaster* has similarities with enzymes of mammalian cells, specially with human mitochondrial thymidine kinase 2 with which it shares many substrates (13-15). Dm-DNK enzymes are involved in phosphorylation of natural desoxyribonucleosides.

Here we evaluate the mutagenic and recombinogenic effects of EFV and the results indicated that this compound was toxic at higher concentrations (12.5, 25 and 50 mg/mL) and showed no induction of toxic genetic events. Our toxicity results corroborate the study of Díaz-Delfín et al., (16), showing that at low concentrations (0.5 and 4 μ M) EFV was not significantly cytotoxic, but at 20 μ M caused extensive cell death of adipocytes in cell cultures.

Despite low rates of toxicity of many antiretroviral regimens, the accumulation of effects over decades of treatment is controversial and not properly established (17). Adjene and Igbigbi (18) suggested that administration of EFV for long period of time showed toxic effects on the inferior colliculus cells of Wistar rats observed as a decreasing in cell number probably due to cell death induced by EFV.

However, Bumpus (19) incubated human hepatocytes with EFV and 8-hidroxyefavirenz (8-OHEFV), the main EFV metabolite and showed cell death, caspase-3 activation, formation of reactive oxygen species, stimulation of phosphorylation of JNK signaling pathway and stimulated the expression of isoform proapoptotic protein Bim (bcl-2, a mediator of cell

death). The data suggest that the oxidative metabolite 8-OHEFV is a more potent inducer of hepatic cell death than the original compound of EFV.

In review studies about genotoxicity and carcinogenicity of various antibacterial, antiviral, antimalarial and antifungal drugs of frequent use and long duration conducted by Brambilla et al. (20) and Wu et al. (4), EFV showed no genotoxic effects *in vitro* and *in vivo* using different organisms or cell cultures (*Salmonella typhimurium* for reverse mutation; *Escherichia coli* for reverse mutation and bacterial mutagenicity – Ames test; ovarian cells of Chinese hamster for gene mutation and chromosomal aberrations; mice for micronucleus test; mammalian cell for chromosomal aberration and gene mutation; and human lymphocytes for chromosomal aberrations). The absence of toxic genetic effects of EFV was confirmed in our results.

Here we demonstrated that while EFV induced toxicity and absence of damages in DNA, TDF showed no toxicity, but was almost predominantly recombinogenic at all concentrations analyzed.

Brambilla et al. (21) performed a review about carcinogenicity of drugs. According to the guidelines for carcinogenicity testing of pharmaceuticals, a carcinogenicity study in the short (test for gene mutation in bacteria – Ames test for example), medium (*in vitro* test with cytogenetic evaluation of chromosomal damage with mammalian cells or mouse lymphoma tk assay that can detect both gene mutation and chromosomal damage) and long term using *in vivo* systems should be performed for all pharmaceuticals (test for chromosomal damage using rodent hematopoietic cells, for example). In this review, EFV shows any effects in all tests of long-term carcinogenesis assay (liver and lung tumours in female mice), whereas tenofovir showed positive results in the assay of carcinogenesis long-term in female mice. According to Brambilla et al. (20), although not show positive genotoxicity in *S. typhimurim* and mice (micronucleus), tenofovir was genotoxic in cell line L5178Y mouse lymphoma. In a

review study conducted by Wu et al. (4) tenofovir was genotoxic when tested in mammalian cell cultures. Our results about genetic toxicity using *Drosophila melanogaster in vivo* corroborate this data.

In a review including data about carcinogenicity effects induced by drugs for human use authorized in Europe between 1995 and 2009, Friedrich and Olejniczak (22) showed that EFV was not reported as a genotoxic drug and was negative for carcinogenicity in rats, but was carcinogenic to mice. In contrast, TDF was reported as genotoxic and carcinogenic to rats and mice, and was related with lipoma, uterine polyps, duodenal tumors hepatic adenoma in mice, presenting therefore, carcinogenic risk to humans.

In our study, we evaluate the toxic and toxic genetic effect of EFV and TDF and the results indicated that the EFV was toxic in high concentrations (12.5, 25 and 50mg/mL) and showed no induction of toxic genetic events. Inversely, TDF showed no toxicity at the concentrations tested, but was able to induce toxic genetic events at all concentrations, with a prevalence of recombinogenic events. We considered that homologues recombination is an important parameter to be considering in the evaluation of the carcinogenic risk/benefit and should be performed before a medicine prescription.

