



UNIVERSIDADE LUTERANA DO BRASIL

**INVESTIGAÇÃO DA TOXICIDADE GENÉTICA DE AGENTES
ANTIVIRAIS EM CULTURA DE LINFÓCITOS HUMANOS**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Diagnóstico Genético e Molecular da Universidade Luterana do Brasil para obtenção do Grau de Mestre em Diagnóstico Genético e Molecular.

Eloir Dutra Lourenço

Orientadora: Dra. Heloísa Helena Rodrigues de Andrade

CANOAS
Janeiro/2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Toxicidade Genética (TOXIGEN) dos Programas de Pós-Graduação em Diagnóstico Genético e Molecular e em Genética e Toxicologia Aplicada da Universidade Luterana do Brasil, subvencionado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) e Universidade Luterana do Brasil (ULBRA).

Aos Meus Pais

São essas pessoas maravilhosas que têm tanta ternura no coração e que compreendem tudo. Eles têm sempre uma palavra certa no momento certo, um abraço, mesmo que virtual, nos momentos em que mais precisamos e nos oferecem, mesmo se não o pedimos. Eles têm esse entendimento adivinhado pelo coração que só os verdadeiros pais possuem.

Há quem os chame de amigos, mas eles vão, além disso: aprendemos a sentir necessidade da presença deles, não como uma dependência, mas como algo que nos transmite segurança. Enfim, muito obrigado por confiarem em mim, considerarem meus sentimentos e necessidades apoiando-me com incentivos me estimulando a prosseguir com os elogios.

Com vocês eu aprendi a buscar uma vida feliz, bem sucedida e satisfatória, e só tenho a agradecer por vocês existirem. Amo vocês.

A minha noiva Letícia

“As coisas que realizamos, nunca são tão belas quanto as que sonhamos. Mas às vezes, nos acontecem coisas tão belas, que nunca pensamos em sonhá-las. Para mim aconteceu.....VOCÊ !!!”

Lê, obrigado pelo carinho e companheirismo constante.

Dedico este trabalho a vocês

Agradecimentos especiais

A Deus

Pela vida e por tudo que me ofereceu ao longo destes anos.

A minha irmã

Por compreender minha distância, torcer pelo meu sucesso e por cuidar de nossos pais na minha ausência.

Aos meus sobrinhos

Obrigado por torcerem pelo Tato !

Agradecimentos

A Dra. Heloísa Helena Rodrigues de Andrade

Por ter me ouvido e ter me dado claras e breves respostas às dúvidas e perguntas que me inquietaram no desenvolvimento deste trabalho, meu muito obrigado. Agradeço também por ter reforçado minha confiança para continuar desenvolvendo meus pensamentos críticos, chegando aos resultados desejados. Foi assim, com seu incentivo constante, que você me deu um modelo positivo para seguir. Obrigado por tudo.

A Dra. Viviane Souza do Amaral

Presença constante em todos os momentos deste trabalho! Muito obrigado pelo apoio, pela ajuda na execução prática, pelas sugestões e incentivo em prosseguir. Valeu Vivi!

Amigos do TOXIGEN

Rafael, Ronaldo e Fernanda. Obrigado pela ajuda, apoio, incentivo e acima de tudo pela amizade que construímos durante este período. Com certeza, não esquecerei vocês. Um grande abraço.

ÍNDICE

RESUMO..... 7

ABSTRACT..... 9

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO..... 11

1.1 Primeiros medicamentos..... 16

1.2 Zidovudina (AZT) 17

1.3 Lamivudina (3TC) 18

1.4 Estavudina (D4T)..... 19

1.5 Genotoxicidade associada aos compostos AZT, 3TC e D4T 20

2. OBJETIVOS 23

CAPÍTULO 2

1. ARTIGO CIENTÍFICO 24

Micronuclei induced by transcriptase inhibitors in mononucleate
and binucleate cells using the cytokinesis- block assay micronucleus..... 24

CAPÍTULO 3

PERSPECTIVAS PARA O FUTURO..... 42

BIBLIOGRAFIA 44

RESUMO

Aproximadamente, 65 milhões de pessoas no mundo, estão infectadas pelo vírus da HIV - um lentivírus com genoma de RNA, pertencente à família Retroviridae - que causa a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), uma doença degenerativa do sistema imune. O tratamento dos pacientes portadores de HIV está basicamente centrado na utilização de inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleosídeos (NRTIs), que interferem no ciclo de replicação do vírus. A associação zidovudina (AZT)/lamivudina (3TC) foi considerada a dupla de análogos de nucleosídeos de primeira opção para compor o esquema de tratamento, pelo maior potencial de adesão dos pacientes e pela menor toxicidade. Apesar da eficácia clínica, no controle da proliferação do HIV, uma série de efeitos colaterais estão associados a sua utilização, destacando-se a atividade genotóxica e carcinogênica. Adicionalmente, foi mais recentemente lançado no mercado um novo análogo destes NRTIs - a estavudina (d4T) - cuja possível vantagem clínica permanece não elucidada.

O presente trabalho procurou avaliar a atividade genotóxica dos compostos AZT, 3TC e d4T, através do ensaio de Micronúcleo (CBMN) em cultura de linfócitos humanos - visando caracterizar o seu possível potencial como indutores de perdas de fragmentos cromossômicos, e de cromossomos inteiros. Para tanto foram analisadas as células mononucleadas - indicativas de efeitos aneugênicos - assim como as binucleadas - que referem atividade clastogênica. Os dados obtidos em células mononucleadas tratadas com diferentes concentrações dos três NRTIs não foram significativamente diferentes daqueles observados nos respectivos controles negativos. Por outro lado, houve uma prevalência de respostas positivas quando a incidência de MN foi analisada nos linfócitos binucleados. A somatória destes achados indica que a toxicidade genética destas drogas está exclusivamente associada a sua ação como indutores de quebras, que quando fixadas se manifestam como perda de

fragmentos cromossômicos – clastogênese. Foi também objetivo deste trabalho correlacionar as respostas tóxico-genéticas observadas com as estruturas químicas destas três drogas. As diferenças químicas entre AZT e 3TC relacionam-se a posição 3' no 2'-deoxiribonucleosídeo - já que nesta posição a AZT possui um grupo azido e a 3TC um átomo de hidrogênio. Por outro lado a d4T difere em relação às duas primeiras drogas pela presença de uma 2', 3', dideoxirribose insaturada. No entanto, como os três antiretrovirais se comportam como clastogênicos, pode-se sugerir que estas mudanças estruturais não interferem sobre o seu padrão de atividade genotóxica – a indução de quebras cromossômicas e formação de fragmentos acêntricos, que são perdidos ao longo das divisões mitóticas.

ABSTRACT

Roughly 65 million people are infected with HIV worldwide. HIV is a lentivirus of the Retroviridae family. The virus has an RNA genome and causes the Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS), a disease that depletes the human immune system. Treatment of HIV-infected patients is focused on the use of nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NRTIs), which block the viral replication cycle. The Zidovudine (AZT)/Lamivudine (3TC) drug association has been considered the nucleoside analogue combination of choice in the treatment of HIV infection due to the more efficient patient compliance and to the lower toxicity exhibited. In spite of the clinical efficiency in the control of HIV replication, a series of side effects have been reported for the drug combination, particularly concerning genotoxic and carcinogenic actions. Additionally, a new NRTI analogue has been recently released, d4T, whose overall clinical advantages remain imprecise. The present study aimed to characterize the potential of AZT, 3TC, and d4T as inductors of loss of chromosome fragments and of whole chromosomes. The genotoxic action of the compounds was assessed by the micronuclei assay (CBMN) in human lymphocyte cultures. The analyses were conducted with mononucleate cells, which indicate the occurrence of aneugenic effects, and with binucleate cells, which mirror clastogenic action. The data obtained for mononucleate cells treated with different concentrations of the three NRTIs did not differ significantly from the results observed for the respective negative controls. On the other hand, a prevalence of positive responses was observed for the incidence of MN in binucleate lymphocytes. Taken together, these findings suggest that the genotoxicity of these drugs is linked exclusively to their action as inductors of chromosome breakages, which after fixation were evidenced as chromosome losses (clastogenesis). This study also aimed to correlate the

genotoxic responses observed due to the differences in the chemical structure of the three drugs. Such differences as occurring between AZT and 3TC concern the 3' position in the 2'-deoxyribonucleoside, as it is in this position that the AZT has an azido group, and 3TC has a hydrogen atom. Conversely, d4T differs from the other two drugs in the presence of one unsaturated 2', 3'-dideoxyribose group. Nevertheless, as the three ARVs behave as clastogens, it might be suggested that these structural differences do not interfere in the drugs' genotoxic activity, namely chromosome breakages and formation of acentric fragments that are lost all through the mitotic divisions suffered.

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO

A Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), uma doença degenerativa do sistema imunológico, é causada pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), que diminui a quantidade e proporção de células T CD4 no plasma, facilitando assim o seu desenvolvimento. A infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) é considerada como a mais importante e devastadora epidemia contemporânea, em função das estimativas de que cerca de 65 milhões de pessoas estão infectadas pelo vírus, das quais 25 milhões virão ao óbito (*Centers for Disease Control and Prevention* - CDC, 2006). Quando estas estimativas referem-se ao Brasil são relatados 371.827 casos de AIDS – dos quais 67.006 portadores do vírus encontram-se na região sul do país - com 32.402 casos no Rio Grande do Sul, segundo o Boletim epidemiológico AIDS 2005.

