

**AVALIAÇÃO *IN VIVO* DO POTENCIAL
MUTAGÊNICO DOS FÁRMACOS
CISPLATINA E OXALIPLATINA ATRAVÉS DO
TESTE SMART EM *Drosophila melanogaster* –
RESULTADOS PARCIAIS**

Vicente Rutkoski da Silva¹
Rafael Rodrigues Dihl²
Mauricio Lehmann³

RESUMO

No presente estudo foi investigada a atividade mutagênica dos fármacos cisplatina (CIS) e oxaliplatina (OXA), amplamente utilizados no tratamento do câncer. Esta investigação foi realizada através do teste para detecção de mutação e recombinação em células somáticas (SMART) de *Drosophila melanogaster*. Os resultados obtidos até o momento mostram que a CIS foi mais tóxica que a OXA. Enquanto a primeira apresentou valores de sobrevivência superiores a 70% apenas nas concentrações que variaram de 0,006 a 0,05 mM, a OXA mostrou índices de sobrevivência superiores a 85% em todas as concentrações avaliadas (0,006 a 1,0 mM). Adicionalmente, observou-se que a CIS é uma potente indutora de danos genéticos e a OXA não foi capaz de induzir lesões no DNA. Estes dados estão de acordo com estudos prévios que demonstram haver importantes diferenças quanto ao número de lesões induzidas e nos sistemas de reparação de DNA entre os fármacos estudados.

Palavras-chave: Cisplatina, oxaliplatina, genotoxicidade, *Drosophila melanogaster*.

ABSTRACT

In the present study it was investigated the mutagenic activity of the drugs cisplatin (CIS) and oxaliplatin (OXA), which are widely used in cancer treatment. This research was performed using the somatic mutation and recombination test (SMART) in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. The results obtained so far show that CIS was more toxic than OXA. While the first showed survival rates over 70% only at concentrations from 0.006 to 0.05 mM, OXA showed survival rates over 85% in all tested concentrations (0.006 to 1 mM). Additionally, CIS was shown to be a potent inducer of genetic damage, and OXA was not able to induce DNA lesions. These data are consistent with previous studies that demonstrate important differences in the incidence of induced lesions and DNA repair systems among the drugs studied.

Keywords: Cisplatin, oxaliplatin, genotoxicity, *Drosophila melanogaster*.

¹ Acadêmico do curso de Biomedicina/ULBRA – Bolsista PROBIC/FAPERGS

² Professor do curso de Biologia e do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde/ULBRA

³ Professor - Orientador do curso de Engenharia Ambiental e do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde/ULBRA (mauriciolehmann@gmail.com)

INTRODUÇÃO

O câncer é um importante problema de saúde pública em países desenvolvidos e em desenvolvimento (WHO, 2002). A Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou, para o ano 2030, 21 milhões de novos casos de câncer e 13 milhões de mortes. O maior efeito desse aumento vai incidir em países de baixa e média rendas. No Brasil, as estimativas para o ano de 2014, apontam a ocorrência de aproximadamente 576.000 casos novos de câncer, incluindo os casos de pele não melanoma, reforçando a magnitude do problema desta doença no país (INCA, 2014).

Aproximadamente em dois terços dos pacientes, a neoplasia apresenta micrometástases, sendo necessária uma abordagem sistêmica, na maioria dos casos com o tratamento quimioterápico. A quimioterapia tem como objetivo principal a destruição das células neoplásicas, preservando as normais. Entretanto, a maioria dos agentes quimioterápicos atua de forma não-específica, sendo todos de baixo peso molecular o que permite que sejam transmitidos através da membrana da maior parte dos tecidos, lesando tanto células malignas quanto normais, resultando em diferentes efeitos colaterais (HARPER et al., 2010; INCA, 2014).

Muitos compostos são utilizados na quimioterapia oncológica, a maioria deles tem como mecanismo de ação a interação com o DNA, como os análogos das bases nitrogenadas, agentes intercalantes e os agentes alquilantes. Os agentes alquilantes são os mais antigos e um dos grupos de fármacos mais utilizados. A citotoxicidade destes compostos ocorre quando há formação de ligações covalentes com o DNA, interferindo na replicação e/ou transcrição, processos essenciais para a divisão celular. Dentre os agentes alquilantes, os quimioterápicos a base de platina são amplamente utilizados no tratamento de vários tipos de câncer (KESKIN et al., 2000; SCHMITT; FREZZA; DOU, 2013, BOWDEN, 2014).

