

**TOXICIDADE GENÉTICA DAS
ANTRACICLINAS: ASSOCIAÇÃO ENTRE
ESTRUTURA QUÍMICA E AÇÃO INIBITÓRIA
SOBRE A TOPOISOMERASE II**

Mauricio Lehmann

UFRGS

2003

**TOXICIDADE GENÉTICA DAS ANTRACICLINAS:
ASSOCIAÇÃO ENTRE ESTRUTURA QUÍMICA E AÇÃO
INIBITÓRIA SOBRE A TOPOISOMERASE II**

MAURICIO LEHMANN

Tese de Doutorado apresentado ao Programa de Pós-
Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade
Federal do Rio Grande do Sul, para a obtenção do Grau de
Doutor em Ciências

Orientadora: Profa. Dra. Heloísa Helena Rodrigues de Andrade

Porto Alegre
2003

**Dedico esta tese à Jaqueline,
pelo seu carinho, Amor, dedicação e paciência.**

IMAGINE

“Imagine there's no heaven,
it's easy if you try,
no hell below us,
above us only sky,
Imagine all the people,
living for today.

Imagine there's no countries,
it isn't hard to do,
nothing to kill or die for,
and no religion too,
Imagine all the people,
living life in peace.

You may say I'm a dreamer,
but I'm not the only one,
I hope someday you'll join us,
and the world will be as one.

Imagine no possessions,
I wonder if you can,
no need for greed or hunger,
a brotherhood of man,
Imagine all the people,
sharing all the world.

You may say
I'm a dreamer,
but I'm not the only one,
I hope someday you'll join us,
and the world will live as one.”

John Lennon

**“O jeito de ver pela fé é fechar os olhos da razão”
Benjamin Franklin**

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

AOS MEUS PAIS

Não há palavras que possam definir com clareza Amor e gratidão. Assim é melhor defini-los com gestos, carinho e muita dedicação.

E foi exatamente desta forma que vocês me ensinaram: que honestidade, respeito e Amor não se compram, eles são o fruto daquilo que construímos ao longo de nossas Vidas.

Obrigado, por tudo!

À MINHA MÃE

Sei que muitas vezes deixaste de realizar sonhos para que os dos teus filhos pudessem ser realizados.

E espero que ao veres estes sonhos serem realizados, tu saibas o quanto fazes parte deles.

AO MEU PAI

Talvez não tenhamos brincado tanto quanto queríamos quando eu era criança, também não estivemos lado a lado em vários momentos importantes de nossas

Vidas, mas sempre que eu precisei de ti, você estava lá!

Seja com gestos, palavras ou até mesmo pelo silêncio, tu nunca deixaste de ser o meu grande mestre.

À HELÔ

Desde a Iniciação Científica até o Doutorado foram 12 anos de convivência. Se isto pudesse ser traduzido de alguma forma, eu diria:

respeito, dedicação, confiança, carinho, dignidade e mais do que isto, a certeza de que tudo foi extremamente verdadeiro!

Eu posso dizer que foi mais do que uma honra ter sido teu orientado por todo esse tempo, foi uma grande felicidade!

Se hoje sou um pesquisador, devo isto a ti.

Mais do que te agradecer, eu gostaria de te dar os Parabéns! Porque também ao longo destes anos, eu vi o quanto tu também amadureceste, tornando-se esta mulher incrível que és.

Que o futuro nos aguarde!

À BIBA

Eu posso me considerar um grande privilegiado, por ter tido durante toda a minha formação a possibilidade de ter duas orientadoras: a Helô e você!

Agradeço pelos conselhos, ensinamentos, pela ajuda e principalmente pelo carinho ao longo de todos estes anos.

Levarei sempre comigo tudo o que me ensinaste!

À JAQUELINE

O que dizer a quem se Ama?

O que dizer a alguém que está ao meu lado em cada momento,
confortando, ajudando e aconselhando?

O que dizer a alguém que traz a certeza de que é possível compartilhar uma
Vida, juntos, sem perder a individualidade?

O que dizer a alguém que passa a sensação de paz e confiança?

O que dizer a alguém que através de um olhar é capaz de olhar dentro de
mim?

O que dizer a quem se Ama?

Simplesmente, esteja sempre comigo!

Te Amo!

AGRADECIMENTOS

À Kênya, minha grande amiga, agradeço não apenas pela ajuda mas pela grande lição de Vida que passou. Além da minha admiração, quero que saibas que tens o meu respeito e carinho. Obrigado pelos conselhos. Da mesma forma que um dia me disseste, eu repito: tu és minha irmã do coração!

Ao Prof. Edmundo Kanan Marques agradeço pela orientação no início deste Doutorado e mais do que isto, agradeço pela confiança em meu trabalho.

À minha irmã Patrícia, agradeço pelo carinho.

Ao meu irmão Edegar, agradeço pelo passado. Que um dia ele possa voltar!

Ao Romeu e à Teresa, meus queridos sogro e sogra, agradeço pelo carinho com o qual me receberam em sua Família.

Às minhas grandes amigas e colegas Megui e Viviane, agradeço pela ajuda, pela companhia e pelos momentos de descontração. Contem sempre comigo!

Ao Rafael e ao Knulp pelo incentivo e pelas conversas descontraídas.

Ao Knulp, à Aline, à Graziela e à Camila agradeço pela ajuda valiosa na obtenção dos dados.

A toda a equipe do Laboratório de Mutagênese da UFRGS e do Laboratório TOXIGEN da ULBRA: Alexandre, Aline, Camila, Graziela, Janaína, Knulp, Megui, Mariana, Rafael, Vanderlei e Viviane, agradeço pela ajuda e pelo carinho. Todos vocês são muito mais que colegas, são grandes amigos. Espero ter contribuído para a formação de vocês! Cuidem bem destes Laboratórios!

À minha grande amiga Renata, agradeço a ajuda, os conselhos e o carinho.

Aos meus amigos Andrés, Fabiano e Leonardo, agradeço pelo carinho e pelas festas do passado!

“Por simples senso comum não acredito em Deus, em nenhum”

Charles Chaplin

Ao meu grande amigo Andrés, o eterno padrinho, agradeço pela amizade sincera e pelo carinho.

Aos Drs. Ulrich Graf e Hansjörg Frei, pelos ensinamentos sobre o teste SMART e pela ajuda na análise estatística dos dados.

À Dra. Lúcia R. Ribeiro agradeço pela confiança e por ter viabilizado o meu estágio no Laboratório TOXICAN em Botucatu-SP.

