

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE TÓXICO-GENÉTICA DA ENROFLOXACINA

MAURICIO ALVES ALTE¹
SIMONE THOMÉ²
BIANCA REGINA RIBAS DE ABREU³
MAURICIO LEHMANN⁴
RAFAEL RODRIGUES DIHL⁵

RESUMO

A Enrofloxacin foi a primeira fluoroquinolona introduzida e aprovada na medicina veterinária, sendo amplamente utilizada em espécies domésticas, exóticas e silvestres, apresentando ação bactericida contra uma grande variedade de microorganismos. Devido à escassez de informações disponíveis na literatura sobre o seu potencial tóxico-genético, o presente trabalho avaliou a atividade recombinogênica e mutagênica da enrofloxacin através do teste SMART. Os resultados demonstraram aumentos significativos na frequência de indução de clones mutantes e indicaram que a enrofloxacin pode atuar principalmente como indutora de recombinação homóloga, evento genético associado ao processo carcinogênico.

Palavras-chave: Enrofloxacin, fluoroquinolonas, SMART, recombinação homóloga

ABSTRACT

Enrofloxacin was the first fluoroquinolone introduced in markets and approved for veterinary uses. It exerts bactericidal action against a variety of microorganisms, and is widely employed to treat diseases affecting domesticated, exotic and native species. Considering the paucity of information published on the genotoxic potential of enrofloxacin, the present study investigates the recombinogenic and mutagenic activities of the drug using the SMART assay. The results show significantly

¹ Acadêmico do Curso de Biomedicina/ULBRA – Bolsista PROICT/ULBRA

² Professora do Curso de Medicina Veterinária/ULBRA

³ Laboratório da Toxicidade Genética da ULBRA - Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde/ULBRA

⁴ Professor do Curso de Engenharia Ambiental/ULBRA e do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde/ULBRA

⁵ Professor - Orientador do Curso de Ciências Biológicas/ULBRA e do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde/ULBRA (rafael.rodrigues@ulbra.br)

higher frequencies of mutant clone induction in treated samples, compared to controls, and indicate that enrofloxacin may act mainly as inducer of homologous recombination, an event associated with carcinogenesis.

Keywords: Enrofloxacin, fluoroquinolones, SMART, homologous recombination.

INTRODUÇÃO

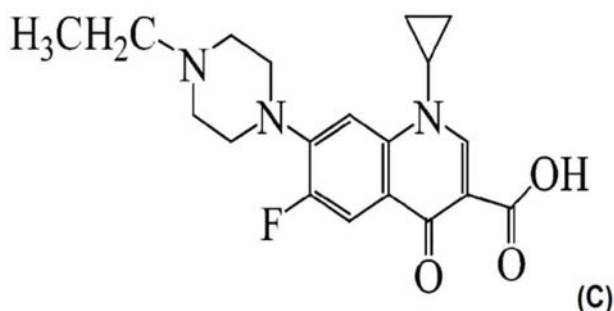
Dentre os antimicrobianos mais utilizados, as quinolonas fazem parte da classe de agentes com maior eficiência no tratamento de várias patologias causadas por bactérias. Sua utilização é ampla e tem sido empregada tanto na medicina humana quanto na medicina veterinária (BROWN, 2008).

O composto básico mais antigo dessa classe de agentes antimicrobianos sintéticos é o ácido nalidíxico, que constitui as chamadas quinolonas de primeira geração (SUH; LORBER, 1995).

Devido ao rápido desenvolvimento de resistência bacteriana e a limitação terapêutica das quinolonas, vários estudos foram conduzidos no intuito de modificar a sua estrutura química, para originar análogos de quinolonas com baixos efeitos colaterais, a fim de garantir melhor eficiência no diagnóstico e prognóstico do indivíduo. Sendo assim, foram originadas as quinolonas de segunda, terceira e quarta geração (BALL, 2000). Com a adição de flúor na molécula, originaram-se as fluoroquinolonas, que são comumente utilizadas no tratamento de uma gama de afecções (DAVIES, 1996).

A enrofloxacin (Figura 1) foi a primeira fluoroquinolona introduzida e aprovada na medicina veterinária para uso em animais de pequeno porte, sendo considerada eficaz e segura em terapias combinadas com outros medicamentos (PAPICH; RIVIERE, 2001). O emprego da enrofloxacin tem apresentado rápida ação bactericida contra uma gama de agentes patogênicos e vem sendo utilizada em espécies domésticas, exóticas e silvestres. Sua administração é bem tolerada, tanto por via oral, como subcutânea e intramuscular (MARTINEZ et al., 2006).