Funding

This study was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Acknowledgements

The drugs tested were donated by Hospital de Doenças Tropicais Dr. Anuar Auad.

References

1. DeClercq, E. (2009) Anti-HIV drugs: 25 compounds approved within 25 years after the discovery of HIV. *International Journal of Antimicrobial Agents*, **33**, 307–320.
2. Broder, S. (2010) The development of antiretroviral therapy and its impact on the -1/AIDS pandemic. *Antiviral Research*, **85**, 1-18.

3. Rakhmanina, N. Y. and Anker, J. N. (2010) Efavirenz in the Therapy of HIV Infection. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.*, **6**, 95-103.
4. Wu, K. M.; Powley, M. W. and Ghantous, H. (2012) Timing of carcinogenicity studies and predictability of genotoxicity for tumorigenicity in anti-HIV drug development. *International Journal of Toxicology*, **31**, 211-221.
5. Delaney, W. E.; Ray, A. S.; Yang, H; Qi, X.; Xiong, S., Zhu, Y and Miller, M. M. (2006) Intracellular metabolism and in vitro activity of tenofovir against hepatitis B virus. *Antimicrob Agents Chemother.*, **50**, 2471 – 2477.
6. DeClercq, E. and Holý, A. (2005) Acyclic nucleoside phosphonates: a key class of antiviral drugs. *Nature Publishing Group*, **4**, 928-940.
7. Lee, H.; Hanes, J and Johnson, K. A. (2003) Toxicity of Nucleoside Analogues Used to Treat AIDS and the Selectivity of the Mitochondrial DNA Polymerase[†]. *Biochemistry*, **42**, 14712-14719.
8. Bishop, A. J. R. and Schiestl, R. H. (2003) Role of homologous recombination in carcinogenesis. *Experimental and Molecular Pathology*, **74**, 94-105.
9. Graf, U.; Wurgler, F.E.; Katz, A.J.; Frei, H.; Juon, H.; Hall, C.B. and Kale, P.G. (1984) Somatic Mutation and Recombination Test in *Drosophila melanogaster*. *Environmental Mutagenesis*, **6**, 153-188 (1984).
10. Andrade, H.H.R.; Reguly, M.L. and Lehmann, M. (2004) *Drosophila* Cytogenetics Protocols. Edited by: D. S. Henderson. *Methods in Molecular Biology*, **247**, 389-409.
11. Kastenbaum, M.A. and Bowman, K.O. (1970) Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies. *Mutation Research*, **9**, 527–549.
12. Frei, H. and Wurgler, F. E. (1988) Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assay indicate a positive, negative, or inconclusive result. *Mutation Research*, **203**, 297-308.
13. Munch-Petersen, B.; Piskur, J. and Sondergaard, L. (1998) Four Deoxynucleoside Kinase Activities from *Drosophila melanogaster* Are Contained within a Single Monomeric Enzyme, a New Multifunctional Deoxynucleoside Kinase. *The Journal of Biological Chemistry*, **273**, 3926-3931.
14. Johansson, M.; Rompay, A. R. V.; Degève, B.; Balzarini, J. and Karlsson, A. (1999) Cloning and Characterization of the Multisubstrate Deoxyribonucleoside Kinase of *Drosophila melanogaster*. *The Journal of biological chemistry*, **274**, 23814-23819.
15. Solaroli, N.; Bjerke, M.; Amiri, M. H.; Johansson, M. and Karlsson, A. (2003) Active site mutants of *Drosophila melanogaster* multisubstrate deoxyribonucleoside kinase. *Eur. J. Biochem.*, **270**, 2879–2884.
16. Díaz-Delfín, J.; Gutiérrez, M. del M.; Gallego-Escuredo, J. M.; Domingo, J. C.; Mateo, M. G.; Villarroya, F.; Domingo, P. and Giralt, M. (2011) Effects of nevirapine and efavirenz on

human adipocyte differentiation, gene expression, and release of adipokines and cytokines. *Antiviral Research*, **91**, 112-119.