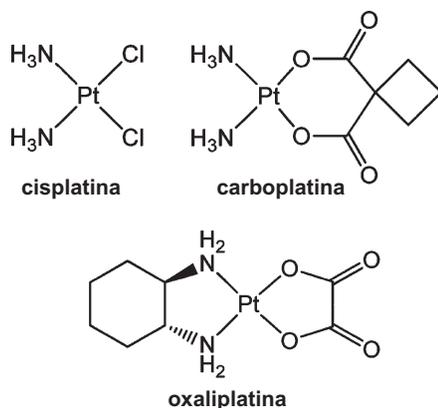
O mecanismo de ação antitumoral dos complexos de platina envolve o bloqueio do ciclo celular na fase G2, podendo desencadear a morte da célula. A ligação destes compostos ao DNA é considerada o passo crítico para a sua atividade antitumoral, mas também é indicativo de um risco para o hospedeiro devido ao seu potencial genotóxico. Além disso, a interação direta e indireta de compostos à base de platina com proteínas, RNA e enzimas contribui para a complexidade do mecanismo de apoptose envolvido no efeito antitumoral (HOSTETTER; CHAPMAN; DEROSE, 2009; NDINGURI et al., 2009; BECKER; WEISS; THEILE, 2014).

A formação de adutos de DNA provoca a distorção na estrutura desta molécula, incluindo alterações nos processos de compactação da dupla hélice, que impede a replicação e a transcrição, resultando assim no aumento da morte celular (apoptose) e no bloqueio do ciclo celular na fase G2 (ALMEIDA et al., 2006; ANG; MYINT; LIPPARD, 2010). A principal via citotóxica desses compostos caracteriza-se pela formação de ligações cruzadas intercadeias ou pontes intercadeias de DNA (ICLs), entre duas guaninas adjacentes (GG) ou entre guanina e adenina (AG), tendo como efeito principal a inibição da replicação do DNA (FRANCESCO; RUGGIERO; RICCARDI, 2002, DEEPA;

KOLANDAIVEL; SENTHILKUMAR, 2013). O risco de tumores secundários resultantes do tratamento com estes agentes aumenta possivelmente devido aos efeitos mutagênicos nas células normais (WU et al., 2011).

Apesar dos efeitos colaterais observados, os complexos de platina ainda são os fármacos de escolha no tratamento de aproximadamente 50 a 70% dos pacientes tratados com medicamentos antitumorais (HARPER et al., 2010). Atualmente, apenas quatro drogas de platina estão liberadas pelos órgãos de controle para uso clínico. São elas: cisplatina, carboplatina, oxaliplatina (Figura 1) e, mais recentemente, nedaplatina, lobaplatina e a heptaplatina, cuja comercialização é restrita ao Japão, China e Coréia, respectivamente (JUNG; LIPPARD, 2007; WHEATE et al., 2010; ALI et al., 2013). Neste sentido a oxaliplatina (OXA) apresenta algumas vantagens em relação à cisplatina (CIS), sendo elas induzir menor resistência das células tumorais ao tratamento quimioterápico e apresentar menos efeitos colaterais (ALI et al., 2013).

Figura 1: Estrutura química dos derivados de platina: cisplatina, carboplatina e oxaliplatina. Modificado de Ang, Myint e Lippard, 2010.



Tendo em vista a escassez de informações referentes à atividade mutagênica da OXA, o presente estudo tem como objetivo avaliar a toxicidade genética deste quimioterápico comparado aos dados obtidos com a CIS através do teste para a Detecção de Mutação e Recombinação Somática (SMART) em *Drosophila melanogaster*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Agentes Químicos

Foram utilizados os medicamentos Citoplax[®] (cisplatina), fabricado por Laboratório Químico Farmacêutico Bergamo Ltda., Taboão da Serra, Brasil, e Lipoxal[®] (oxaliplatina), produzido por Laboratório IMA S.A.I.C., Buenos Aires, Argentina. O agente químico

uretano (URE, CAS n° 51-79-6), utilizado como controle positivo, foi obtido da Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA. As diferentes soluções foram preparadas à hora do tratamento por dissolução em água destilada e deionizada.

Teste para Detecção de Mutação e Recombinação Somática (SMART)

O Teste SMART de asa baseia-se na identificação de cerdas com fenótipos mutantes que representam a expressão fenotípica da ocorrência de lesões em nível de DNA. Tais alterações são primordialmente induzidas nas células dos discos imaginais que, por inúmeras divisões mitóticas, darão origem às asas dos adultos com suas cerdas. Os tricomas mutantes organizam-se em manchas, com fenótipos característicos, que indicam a ocorrência de eventos genéticos relacionados com mutações pontuais, aberrações cromossômicas e rearranjos estruturais devidos à recombinação mitótica. Para maiores detalhes sobre o teste SMART ver Andrade, Reguly e Lehmann (2004).