O aparecimento dos primeiros casos de AIDS, a sua rápida e franca disseminação e o desconhecimento do fator etiológico envolvido, levou-a a categoria de condição clínica mais pesquisada em todo o mundo (Souza e Almeida, 2003). Os primeiros relatos desta doença foram associados a um conjunto de manifestações clínicas - Sarcoma de Kaposi e pneumonia por *Pneumocystis carinii* - em pacientes homossexuais masculinos, oriundos de grandes cidades norte-americanas (Nova York, Los Angeles e São Francisco). Embora estas duas enfermidades já fossem conhecidas, nunca haviam se manifestado juntas. De fato, a pneumocistose ocorre em pacientes em estágios avançados do câncer e o Sarcoma de Kaposi em idosos procedentes da bacia do mediterrâneo (Wutzler e Thust, 2001).

Diante deste quadro, o CDC passou a estudar a doença e a definir o seu perfil clínico e epidemiológico. Como a incidência, no início, era predominantemente entre homossexuais, suspeitou-se que houvesse relação com o estilo de vida. No entanto, não tardaram a surgir casos

entre heterossexuais e crianças recém-nascidas. Apesar disto, as principais características epidemiológicas continuaram sugerindo que a doença era infecciosa, transmitida por via sexual, vertical e parental.

Com o agravamento da disseminação da AIDS, foram delineados diferentes estudos visando identificar o agente etiológico da doença, possivelmente um vírus. Somente quando milhares de americanos já a haviam contraído foi descoberto o retrovírus, considerado agente etiológico da AIDS, - o HIV, vírus da imunodeficiência humana. De fato, o HIV-1 foi simultaneamente isolado em 1983, pelos pesquisadores Luc Montaigner, na França, como Vírus Associado a Linfadenopatia (LAV) e Robert Gallo, nos EUA, como Vírus T-Linfotrópico Humano tipo III. Em 1986 foi identificado outro agente etiológico com características semelhantes, também um retrovírus, que recebeu a denominação de HIV-2, demonstrando menor virulência que o HIV-1. Recentemente, foram descritos subtipos tanto do HIV-1 quanto do HIV-2 (AIDSinfo Drug Database, 2006).

O HIV apresenta maior afinidade pelas células do sistema imune humano, causando severa imunossupressão por depleção das células que expressam as proteínas CD4 e CD8 - que incluem os linfócitos T, macrófagos e monócitos (Peter & Gambertoglio, 1998; Abbas *et al.*, 2003). Através do método de reação em cadeia da polimerase (PCR) foi revelado que o RNA do HIV pode ser detectado no plasma, em qualquer estágio da doença. Além disso, em indivíduos assintomáticos, o tecido linfóide é o maior sítio de replicação viral, quando comparado à concentração viral presente no sangue periférico (Peter & Gambertoglio, 1998).

A típica estrutura genômica do vírus HIV-1 (Figura 1), consiste de duas fitas idênticas de RNA (9,2 kb), que se apresentam sob a forma de uma ribonucleoproteína contendo as enzimas transcriptase reversa (RT), integrase e protease - assim como a proteína de ligação p7 (Peçanha *et al.*, 2002). Envolvendo o genoma e suas enzimas associadas há um cerne ou capsídeo formado pela proteína p24, que está contido em uma matriz

protéica (proteína p17) circundante.

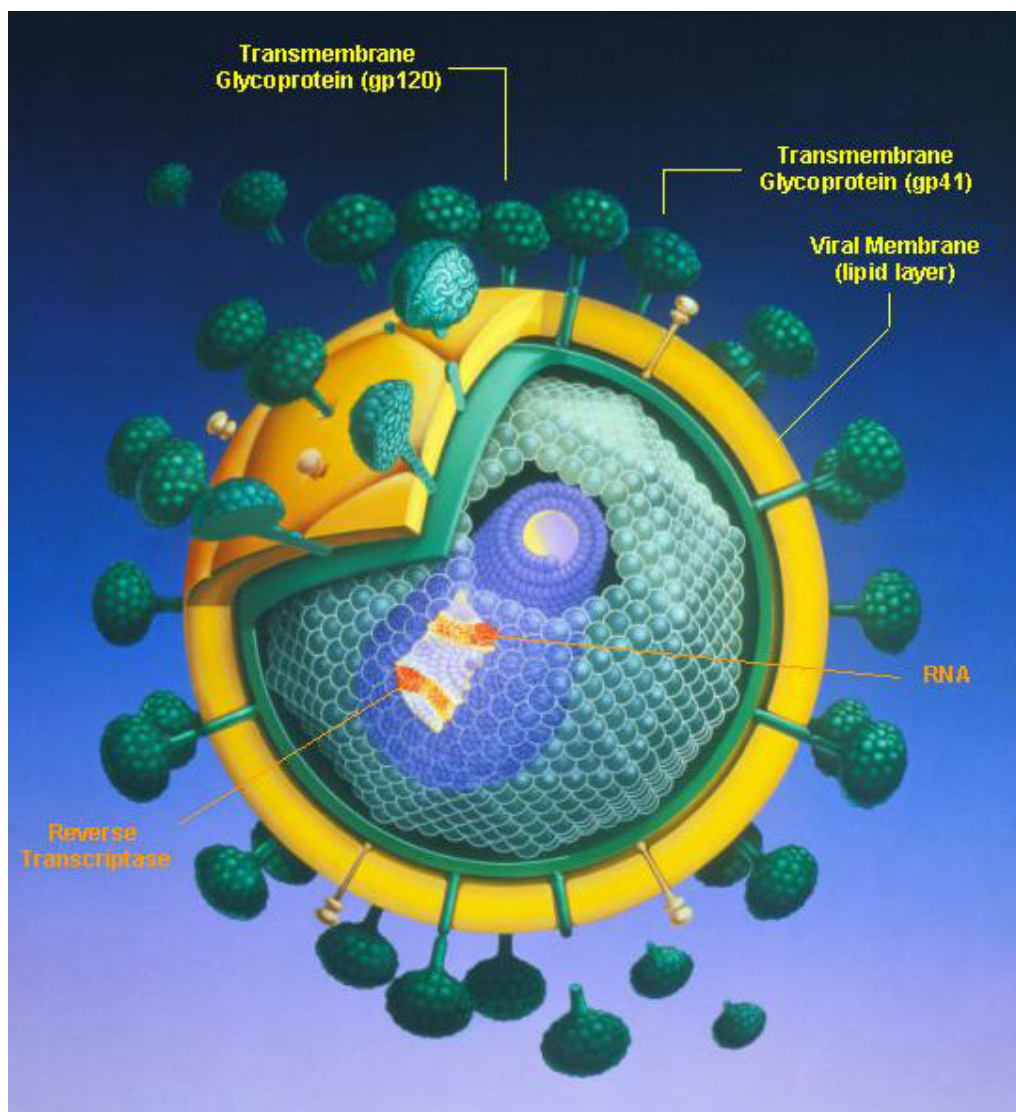


Figura 1: Estruturas do HIV (Virco, 2006)

Finalmente, a parte mais externa do vírus é formada por um envelope de membrana fosfolipídica (derivada das células do hospedeiro), contendo proteínas de membrana (gp41 e gp120) - codificadas pelo genoma viral - que se ligam às CD4 da membrana do hospedeiro (Peçanha *et al.*, 2002; Abbas *et al.*, 2003).

A infecção se inicia com a ligação das subunidades da proteína gp120 às moléculas de CD4 e aos co-receptores de quimiocinas. Em seguida, há uma alteração na conformação da proteína gp41 que se insere

na membrana celular (fusão peptídica) e induz a fusão da membrana viral com a membrana celular da célula hospedeira. Ocorre, então, a liberação do genoma viral no citoplasma da célula. A partir deste momento, são ativadas as enzimas virais do complexo nucleoprotéico, iniciando-se assim o ciclo replicativo do HIV. O genoma RNA do vírus é transcrito, pela RT viral, formando o DNA viral de fita dupla que, juntamente com a integrase viral, penetra no núcleo da célula e integra-se ao genoma do hospedeiro (Abbas *et al.*, 2003) (Figura 2).