17. Richman, D. D.; Margolis, D. M.; Delaney, M.; Greene, W. C.; Hazuda, D. and Pomerantz, R. J. (2009) The Challenge of Finding a Cure for HIV Infection. *Science*, **323**, 1304-1307.
18. Adjene, J. O. and Igbigbi, P. S. (2010) Effects of Chronic Administration of Efavirenz on the Inferior Colliculus of Adult Wistar Rats. *Fooyin J Health Sci*, **2**, 105–108.
19. Bumpus, N. N. (2011) Efavirenz and 8-hydroxyefavirenz induce cell death via a JNK- and BimEL-dependent mechanism in primary human hepatocytes. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **257**, 227-234.
20. Bambilla, G.; Mattioli, F.; Robbiano, L. and Martelli, A. (2011) Studies on genotoxicity and carcinogenicity of antibacterial, antiviral, antimalarial and antifungal drugs. *Mutagenesis*, 1–27.
21. Brambilla, G.; Mattioli, F.; Robbiano, L. and Martelli, A. (2012) Update of carcinogenicity studies in animals and humans of 535 marketed pharmaceuticals. *Mutation Research*, **750**, 1-51.
22. Friedrich, A. and Olejniczak, K. Evaluation of carcinogenicity studies of medicinal products for human use authorised via the European centralised procedure (1995–2009). (2011) *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, **60**, 225-248.
23. Chemfinder. Available in:
(<http://www.chemfinder.com/chembiofinder/Forms/Search/ContentArea/ChemBioVizSearch.aspx?FormGroupId=8&AppName=CHEMBIOFINDER&AllowFullSearch=true&KeepRecordCountSynchronized=false&SearchCriteriaId=6&SearchCriteriaValue=efavirenz&CurrentIndex=0>). Access: 04/07/2012 to 16:45 h. (a)
24. Chemfinder. Available in:
(<http://www.chemfinder.com/chembiofinder/Forms/Search/ContentArea/ChemBioVizSearch.aspx?FormGroupId=8&AppName=CHEMBIOFINDER&AllowFullSearch=true&KeepRecordCountSynchronized=false&SearchCriteriaId=6&SearchCriteriaValue=tenofovir+disoproxil+fumarate&CurrentIndex=0>). Access: 04/07/2012 to 16:42 h. (b)
25. Frei, H., Clements, J. Howe, D. and Wurgler, F.E. (1992) The genotoxicity of the anti-cancer drug mitoxantrone in somatic and germ cells of *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, **279**, 21-33.

TABLE I

<u>Spots per fly (no. of spots) statistical diagnosis^a</u>					
Compound and Genotype	No. of flies	Small single spots	Large single spots	Twin spots	Total spots
(mg.mL ⁻¹)	(N)	(1-2 cells) ^b m = 2	(> 2 cells) ^b m = 5	m = 5	m = 2
EFV					
<i>mwh/flr³</i>					
Neg. Control	60	0.50 (30)	0.07 (04)	0.02 (01)	0.58 (35)
0.78125	60	0.47 (28) -	0.07 (04) i	0.00 (00) i	0.53 (32) -
1.5625	60	0.47 (28) -	0.02 (01) -	0.00 (00) i	0.48 (29) -
3.125	60	0.38 (23) -	0.08 (05) i	0.03 (02) i	0.50 (30) -
6.25	60	0.53 (32) -	0.03 (02) i	0.07 (04) i	0.63 (38) -

^a Statistical diagnosis according Frei and Würzler (12): +, positive; -, negative; i, inconclusive. *m*, multiplication factor for evaluation of significantly negative results. Levels of significance a = b = 0.05. ^b Including rare single spots *flr³*.

TABLE II

Evaluation of the mutagenic and/or recombinogenic effects of the tenofovir disoproxil fumarate (TDF) in somatic cells larvae proceeding from standard cross

