

13ª JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

GENÉTICA

AVALIAÇÃO DA MUTAGENICIDADE DE INIBIDORES DA TIROSINA CINASE ANÁLOGOS DO IMATINIBE

¹Guilherme Henriques de Araujo Chaves (IC-UNIRIO); ¹Mariana Marques da Costa Lima; ^{1,2}Carlos Fernando Araujo Lima (Mestrado-FAPERJ Nota 10); ²Ismar Felzenszwalb; ³Monica Macedo Bastos; ³Núbia Boechat; ¹Claudia Alessandra Fortes Aiub (Orientadora).

¹Laboratório de Genotoxicidade, Departamento de Genética e Biologia Molecular; Instituto Biomédico; Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro.

²Laboratório de Mutagênese Ambiental, Departamento de Biofísica e Biometria; Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes; Universidade do Estado do Rio de Janeiro

³Departamento de Síntese Orgânica, FarManguinhos, Fundação Oswaldo Cruz.

Apoio Financeiro: FAPERJ, CNPq, UNIRIO, UERJ

Palavras-chave: Mutagenicidade, citotoxicidade, Quimioterapia experimental, antileucêmico

INTRODUÇÃO

A leucemia mielóide crônica é uma doença com intensa proliferação do tecido hematopoiético, células indiferenciadas, chamadas blastos, começam a dividir-se anormalmente e acumulam-se na medula óssea. Desta forma tem-se uma produção insuficiente de eritrócitos, que começam a ser liberados na corrente sanguínea, ainda imaturos. Não se tem registros de causas prováveis que levem ao desenvolvimento da leucemia mielóide aguda, contudo está frequentemente associada à anemia, deficiência plaquetária e comprometimento do sistema imune (S.L.R. Martins, R.P. Falcão, 2000).

O diagnóstico clínico da doença é feito através da análise de amostras provenientes do sangue e medula óssea, buscando-se identificar ao microscópio os blastos. Os pacientes também são submetidos à imunofenotipagem e citogenética, esta última analisa numérica e morfológicamente os cromossomos do paciente (N. Hamerschlak, 2008).

Na tentativa de reduzir a proliferação anormal causada pela doença, alguns medicamentos com capacidade inibitória da tirosina-quinase BCR-Abl-1 são utilizadas, por serem capazes de inibir a proliferação e induzir apoptose em linhagens celulares BCR-Abl+ bem como em células leucêmicas jovens de pacientes com LMC cromossomo Philadelphia positivo (Ph+) e leucemia linfoblástica aguda (LLA).

A partir da década de 1950 a utilização de drogas citotóxicas tornou-se cada vez mais comum no tratamento de câncer. Contudo uma série de efeitos secundários trazem preocupações, como alguns tipos de câncer secundários e até mesmo alterações mutagênicas, gerando infertilidade ou até mesmo má formação em crianças com pais que tenham histórico de câncer. Por essa razão torna-se extremamente importante a realização de ensaios de mutagenicidade em toda droga, antes que esta seja disponibilizada à população.

OBJETIVO

Avaliar a mutagenicidade e citotoxicidade de drogas antineoplásicas, análogos do imatinibe, capazes de inibir seletivamente a atividade de tirosina cinase de BCR-Abl-1.

METODOLOGIA

As moléculas TMINA e TMFAP foram sintetizadas no departamento de síntese orgânica da FarManguinhos/FIOCRUZ e avaliados quanto a sua atividade antileucêmica frente às linhagens celulares K562 (susceptível à Vincristina) e LUCENA (resistente à Vincristina). Foram realizados o teste qualitativo de citotoxicidade o ensaio de Ames. Para o teste qualitativo de citotoxicidade, as linhagens bacterianas de Salmonella entérica sarovar Typhimurium (TA97, TA98, TA100, TA102 e TA1535) cresceram por cerca de 18 horas em meio líquido LB, acrescido de ampicilina para linhagens TA97, TA98 e TA100 e tetraciclina apenas para a linhagem TA102, à 37°C, 150 rpm. Na realização do ensaio, tubos de ensaio contendo 500 µL de solução tampão fosfato de sódio (0,2 M pH 7,4) são acrescidos de 100 µL da suspensão bacteriana. A estes foram adicionados 2ml de ágar de superfície (Top Agar) e vertida em placas de petri contendo ágar LB. Em seguida, 10 µL de cada concentração (0,1; 1; 10; 100; 1000 µM) das drogas TMINA e TMFAP, assim como os respectivos controles negativos e positivos foram colocados no centro da placa. As placas foram mantidas em estufa de crescimento bacteriano por 24 horas a 37°C e então foram analisadas. As concentrações das amostras foram consideradas citotóxicas quando foi possível observar a formação de um halo de inibição ao redor da aplicação da amostra. Para o ensaio de Ames, incubou-se, em tubos de ensaio, 100 µL das cepas TA98 e TA100, com 100 µL com cinco concentrações (0,001; 0,01; 0,1; 1 e 10 µM de cada droga, TMINA ou TMFAP, diluídas em dimetil sulfoxido 10%(DMSO), e 500 µL de tampão fosfato ou da fração metabólica (S9 mix, 4%).