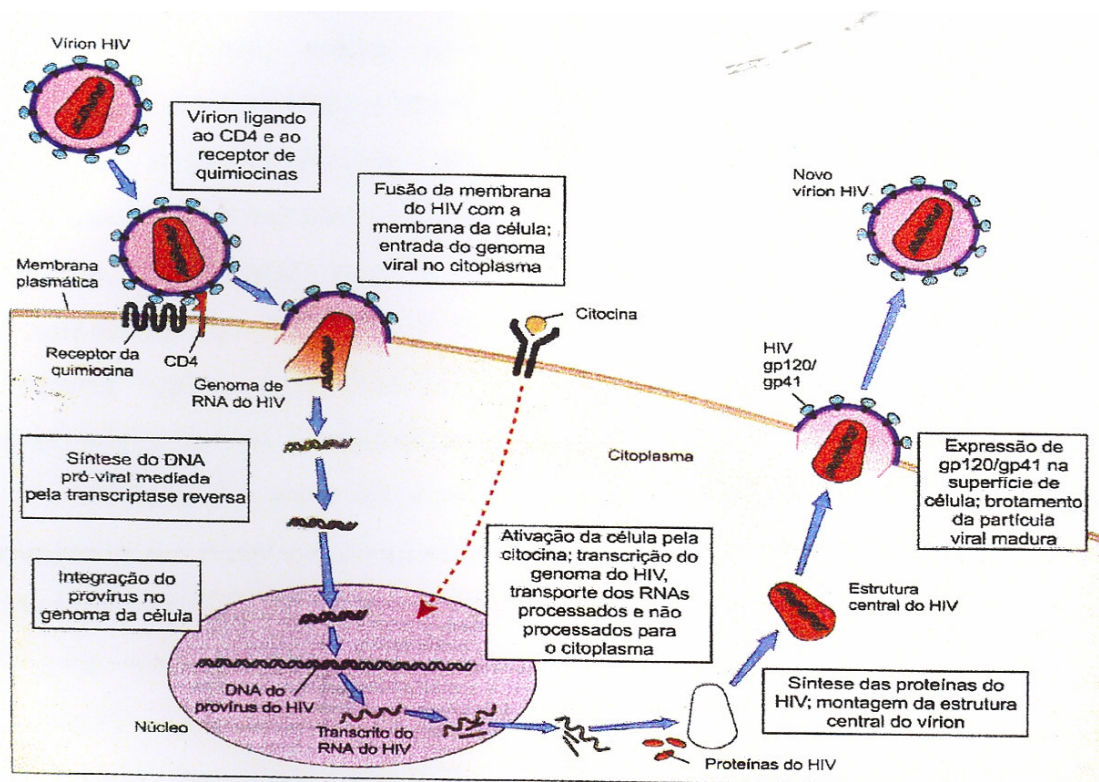


Figura 2 - Ciclo de vida do HIV na célula hospedeira

(Abbas *et al.*, 2003)

O DNA do HIV integrado ao genoma do hospedeiro passa a ser chamado de provírus, podendo permanecer latente por anos ou meses. No entanto, estímulos fisiológicos - como as citocinas do sistema imune, podem acelerar o processo de transcrição do gene viral, reativando o provírus. Neste último caso, a expressão inicia-se pela produção de

proteínas reguladoras - que passam a comandar a síntese de novos genomas virais - progredindo para um estágio tardio, no qual são expressas proteínas estruturais, participantes da construção da estrutura externa dos novos vírus. A formação da partícula viral madura acontece quando os vírus migram até a membrana celular do hospedeiro, onde as proteínas virais gp120 e gp41 são inseridas. O vírus pode, então, infectar novas células ou permanecer no fluido extracelular (Abbas *et al.*, 2003). É importante salientar que o HIV não codifica enzimas - como nucleosídeo quinase, nucleotídeo redutase e timidilato sintetase - sendo dependente do maquinário metabólico da célula hospedeira para a síntese de DNA e RNA. Entretanto, o HIV codifica uma série de proteínas estruturais e regulatórias, além de enzimas essenciais para a clivagem de proteínas (proteases) e incorporação do produto do DNA viral, no genoma humano, as integrases (Balzarini, 2000).

Como o HIV utiliza as células CD4 ativadas para a sua autoduplicação, qualquer estímulo que demande resposta imune aguda leva a proliferação dos linfócitos CD4, com conseqüente duplicação dos provírus integrados ao DNA da célula hospedeira. Desta forma, o pró-vírus também estará se multiplicando, através das células de defesa do organismo infectado - o que significa que a ativação da resposta imune como reação ao vírus da AIDS, tem o efeito paradoxal de intensificar a replicação viral e acelerar a progressão da doença (Deeks & Walker, 2004).

A infecção pelo vírus HIV está intimamente associada com elevação do risco de desenvolvimento de linfomas sistêmicos da doença de Hodgkin e também de linfomas primários no sistema nervoso central (Parekh *et al.*, 2003). Além disto, em situações nas quais os indivíduos têm seu sistema imunológico debilitado, os riscos de desenvolvimento de câncer associado a vírus aumentam em até cem vezes. Quando foi avaliada a incidência do Sarcoma de Kaposi em dois grupos de pacientes imunossuprimidos - infectados pelo HIV e transplantados - observou-se um aumento de quatro vezes na incidência deste tipo de linfoma no grupo

de portadores de HIV em relação aos transplantados - tornando evidente o papel deste vírus sobre a indução deste tipo de neoplasia (Serraino *et al.*, 2005). Um outro agente causador de lesões escamosas intra-epiteliais precursoras de câncer cervical em mulheres é o papilomavírus (HPV) - que tem a sua virulência e ação oncogênica significativamente aumentada em presença do HIV (Hawes *et al.*, 2006).

1.1. Os Primeiros Medicamentos

Em 1986 foi aprovada - pelo órgão norte-americano de controle sobre produtos farmacêuticos FDA (*Food and Drug Administration*) - a primeira droga antiviral, a zidovudina ou AZT - que revelou um impacto discreto sobre a mortalidade geral de pacientes infectados pelo HIV. O avanço nas pesquisas científicas possibilitou o aparecimento, em 1996, de uma proposta terapêutica, conhecida como Coquetel Anti-Aids, que aumentou a sobrevivência dos pacientes infectados. Esta terapia anti-retroviral de alta potência - trouxe avanços inestimáveis, propiciando o esclarecimento de aspectos fundamentais da doença. De fato, a melhor maneira de combater o vírus é impedir sua multiplicação. É o que fazem os medicamentos anti-HIV, que devem baixar a carga viral - tornando-a não detectável - e, se possível, restaurar a imunidade. Mas, para que o tratamento contra a AIDS seja mais eficaz, é recomendável iniciá-lo antes da manifestação de doenças oportunistas, quando o sistema imunológico já está muito enfraquecido (Parekh *et al.*, 2003).

Atualmente estão disponíveis no mercado diferentes classes de drogas anti-retrovirais que interferem em diferentes etapas do ciclo de replicação do vírus: (i) inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleosídeos (NRTIs), (ii) inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleotídeos (NtRTIs), (iii) inibidores da transcriptase reversa não-análogos de nucleotídeos (NNRTIs), (iv) inibidores da protease (PIs) e (v) inibidores de fusão (FI) (Stolk e Lüers, 2004).

Os NRTIs são drogas que inibem a transcriptase reversa através de

sua incorporação na cadeia de DNA, levando à interrupção da transcrição de RNA para DNA. Os segmentos incompletos de DNA viral são posteriormente destruídos por enzimas celulares. Neste grupo, estão incluídos diversos medicamentos utilizados para o tratamento de pacientes com AIDS, entre os quais se destacam a zidovudina e a lamivudina (Stolk e Lüers, 2004) com disponibilidade de uso terapêutico também para a estavudina (d4T) (Figura 2).

1.2. Zidovudina (AZT)

A AZT (3'-azido-3'-desoxitimidina,) é um anti-retroviral do tipo NRTI, análoga da timidina, que apresenta uma substituição do grupo 3'-hidroxila (-OH) por um grupo azido (-N₃) - C₁₀H₁₃O₄, peso molecular 267,2438 e solubilidade em água 1 – 5 g/mL a 17°C. A AZT é rápida e quase completamente absorvida pelo trato gastrointestinal, ainda que a sua biodisponibilidade sistêmica, em formulações do tipo cápsula ou solução, seja de aproximadamente 65 % (variando entre 52 a 75%). A sua biodisponibilidade em neonatos com até quatorze dias de vida é de aproximadamente 89 %, decrescendo para cerca de 61 % nos neonatos com mais de quatorze dias. Sua distribuição ultrapassa a barreira hematoencefálica atingindo médias aproximadas de 24% da concentração plasmática em crianças. Também apresenta concentrações no sêmen de pacientes infectados pelo HIV (Moodley *et al.*, 1998). Há casos reportados da presença de AZT no Sistema Nervoso Central de fetos humanos, demonstrando que a droga também ultrapassa a barreira placentária. Após sofrer metabolização no fígado, a AZT é primariamente eliminada na forma do metabólito inativo 3'-azido-3'-desoxi-5'-O-β-D-glicopiranosiltimidina (GAZT), com 60 a 80 % da dose administrada, sendo detectada na urina. A sua excreção ocorre via renal com meia-vida de aproximadamente uma hora no plasma sanguíneo, e de cerca de 3,3 horas no meio intracelular. Após a fosforilação intracelular, a AZT inibe a replicação do HIV por interferir na atividade da transcriptase reversa viral e na ação da DNA

polimerase (Langtry e Campoli-Richards, 1989; Stretcher, 1991).

O tratamento de escolha disponível para os pacientes com AIDS envolve a combinação de dois NRTIs com um PI ou NNRTI. A associação zidovudina/lamivudina foi considerada a dupla de análogos de nucleosídeos de primeira opção para compor o esquema de tratamento, pelo maior potencial de adesão dos pacientes ao tratamento e pela menor toxicidade (Souza e Almeida, 2003; Stolk e Lüers, 2004).