Compound and Genotype (mg.mL ⁻¹)	No. of flies (N)	Spots per fly (no. of spots) statistical diagnosis ^a				Total <i>mwh</i> clones ^c (n)	Clone induction frequencies (per 10 ⁵ cells per cell division) ^d n/NC ^e		Recombination (%) ^g
		Small single spots (1-2 cells) ^b m = 2	Large single spots (> 2 cells) ^b m = 5	Twin spots m = 5	Total spots m = 2		Observed	Corrected for control	
TDF									
<i>mwh/flr³</i>									
Negative Control	40	0.55 (22)	0.05 (02)	0.10 (04)	0.70 (28)	28	1.43		
1.25	40	0.95 (38) +	0.10 (04) i	0.10 (04) i	1.15 (46) +	46	2.36	0.92	150
2.5	40	0.73 (29) i	0.35 (14) +	0.15 (06) i	1.23 (49) +	48	2.46	1.02	140.20
5	40	1.08 (43) +	0.48 (19) +	0.33 (13) +	1.88 (75) +	75	3.84	2.41	104.15
10	40	1.78 (71) +	1.03 (41) +	0.75 (30) +	3.55 (142)+	134	6.86	5.43	96.32
<i>mwh/TM3</i>									
Negative Control	40	0.63 (25)	0.00 (00)		0.63 (25)	25	1.28		
1.25	40	0.38 (15) -	0.03 (01) i	f	0.40 (16) -	16	0.82	- 0.46	
2.5	40	0.43 (17) -	0.00 (00) i		0.43 (17) -	17	0.87	- 0.41	
5	40	0.53 (21) -	0.05 (02) i		0.58 (23) -	23	1.18	- 0.10	
10	40	0.65 (26) -	0.08 (03) i		0.73 (29) -	29	1.49	- 0.20	

^a Statistical diagnosis according to Frei and Würigler (12): +, positive; -, negative; i, inconclusive. *m*, multiplication factor for the evaluation of significantly negative results. Levels of significance $\alpha = \beta = 0.05$. ^b Including rare single spots *flr³*. ^c Considering *mwh* clones from *mwh* single and twin spots. ^d Calculated according to Frei et al. (25). ^e $C = 48,000$, that is, approximated number of cells examined per fly. ^f Only *mwh* single spots can be observed in *mwh/TM3* heterozygotes as the balancer chromosome *TM3* does not carry the *flr3* mutation. ^g Recombination percent calculated according to $R = 1 - [(n/NC \text{ } mwh/TM3)/(n/NC \text{ } mwh/flr^3)] * 100$.

Figures:

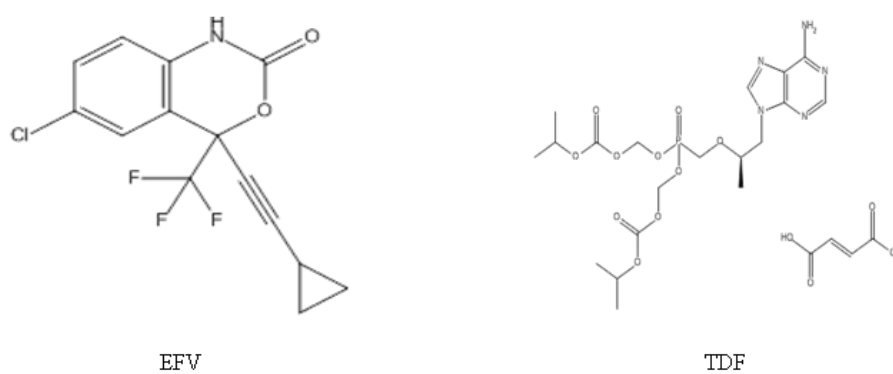


Fig. 1. Chemical structure of the EFV and TDF. According to Chemfinder (23,24)