Linhagens Utilizadas

Foram utilizadas linhagens de *D. melanogaster* portadoras de genes marcadores específicos localizados no cromossomo 3, que permitem detectar a indução de mutação e recombinação em células somáticas. Tais linhagens são designadas como *flr³* e *mwh* e apresentam, respectivamente, as seguintes constituições genéticas:

- *flr³* - *flr³/In(3LR)TM3,ri p^o sep l(3)89Aa bx^{34e} e Bd^S*
- *mwh* - *mwh/mwh*

Todos os estoques de *D. melanogaster*, assim como os cruzamentos, foram mantidos em frascos de vidros de 1/4 L contendo meio de cultura padrão a 25°C ±1°C e a umidade de 60-70%.

Nesta abordagem experimental foi empregado o cruzamento padrão, no qual foram cruzadas fêmeas virgens *flr³* com machos *mwh*, originando larvas portadoras de nível basal de atividade metabólica dependente de citocromo P450.

Tratamentos

Os cruzamentos foram realizados em massa (80 fêmeas:40 machos), durante 3 dias, em vidros contendo meio de cultura padrão. Após este período, transferiu-se as moscas para tubos de 1/4 L contendo meio de ovoposição (fermento biológico fresco, açúcar e água), onde permaneceram por 8 h, tendo sido posteriormente descartadas. Depois de 72 h do início do período de ovoposição, coletou-se larvas de terceiro estágio por flotação em água destilada, sendo posteriormente transferidas para tubos de plástico contendo 1,5 g de meio instantâneo (*Carolina Biological Supply, Burlington, NC, EUA*) onde se adicionou 5 mL das diferentes soluções de tratamento.

Empregou-se, no mínimo, quatro concentrações dos compostos, definidas a partir da avaliação do índice de sobrevivência. Para tanto, colocou-se 100 larvas em cada tubo de tratamento, com o objetivo de estabelecer as porcentagens de sobrevivência após a contagem das moscas adultas eclodidas. Para a avaliação tóxico-genética utilizou-se concentrações que apresentaram índice de sobrevivência de no mínimo 70%.

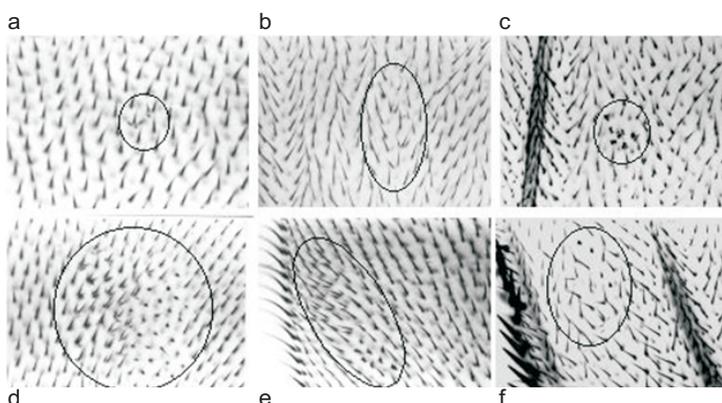
Análise Microscópica

Após a eclosão das moscas, as asas dos indivíduos trans-heterozigotos foram retiradas, colocadas em lâminas de vidro e analisadas em microscópio óptico com aumento de 400 x.

As asas de pelo menos 20 indivíduos de cada sexo foram analisadas, por ponto de tratamento, observando-se os fenótipos das cerdas existentes nas superfícies dorsal e ventral. Estas cerdas originam-se dos discos imaginais de larvas de terceiro estágio que foram expostas aos diferentes tratamentos. A ocorrência - ao longo do desenvolvimento larval - de alterações no material genético destas células leva ao aparecimento, nas asas dos adultos, de manchas com os fenótipos cerdas múltiplas e/ou cerdas com a base alargada - refletindo a expressão dos marcadores genéticos, representados pelos genes recessivos *mwh* e/ou *flr³*, respectivamente.