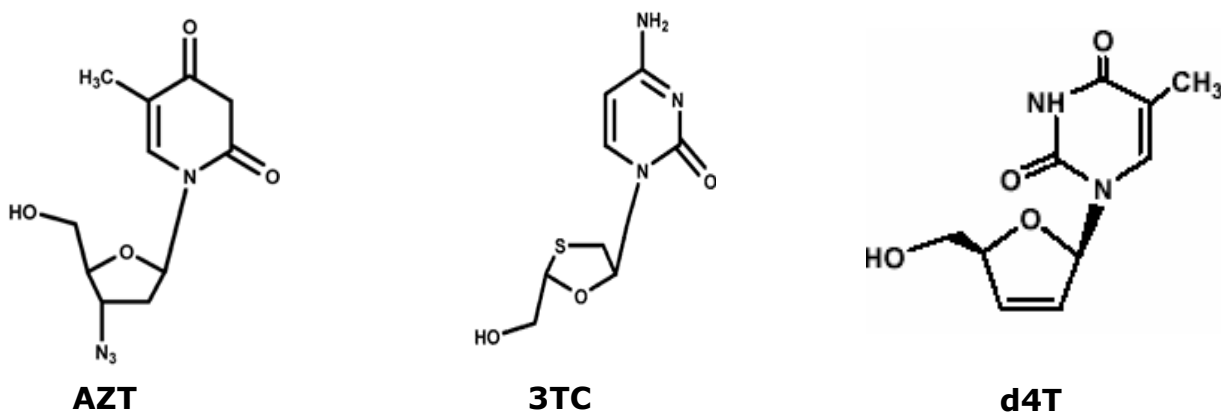


Figura 2. Estrutura química da zidovudina (AZT), lamivudina (3TC) e estavudina (d4T).

1.3. Lamivudina (3TC)

A lamivudina (2'-didesoxi-3'-tiacitidina) é um L-enantiômero do didesoxinucleosídeo análogo da citosina. Da mesma forma que a AZT, é metabolizada no interior das células, gerando somente um metabólito ativo (5'-trifosfatado), que por sua vez inibe a atividade do HIV - através de sua incorporação ao DNA viral, induzindo a terminação do alongamento da cadeia. Apresenta uma meia-vida intracelular de 10,5 a 15,5 horas. A lamivudina é rapidamente absorvida em nível gastrointestinal, com biodisponibilidade, via oral, de, respectivamente, 82 e 68 %, em adultos e

crianças. Após administração oral, o tempo médio para atingir a concentração sérica máxima é de cerca 1 hora. A sua depuração sistêmica média é de aproximadamente 0,32 l/h, predominantemente renal (70%), através de secreção tubular ativa, porém, com pouco metabolismo hepático (10%). Há casos reportados da presença da 3TC no Sistema Nervoso Central e no Líquido Cefalorraquidiano (LCR). A relação média entre concentração da 3TC no LCR e no soro é baixa - 4 a 8 % em adultos e 9 a 17 % em crianças. Ao contrário da AZT, a 3TC sempre foi empregada em conjunto com outros anti-retrovirais (Painter *et al.*,2004).

1.4. Estavudina (d4T)

Como a zidovudina, a estavudina (2',3'-didehidro-3'-desoxitimidina), é um análogo da timidina, contendo uma dupla ligação entre os carbonos 2' e 3' da pentose. Assim como os demais fármacos do grupo, a estavudina deve ser convertida, por ação das quinases intracelulares, ao derivado trifosfato (d4TTP), que inibe a transcriptase reversa e provoca término do prolongamento da cadeia de DNA. Além disso, inibe enzimas celulares, tais como as β e γ -DNA polimerases, reduzindo assim a síntese do DNA mitocondrial. A possível vantagem do seu uso clínico continua não elucidada especialmente em função do desconhecimento do seu modo de metabolização. O fármaco é quase completamente absorvido após administração oral, não sendo afetado pela presença de alimento, sendo capaz de se distribuir igualmente tanto nas hemácias quanto no plasma (Eastmond and Tucker, 1989). A sua biodisponibilidade média absoluta é de 86,4% - com picos de concentração plasmática ocorrendo em até 1 hora após a administração - apresentando aumentos diretamente relacionados às doses. Não foi observado acúmulo significativo de estavudina com administrações repetidas a cada 6, 8 ou 12 horas. O trifosfato de estavudina tem uma meia-vida intracelular de 3,5 horas tanto nas células T como nas mononucleadas do sangue periférico, sendo capaz de atravessar a barreira hematoencefálica. Cerca de 50% do

fármaco inalterado pode ser detectado na urina (Venkatachalam *et al.*, 2006).

1.5. Genotoxicidade associada aos compostos Zidovudina, Lamivudina e Estavudina

Apesar da eficácia do AZT e 3TC no controle da proliferação do HIV em pacientes com AIDS, uma série de efeitos colaterais são associados à sua utilização, destacando-se a atividade genotóxica e carcinogênica (Wutzler e Thust, 2001; Tozser, 2003). Estes análogos atuam como substrato para a DNA polimerase mitocondrial humana (*Pol γ*), o que leva a inibição da replicação desta organela, e a manifestação de sintomas relacionados a síndromes mitocondriais nos pacientes tratados com coquetéis de NRTIs – miopatias, neuropatias periféricas, miocardiopatia hipertrófica, *Diabetes mellitus*, pancreatite, acidose láctica e falência das células hepáticas (Dagan *et al.*, 2002). Estudos histológicos e de microscopia eletrônica, em células musculares expostas ao AZT, demonstraram acúmulos anormais de mitocôndrias com inclusões cristalinas no espaço abaixo do sarcolema e fibras vermelhas rotas, que são parâmetros diagnósticos para desordens genéticas mitocondriais - causadas por mutações pontuais, deleções e/ou aneuploidias (Dagan *et al.*, 2002; Miglione *et al.*, 1989). Complementando estes estudos, foram observados sinais de disfunção desta organela em algumas crianças expostas a agentes antiretrovirais, ainda no útero materno - que desenvolveram encefalomiopatia neonatal, anemia, hiperlactatemia, atrasos psicomotores e distúrbios visuais, em períodos variando de uma semana a trinta meses de idade (Poirier *et al.*, 2003; Tovo *et al.*, 2005).

De fato, um grande número de trabalhos experimentais, utilizando bioensaios *in vivo* e *in vitro*, caracteriza a AZT como indutora de danos tóxico genéticos, relacionados com mutações gênicas em diferentes linhagens celulares, detectadas através de teste da hipoxantina fosforribosiltransferase (HPRT) (Fenech *et al.*, 2003). Foi também

evidenciado que o DNA destas células mutantes apresentava grandes deleções, atribuídas à incorporação da AZT no DNA celular, que são responsáveis pela terminação da sua replicação (Sussman *et al.*, 1999; Mittelstaedt *et al.*, 2004). Verificou-se, também, a atividade clastogênica desta droga, expressa como aberrações cromossômicas em culturas de células humanas e de hamster Chinês, assim como em medula óssea de camundongos e ratos (Gonzalez-Cid e Larripa, 1994; Dertinger *et al.*, 1996; Agarwal e Olivero, 1997; Rosefort *et al.*, 2004). Por outro lado, a AZT mostrou atividade recombinogênica no teste de troca entre cromátides irmãs (SCE) em células ovarianas de hamster Chinês (CHO) (Gonzalez-Cid e Larripa, 1994; Littlefield *et al.*, 1999). Utilizando o teste SMART de asa foi possível traçar o padrão de genotoxicidade do AZT como um agente efetivamente indutor de eventos do tipo recombinação mitótica (~82%), porém capaz de induzir mutações pontuais e/ou cromossômicas em menor proporção (~18%) - em células somáticas de *D. melanogaster* (Cunha, comunicação pessoal).

Em relação aos efeitos carcinogênicos, a AZT induziu a formação de epiteloma vaginal em fêmeas de camundongos e ratos, assim como câncer de pulmão, fígado, ovário e mama em neonatos nascidos de fêmeas tratadas com doses cinco vezes maiores do que as administradas a mulheres gestantes (Olivero *et al.*, 1997; Ayers *et al.*, 1997; Wutzler e Thust, 2001). Em filhotes de ratas F344 - que receberam doses de 480, 240 e 80 mg de AZT / Kg / dia, nos últimos sete dias de gestação - houve aumento significativo na incidência de gliomas quando comparado ao controle negativo (Walker *et al.*, 2004). O conjunto destes dados sugere que, a exemplo do evidenciado para fetos de roedores, crianças expostas, por via transplacentária, a combinações de NRTIs podem ter risco aumentado de desenvolver câncer (Meng *et al.*, 2000; Mittelstaedt *et al.*, 2004).

No que se refere a 3TC, os resultados de genotoxicidade, apontam para ausência de indução de danos genéticos na maioria dos testes realizados com esta droga. A presença de lesões no DNA foi detectada

apenas no teste "mouse lymphoma assay" (Wutzler e Thust, 2001). Esta menor atividade genotóxica da 3TC, quando comparada à da AZT, vem sendo atribuída a diferenças em suas estruturas moleculares. Embora as DNA polimerases catalisem a incorporação de ambas na cadeia de DNA, a 3TC, mas não a AZT é rapidamente removida pela atividade 3' - 5' exonucleásica destas enzimas (von Tungeln *et al.*, 2002).