Figura 1. Estrutura química da enrofloxacin. Modificado de Hu et al., 2007.



Com auxílio de estudos de farmacocinética, pode-se evidenciar que a enrofloxacin possui um metabólito principal, a ciprofloxacina, e sua atividade antimicrobiana tem sido associada em parte à ação deste metabólito (MENGOZZI et al., 1996).

A ação das fluoroquinolonas está centrada na inibição da replicação do DNA bacteriano, através de sua ação sobre as enzimas topoisomerases tipo II bacterianas, a DNA girase e a topoisomerase IV. Conseqüentemente, quando há bloqueio da síntese de DNA e divisão da célula, ocorre a morte da bactéria (SUH; LORBER, 1995; KHOBURSKY; COZZARELLI, 1998).

Em função da similaridade estrutural e funcional da topoisomerase II com a girase, a ocorrência de reações cruzadas pode desencadear um papel potencialmente genotóxico (FORT, 1992). Sendo assim, o fato de existirem poucos dados na literatura acerca da atividade genotóxica das fluoroquinolonas *in vivo*, o presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos genotóxicos da enrofloxacin, utilizando o teste para detecção de mutação e recombinação somática em *Drosophila melanogaster* (SMART).

MATERIAIS E MÉTODOS

Teste para detecção de mutação e recombinação somática (SMART)

O medicamento utilizado foi a Enrofloxacin (Baytril®) obtido da Bayer S.A., São Paulo, SP, Brasil. Foram analisadas quatro diferentes concentrações de enrofloxacin: 2,5, 5, 10 e 20 mM. Como diluente e controle negativo foi utilizado água destilada e deionizada. Como controle positivo foi utilizado o agente alquilante Etilmetanosulfonato (EMS, CAS 62-50-0) obtido da Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA.

O teste SMART baseia-se na identificação de pelos com fenótipos mutantes que são originados em decorrência de lesões em nível de DNA. Essas alterações são originadas em células dos discos imaginários, que por divisão mitótica, darão origem às asas dos adultos. Através da análise desses pelos com fenótipos mutantes, podemos verificar a ocorrência de mutações pontuais,

aberrações cromossômicas e rearranjos estruturais (ANDRADE et al. 2004).

O ensaio fez uso de duas linhagens diferentes de *Drosophila melanogaster*, portadoras de genes marcadores específicos, localizados no cromossomo 3. Tais linhagens são designadas como *flr³* e *mwh* e o cruzamento entre essas linhagens dá origem a larvas com duas constituições genotípicas, no que se refere aos genes marcadores: larvas *mwh +/ + flr³* - que são trans-heterozigotas para os marcadores recessivos *mwh* e *flr³* e larvas *mwh +/ TM3, Bd^S* - heterozigotas para o cromossomo TM3, necessário para balancear o marcador *flr³*, já que este é letal em homozigose (GARCIA-BELLIDO; DAPENA, 1974). Os adultos heterozigotos para o cromossomo TM3 apresentam recortes nas asas - determinados pelo gene marcador *Bd^S* - o que permite diferenciá-los dos imagos trans-heterozigotos, que apresentam asas com formato redondo normal.

Sendo assim, as larvas provenientes desses cruzamentos foram submetidas aos tratamentos com as diferentes concentrações da enrofloxacina e controles negativo e positivo. Após o nascimento desses indivíduos tratados, as asas dos adultos foram retiradas e submetidas à montagem em lâminas de vidro contendo cinco pares de asas de machos e cinco pares de asas de fêmeas. A análise dessas lâminas foi feita em microscópio óptico com aumento de 400 vezes onde se fez uma varredura de ambos os lados ventral e dorsal das asas em busca dos fenótipos mutantes.

Foram analisados 50 indivíduos de cada tratamento, observando-se manchas com os fenótipos pelos múltiplos e/ou pelos 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 tanto pelos múltiplos (*mwh*), como pelos com a base alargada (*flr³*) estão presentes dentro de uma mesma mancha (GRAF et al., 1984).