Os diferentes tipos de manchas são designados como simples *mwh* ou *flr³*, quando apenas um dos marcadores se expressa, ou como manchas gêmeas, quando ambos os fenótipos mutantes, cerdas múltiplas (*mwh*), e base alargada (*flr³*) estão presentes dentro de uma mesma mancha (Figura 2). Manchas simples com uma ou duas células mutantes são designadas como pequenas e as demais como grandes. São considerados clones independentes aqueles separados por 3 ou mais fileiras de tricomas normais (GRAF et al., 1984).

Figura 2: Diferentes tipos de manchas e suas variações. a. Mancha simples pequena, com duas células expressando o fenótipo *mwh*. b. Mancha simples grande, com 5 células expressando o fenótipo *mwh*. c. Mancha simples grande, com 6 células expressando o fenótipo *flr³*. d., e., f. Manchas gêmeas, com clones adjacentes de células expressando os dois fenótipos.



O tipo de mancha mutante observada nas asas dos adultos trans-heterozigotos permite a caracterização de eventos genotóxicos distintos. Desta forma, manchas simples - com os fenótipos de cerdas múltiplas ou cerdas com a base alargada - podem originar-se por:

- (i) alteração no conteúdo informacional dos genes selvagens flr^{3+} ou $mwh+$;
- (ii) deleção de um fragmento cromossômico contendo os marcadores selvagens mwh^+ ou flr^{3+} ;

Além disso, a ocorrência de recombinação simples entre os locos mwh e flr^3 leva ao aparecimento de manchas simples com o fenótipo cerdas múltiplas, enquanto que uma recombinação simples entre flr^3 e o centrômero, seguida de uma recombinação simples entre flr^3 e mwh origina cerdas com a base alargada.

Portanto, as manchas simples podem originar-se tanto por eventos mutacionais - incluindo mutações pontuais e aberrações cromossômicas - como também por recombinação mitótica. Já as manchas gêmeas, que expressam concomitantemente os fenótipos flr^3 e mwh , são produtos exclusivos de eventos recombinacionais - envolvendo a ocorrência de uma recombinação simples entre flr^3 e o centrômero, com posterior segregação de um cromossomo recombinado e um parental (GRAF *et al.*, 1989).

Análise Estatística

As frequências de manchas obtidas nos tratamentos com as diferentes concentrações dos fármacos foram comparadas com o controle negativo. Para tanto, foi utilizado o teste binomial condicional de Kastembaum e Bowman (1970), seguindo o procedimento de decisões múltiplas de acordo com Frei e Würgler (1988).

O teste binomial condicional é aplicado sobre duas hipóteses e permite a obtenção de quatro diagnósticos estatísticos: positivo, negativo, fraco-positivo e inconclusivo. Na hipótese nula (H_0) é estabelecido que não existe diferença na frequência de manchas induzidas nos dois grupos e na hipótese alternativa (H_A) é adicionado um fator multiplicador (m), onde se afirma que um dos grupos apresenta uma frequência de manchas m vezes maior ou menor que o outro.

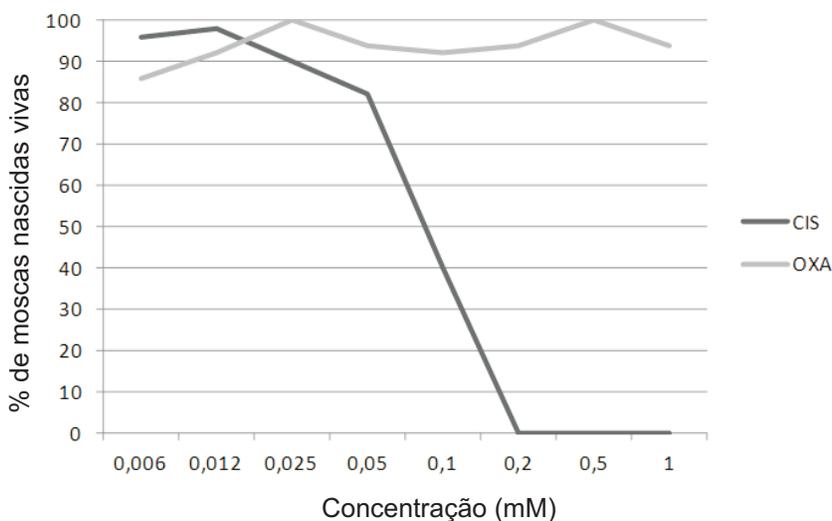
Uma vez que as manchas simples pequenas e o total de manchas têm uma alta frequência espontânea, o valor multiplicador m é fixado em 2. Para as manchas simples grandes e gêmeas, que apresentam uma frequência espontânea baixa, o m é estabelecido em 5 (FREI; WÜRGLER, 1995; ANDRADE; REGULY; LEHMANN, 2004).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O presente trabalho avaliou através do teste SMART de asa em *D. melanogaster* o potencial tóxico-genético dos fármacos CIS e OXA utilizando o cruzamento padrão. Inicialmente, foi realizada a avaliação de toxicidade dos fármacos para, posteriormente,