Estudos experimentais objetivando informações sobre a segurança e a farmacocinética da 3TC - sozinha ou em combinação com a AZT - indicam que a 3TC não produz efeitos tóxicos em fetos ou em recém-nascidos (Moodley *et al.*, 1998), além de não atenuar ou potencializar a atividade tóxica e genotóxica causada pela AZT (Von Tungeln *et al.*, 2002).

Embora os trabalhos sobre a carcinogenicidade destes fármacos em humanos ainda não tenham apresentado evidências conclusivas, muitos autores os consideram carcinógenos, baseados tanto na interferência destes NRTIs sobre o metabolismo de ácidos nucléicos, quanto nas evidências experimentais em organismos teste específico. Como a incorporação e o subsequente processamento dos análogos de base no DNA das células alvo é, presumivelmente, uma pré-condição da atividade genotóxica destes agentes, a extensão das lesões por eles induzidas depende da atividade proliferativa dos modelos experimentais empregados, da duração da exposição e do período pós-exposição (Wutzler & Thust, 2001).

Com relação a estavudina não foram encontrados relatos referentes a sua possível toxicidade genética. São apenas referidos efeitos tóxicos, já que pacientes que fazem uso desta droga apresentam alto risco de desenvolver lipodistrofia - distribuição anormal de gordura e perda periférica de tecido gorduroso - quando comparados com aqueles tratados com outros NRTIs (Venkatachalam *et al.*, 2006). Na verdade a perda de gordura tecidual e as mudanças metabólicas observadas nesta Síndrome parecem estar correlacionadas com a toxicidade mitocondrial imposta por esta família de drogas (Thomas e Kakuda, 2000).

2. OBJETIVOS

O teste de micronúcleo *in vitro* é uma importante ferramenta para a Genética Toxicológica, sendo amplamente empregado nas áreas de ecotoxicologia (Gauthier *et al.*, 1999), nutrição (Fenech e Rinaldi, 1995; Fenech, 2000), biomonitoramento de populações humanas, epidemiologia molecular (Norppa, 1997), e principalmente na identificação do potencial genotóxico de agentes químicos e físicos (Kirsch-Volders, 1997), assim como, de amostras de origem ambiental. Por outro lado à utilização deste bioensaio para avaliar os danos genéticos induzidos pela AZT, 3TC e d4T poderá melhor caracterizar a ação tóxica genética destes agentes antivirais.

Dentro deste contexto, o presente trabalho tem como objetivos:

- Avaliar a ação genotóxica da AZT, 3TC e d4T - através do ensaio CBMN em cultura de linfócitos humanos;
- Caracterizar os danos genéticos – aneugênese ou clastogênese - impostos por estes três agentes antivirais;
- Correlacionar as respostas tóxico-genéticas observadas com as diferenças na estrutura química destas três drogas.

CAPÍTULO 2

Manuscript for *Mutation Research*

MICRONUCLEI INDUCED BY TRANSCRIPTASE INHIBITORS IN
MONONUCLEATE AND BINUCLEATE CELLS USING THE CYTOKINESIS-
BLOCK MICRONUCLEUS ASSAY

Eloir Dutra Lourenço², Viviane Souza do Amaral¹, Maria Luiza Reguly¹
Maurício Lehmann ^{1,2} and Heloisa Helena Rodrigues de Andrade ^{1,2}

¹ Programa de Pós-Graduação em Genética e Toxicologia Aplicada
Laboratório da Toxicidade Genética, Universidade Luterana do Brasil,
Canoas, RS, Brazil. ² Programa de Pós-Graduação em Diagnóstico
Genético e Molecular

Key words: Micronucleus assay, transcriptase inhibitors, AZT, 3TC, d4T.

*Correspondence: Heloísa H. R. de Andrade, Laboratório da Toxicidade
Genética – Programa de Pós-Graduação em Genética e Toxicologia
Aplicada – ULBRA, Prédio 22, 4º andar, Sala 25, Av. Farroupilha, 8001,
92450-900, Canoas, RS, Brazil. Tel/Fax: + 55 51 34779214.

E-mail: heloisa@ulbra.br

Abstract

The present study evaluates the clastogenic and/or aneugenic potential of nucleoside reverse transcriptase inhibitors - Zidovudine (AZT), Lamivudine (3TC) and Stavudine (d4T) - by analyzing micronuclei in human lymphocyte cultures (CBMN assay). A prevalence of positive responses was observed for all antiretrovirals tested in binucleate cells. This genotoxicity was restricted to binucleate cells, since no significantly increase in MN frequencies ($P < 0.05$) was detected in mononucleate cells. These data figure AZT, 3TC and 4dT as chromosome breakage agents and impute their genotoxicity to clastogenic action. Considering that the structural chemical differences between AZT and 3TC lie in the 3' position in the 2'-deoxyribonucleoside and in an unsaturated 2', 3', dideoxyribose for d4T, it is possible to suggest that these chemical distinctions did not modify their action as clastogens.

INTRODUCTION

Nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NRTIs) are widely used in the therapy of human immunodeficiency virus (HIV) infections and have proven beneficial in extending the lives of HIV-infected patients. NRTIs integrate into viral DNA, leading to replication termination as well as inhibition of viral reverse transcriptase nucleotide binding site [1].

Zidovudine (3'-Azido-3'-deoxythymidine; AZT), Lamivudine (2'-deoxy-3'-thiacytidine; 3TC) and Stavudine (2',3'-didehydro-2',3'-dideoxythymidine; d4T) are nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NRTIs). Typically, AZT and 3TC are administered as an integral part of the highly active antiretroviral therapy protocols. AZT produces genotoxic manifestations that include mutagenesis, chromosomal aberrations and telomere shortening [1;2]. The major mechanisms of mutation induction by AZT involve large interstitial deletions and mitotic recombination [3].

Based on AZT action data, it was suggested that the genotoxicity of NTRIs might be defined as a complex, intricate network of events, which may lead to large-scale genomic instability as a result of drug-DNA incorporation [4]. Several different authors, using various cell cultures and animal species, have reported induction of MN by AZT. Yet,

few are reports characterizing the chromosomal action of 3TC alone [5], and no data concerning the genotoxic potency of d4T has been published in the literature.

The present study evaluates the clastogenic and/or aneugenic potential of AZT, 3TC and d4T by analyzing micronuclei in human lymphocyte cultures (CBMN assay). Additionally, this in vitro study was focused on the structure–activity relationships existing in this class of compounds with respect to their mutagenic effects. Previous studies reported that MN in mononucleate cells might be an interesting additional parameter in the CBMN assay — since these cells can mirror aneugenic action [6; 7]. In line with this observation we decided to analyze both mononucleate and binucleate cells, in an attempt to detect differential responses between the three NTRIs and their spectrum of chromosomal mutagenic action.

2. MATERIALS AND METHODS

DONORS, CELL CULTURES, TREATMENT AND CELL HARVESTING

2.2. Cytokinesis-Block Micronucleus Assay (CBMN)

Donors and cell cultures

Peripheral blood was obtained once from two females (26 and 29 years age, referred to as donor 1 and 2, respectively) and one male (24 years age, referred to as donor 3), unrelated donors who had free normal karyotypes. For each donor, one series of cultures was prepared with two parallel cultures (duplicates) for every NRTIs concentration tested. Whole blood cultures were used as recommended by Migliori *et al*, [8].

For each culture, 0.8 ml-heparinized blood samples were added to 8 ml RPMI-1640 medium (Sigma), containing 10% fetal calf serum, 1% penicillin/streptomycin (Ceme) and 80- μ l phytohemagglutinin (10 μ l/ml) (PHA, Gibco). After a 44-h cultivation period, all cultures were supplemented with 6- μ g/ml cytochalasin B (cyt-B), (Sigma), to prevent cells that have completed one nuclear division from performing cytokinesis. The use of cyt-B enables the accumulation of virtually all-dividing cells at the binucleate stage, by dividing cell populations regardless of their degree of synchrony and proportion of dividing cells.

Drug treatment and cell harvesting

Forty-eight hours before harvesting the cells, cultures were supplemented with the different NTRIs [(zidovudine: 3'-azido-3'-deoxythymidine, AZT, CAS n° 30516-87-1), (lamivudine: 2'-deoxy-3'-thiacytidine; 3TC, CAS n° 134678-17-4) and (stavudine: 2',3'-didehydro-2',3'-dideoxythymidine, d4T; CAS n°. 3056-17-5), bleomicine [(Blenoxane from Bristol; positive control] or sterile distilled water [negative control], which were previously sterilized in a Sartorius filter with a 0.22- μ m pore membrane.

In total, blood cultures were incubated for 72 hours at 37° C. Hypotonic treatment was performed for 5 min in 0.075 M KCl. This procedure preserves the cytoplasm, which allowed MNs assignment to their corresponding main nucleus. Fixation was done three times in methanol: acetic acid (3:1) prior to transfer to slides. For MN counting, cells were Giemsa-stained according to standard methods.