À Patrícia L. A. de Lima, agradeço pelo carinho com o qual me recebeu em sua casa e por toda a ajuda durante o meu estágio em Botucatu.

Ao Álisson Gontijo, agradeço pelos ensinamentos sobre o teste Cometa e pela ajuda.

A todo o pessoal do Laboratório TOXICAN da Faculdade de Medicina da UNESP de Botucatu-SP, agradeço pela ajuda e pelo carinho, especialmente à Dra. Daisy M. F. Salvadori.

Ao Elmo, agradeço pela imensa ajuda, que sempre foi indispensável. Podes ter a certeza de que tens o meu mais sincero respeito e minha profunda admiração.

À Virgínia, agradeço pelo carinho.

Ao Félix Nonnenmacher agradeço pela excelente revisão dos artigos.

Agradeço a todos os Professores e Funcionários do Departamento de Genética da UFRGS que contribuíram tanto para a minha formação quanto para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos demais amigos, que apesar de não serem muitos, foram e são especiais em qualquer momento.

"O lugar de ser feliz é aqui, o tempo de ser feliz é agora, o meio de ser feliz é fazendo os outros felizes"

R. Ingersoll

Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Mutagênese do Departamento de Genética do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), subvencionado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) e pela Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

SUMÁRIO

Capítulo I: Introdução Geral	1
1.1. DNA topoisomerasas	3
1.2. Inibição das enzimas DNA topoisomerasas.....	3
1.2.1. Venenos de topoisomerase.....	4
1.2.2. Inibidores catalíticos de topoisomerase	5
1.3. Antraciclina.....	8
1.4. A recombinação homóloga e o seu papel na carcinogênese e mutagênese.....	13
1.5. Objetivos.....	16
 Capítulo II: Doxorubicin and two of its analogues are preferential inducers of homologous recombination compared with mutational events in somatic cells of <i>Drosophila melanogaster</i>.....	 18
 Capítulo III: The influence of topoisomerase inhibitory activity on the somatic genotoxicity of daunorubicin, idarubicin and aclarubicin.....	 41
 Capítulo IV: Discussão Geral	70
4.1. Genotoxicidade das antraciclina.....	71
4.2. Estrutura química e toxicidade genética.....	76
 Capítulo V: Bibliografia Geral	79

Resumo e Abstract

Resumo

Considerando não apenas a importância das antraciclinas na terapêutica do câncer, mas também os efeitos colaterais associados ao uso destas drogas, o presente estudo procurou avaliar a atividade genotóxica de seis antraciclinas em uso clínico - doxorubicina (DOX), daunorrubicina (DNR), epirubicina (EPI), idarrubicina (IDA), além dos análogos de última geração, pirarrubicina (THP) e aclarrubicina (ACLA). Para tanto, foi empregado o Teste de Mutação e Recombinação Somática (SMART) em *Drosophila melanogaster*, que permite a detecção simultânea de mutação gênica e cromossômica, assim como de eventos relacionados com recombinação mitótica - possibilitando quantificar a contribuição deste último parâmetro genético para a genotoxicidade total induzida pelas drogas em estudo. Os dados obtidos a partir desta análise demonstraram que todas as antraciclinas estudadas induziram acréscimos significativos, relacionados tanto à mutação, quanto à recombinação nas células somáticas deste inseto. Além disso, a recombinação mitótica - entre cromossomos homólogos - foi o evento responsável por, aproximadamente, 62 a 100% da toxicidade genética observada. A comparação do potencial genotóxico dos diferentes análogos, através da padronização do número de danos genéticos por unidade de tratamento (mM), caracterizou a ACLA e o THP como as drogas mais potentes - sendo cerca de 20 vezes mais efetivas, como genotoxinas, do que a DOX, o análogo menos potente.

Já que a principal ação genotóxica desta família de compostos está relacionada à inibição da topoisomerase II (topo II) - uma enzima que atua no relaxamento da supertorção da dupla hélice de DNA, através da quebra e posterior religação de suas fitas - as diferenças observadas podem ser atribuídas ao mecanismo envolvido neste bloqueio. Enquanto os análogos DOX, DNR, EPI, IDA e THP atuam como venenos de topo II - tornando permanentes as quebras induzidas pela enzima - a ACLA inibe a função catalítica desta enzima, impedindo a sua ligação ao DNA. Cabe ainda ressaltar que a genotoxicidade da ACLA não está restrita à sua atividade catalítica sobre a topo II, mas também à sua ação como veneno de topo I e à sua habilidade de intercalar-se na molécula de DNA.

Quando a potência genotóxica destas drogas foi associada a suas estruturas químicas, observou-se que substituições no grupamento amino-açúcar levaram a uma maior atividade tóxico-genética, quando comparadas a modificações no cromóforo. Cabe ainda ressaltar que as modificações estruturais, presentes nos análogos DOX, DNR, EPI, IDA e THP, não alteraram a sua ação recombinogênica. No entanto, no que se refere a ACLA, observaram-se decréscimos significativos na indução de recombinação mitótica - que podem ser atribuídas às múltiplas substituições presentes tanto no grupamento amino-açúcar quanto no cromóforo.

O conjunto destas observações evidencia que a genotoxicidade total das drogas em estudo está centrada na indução de recombinação homóloga - um evento predominantemente envolvido tanto na iniciação, quanto na progressão do câncer. A alta incidência de tumores secundários, em pacientes submetidos ao tratamento com as antraciclinas, pode, pois, ser atribuída à ação preferencial destas drogas sobre a recombinação mitótica - embora a atividade mutagênica não possa ser desconsiderada.

Abstract

Considering not only the importance of anthracyclines in cancer treatment, but also the side effects credited to these drugs, this study aimed at assessing the genotoxic activity of six anthracyclines currently in clinical use: doxorubicin (DOX), daunorubicin (DNR), epirubicin (EPI), idarubicin (IDA), and the latest generation analogues, pirarubicin (THP) and adarubicin (ACLA). The wing Somatic Mutation and Recombination Test in *Drosophila melanogaster*, which enables the simultaneous detection of chromosomal and genic mutation as well as mitotic recombination events, was used. The share of mitotic recombination events in the total genotoxicity of the drugs assessed was also quantified. The data obtained revealed that all anthracyclines studied induced significant increments in either mutation or recombination in the *Drosophila* somatic cells. Moreover, mitotic recombination — between homologous chromosomes — was the event responsible for approximately 62 to 100% of the genotoxicity figures observed. The comparison between the genotoxic potencies of the different analogues via standardization of the number of DNA damages per concentration unit (mM), established ACLA and THP as the most potent drugs, being ~20 times more genotoxic than DOX, the weakest genotoxic drug.