A análise estatística foi realizada através da comparação dos resultados obtidos nos diferentes tratamentos com aqueles obtidos no controle negativo. Para tanto, utilizamos o teste binomial condicional de Kastambaum e Bowman (1970), seguindo o procedimento de decisões múltiplas de acordo com Frei e Wurgler (1988). Para fins de confirmar resultados e excluir *outliers* utilizamos o teste U de Wilcoxon, Mann e Whitney (FREI; WÜRGLER, 1995).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram analisadas quatro diferentes concentrações, 2,5, 5,0, 10,0 e 20,0mM para a enrofloxacina. Tais concentrações foram determinadas a partir de experimento piloto, onde foram escolhidas doses que garantiram a sobrevivência de no mínimo 70% da moscas. Os dados obtidos em dois experimentos independentes foram agrupados, uma vez que não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes.

Os resultados obtidos no cruzamento padrão após exposição crônica das larvas aos tratamentos estão demonstrados na figura 2. No caso de diagnóstico estatístico positivo, as moscas *mwh/TM3* (Figura 3) também foram analisadas, o que proporcionou quantificar a proporção dos eventos de mutação e recombinação para a genotoxicidade total observada.

Figura 2. Frequência de indução de clones mutantes a partir da análise dos indivíduos trans-heterozigotos após exposição crônica das larvas a diferentes concentrações (mM) de Enrofloxacina.

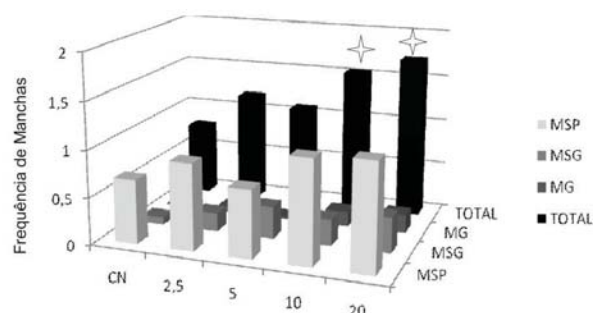
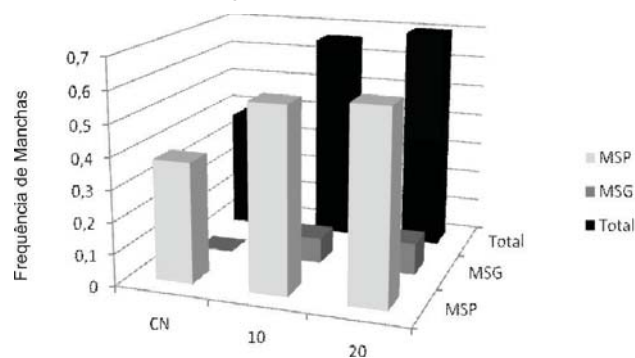


Figura 3. Frequência de indução de clones mutantes a partir da análise dos indivíduos heterozigotos-TM3 após exposição crônica das larvas a diferentes concentrações (mM) de Enrofloxacina.

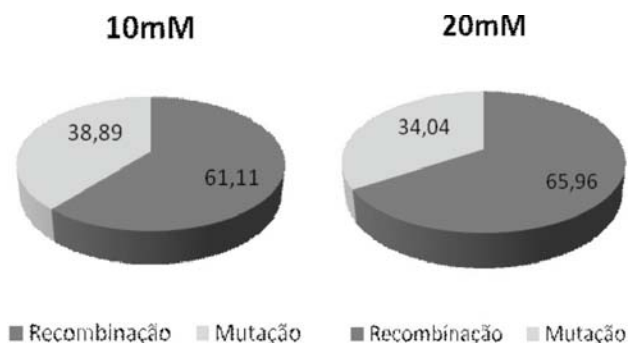


Os valores de controle negativo foram 0,78 para a progênie Trans-heterozigota e de 0,38 para os indivíduos heterozigotos-TM3, o que está em conformidade com relatos da literatura (FREI; WÜRGLER, 1995;1996). No que se refere aos resultados de genotoxicidade, a enrofloxacina induziu aumentos significativos na indução de clones mutantes para o total de manchas

dos indivíduos trans-heterozigotos, quando comparado ao respectivo controle negativo. Os resultados positivos foram observados nas duas concentrações mais altas, 10 e 20 mM, evidenciando que a enrofloxacin induziu alterações no material genético das células somáticas de *Drosophila melanogaster*.