definir as concentrações a serem empregadas na avaliação de mutagenicidade. A partir da análise dos dados mostrados na Figura 3 pode-se verificar que a OXA apresentou valores de sobrevivência que variaram de 86 a 94%, considerando a variação na concentração de 0,006 a 1,0 mM, a CIS apresentou valores de sobrevivência superiores a 70% apenas nas concentrações de 0,006 a 0,05 mM. Desta forma, é possível verificar que a OXA é menos tóxica que seu análogo. É possível explicar estas diferenças na toxicidade através de informações prévias obtidas na literatura que descrevem a OXA como um composto que induz menos adutos e ligações cruzadas no DNA, e também ao fato de que o reparo destes danos tem se mostrado mais eficiente (FAIVRE et al., 2003; ALMEIDA et al., 2006; PANG et al., 2007).

Figura 3: Porcentagem de moscas nascidas vivas após a exposição crônica de larvas de terceiro estágio a diferentes concentrações dos fármacos CIS e OXA.



Os resultados obtidos referentes à toxicidade-genética mostram que a CIS aumentou a frequência de danos genéticos em todas as concentrações utilizadas, apresentando uma evidente relação dose-efeito. O aumento verificado ocorreu em todos os tipos de manchas, incluindo as manchas gêmeas, indicando que este fármaco induz lesões genéticas originadas também por recombinação somática (Tabela 1).

Tabela 1. Resultados obtidos no cruzamento padrão (CP) do teste SMART após exposição crônica de larvas de 3º estágio a diferentes concentrações dos fármacos cisplatina e oxaliplatina.

Tratamentos	No. de moscas (N)	Manchas por mosca (no. de manchas) diagnóstico estatístico ^a					Manchas com clones <i>mmw</i> ^c (n)	Média da classe de tamanho dos clones ^c	Frequência de indução de clones (por 105 células por divisão celular) ^d (n/NC) ^{e,f}
		Manchas simples pequenas ^b (1-2 céls.) <i>m</i> = 2		Manchas simples grandes ^b (>2 céls.) <i>m</i> = 5		Total de manchas ^b <i>m</i> = 2			
		Manchas simples pequenas ^b (1-2 céls.) <i>m</i> = 2	Manchas simples grandes ^b (>2 céls.) <i>m</i> = 5	Manchas gêmeas <i>m</i> = 5	Total de manchas ^b <i>m</i> = 2				
Controles									
CN ^g	30	1,07 (32)	0,27 (08)	0,07 (02)	1,40 (42)	40	1,78	2,73	
CP ^h	20	6,10 (122) +	0,75 (15) +	0,30 (06) +	7,15 (143) +	140	1,62	14,34 [11,61]	
Cisplatina (mM)									
0,006	20	3,80 (76) +	1,00 (20) +	0,50 (10) +	5,30 (106) +	103	1,85	10,55 [7,82]	
0,012	20	6,05 (121) +	1,90 (38) +	0,80 (16) +	8,75 (175) +	171	2,08	17,52 [14,79]	
0,025	30	14,47 (434) +	4,53 (136) +	1,43 (43) +	20,43 (613) +	607	1,99	62,19 [59,46]	
0,05	20	31,60 (632) +	14,95 (299) +	5,50 (110) +	52,05 (1041) +	1030	2,26	105,53 [102,80]	
Oxaliplatina (mM)									
0,006	20	0,95 (19) -	0,00 (00) -	0,10 (02) i	1,05 (21) -	21	1,71	2,15 [-0,58]	
0,012	20	0,70 (14) -	0,10 (02) -	0,00 (00) -	0,80 (16) -	16	1,88	1,64 [-1,09]	
0,025	20	1,35 (27) i	0,15 (03) -	0,10 (02) i	1,60 (32) -	31	1,84	3,18 [0,44]	
0,05	20	1,25 (25) -	0,05 (01) -	0,00 (00) -	1,30 (26) -	26	1,35	2,66 [-0,07]	
0,1	20	1,50 (30) i	0,15 (03) -	0,00 (00) -	1,65 (33) -	33	1,47	3,48 [0,75]	
0,2	20	1,45 (29) i	0,05 (01) -	0,05 (01) -	1,55 (31) -	31	1,48	3,18 [0,44]	
0,5	20	1,25 (25) -	0,35 (07) i	0,05 (01) -	1,65 (33) -	33	2,18	3,38 [0,65]	

^aDiagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würzger (1988): +, positivo; -, negativo; i, inconclusivo, $P \leq 0,05$. ^bIncluindo manchas simples *flr*² raras. ^cForam considerados apenas os clones *mmw* das manchas simples *mmw* e das manchas gêmeas. ^dCalculado de acordo com Frei *et al.* (1992). ^eC = 48.800 (aproximadamente o número de células analisadas por mosca). ^fValores entre colchetes representam as frequências de manchas induzidas corrigidas pela incidência espontânea estimada a partir do controle negativo. ^gCN: controle negativo, água destilada e deionizada, ^hCP: controle positivo, uretano 20 mM.

Neste sentido, os dados obtidos na literatura científica mostram resultados semelhantes. A CIS foi capaz de induzir trocas entre cromátides irmãs (TCIs), aberrações cromossômicas e aumentar a frequência de micronúcleos quando avaliada em cultura de linfócitos humanos, células da medula óssea e sangue periférico de camundongos e ratos (ANTUNES et al., 2005; KHYNRIAM; PRASAD, 2003; KOSMINDER et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2009; RJIBA-TOUATI et al., 2012; SERPELONI et al., 2013). Este fármaco quando avaliado em linfócitos humanos através do teste de micronúcleos com bloqueio de citocinese (CBMN) associado ao uso da técnica de hibridização *in situ* por fluorescência (FISH), apresentou aumento na frequência de micronúcleos, gerados tanto por quebras, quanto por alterações cromossômicas numéricas (NERSESYAN et al., 2006). Adicionalmente, foi descrito como indutor de mutação gênica, quando avaliado através do SOS-cromoteste em *Escherichia coli* (OVERBECK; KNIGHT; BECK, 1996; GEBEL et al., 1997) e do teste de mutação do gene *Hprt* em células de ovário de hamster chinês CHO-K1 (GEBEL et al., 1997).

Através do teste SMART em *D. melanogaster*, a CIS foi previamente caracterizada como mutagênica e recombinogênica (KATZ, 1987; DANESI et al., 2010a,b) além de induzir recombinação mitótica em células diplóides de *Aspergillus nidulans* (MIYAMOTO et al., 2007). Em células do gânglio cerebral de *D. melanogaster* este composto foi capaz de aumentar a frequência de quebras na dupla fita de DNA (GARCÍA SAR et al., 2008).

Ao contrário da CIS, os resultados encontrados com a OXA no presente estudo mostram que este fármaco, nas concentrações avaliadas, não foi capaz de induzir danos genéticos através do teste SMART. Por se tratar de uma avaliação preliminar, os resultados aqui obtidos devem ser vistos com cautela, sendo necessário aumentar o número amostral e avaliar concentrações mais elevadas possibilitando esclarecer os resultados inconclusivos encontrados e também confirmar os dados obtidos até o momento.

Considerando as informações descritas na literatura, existem poucos estudos acerca das propriedades mutagênicas da OXA. Almeida et al. (2006) utilizaram a versão alcalina do teste cometa em células da linhagem tumoral H460 para medir a formação de pontes no DNA pelos agentes OXA e CIS, assim como estudar a cinética de reparação destes danos. Adicionalmente, os autores investigaram através deste mesmo bioensaio os adutos induzidos no DNA dos linfócitos de pacientes submetidos à quimioterapia com a OXA. Os autores concluíram que a CIS induziu maior quantidade de adutos se comparada à OXA *in vitro*, utilizando as mesmas concentrações, e que houve diferenças na eficiência de reparação dos danos induzidos. Da mesma forma, estes fármacos foram capazes de induzir lesões em linfócitos *in vivo*, apresentando diferenças na formação de pontes e no reparo destas lesões. Também utilizando a versão alcalina do teste cometa, porém em células de câncer colorretal HCT116, PANG et al. (2007) observaram que apenas a OXA e a carboplatina foram capazes de induzir lesões no DNA, ao contrário da CIS que mostrou ausência de genotoxicidade. Esta diferença encontrada sugere padrões distintos de indução de danos no DNA entre estes fármacos.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados apresentados neste estudo demonstram que os fármacos CIS e OXA apresentam comportamentos distintos no que se refere à atividade mutagênica. Enquanto a