Since the major genotoxic action of anthracyclines is related to the inhibition of topoisomerase II (topo II) — an enzyme that acts to relieve torsional strain on the DNA double helix via the breakage and subsequent rejoining of its strands — the differences observed may be inputted to the mechanism involved in this inhibitory effect. While the analogues DOX, DNR, EPI, IDA and THP act as topo II poisons — rendering permanent the breakage induced by the enzyme — ACLA inhibits the catalytic function of this enzyme by stopping its linkage to DNA. It is also worth mentioning that the genotoxicity exerted by ACLA is not restricted to its catalytic activity on topo II: its genotoxicity can also be expressed as its topo I poison activity and its ability to intercalate in the DNA molecule.

When the genotoxic potency of these analogues was viewed side by side with their chemical structures, substitutions in the aminosugar, as opposed to changes in the chromophore, led to a higher genotoxic

activity. It is also important to note that structural modifications present in the analogues DOX, DNR, EPI, IDA and THP did not alter the recombinagenic action exerted by these compounds. Nevertheless, as regards ACLA, significant decreases in the induction of mitotic recombination were observed, which may be inputted to the multiple substitutions present in either the amino sugar or the chromophore.

These observations demonstrate that the total genotoxicity of the drugs under study centers on the induction of homologous recombination — an event involved preeminently in either the initiation and progression of cancer. The high occurrence of secondary tumors in patients undergoing treatment with anthracyclines may be thus ascribed to the preferential action these drugs exert on mitotic recombination — in spite of the fact that mutagenic activity must not be ruled out.

Capítulo I

Introdução Geral

Segundo estimativas do Instituto Nacional do Câncer (INCA), no ano de 2002 cerca de 337.535 novos casos de neoplasias foram registrados no Brasil, causando a morte de aproximadamente 122.600 indivíduos. Tais números colocam o câncer como a terceira principal causa de morte no nosso País, superada apenas por doenças cardiovasculares e por mortes acidentais - relacionadas tanto a acidentes de trânsito, quanto à violência urbana (INCA, 2002). Com base nas taxas anuais de ocorrência desta doença nos Estados Unidos, estima-se que metade dos homens e um terço das mulheres americanas poderão desenvolver câncer em um determinado momento ao longo do seu período de vida - levando a um gasto aproximado de 107 bilhões de dólares anuais, destinados apenas ao diagnóstico e tratamento (Thun e Wingo, 2000).

Apesar deste panorama alarmante, os avanços na prevenção, diagnóstico, tratamento e cura do câncer apontam para um prognóstico mais otimista. Embora estudos epidemiológicos indiquem apenas uma leve queda na taxa de mortalidade, o número de pacientes que sobrevivem, pelo menos cinco anos após o diagnóstico desta doença, vem crescendo nos últimos 20 anos (NIH, 2001).

Entre os diferentes recursos destinados ao tratamento do câncer, a quimioterapia - contando com uma ampla categoria de drogas, que atuam em diferentes alvos celulares - juntamente com a radioterapia e a cirurgia oncológica, tem não apenas levado à cura, mas também a aumentos significantes na expectativa e qualidade de vida dos pacientes (NIH, 2001). A década de 1940 é o marco da terapia do câncer via utilização de drogas químicas capazes de matar as células cancerosas às expensas de efeitos citotóxicos agudos às células normais. A partir de então, a descoberta de substâncias que atuam em diferentes alvos celulares, associada às pesquisas de análogos com menor ação tóxica e comprovada eficácia clínica, ampliou o arsenal disponível para a quimioterapia - ao mesmo tempo em que o DNA deixou de ser o único alvo no combate às células tumorais. A descoberta das topoisomerasas e a demonstração do seu papel essencial para a duplicação do DNA levaram à descoberta e posterior utilização de um novo grupo de compostos, designados como inibidores de topoisomerase, amplamente

empregados no tratamento de diversos tipos de tumores malignos (Osheroff, 1998).

1.1. DNA Topoisomerases

As enzimas DNA topoisomerases desempenham um papel fundamental em praticamente todos os aspectos do metabolismo e da estrutura do DNA - replicação, transcrição, recombinação, reparação e construção da cromatina - modificando o seu estado topológico, através da quebra e posterior religação de suas fitas (Berger, 1998). De acordo com o mecanismo de ação, estas enzimas foram divididas em dois grandes grupos: (i) DNA topoisomerases tipo I (topo I) e tipo II (topo II) (Kingma e Osheroff, 1998).

Enquanto a topo I é capaz de introduzir quebras simples na molécula de DNA, promovendo a passagem da outra fita intacta através desta quebra, a topo II introduz quebras em ambas as fitas, permitindo assim a passagem de outra dupla hélice. Após a ocorrência deste evento, ambas as enzimas catalisam a religação das ligações fosfodiéster do DNA. Ainda que a ação da topo I esteja basicamente vinculada ao processo de transcrição gênica mediada pela RNA polimerase I ou II, a atividade da topo II é mais ampla, já que atua na mitose, estando envolvida na condensação dos cromossomos e segregação das duplas hélices de DNA e na manutenção da estrutura da cromatina. Destaca-se também sua função sobre os mecanismos envolvidos tanto no processo recombinacional, quanto no reparo que envolve recombinação (Larsen *et al.*, 1998).

1.2. Inibição das enzimas DNA topoisomerases

Em condições normais, as quebras introduzidas nas fitas de DNA pelas topoisomerases I e II são toleradas pelas células em função não apenas de seu caráter intermediário, mas também devido aos baixos níveis em que são produzidas. Entretanto, a manutenção de tais quebras e o conseqüente incremento nas suas freqüências promovem a

ocorrência de eventos genotóxicos, expressos como inserções, deleções, translocações e recombinação mitótica – podendo ainda induzir uma série de eventos relacionados com a morte celular programada. Conseqüentemente, drogas capazes de favorecer a manutenção das quebras mediadas por estas enzimas podem ser potencialmente consideradas como agentes quimioterápicos – já que os múltiplos efeitos acima citados podem ser citotóxicos, levando as células tumorais à morte (Kingma e Osheroff, 1998).