Na análise do genótipo TM3, a enrofloxacin não promoveu aumentos significativos no total de manchas observadas. Para quantificar a proporção de eventos mutagênicos e recombinogênicos, foi feita a análise dos indivíduos heterozigotos-TM3 nas duas maiores concentrações. Os resultados obtidos apontaram que cerca de 60 - 66% da atividade encontrada está associada à recombinação somática e 34 - 39 % à atividade mutagênica gênica e/ou cromossômica (Figura 4). Todos os eventos detectados na progênie heterozigota-TM3 são exclusivamente mutacionais, já que, a presença do cromossomo balanceador TM3 torna os produtos de recombinação inviáveis. Sendo assim, pode-se apontar a enrofloxacin como indutora preferencialmente de recombinação homóloga.

Figura 4. Contribuição dos eventos de mutação e recombinação (%) para a genotoxicidade observada nas concentrações de 10mM e 20mM da Enrofloxacin



A enrofloxacin é uma fluoroquinolona desenvolvida exclusivamente para uso em medicina veterinária. Além do amplo espectro de ação, é caracterizada por atuar contra microorganismos resistentes a outros antimicrobianos de uso veterinário (BALL, 2000; FANG et al., 2000; BROWN, 2008).

Dados prévios com relação à atividade genotóxica da enrofloxacin demonstraram que ela pode atuar como indutor de aberrações cromossômicas *in vitro* em linfócitos de sangue periférico humano. Parte da genotoxicidade da enrofloxacin foi atribuída ao seu metabólito, a ciprofloxacina (GORLA et al., 1999). De fato, alguns estudos têm demonstrado que a enrofloxacin é convertida em ciprofloxacina em diferentes espécies (KAARTINEN et al., 1995; CESTER; TOUTAIN, 1997), e já foi apontado, anteriormente,

que a ciprofloxacina apresentou efeito clastogênico em células V79 de hamster Chinês e aumentou a frequência de micronúcleos e quebras de DNA em células WTK-1 humanas, nos ensaios de micronúcleos com bloqueio da citocinese (CBMN) e Cometa. Além disso, a ciprofloxacina induziu aberrações cromossômicas em células da medula óssea de camundongos (MUKHERJEE et al., 1993).

As fluoroquinolonas se ligam ao complexo DNA – topo II, formando o complexo ternário e interferindo no processo de quebra/religamento das cadeias do DNA pela topo II. Este processo resulta em quebras duplas de fitas do DNA, bloqueio do processo replicativo e morte celular. Já, a recombinação homóloga atua nas quebras de cadeias de DNA, favorecendo o processo de replicação (ROTHSTEIN et al., 2000; BISHOP; SCHIESTL, 2001). Desta forma, considerando a homologia funcional e estrutural entre a topo II eucariótica e a enzima procariótica, pode-se explicar a maior frequência de eventos recombinacionais observados no presente trabalho.

Sendo assim, a recombinação homóloga que atua como um mecanismo de reparo de DNA pode resultar na perda da heterozigosidade de genes envolvidos na regulação do ciclo celular. Estas alterações genéticas podem exercer papéis importantes nas diferentes etapas do processo carcinogênico, revelando mutações recessivas (BISHOP; SCHIESTL, 2003).

Finalmente, para avaliar o risco associado à exposição à enrofloxacin, é essencial que os efeitos genotóxicos desta substância sejam investigados e, portanto, a utilização do teste SMART como bioensaio para avaliar o perfil genotóxico desta classe de compostos se justifica, uma vez que o SMART detecta simultaneamente eventos de mutação gênica e/ou cromossômica e também recombinação somática. Outro ponto relevante refere-se à semelhança genética e bioquímica entre a *Drosophila* e mamíferos, além da homologia encontrada entre genes supressores tumorais e oncogenes humanos, motivo pelo qual ela é considerada um excelente modelo para estudos de genotoxicidade (TICKOO; RUSSEL, 2002).

CONCLUSÃO

Foram observados resultados positivos, para o total de manchas nas concentrações mais altas, 10,0 e 20,0 mM para a enrofloxacin, nos indivíduos trans-heterozigotos, quando comparadas ao controle negativo. Por outro lado, não foi observado nenhum aumento significativo na frequência do total de manchas para os indivíduos heterozigotos TM3. Neste sentido, pode-se concluir que a enrofloxacin

atua preferencialmente como indutora de recombinação homóloga somática, evento genético que está associado a diferentes etapas do processo carcinogênico.