CIS mostra-se uma potente indutora de danos genéticos, a OXA, em concentrações iguais e até 10x superiores, não foi capaz de induzir lesões no material genético. Desta forma, somados aos dados descritos na literatura, os resultados do presente trabalho indicam haver diferenças importantes no padrão de indução de lesões genéticas e também em relação aos mecanismos de reparação do DNA envolvidos na correção destes danos. Desta forma, são necessários estudos adicionais que possibilitem esclarecer as diferenças encontradas e assim contribuir para o desenvolvimento de novos análogos que apresentem melhor eficácia clínica e que ao mesmo tempo induzam menos efeitos colaterais aos pacientes sob tratamento quimioterápico.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

REFERÊNCIAS

- ALI, I. et al. Platinum compounds: a hope for future cancer chemotherapy. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 2, p. 296-306, 2013.
- ALMEIDA, G. M. et al. Detection of oxaliplatin-induced DNA crosslinks *in vitro* and in cancer patients using the alkaline comet assay. **DNA Repair**, v. 5, n. 2, p. 219-225, 2006.
- ANDRADE, H. H. R.; REGULY, M. L.; LEHMANN, M. Wing Somatic Mutation and Recombination Test (SMART). In: HENDERSON, D. S. (Ed.). **Drosophila Cytogenetics Protocols**. Totowa: Human Press, 2004. p. 389-412.
- ANG, W. H.; MYINT, M.; LIPPARD, S. J. Transcription inhibition by platinum-DNA cross-links in live mammalian cells. **Journal of The American Chemical Society**, v. 132, n. 21, p. 7429-7435, 2010.
- ANTUNES, L. M., et al. Evaluation of the clastogenicity and anticlastogenicity of the carotenoid bixin in human lymphocyte cultures. **Mutation Research**, v. 585, n. 1-2, p. 113-119, 2005.
- BECKER, J. P.; WEISS, J.; THEILE, D. Cisplatin, oxaliplatin, and carboplatin unequally inhibit *in vitro* mRNA translation. **Toxicology Letters**, v. 225, n. 1, p. 43-47, 2014.
- BOWDEN, N. A. Nucleotide excision repair: why is it not used to predict response to platinum-based chemotherapy? **Cancer Letters**, v. 346, p. 163-171, 2014.
- DANESI, C. C. et al. Mutagenic evaluation of combined paclitaxel and cisplatin treatment in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Mutation Research**, v. 696, n. 2, p. 139-143, 2010a.
- DANESI, C. C. et al. Evaluation of the genotoxicity of cisplatin, paclitaxel and 5-fluorouracil combined treatment in the *Drosophila* wing-spot test. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 11, p. 3120-3124, 2010b.
- DEEPA, P.; KOLANDAIVEL, P.; SENTHILKUMAR, K. Structural properties and the effect

- of platinum drugs with DNA base pairs. **Structural Chemistry**, v. 24 n. 2, p. 583-595, 2013.
- FAIVRE, S. et al. DNA strand breaks and apoptosis induced by oxaliplatin in cancer cells. **Biochemical Pharmacology**, v. 66, n. 2, p. 225-237, 2003.
- FRANCESCO, A. M. D. I.; RUGGIERO, A.; RICCARDI, R. Cellular and molecular aspects of drugs of the future: oxaliplatin. **Cellular and Molecular Life Science**, v. 59, n. 11, p. 1914-1927, 2002.
- FREI, H.; WÜRGLER, F. E. Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate positive, negative or inconclusive result. **Mutation Research**, v. 203, n. 4, p. 297-308, 1988.
- FREI, H.; WÜRGLER, F. E. Optimal experimental design and sample size for the statistical evaluation of data from somatic mutation and recombination tests (SMART) in *Drosophila*. **Mutation Research**, v. 334, n. 2, p. 247-258, 1995.
- FREI, H. et al. The genotoxicity of the anticancer drug mitoxantrone in somatic and germ-cells of *Drosophila melanogaster*. **Mutation Research**, v. 279, n. 1, p. 21-33, 1992.
- GARCÍA SAR, D. et al. *In vivo* detection of DNA adducts induced by cisplatin using capillary HPLC-ICP-MS and their correlation with genotoxic damage in *Drosophila melanogaster*. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 390, n. 1, p. 37-44, 2008.
- GEBEL, T. et al. Genotoxicity of platinum and palladium compounds in human and bacterial cells. **Mutation Research**, v. 389, n. 2-3, p. 183-190, 1997.
- GRAF, U. et al. Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 6, n. 2, p. 153-188, 1984.
- GRAF, U. et al. Thirty compounds tested in the *Drosophila* wing spot test. **Mutation Research**, v. 222, n. 4, p. 359-373, 1989.
- HARPER, B. W. et al. Advances in platinum chemotherapeutics. **Chemistry**, v. 16, n. 24, p. 7064-7077, 2010.
- HOSTETTER, A. A.; CHAPMAN, E. G.; DEROSE, V. J. Rapid cross-linking of an rna internal loop by the anticancer drug cisplatin. **Journal of the American Chemical Society**, v. 131, n. 26, p. 9250-9257, 2009.
- Instituto Nacional do Câncer. INCA. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br>>. Acesso em: 08 jun. 2014.
- JUNG, Y.; LIPPARD, S. J. Direct cellular responses to platinum-induced DNA damage. **Chemical Reviews**, v. 107, n. 5, p. 1387-1407, 2007.
- KASTEMBAUM, M. A.; BOWMAN, K. O. Tables to determining the statistical significance of mutation frequencies. **Mutation Research**, v. 9, n. 5, p. 527-549, 1970.
- KATZ, A. J. Genotoxic effects of cisplatin in somatic tissue of *Drosophila melanogaster*. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v.10, n. 2, p. 197-203, 1987.
- KESKIN, O. et al. Characterization of anticancer agents by their growth inhibitory activity and relationships to mechanism of action and structure. **Anti-Cancer Drug Design**, v. 15, n. 2, p. 79-98, 2000.