Atualmente, uma série de compostos denominados, genericamente, de inibidores de topoisomerase é usada no tratamento de diferentes tipos de câncer, ou encontra-se em fase de experimentação. Dentre estes, destacam-se dois grandes grupos, que foram diferenciados em função dos seus mecanismos de ação sobre as topoisomerasas: compostos de classes I e II. Os primeiros atuam como estabilizadores dos complexos DNA-topoisomerase, impedindo a religação das fitas de DNA clivadas pela ação catalítica da topoisomerase - sendo também denominados como “venenos de topoisomerase”, pois de certa forma transformam esta enzima em uma potente toxina celular. Os incluídos na classe II interferem com a atividade catalítica da enzima, sem promover a estabilização dos complexos clivados formados pelas topoisomerasas e o DNA - sendo também chamados de “inibidores catalíticos” de topoisomerase (Topcu, 2001).

1.2.1. Venenos de topoisomerase

Na verdade, a grande maioria dos inibidores de topoisomerase exerce a atividade citotóxica através da estabilização do complexo formado entre a molécula de DNA e a enzima, após a ocorrência da quebra. Estes bloqueadores interagem com o complexo DNA-topoisomerase, impedindo que a enzima finalize sua atividade catalítica, mantendo as quebras simples e duplas geradas no DNA (Figura 1). Entretanto, deve-se ressaltar que a formação deste complexo ternário, droga-DNA-topoisomerase, não é suficiente para induzir apoptose, pelo menos no que se refere aos venenos de topo I. Esta observação está fundamentada no fato de que o complexo de clivagem, envolvendo a

topo I, leva à formação de quebras simples na dupla hélice de DNA – que não são indutoras de morte celular programada, já que este tipo de lesão é facilmente reparado pela maquinaria de reparação. É, ainda, importante ressaltar que tanto a ação citotóxica, quanto a apoptose induzidas pelos inibidores de topo I estão relacionadas com a formação de quebras duplas na molécula de DNA - que são geradas quando a forquilha de replicação encontra o complexo clivado DNA-topo I-droga, ou quando a bolha de transcrição colide com este complexo (Rubin e Hait, 2000).

1.2.2. Inibidores catalíticos de topoisomerase

Ao contrário dos venenos de topoisomerase, os inibidores catalíticos atuam através do bloqueio de uma função específica mediada pela enzima e, desta forma, não são capazes de promover a estabilização do complexo clivado, DNA-topoisomerase (Figura 2). Uma grande variedade de drogas, que podem diferir tanto na estrutura química, quanto na forma com que exercem suas atividades, é incluída nesta categoria. Para explicar esta diversidade de compostos é preciso considerar que as topoisomerasas: *(i)* interagem tanto com o DNA, quanto com o ATP (apenas a topo II), *(ii)* executam suas atividades através de uma série de reações catalíticas e, finalmente, *(iii)* passam por profundas modificações conformacionais durante estas diferentes etapas. Já foram identificados compostos capazes de bloquear cada uma destas reações, podendo-se dividi-los em três grupos distintos. No primeiro, encontram-se as drogas que bloqueiam a ligação da enzima ao DNA e, portanto, inibem as funções catalítica e estrutural das topoisomerasas. No segundo, incluem-se aquelas substâncias que não impedem o acesso da enzima ao DNA, mas sim bloqueiam unicamente a função catalítica das topoisomerasas. No terceiro, agrupam-se os inibidores que, além de terem o comportamento atribuído ao segundo grupo, estabilizam reações intermediárias induzindo danos celulares - bloqueando especificamente a topo II quando esta se encontra na etapa posterior à religação das fitas de DNA (Jensen e Sehested, 1997; Fortune e Osheroff, 2000).