Slide Analysis

To avoid scorer bias, slides were coded so as to blind the scorer to the sample. Cells were scored for MN according to the criteria proposed by Fenech *et al.* [9]. MN frequencies were scored from controls and NTRIs-treated (Table 1) cultures and from each of their duplicates. For

each culture, 500 binucleate and 500 mononucleate cells were studied. Since the data of duplicate cultures showed no statistical differences they were pooled — totaling 3,000 for both cultures studied for each donor and concentration.

As a parameter for cytotoxicity, the nuclear division index (NDI) was studied by screening 1,000 cells per donor at 400X magnification for the frequency of cells with one, two, three or four nuclei. From these data, NDI was calculated according to the formula:

$$\text{NDI} = [\text{M1} + 2(\text{M2}) + 3(\text{M3}) + 4(\text{M4})] / \text{N}$$

Where M1-M4 represents the number of cells with 1-4 nuclei and N is the total number of cells scored. Since nuclear divisions are asynchronous in CBMN blocked lymphocytes, cells with three nuclei may arise [10; 7].

Statistical Analysis

The non-parametric Kruskal-Wallis ANOVA was used to compare statistically the frequencies of mono- and binucleated cells with micronuclei between samples and negative controls. The Student *t*-test was used to compare NDI of samples and controls.

3. RESULTS AND DISCUSSION

CBMN assay was performed in human lymphocyte cultures treated with three nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NRTIs) - AZT, 3TC or d4T — in two simultaneously independent experiments under identical conditions. Human cells were exposed for 48 h to: 625, 500, 375, 250 or 125 µg/ml AZT; 750, 500, 250 or 125 µg/ml 3TC, or 750, 500, 250 or 125 µg/ml d4T.

Nuclear Division Index (NDI)

Control (distilled water) solvent-treated cultures of all donors showed NDI values of approximately 2. Compared to negative control, the NDI values obtained for bleomycin (1.8; $P < 0.05$), AZT (1.8; $P < 0.05$), 3TC (1.8; $P < 0.05$) and d4T (1.4; $P < 0.05$) were significantly low in all doses treated cultures (Data not shown).

Induction of MN in binucleated and mononucleate cells

All antiretrovirals tested induced significant increments in MN frequencies in binucleate cells ($P < 0.05$). Considering AZT and 3TC, this effect was observed for the majority of doses, except for 125µg/ml – showing a direct dose-effect relation. For d4T, an opposite response was observed — since increments in its concentrations led to decreases in

micronucleate cell frequencies (Table 1).

No significantly raise in mononucleate cell MN frequencies ($P < 0.05$) was observed for AZT, 3TC and d4T, for all doses applied, which means the antiretrovirals are not acting as aneugenic agents.

Genotoxicity of Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors (NRTIs)

The major aim of the present study was to evaluate the clastogenic and/or aneugenic potential of three antiretroviral agents — AZT, 3TC and d4T — by observing micronuclei in human lymphocyte cultures (CBMN). Our *in vitro* experiments revealed that the genotoxicity ascribed to AZT, 3TC and d4T was restricted to binucleate cells, which figures these NRTIs as probable chromosome breakage agents in human cells. This proposition was based on a previous study that reported MN induction occurring exclusively in binucleate cells as related to DNA breaks. Aneugenic drugs — as diethylstilbestrol, griseofulvin and vincristine sulphate — increase MN frequencies in mononucleate and binucleate cells, whilst clastogens as mitomycin C, bleomycin and doxorubicin increase MN frequency just in binucleate cells [6; 7].

Several different authors have pointed AZT as an inductor of MN, using various cell cultures and animal species [11; 12; 13]. AZT showed clastogenic effects expressed as micronuclei in human peripheral blood

lymphocytes, although a negative response in *Salmonella typhimurium* gene mutation assay was observed. This is probably due to the absence of phosphorylation and activation enzymes present in mammalian and may be related to its phosphorylation and activation [14]. Its incorporation into DNA — inducing genic mutation in the hypoxanthine-guanine phosphoribosyl-transferase (HRPT) and thymidine kinase (TK) genes, as well as its ability to induce chromosomal aberrations, sister chromatid exchange, shortened telomeres [15; 16]. 3TC was also mutagenic in the L5178Y/TK^{+/-} mouse lymphoma assay, increased the thymidine kinase (Tk) mutant frequency in mice, which was associated with loss of the wild-type (Tkp) allele (loss of heterozygosity; LOH) and a pattern of discontinuous LOH, which indicates 3TC as a transplacental mutagen [17]. It also worked as a clastogenic agent in cytogenetic assay using cultured human lymphocytes [18]. As far as we know, no d4T-genetic toxicity data were available on literature, although in our study d4T was proved to induce significant increments in MN frequencies restricted to binucleate cells. This also imputes its genotoxicity to clastogenic events.

Regarding the chemical structure of these NRTIs, their differences lie in the 3' position in 2'-deoxyribonucleoside: AZT has an azido group; 3TC has a hydrogen atom, and d4T an unsaturated 2', 3',dideoxyribose group (Figure 1). In spite of the structural differences between AZT, 3TC

and d4T, no obvious alterations — focused on specially clastogenic effect — were observed, which means that neither the azido group, nor hydrogen or an unsaturated dideoxyribose interfere in the drugs' genotoxic behavior. The 2', 3'- dideoxyribose replacement ascribes a new property to 4dT, represented by aneugenic action. Additionally, we must consider that although scoring mononucleates appears promising for the detection of MN induction by aneugens, the unknown origin/status of these cells interferes in data reliability [19; 7]. All in all, this study pointed out CBMN as an assay that affords to quantitatively enumerate NRTIs potential ability to disturb the human genome. Overall, an analysis of the complexity of antiretroviral genotoxicity should reveal further mechanisms that will allow the development of protective intervention strategies [20; 15].

REFERENCES

[1] Huang, M., Jolicoeur, P. Characterization of the gag/fusion protein encoded by the defective Duplan retrovirus inducing murine acquired immunodeficiency syndrome, *Journal of Virology*, v. 64 (1990) 5764-5772.

[2] Dobrovolsky, V.N., McGarrity, L.J., Von Tungeln, L.S., Mittelstaedt, R.A., Morris, S.M., Beland, F.A., Heflich, R.H. Micronucleated erythrocyte frequency in control and azidothymidine - treated TK+/, TK+/- and TK-/- mice, *Mutation Research*, v. 570 (2005) 227-235.

[3] Mittelstaedt, S., Von Tungeln., Vasily, N., Michelle, E., Joseph, G., Robert, H., Frederick, A. Frequency of Tk and Hprt lymphocyte mutants and bone marrow micronuclei in mice treated neonatally with zidovudine and didanosine, *Mutagenesis*, v.19 (2004) 307-311.

[4] Olivero, O.A., Anderson, L.M., Diwan, B.A., Haines, D.C., Harbaugh, S.W., Moskal, T.J., Jones, A.B., Rice, J.M., Riggs, C.W., Logsdon, D., Yuspa, S.H., Poirier, M.C. Transplacental effects of 3'-azido-2',3'-dideoxythymidine (AZT): tumorigenicity in mice and genotoxicity in mice and monkeys, *Journal National Cancer Institute*, v.89 (1997)1602-1608.

[5] Von Tungeln, L.S., Hamilton, L.P., Dobrovolsky, V.N., Bishop, M.E., Shaddock, J.G., Heflich, R.H., Beland, F.A. Frequency of Tk and Hprt lymphocyte mutants and bone marrow micronuclei in B6C3F(1)/Tk+/- mice treated neonatally with zidovudine and lamivudine, *Carcinogenesis*, v.23 (2002) 1427-1432.

[6] Elhajouji, A., Cunha, M., Kirsch-Volders, M. Spindle poisons can induce polyploidy by mitotic slippage and micronucleate mononucleates in the cytokinesis-block assay, *Mutagenesis*, v. 13 (1998) 193-198.

[7] Rosefort, C., Fauth, E., Zanki, H. Micronuclei induced by aneugens and clastogens in mononucleate and binucleate cells using the cytokinesis block assay, *Mutagenesis*, v. 19 (2004) 277-284.

[8] Migliore, L., Nieri, M., Amodio, S., Loprieno, N. The human lymphocyte micronucleus assay: a comparison between whole-blood and separated-lymphocyte cultures, *Mutation Research*, v. 227 (1989) 167-172.

[9] Fenech, M., Chang, W.P., Kirsch-Volders, M., Holland, N., Bonassi, S., Zeiger, E. HUMN Project: detailed description of the scoring criteria for cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures, *Mutation Research*, v. 534 (2003) 65-75.

[10] Eastmondand, D.A., Tucker, J.D. Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochore antibody, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, v. 13 (1989) 34-43.

[11] Gonzalez-Cid, M., Larripa, I. Genotoxic activity of azidothymidine (AZT) in in vitro systems, *Mutation Research*, v.321 (1994) 113-118.

[12] Agarwal, R.P., Olivero O.A. Genotoxicity and mitochondrial damage in human lymphocytic cells chronically exposed to 3'-azido2', 3'dideoxythymidine, *Mutation Research*, v.390 (1997) 223-231.

[13] Aruna, R., Jagetia, G.C. Azidothymidine induces dose dependent increase in micronuclei formation in cultured HeLa cells, *Pharmazie*, v. 56 (2001) 492-500.

[14] Wutzler, P., Thust, A. Genetic risks of antiviral nucleoside analogues – a survey, *Antiviral Research*, v.49 (2001) 55-74.