- KHYNRIAM, D.; PRASAD, S. B. Cisplatin-induced genotoxic effects and endogenous glutathione levels in mice bearing ascites Dalton's lymphoma. **Mutation Research**, v. 526, n. 1-2, p. 9-18, 2003.
- KOSMINDER, B. et al. Evaluation of the genotoxicity of cis-bis-(3-aminoflavone) dichloroplatinum(II) in comparison with cis-DDP. **Mutation Research**, v. 558, n. 1-2, p. 93-110, 2004.
- MIYAMOTO, C. T. et al. Genotoxicity (mitotic recombination) of the cancer chemotherapeutic agents cisplatin and cytosine arabinoside in *Aspergillus nidulans*. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, n. 6, p. 1091-1095, 2007.
- NDINGURI, M. W. et al. Peptide targeting of platinum anti-cancer drugs. **Bioconjugate Chemistry**, v. 20, n. 10, p. 1869-1878, 2009.
- NERSESYAN, A., et al. Cytogenetic toxicity of cycloplatin in human lymphocytes: detection by the micronucleus test and fluorescence in situ hybridization. **Anti-Cancer Drugs**, v. 17, n. 3, p. 289-295, 2006.
- OLIVEIRA, R. J. et al. Evaluation of chemopreventive activity of glutamine by the comet and the micronucleus assay in mice's peripheral blood. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 28, n. 1, p. 120-124, 2009.
- OVERBECK, T. L.; KNIGHT, J. M.; BECK, D. J. A comparison of the genotoxic effects of carboplatin and cisplatin in *Escherichia coli*. **Mutation Research**, v. 362, n. 3, p. 249-259, 1996.
- PANG, S. K. et al. DNA damage induced by novel demethylantharidin-integrated platinum anticancer complexes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 363, n. 1, p. 235-240, 2007.
- RJIBA-TOUATI, K. et al. Induction of DNA fragmentation, chromosome aberrations and micronuclei by cisplatin in rat bone-marrow cells: protective effect of recombinant human erythropoietin. **Mutation Research**, v. 747, n. 2, p. 202-206, 2012.
- SERPELONI, J. M. et al. Effects of lutein and chlorophyll b on GSH depletion and DNA damage induced by cisplatin *in vivo*. **Human & Experimental Toxicology**, v. 32, n. 8, p. 828-836, 2013.
- SCHMITT, S. M.; FREZZA, M.; DOU, Q. P. New applications of old metal-binding drugs in the treatment of human cancer. **Frontiers in Bioscience**, v. 4, p. 375-391, 2013.
- WHEATE, N. J., et al. The status of platinum anticancer drugs in the clinic and in clinical trials. **Dalton Transactions**, v. 39, n. 35, p. 8113-8127, 2010.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Policies and managerial guidelines for national cancer control programs. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 12, n. 5, p. 366-370, nov. 2002.
- WU, B. et al. Specific DNA structural attributes modulate platinum anticancer drug site selection and cross-link generation. **Nucleic Acids Research**, v. 39, n. 18, p. 8200-8012, 2011.