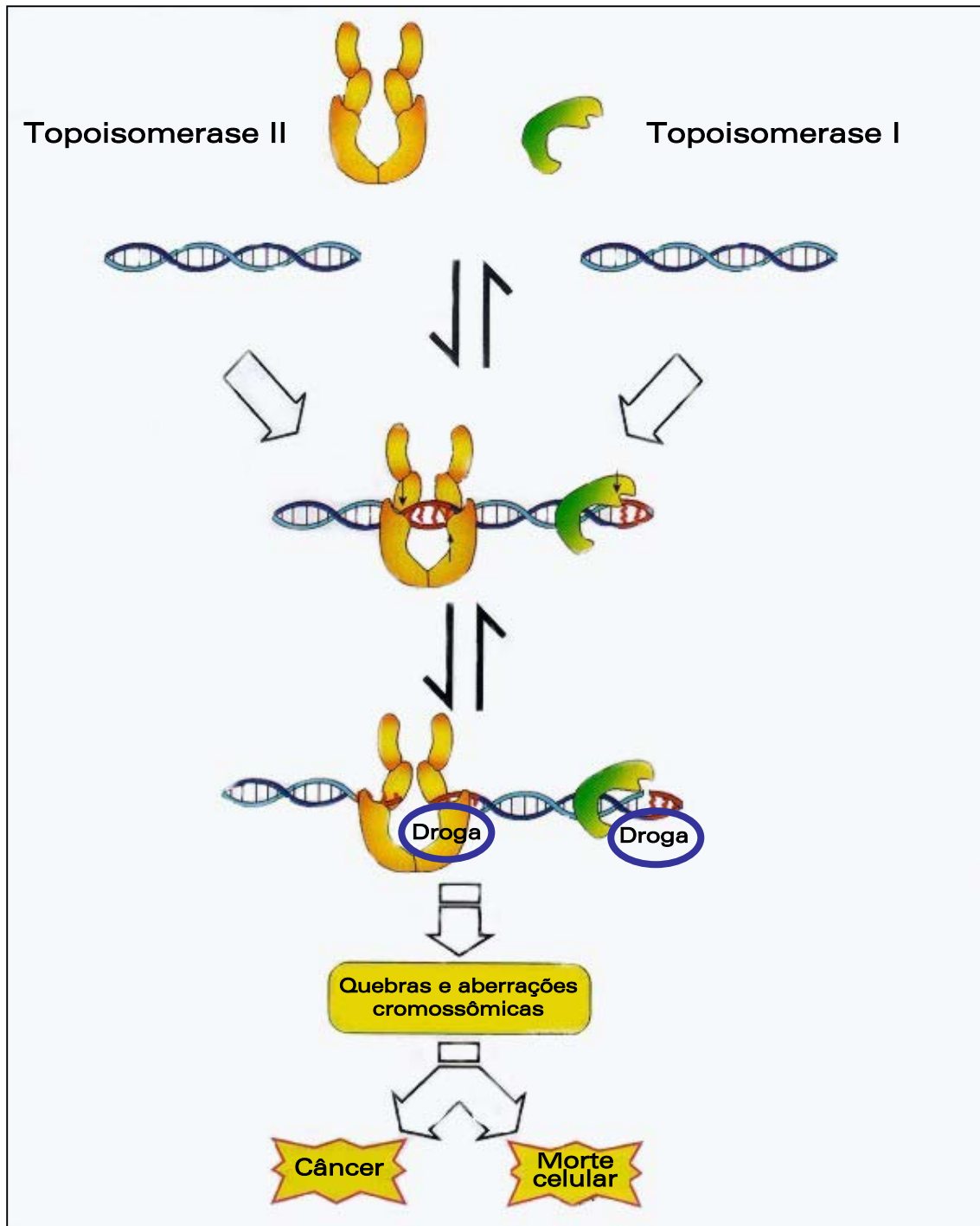


Figura 1. Mecanismo de ação dos venenos de topoisomerase I e II. A formação do complexo ternário, DNA-topoisomerase-droga, impede a restauração das fitas de DNA, gerando quebras simples e duplas permanentes, que podem, posteriormente, levar à morte celular ou ao desenvolvimento de tumores secundários (de acordo com Kingma e Osheroff, 1998, modificado).

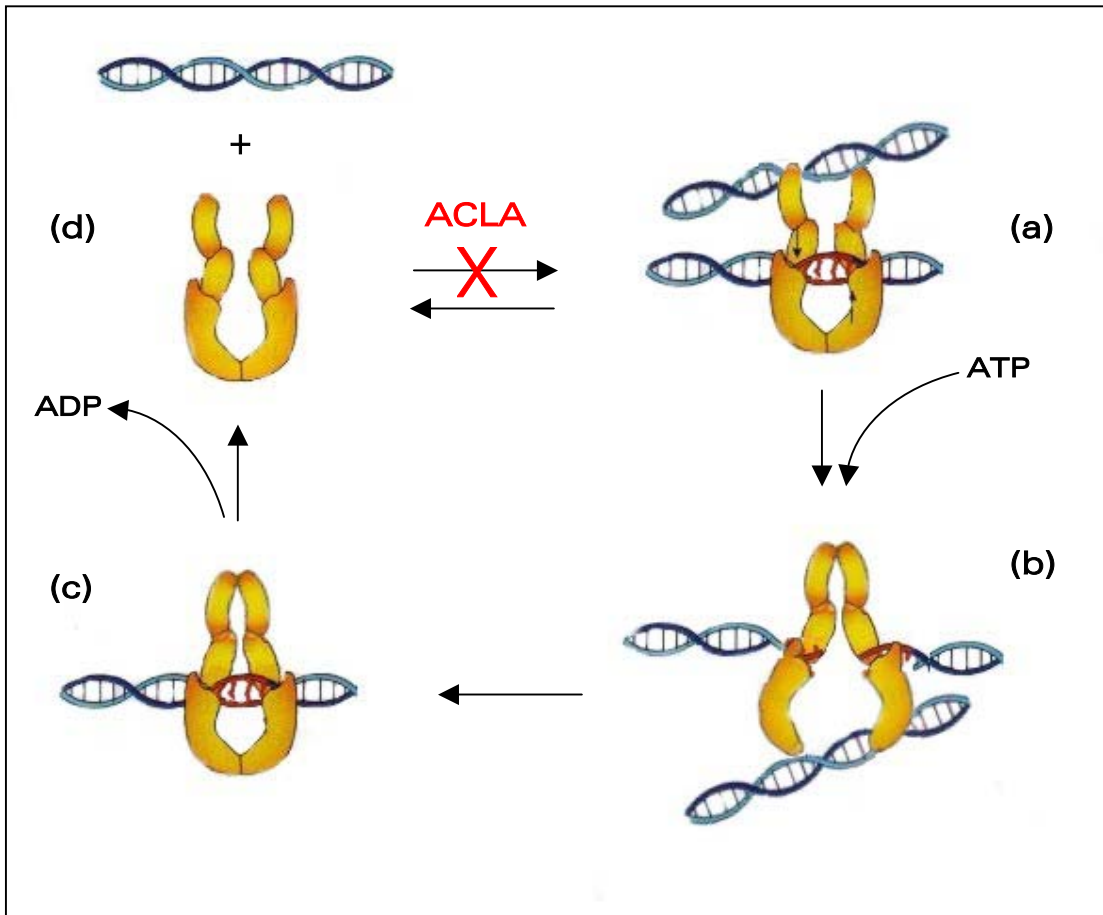


Figura 2. Ciclo catalítico da enzima topo II: (a) a enzima se liga à dupla hélice de DNA, sendo esta a etapa bloqueada pela Aclarrubicina (ACLA) (identificada por X); (b) através da ligação do ATP, a topo II captura uma segunda hélice de DNA, que passa pela quebra gerada na outra fita, sendo, posteriormente, liberada; (c) após a passagem da fita, a enzima restaura a quebra na dupla hélice de DNA à qual está ligada; e (d) a hidrólise do ATP desencadeia o desligamento da enzima, que retorna à sua conformação inicial (de acordo com Capranico *et al.*, 1997, modificado).

1.3. Antraciclinas

Considerando a diversidade de compostos que atuam como inibidores das topoisomerasas, pode-se afirmar que as antraciclinas são a família de compostos com o maior número de representantes em uso clínico. Não apenas a quantidade de drogas disponíveis, mas, principalmente, a sua importância dentro da terapêutica do câncer, justifica o amplo estudo das antraciclinas, no que se refere às suas mais diversas funções biológicas. Seis inibidores de topo II, incluídos no grupo das antraciclinas, são efetivamente utilizados no tratamento de diversos tipos de tumores (Tabela 1). Entre estes, destaca-se a doxorrubicina (DOX), não apenas por ser uma das primeiras antraciclinas a ser descoberta, mas, principalmente, por apresentar o mais amplo espectro de atividade antitumoral (Rubin e Hait, 2000).

Tabela 1. Antraciclinas em uso clínico e os diferentes tumores para os quais são indicadas.