[15] Olivero, O.A. Mechanisms of genotoxicity of nucleoside reverse transcriptase inhibitors, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, v. 47 (2006) 000-000.

[16] Kirsch-Volders, M., Vanhauwaert, A., De Boeck, M., Decordier, L. Importance of detecting numerical versus structural chromosome aberrations. *Mutation Research*, v. 504 (2002) 137-148.

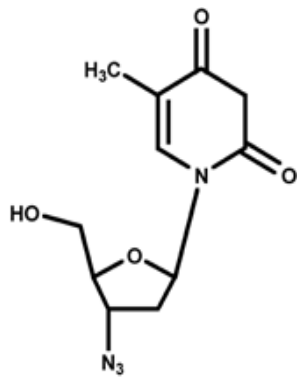
[17] Von Tungeln, L.S., Williams, L.D., Doerge, D.R., Shaddock, J.G., McGarrity, L.J., Morris, S.M., Mittelstaedt, R.A., Heflich, R.H., Beland, F.A. Transplacental drug transfer and frequency of Tk and Hprt lymphocyte mutants and peripheral blood micronuclei in mice treated transplacentally with zidovudine and lamivudine, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, (2006).

[18] Bishop, A.J., Schiestl, R.H. Role of homologous recombination in carcinogenesis, *Experimental and Molecular Pathology*, v. 74 (2003) 94-105.

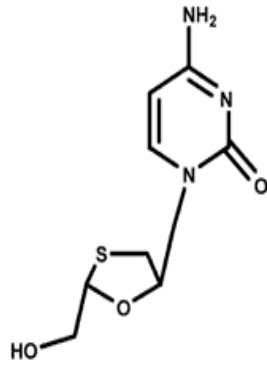
[19] Fenech, M. The in vitro micronucleus technique. *Mutation Research*, v.455 (2000) 81-95.

[20] Norppa, H. and Falck, G.C. What do human micronuclei contain?
Mutagenesis, v. 18 (2003) 221-233.

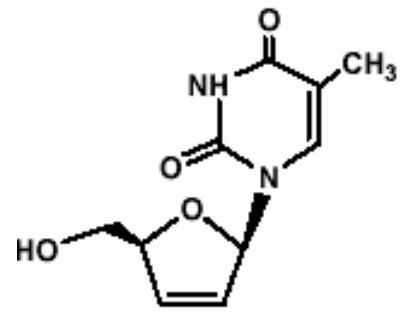
Figure 1. Chemical structure of Zidovudine (AZT), Lamivudine (3TC), and Estavudine (d4T).



AZT



3TC



d4T

Table I – Mean (\pm SD) of MN induction in human peripheral blood lymphocytes in different antiretrovirals.

	AZT		3TC		d4T			
	Mononucleate	Binucleate	Mononucleate	Binucleate	Mononucleate	Binucleate		
	Mean \pm SD	Mean \pm SD	Mean \pm SD	Mean \pm SD	Mean \pm SD	Mean \pm SD		
Doses			Doses			Doses		
NC^a	0 \pm 0	1.0 \pm 0.63	NC^a	0 \pm 0	0.33 \pm 0.47	NC^a	0.50 \pm 0.50	0.33 \pm 0.52
PC^b	0.67 \pm 0.52	18.83 \pm 2.4*	PC^b	0.67 \pm 0.52	18.83 \pm 2.4*	PC^b	0.67 \pm 0.52	18.83 \pm 2.4*
125μg/ml	0 \pm 0	1.67 \pm 1.52	125μg/ml	0 \pm 0	1.17 \pm 0.75	125μg/ml	3.00 \pm 1.79	4.17 \pm 2.71*
250μg/ml	0.33 \pm 0.52	2.5 \pm 1.05	250μg/ml	0 \pm 0	1.67 \pm 0.82	250μg/ml	1.17 \pm 1.17	4.17 \pm 1.17*
375μg/ml	0.17 \pm 0.41	3.17 \pm 0.41*	500μg/ml	0 \pm 0	2.5 \pm 0.55*	500μg/ml	1.33 \pm 1.75	2.30 \pm 1.21*
500μg/ml	0.7 \pm 0.52	4.7 \pm 1.03*	750μg/ml	0.17 \pm 0.37	3.0 \pm 0.63*	750μg/ml	1.17 \pm 0.75	2.50 \pm 2.07*
625μg/ml	0.5 \pm 0.55	5.0 \pm 0.63*						

Mono, mononucleated cells; Bi, binucleated cells; ^aNC: negative control; ^bPC: positive control. There were no cells with more than one micronucleus; P<0.05 when compared with the negative controls.

CAPÍTULO 3

4. PERSPECTIVAS PARA O FUTURO

A infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) acomete cerca de 65 milhões de pessoas, das quais 25 milhões virão ao óbito (Centers for Disease Control and Prevention - CDC, 2006). Aproximadamente 40 milhões de adultos são portadores do vírus da imunodeficiência do tipo 1 (HIV-1) - entre estes 50% são mulheres com idade entre 19 e 49 anos. A alta incidência de mulheres infectadas, em idade reprodutiva, faz com que a cada ano cerca de 600.000 crianças nasçam com o vírus da HIV.

O aparecimento, em 1996, de uma proposta terapêutica inovadora, composta por um coquetel de agentes conhecidos como NRTIs - entre os quais se destacam a AZT e a 3TC - permitiu a sobrevivência dos pacientes infectados, trazendo como consequência colateral a preocupação quanto aos efeitos destas drogas sobre a estabilidade genômica.

Caracteristicamente os metabólitos da AZT induzem MN em eritrócitos policromados (Von Tungeln *et al.*, 2002), embora não tenha sido detectado este tipo de evento quando do tratamento com 3TC. Subseqüentemente foi possível estabelecer que o mecanismo envolvido na indução de mutações pela AZT relaciona-se a quebras cromossômicas e eventos recombinacionais mitóticos (Mittelstaedt *et al.*, 2004). Implicações sobre efeitos genotóxicos trans-placentários são também atribuídas a ambas AZT e 3TC, com ênfase especial para grandes deleções intersticiais e recombinação mitótica - presentes no genoma de fetos em desenvolvimento. Adicionalmente a AZT leva a perda da heterozigose (LOH), e a inativação de supressores tumorais - genes que desempenham um papel crucial na indução do câncer.

Coletivamente, os resultados referentes à presença de anormalidades no DNA mitocondrial de pacientes tratados, suportam a hipótese da ação da AZT sobre esta organela – salientando que a frequência de lesões, em mitocôndrias proveniente de mulheres, é significativamente maior do que em homens (Divi *et al.*, 2004; Walker *et al.*, 2004). Todas estas informações somadas a progressão da patogênese causada pelas mutações nucleares e mitocondriais salientam a importância de estudos que levem a um conhecimento mais aprofundado da toxicidade genética associada ao uso destes inibidores de transcriptase, especialmente no que se refere a 3TC e a d4T, ainda pouco conhecidas quanto as suas potencialidades como indutoras de diferentes tipos de lesões. Também a comparação da genotoxicidade destas drogas quando administradas em conjunto, e a utilização de bio-ensaios que propiciem a detecção de diferentes eventos mutacionais e recombinogênicos, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, poderão contribuir para uma melhor compreensão das causas do aumento nos níveis de mutações – já que um critério de avaliação acerca do custo benefício facilita a escolha da melhor forma de terapia a ser utilizada. É ainda importante que os pacientes que fazem uso da monoterapia ou terapia combinada sejam monitorados, tanto no que se refere a parâmetros clínicos quanto a alterações tóxico genéticas e tumorais correlacionadas a terapia anti-retroviral.

5. BIBLIOGRAFIA

Abbas, A. K., Lichtman, A. H., Pober, J. S. *Imunologia Celular e molecular*, 4ª ed., Rio de Janeiro: Revinter, 2003.

Agarwal, R.P., Olivero O.A. Genotoxicity and mitochondrial damage in human lymphocytic cells chronically exposed to 3'-azido2', 3'dideoxythymidine. *Mutation Research*, v.390, p. 223-231, 1997.

Ayers, K.M., Torrey, C.E., Reynolds, D.J. A transplacental carcinogenicity bioassay in CD-1 mice with zidovudine. *Fundamental and Applied Toxicology*, v. 38, p. 195-198, 1997.

Balzarini, J. Effect of antimetabolite drugs of nucleotide metabolismo in the anti-human immunodeficiency virus activity of nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *Pharmacology & Therapeutics*, v. 87, p. 175-187, 2000.

Centers for Disease Control and Prevention - CDC, 2006. www.cdc.gov. Acessado em 01/12/06.

Dagan, T., Sable, C., Bray, J., Gerschenson, M. Mitochondrial dysfunction and antiretroviral nucleoside analog toxicities: what is evidence? *Mitocondrion*, v.1, p. 397-412, 2002.

Deeks, S., & Walker, B.D. The immune response to AIDS virus infection: good, bad, or both? *The Journal of clinical investigation*, v. 113, p. 808-810, 2004.

Dertinger, S.D., Torous, D.K., Tometsko, K.R. Induction of micronuclei by low doses of azidothymidine (AZT). *Mutation Research*, v.368, p.