REFERÊNCIAS:

- 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: Humana, 2004. v. 247, p. 389-412.
- BALL, P. Quinolone generations: natural history or natural selection? *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 46, p. 17-24, 2000.
- BISHOP, A. J.; SCHIESTL, R. H. Homologous recombination as a mechanism of carcinogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1471, p. 109-121, 2001.
- BISHOP, A. J.; SCHIESTL, R. H. Role of homologous recombination in carcinogenesis. *Experimental and Molecular Pathology*, v. 74, p. 94-105, 2003.
- BROWN, S. A. Fluoroquinolones in animal health. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, v. 19, p. 1-14, 2008.
- CESTER, C. C.; TOUTAIN, P. L. A comprehensive model for enrofloxacin to ciprofloxacin transformation and disposition in dog. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 86, p. 1148-1155, 1997.
- DAVIES, J. Medicine — Bacteria on the rampage. *Nature*, v. 383, p. 219-220, 1996.
- FANG, K.C. et al. Synthesis, antibacterial, and cytotoxic evaluation of certain 7-substituted norfloxacin derivatives. *Journal Medicinal Chemistry*, v. 43, p. 3809-3812, 2000.
- FORT, F. L. Mutagenicity of quinolone antibacterials. *Drug Safety*, v. 7, p. 214-222, 1992.
- FREI, H.; WÜRGLER, F. E. Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative or inconclusive result. *Mutation Research*, v. 203, p. 297-308, 1988.
- _____. Optimal experimental design and sample size for the statistical evaluation of data from somatic mutation and recombination tests (SMART) in *Drosophila*. *Mutation Research*, v. 334, p. 247-258, 1995.
- _____. Induction of somatic mutation and recombination by four inhibitors of eukaryotic topoisomerases assayed in the wing spot test of *Drosophila melanogaster*. *Mutagenesis*, v. 11, p. 315-325, 1996.
- GARCIA-BELLIDO, A.; DAPENA, J. Induction, detection and characterization of cell differentiation mutants in *Drosophila melanogaster*. *Molecular and General Genetics*, v. 128, p. 117-130, 1974.
- GORLA, N.; GARCIA OVANDO, H.; LARRIPA, I. Chromosomal aberrations in human lymphocytes exposed in vitro to enrofloxacin and ciprofloxacin. *Toxicology Letters*, v. 104, p. 43-48, 1999.
- GRAF, U. et al. Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environmental Mutagenesis*, v. 6, p. 153-188, 1984.
- KAARTINEN, L. et al. Pharmacokinetics of enrofloxacin after single intravenous, intramuscular and subcutaneous injections in lactating cows. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, v. 18, p. 357-362, 1995.
- KASTENBAUM, M. A.; BOWMAN, K. O. Tables to determining the statistical significance of mutation frequencies. *Mutation Research*, v. 9, p. 527-549, 1970.
- KHODURSKY, A. B.; COZZARELLI, N. R. The mechanism of inhibition of topoisomerase IV by quinolone antibacterials. *Journal of Biological Chemistry*, v. 273, p. 27668-27677, 1998.
- MARTINEZ, M.; McDERMOTT, P.; WALKER, R. Pharmacology of the fluoroquinolones: a perspective for the use in domestic animals. *Veterinary Journal*, v. 172, p. 10-28, 2006.
- MENGOZZI, G. et al. Pharmacokinetics of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin after intravenous and intramuscular administrations in sheep. *American Journal of Veterinary Research*, v. 57, p. 1040-1043, 1996.
- MUKHERJEE, A.; SEN, S.; AGARWAL, K. Ciprofloxacin: mammalian DNA topoisomerase type II poison in vivo. *Mutation Research*, v. 301, p. 87-92, 1993.
- PAPICH, M. G.; RIVIERE, J. E. Fluorquinolone Antimicrobial Drug. In: ADAMS, R. H. *Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 8.ed. Oxford: Wiley-Blackwell, 2001.
- SUH, B.; LORBER, B. Quinolones. *Medical Clinic of North America*, v. 79, p. 869-894, 1995.

ROTHSTEIN, R.; MICHEL, B.; GANGLOFF, S. Replication fork pausing and recombination or “gimme a break”. *Genes. Dev.*, v. 14, p. 1–10, 2000.

TICKOO, S.; RUSSELL, S. *Drosophila melanogaster* as a model system for drug discovery and pathway screening. *Current Opinion Pharmacology*, v. 2, p. 555-560, 2002.