Droga	Tipo de tumor
DOX ^a	Tumores sólidos: mama, bexiga, tireóide, ovário, pulmão, próstata, testículo, sarcomas, estômago, carcinoma do endométrio, colo do útero, cabeça e pescoço. Linfoma de Hodgkin e não-Hodgkin, leucemias linfóide e mielóide agudas.
EPI ^a	Melanoma, mama, cólon-retal, renal, gástrico, pancreático, hepatocelular, ovariano, pulmonar, sarcomas, linfoma Hodgkin e não-Hodgkin.
THP ^b	Carcinoma de cabeça e pescoço, linfomas malignos, câncer de mama.
DNR ^a	Leucemias linfóide e mielóide, tumores sólidos pediátricos.
IDA ^a	Leucemia mielóide aguda.
ACLA ^c	Leucemia mielóide aguda.

^aRubin e Hait, 2000; ^bShinozaki *et al.*, 2002 ; ^cFerguson e Pearson, 1996.

Como as antraciclinas foram isoladas da bactéria *Streptomyces peucetius* há mais de três décadas - quando se desconheciam as topoisomerasas - a ação antitumoral a elas atribuída foi relacionada à porção aglicona planar de suas estruturas químicas - que é capaz de se intercalar no DNA. Somente em 1984 comprovou-se que a efetiva citotoxicidade tumoral observada devia-se à inibição da enzima topo II. As antraciclinas podem também bloquear a ação das helicases nucleares, impedindo a separação das fitas de DNA, ao mesmo tempo em que - em função de serem quimicamente definidas como antraquinonas - geram, por reduções de um ou dois elétrons, compostos reativos que danificam macromoléculas e membranas lipídicas. A geração de radicais livres é a causa direta da alta citotoxicidade cardíaca atribuída a esta família de quimioterápicos (Hande, 1998; Danesi *et al.*, 2002).

Este importante efeito colateral, manifestado principalmente após o uso da DOX, é um fator limitante quanto às concentrações aplicadas aos pacientes, já que se deve respeitar a dose máxima tolerada. Neste sentido, objetivando não apenas a redução da cardiotoxicidade, mas também uma maior eficácia clínica no tratamento do câncer, foram sintetizados dois novos análogos de antraciclinas: epirrubicina (EPI) e idarrubicina (IDA), produzidos a partir, respectivamente, dos análogos DOX e daunorrubicina (DNR). A partir destes análogos, já foram sintetizadas mais de 2.300 diferentes antraciclinas, das quais apenas duas foram aprovadas para uso clínico: pirarrubicina (THP) e aclarrubicina (ACLA) (Monneret, 2001).

Apesar de apresentarem uma reduzida cardiotoxicidade, especialmente em relação a DOX, nenhum análogo foi efetivamente superior a esta droga no que se refere ao amplo espectro de utilização (Arcamone *et al.*, 1997). As antraciclinas apresentam, em geral, uma estrutura química básica composta por um cromóforo aglicona aromático ligado a um amino-açúcar (Figura 3). As diferenças entre os análogos DOX, DNR, EPI, IDA e THP residem em quatro radicais: dois ligados ao cromóforo e dois ao amino-açúcar. Na ACLA, as modificações estruturais são mais abrangentes, envolvendo alterações em ambos os grupamentos (Arcamone *et al.*, 1997; Arcamone, 1998).

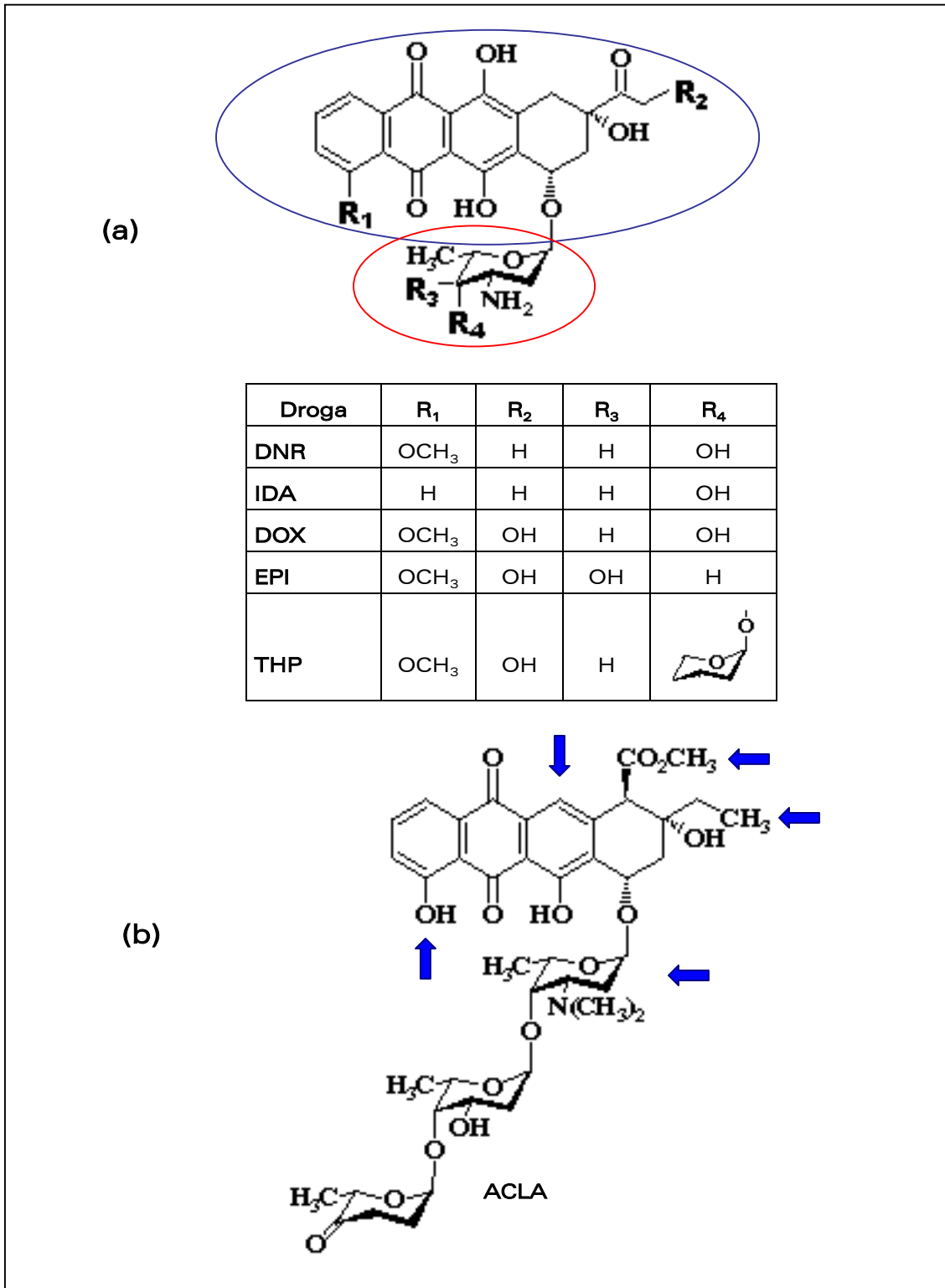


Figura 3. Estrutura química das antraciclinas: (a) estrutura geral dos análogos DOX, DNR, EPI, IDA e THP, indicando o cromóforo (círculo azul) e o amino-açúcar (círculo vermelho) e (b) estrutura da ACLA, indicando as diferenças estruturais em relação aos outros análogos (setas azuis).