Após 20 minutos, foram adicionados a cada tubo, 2 ml de Agar de superfície enriquecido com solução de histidina e biotina 0,5 mM, numa proporção de 10:1 (pH 7,4 à 45°C), e as misturas finais foram vertidas em placas de petri de Ágar Vogel-Bonner. Estas foram incubadas a 37°C durante 72 horas, e as colônias His+ revertentes foram contadas. O índice de mutagenicidade foi calculado pelo valor médio obtido a partir de cada concentração, dividido pelo valor médio do controle negativo sendo índices de mutagenicidade acima de 2 considerados positivos (Maron & Ames, 1983; OECD, 1997).

Para determinar o potencial citotóxico, 10 µL da mistura pós incubação foi diluída em 0,9% de NaCl (w/v). Esta suspensão final, após diluição seriada, continha, para cada amostra, 2 x 10³ células/ml. Uma alíquota de 100 µL desta suspensão foi plaqueada em Agar nutriente, resultando num número

13ª JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

final estimado de 2×10^2 bactérias/placa. As placas foram então incubadas à 37°C durante 24 horas e porcentagens de sobrevivência foram calculadas e comparação com o grupo controle negativo, tomando valores de sobrevivência menores que 70% como indicadores positivos para citotoxicidade (Maron & Ames, 1983; OECD, 1997).

RESULTADOS

Em relação ao ensaio qualitativo de avaliação de citotoxicidade, foram observadas respostas positivas (formação de halos de inibição) na concentração de 1000µM em todas as linhagens e na concentração de 100µM para as linhagens TA100 e TA102 para TMINA. A amostra TMFAP foi capaz de induzir a formação de halos de inibição em todas as linhagens avaliadas, exceto a TA100, nas concentrações de 100 e 1000 µM.

O ensaio de mutagenicidade não encontrou-se resultado positivo, mas em relação a citotoxicidade, a molécula TMINA apresentou resultado positivo para a concentração 10 µM na ausência de S9 com uma taxa de sobrevivência de 59.6%, para a linhagem TA98, enquanto a molécula TMFAP apresentou resultados positivos para concentração 10 µM na ausência de S9 com uma taxa de sobrevivência de 63.1%, e na presença de S9 com taxa de sobrevivência de 54.0% para a mesma concentração. Para a linhagem TA100, apenas a molécula TMFAP apresentou resultados positivos, apenas na ausência de S9, para a concentração de 1 µM com sobrevivência de 66.4% e para a concentração de 10 µM com sobrevivência de 36.0%.

CONCLUSÃO

Os análogos do IMaTINIBI não apresentaram-se mutagênicos, para as concentrações testadas. Nota-se um potencial citotóxico elevado, e no caso da molécula TMFAP para as concentrações 1 µL e 10 µL, podemos notar uma redução tanto no índice de mutagenicidade quanto a sobrevivência, indicando que a droga possui grande citotoxicidade para estas concentrações.

REFERÊNCIAS

- OECD. Guideline 471 for testing chemicals by Bacterial Reverse Mutation Test, 1997.
- MARON, D. M. & AMES, B. N. Mutat. Res. 1983 v.113, p. 173-215.
- HAMERSCHLAK, Nelson. Leucemia: fatores prognósticos e genética. J. Pediatr. (Rio J.) [online]. 2008, vol.84, n.4, suppl. [cited 2014-05-16], pp. S52-S57.
- MARTINS, S.L.R. and FALCAO, R.P.. A importância da imunofenotipagem na Leucemia Mielóide Aguda. Rev. Assoc. Med. Bras. [online]. 2000, vol.46, n.1 [cited 2014-05-16], pp. 57-62.