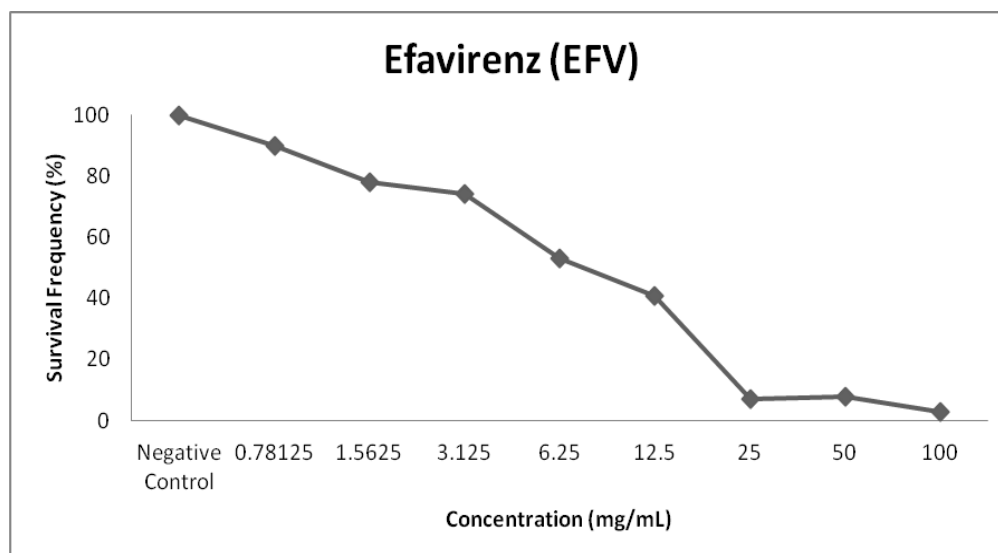


Fig. 2. Toxic effects of EFV

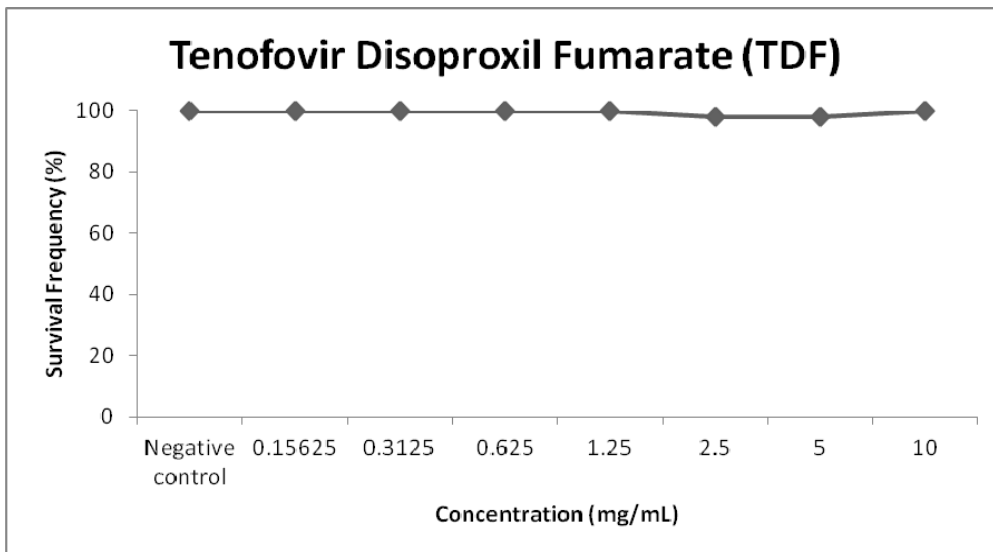


Fig. 3. Toxic effects of TDF

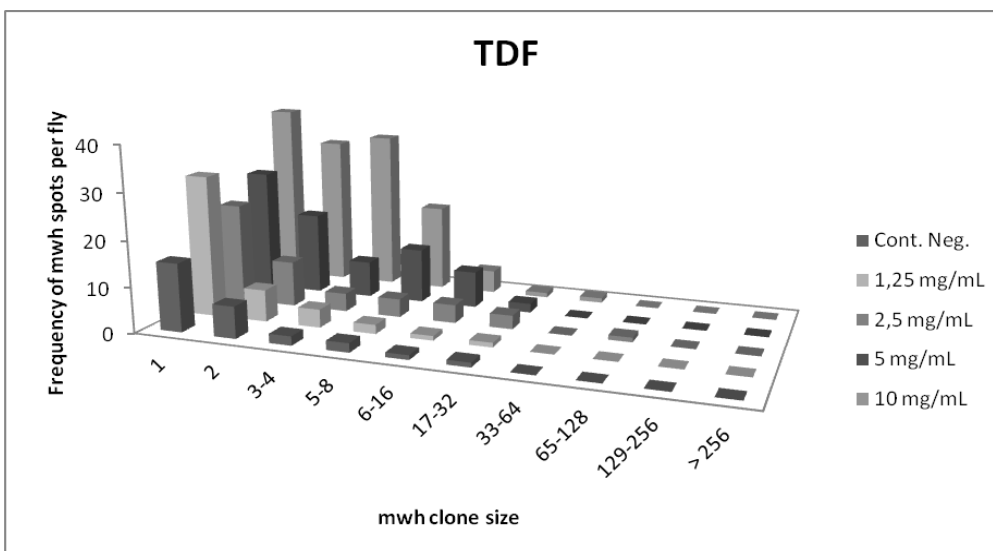


Fig. 4. Frequency of mwh spots per class