Além de causar morte celular - por interferência nos processos de mitose e meiose e por indução de apoptose - as antraciclinas, assim como outros inibidores de topoisomerase, são capazes de gerar danos permanentes no DNA. Este efeito genotóxico pode ter três importantes conseqüências. A primeira, associada a mutações em genes envolvidos nos mecanismos de passagem através da membrana celular, podendo levar a aumento no refluxo das drogas para o exterior das células. A segunda, relacionada à indução de danos genéticos em células germinais, que poderão ser transmitidas às futuras gerações. Por último, o desenvolvimento de tumores secundários a partir de células somáticas que, originalmente, não eram neoplásicas (Baguley e Ferguson, 1998).

Em função do risco adicional que o efeito genotóxico impõe aos pacientes submetidos à quimioterapia, a toxicidade genética associada às antraciclinas vem sendo extensivamente estudada, tendo como enfoque principal a indução de mutações pontuais e cromossômicas. Considerando a indução de mutações gênicas em *Salmonella typhimurium*, foi possível caracterizar que DNR, EPI, IDA e DOX induzem não apenas mutações que alteram o módulo de leitura, como também substituições de bases - transições de AT para GC. Entretanto, somente as três primeiras antraciclinas induzem transições de GC para AT (Au *et al.*, 1981; Bhuyan *et al.*, 1983; Andrivon *et al.*, 1995; Mazue *et al.*, 1996; Gentile *et al.*, 1998; Mackay *et al.*, 2000; Mackay e Phelps, 2001; Brumfield e Mackay, 2002). A avaliação deste mesmo parâmetro genético em cultura de células ovarianas e V79 de hamster Chinês confirma as potencialidades da DOX como indutora de mutações pontuais (Bhuyan *et al.*, 1983; Dickins *et al.*, 1985; Yu *et al.*, 1994; Mazue *et al.*, 1996). A única droga estudada que não mostrou resposta positiva para mutações gênicas foi a ACLA, quando avaliada tanto em cinco diferentes linhagens de *S. typhimurium*, quanto em cultura de células V79 (Westendorf *et al.*, 1984).

Ensaio *in vivo* e *in vitro* caracterizam este grupo de compostos como indutores de danos cromossômicos associados à perda de fragmentos e/ou aneuploidia. Tanto a DOX quanto a IDA mostraram respostas positivas quando avaliadas pelo teste de micronúcleos em medula óssea de camundongos ou ratos (Bhuyan *et al.*, 1983; Motimaya

et al., 1994; Mazue *et al.*, 1996; Nebel *et al.*, 2002). No entanto, considerando os dados obtidos através do teste de aberrações cromossômicas, a ACLA induziu apenas quebras cromatídicas, enquanto que a DOX mostrou uma resposta mais ampla – relacionada a lesões tanto em cromátides quanto em cromossomos (Nersessian *et al.*, 1991). Da mesma forma, quando avaliadas *in vitro*, DOX, DNR, EPI e IDA aumentaram a frequência de micronúcleos e/ou aberrações cromossômicas em diferentes linhagens celulares (Bhuyan *et al.*, 1983; Jeremic *et al.*, 1996; Jagetia *et al.*, 1998; Villani *et al.*, 1998; Stopper *et al.*, 1999; El-Mahdy Sayed Othman, 2000; Jagetia e Nayak, 2000; Villani *et al.*, 2001; González-Cid *et al.*, 2002; Snyder e Gillies, 2002). Adicionalmente, a IDA foi capaz de induzir quebras nas cadeias de DNA na versão alcalina do teste Cometa (Blasiak *et al.*, 2002a,b; Nebel *et al.*, 2002). A exemplo do que foi obtido *in vivo*, a ACLA também causou alterações nas frequências de quebras cromatídicas em cultura de células de hamster Chinês (Suzuki e Nakane, 1994).

A estreita ligação entre inibição das topoisomerasas, bloqueio da replicação do DNA e indução de quebras duplas, associadas ao fato de que este último evento é um dos principais substratos para a ocorrência de recombinação, coloca as antraciclinas como drogas potencialmente recombinogênicas. Esta relação se torna mais marcante quando acrescida de evidências apontando para a participação do mecanismo de reparo por recombinação na correção de quebras duplas de DNA (Baguley e Ferguson, 1998; Ferguson, 1998; Arnaudeau *et al.*, 2000). A despeito destas observações, a caracterização da atividade recombinogênica das antraciclinas vem sendo pouco investigada. De fato, estudos visando a identificação de trocas entre cromátides irmãs (TCIs) mostraram que DOX, DNR e EPI são indutoras de TCIs, quando avaliadas em diferentes linhagens celulares (Bhuyan *et al.*, 1983; Köberle e Speit, 1990; Noviello *et al.*, 1994; Gasiorowski *et al.*, 1996; El-Mahdy Sayed Othman, 2000; Hernández-Ceruelos *et al.*, 2002). Da mesma forma, trabalhos utilizando o Teste de Mutação e Recombinação em Células Somáticas de *Drosophila melanogaster* (SMART) forneceram evidências de que DOX e DNR causam aumentos significativos nas

freqüências de recombinação mitótica (Frei *et al.*, 1985; Clements e Vogel, 1988; Clements *et al.*, 1988; Graf *et al.*, 1989).