301-307, 1996.

Divi, R.L., Walker, V.E., Wade, N.A., Nagashima, K., Seilkop, S.K., Adams, M.E., Nesel, C.J., O'Neill, J.P., Abrams, E.J., Poirier, M.C. Mitochondrial damage and DNA depletion in cord blood and umbilical cord from infants exposed in utero to Combivir. *AIDS*, v.30, p. 1013-1021, 2004.

Eastmondand, D.A., Tucker, J.D. Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochore antibody. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, v. 13, p. 34-43, 1989.

Fenech, M. The *in vitro* micronucleus technique. *Mutation Research*, v.455, p. 81-95, 2000.

Fenech, M., Chang, W.P., Kirsch-Volders, M., Holland, N., Bonassi, S., Zeiger, E. HUMN Project: detailed description of the scoring criteria for cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Research*, v.534, p. 65-75, 2003.

Fenech, M., Rinaldi, J. A comparison of lymphocyte micronuclei and plasma micronutrients in vegetarians and non-vegetarians. *Carcinogenesis*, v.16, p.223-230, 1995.

Gauthier, J.M., Dubeau, H., Rassart, E. Induction of micronuclei in vitro by organochlorine compounds in beluga whale skin fibroblasts. *Mutation Research*, v.439, p. 87-95, 1999.

Gonzalez-Cid, M., Larripa, I. Genotoxic activity of azidothymidine (AZT)

in in vitro systems. *Mutation Research*, v.321, p. 113-118, 1994.

Hawes, S.E., Critchlow, C.W., Sow, P.S., Tourè, P., N'doye, I., Diop, A., Kuypers, J.M., Kasse, A.A., Kiviati, N.B. *Journal of the National Cancer Institute*, v.98, p. 100-111, 2006.

<<http://www.aidsinfo.nih.gov/drugs>>. AIDSinfo Drug Database, 2006.

<<http://www.vircolab.com>>. Virco, 2006.

Kirsch-Volders, M. Towards a validation of the micronucleus test. *Mutation Research*, v.392, p. 1-4, 1997.

Langtry, H.D., Campoli-Richards, D.M. Zidovudine. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic efficacy. *Drugs*, v.37, p. 408-450, 1989.

Littlefield, L.G., Sayer, A.M., Frome, E.L. Comparisons of dose-response parameters for radiation-induced acentric fragments and micronuclei observed in cytokinesis-arrested lymphocytes. *Mutagenesis*, v.4, p. 265-270, 1999.

Meng, Q., Su, T., Olivero, O.A., Poirier, M.C., Shi, X., Ding, X., Walker, V.E. Relationships between DNA incorporation, mutant frequency, and loss of heterozygosity at the TK locus in human lymphoblastoid cells exposed to 3'-azido-3'-deoxythymidine. *Toxicological Sciences*, v. 54, p. 322-329, 2000.

Migliore, L., Nieri, M., Amodio, S., Loprieno, N. The human lymphocyte micronucleus assay: a comparison between whole-blood and separated-lymphocyte cultures. *Mutation Research*, v.227, p.167-172, 1989.

Mittelstaedt, S., Von Tungeln., Vasily, N., Michelle, E., Joseph, G., Robert, H., Frederick, A. Frequency of Tk and Hprt lymphocyte mutants and bone marrow micronuclei in mice treated neonatally with zidovudine and didanosine. *Mutagenesis*, v.19, p. 307-311, 2004.

Moodley, J., Moodley, D., Pillay, K., Coovadia, H., Saba, J., van Leeuwen, R., Goodwin, C., Harrigan, P.R., Moore, K.H., Stone, C., Plumb, R., Johnson, M.A. Pharmacokinetics and antiretroviral activity of lamivudine alone or when coadministered with zidovudine in human immunodeficiency virus type 1-infected pregnant women and their offspring. *Journal Infect Disease*, v.178, p.1327-1333, 1998.

Norppa, H. Cytogenetic markers of susceptibility: influence of polymorphic carcinogen-metabolizing enzymes. *Environ Health Perspect*, v.4, p. 829-835, 1997.

Olivero, O.A., Anderson, L.M., Diwan, B.A., Haines, D.C., Harbaugh, S.W., Moskal, T.J., Jones, A.B., Rice, J.M., Riggs, C.W., Logsdon, D., Yuspa, S.H., Poirier, M.C. Transplacental effects of 3'-azido-2',3'-dideoxythymidine (AZT): tumorigenicity in mice and genotoxicity in mice and monkeys. *Journal National Cancer Institute*, v.89, p. 1602-1608, 1997.

Parekh, S., Ratech, H., Sparano, J.A. Human immunodeficiency virus-associated lymphoma. *Clinical Advances in Hematology and Oncology*, v.1, p.295-301, 2003.

Painter, C., Gilda, C., Stephen, L., Tim, S. In vitro antihepadnaviral activities of combinations of penciclovir, lamivudine, and adefovir antimicrobial. *Agents and Chemotherapy*, v.44, p. 551-560, 2004.

Peçanha, E. P., Antunes, O. A., Tanuri, A. Estratégias farmacológicas para a terapia anti-AIDS. *Química Nova*, v.25, p.1108-1116, 2002.

Peter, K., Gambertoglio J.G. Intracellular phosphorylation of zidovudine (ZDV) and other nucleoside reverse transcriptase inhibitors (RTI) used for human immunodeficiency virus (HIV) infection. *Pharmaceutical Research*, v.15, p. 819-25, 1998.

Poirier, M.C., Divi, R.L., Al-Harhi, L., Olivero, O.A., Nguyen, V., Walker, B., Landay, A.L., Walker, V.E., Charurat, M., Blattner, W.A. Long-term mitochondrial toxicity in HIV-uninfected infants born to HIV-infected mothers. *Journal Acquired Immune Deficiency Syndromes*, v.33, p.175-83, 2003.

Rosefort, C., Fauth, E., Zankl, H. Micronuclei induced by aneugens and clastogens in mononucleate and binucleate cells using the cytokinesis block assay. *Mutagenesis*, v.19, p.277-284, 2004.

Serraino, D., Angeletti, C., Carrieri, M.P., Longo, B., Piche, M., Piselli, P., Arbustini, E., Burra, P., Citterio, F., Colombo, V., Fuzibet, J.G., Dal Bello, B., Targhetta, S., Grasso, M., Pozzetto, U., Bellelli, S., Dorrucchi, M., Dal Maso, L., Busnach, G., Pradier, C., Rezza, G; Kaposi's sarcoma in transplant and HIV-infected patients: an epidemiologic study in Italy and France. *Transplantation*, v.27, p. 1699-1704, 2005.

Souza, M.V.N., Almeida, M.V. Drogas anti-HIV: passado, presente e perspectivas futuras. *Química Nova*, v.26, p.366 – 372, 2003.

Stolk, L.M., Lüers, J.F. Increasing number of anti-HIV drugs but no definite cure. Review of anti-HIV drugs. *Pharmacy World Science*, v.26,

p.133-136, 2004.

Stretcher, B.N. State-of-the-art of zidovudine monitoring. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, v.5, p. 60-68, 1991.

Sussman, R., Olivero, A., Shearer, M., Chougnet, A., Kovacs, A.S., Landay, L., Baker, R., Stek, M., Khoury, M., Proia, A., Kessler, A. Incorporation of zidovudine into leukocyte DNA from HIV-1-positive adults and pregnant women, and cord blood from infants exposed in utero. *AIDS*, v.13, p.919-925, 1999.

Thomas, N., Kakuda, P.D. Pharmacology of Nucleoside and Nucleotide Reverse Transcriptase Inhibitor-Induced Mitochondrial Toxicity, *Clinical Therapeutics*, v. 22, p. 685-708, 2000.

Tovo, P.,A, Chiapello, N., Gabiano, C., Zeviani, M., Spada, M. Zidovudine administration during pregnancy and mitochondrial disease in the offspring. *Antiviral Therapy*, v. 10, p.697-699, 2005.

Tozser, J. Stages of HIV replication as targets for therapeutic intervention. *Medicinal Chemical*, v.3, p. 1447-1457, 2003.

Venkatachalam, T.K., Sarquis, M., Qazi, S., Uckun, F.M. Effect of alkyl groups on the cellular hydrolysis of stavudine phosphoramidates. *Bioorganic & Medicinal Chemical*, v.15, p. 6420-33, 2006

Von Tungeln, L.S., Hamilton, L.P., Dobrovolsky, V.N., Bishop, M.E., Shaddock, J.G., Heflich, R.H., Beland, F.A. Frequency of Tk and Hprt lymphocyte mutants and bone marrow micronuclei in B6C3F(1)/Tk+/- mice treated neonatally with zidovudine and lamivudine.

Carcinogenesis, v.23, p. 1427-1432, 2002.

Walker, D.M., Rucher, R., Funk, K., Hardisty, J.H., Walker, V.F. Transplacental carcinogenicity of 3'-azido-3'-deoxythymidine in B6CF1 mice and F344 rats. *Toxicologist*, v. 73 (abstract 546), p.113, 2004.

Wutzler, P., Thust, A. Genetic risks of antiviral nucleoside analogues – a survey. *Antiviral Research*, v.49, p. 55-74, 2001.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)