1.4. A recombinação homóloga e o seu papel na carcinogênese e mutagênese

Evidências recentes têm sugerido que a recombinação homóloga (RH) é um dos principais processos de alterações genéticas envolvidos na gênese e progressão do câncer. Neste sentido, vários aspectos relacionados ao papel da RH na carcinogênese vêm sendo descritos. O primeiro deles refere-se à perda de heterozigose de genes envolvidos na regulação do ciclo celular, através da indução de conversão gênica, deleção de segmentos cromossômicos e, em menor escala, translocações. O segundo, relaciona-se à demonstração de que indivíduos portadores de síndromes associadas a uma maior predisposição ao câncer apresentam altas taxas de RH. Neste caso, a RH não apenas causa incrementos nos eventos relacionados com a perda de heterozigose, mas também produz rearranjos genômicos aberrantes que, por sua vez, podem atuar na etapa de iniciação do processo carcinogênico. Além disso, a comprovação de que a RH está envolvida na manutenção dos telômeros - um processo intimamente relacionado com a imortalidade de algumas células tumorais - associada à comprovação de que danos oxidativos, induzidos por diferentes espécies reativas de oxigênio, contribuem de forma significativa para a ocorrência deste tipo de evento, reforçam o papel da recombinação homóloga na gênese do câncer (Bishop e Schiestl, 2001).

Levando-se em conta que a RH está diretamente envolvida nos processos de reparação de quebras duplas de DNA (Jackson, 2002) e que as antraciclinas induzem preferencialmente este tipo de quebra, pode-se considerar esta família de quimioterápicos como potenciais carcinógenos. De fato, uma série de evidências experimentais demonstrou que não apenas as antraciclinas, mas também outros inibidores de topo I e II são responsáveis pela indução de tumores secundários - relacionados a deleções e translocações em determinadas regiões cromossômicas (Felix *et al.*, 1995; Harousseau, 1999; Rheingold

et al., 2000; Rubin e Hait, 2000). Considerando que as leucemias mielóides, resultantes do tratamento quimioterápico, têm uma chance de cura restrita à faixa de 10 a 20% dos pacientes (Rheingold *et al.*, 2000), torna-se premente a avaliação da toxicidade genética das drogas empregadas no combate ao câncer primário - com especial ênfase às antraciclinas e ao parâmetro recombinação mitótica.

Neste sentido, destaca-se o teste SMART de asa em *Drosophila melanogaster*, uma ferramenta extremamente sensível para a análise da atividade genotóxica de diversos compostos químicos, entre eles, agentes antineoplásicos (Graf *et al.*, 1989; Vogel e Nivard, 1993; Vogel *et al.*, 1999). Este bioensaio permite a avaliação de danos que envolvem mutação gênica, aberração cromossômica e recombinação mitótica, possibilitando a quantificação deste último evento para a genotoxicidade total dos compostos (Graf *et al.*, 1984).

Para a avaliação da genotoxicidade associada a substâncias de ação direta, emprega-se o cruzamento padrão - que utiliza duas diferentes linhagens de *Drosophila melanogaster*. As larvas oriundas deste cruzamento são submetidas ao tratamento com a amostra do composto a ser estudado. Alterações no material genético das células dos discos imaginiais que originarão as asas dos adultos expressam-se, após a metamorfose, como grupos de pêlos mutantes: com a base alargada e múltiplos, associados, respectivamente, aos genes marcadores recessivos *flr³* e *mwh*. Estes fenótipos manifestam-se devido à perda de heterozigose induzida pelos diferentes eventos genotóxicos acima referidos. A análise da superfície dorsal e ventral das asas considera o número de manchas - que fornece dados quantitativos - e o tipo de mancha - que permite identificar o evento genotóxico induzido. Manchas simples - que expressam apenas um dos genes mutantes, *flr³* ou *mwh* - indicam a ocorrência de mutação gênica e/ou cromossômica, bem como recombinação. Entretanto, manchas gêmeas - formadas por células adjacentes expressando os fenótipos *flr³* e *mwh* - originam-se exclusivamente de eventos recombinacionais (Graf *et al.*, 1984). Outra informação importante a respeito da ação genotóxica das substâncias testadas no teste SMART, refere-se ao tamanho das manchas. Conforme o momento da indução do dano genético e do tempo de ação da

genotoxina durante a embriogênese, podem-se encontrar variações no número de células mutantes presentes nas manchas (Graf, 1995).

A partir do cruzamento inicial de duas diferentes linhagens de *D. melanogaster*, obtêm-se dois genótipos distintos, designados como trans-heterozigotos para os marcadores recessivos *mwh* e *flr³* (*mwh/flr³*) e heterozigotos para o cromossomo *TM3* (*mwh/TM3*). Este último genótipo diferencia-se do trans-heterozigoto pela presença de um recorte na borda das asas. Já que o cromossomo *TM3* apresenta múltiplas inversões - que tornam inviáveis os produtos de recombinação - os imagos heterozigotos para o cromossomo *TM3* expressam somente mutações gênicas e/ou cromossômicas, o que permite quantificar a real contribuição da recombinação, quando estes resultados são comparados com aqueles obtidos para os indivíduos trans-heterozigotos (Graf *et al.*, 1984).

No que se refere à *Drosophila melanogaster* como organismo de escolha para a análise genotóxica de compostos antineoplásicos, devem-se ressaltar as recentes descobertas associadas ao seqüenciamento do genoma deste inseto. A comparação do genoma humano e de *Drosophila* aponta para a alta conservação evolutiva, não apenas em nível de seqüência de DNA, mas principalmente em relação às funções gênicas. São também relevantes os dados obtidos a partir de análises do proteoma, uma vez que 60% dos 289 genes relacionados a doenças humanas apresentam homólogos em *Drosophila* - dos quais 75% portam seqüências protéicas similares nestes dois organismos (Tickoo e Russell, 2002). Tais descobertas, somadas aos mais de 90 anos de contribuição deste organismo à pesquisa genética, colocam a *Drosophila* como um modelo promissor não apenas para o estudo de doenças humanas, mas também para a obtenção de drogas que possam ser efetivamente utilizadas no seu combate.

1.5. Objetivos

Ao considerar todos os efeitos colaterais associados ao uso das antraciclinas - principalmente no que se refere à indução de tumores secundários gerados a partir das suas atividades genotóxicas - este estudo visou à obtenção de dados tóxico-genéticos que abrangem os diferentes tipos de danos induzidos por esta família de compostos, com ênfase na recombinação mitótica. A escassez de informações referentes à ação recombinogênica, assim como a ausência de investigações abrangendo, simultaneamente, mutações gênicas, cromossômicas e recombinação, justificam o delineamento do presente trabalho - centrado na resposta das antraciclinas quando avaliadas através do teste SMART de asa em *Drosophila melanogaster*. Dentro deste contexto, procurou-se atingir os seguintes objetivos:

- Avaliação qualitativa da genotoxicidade de seis antraciclinas em uso clínico - envolvendo a detecção de mutação gênica e cromossômica, assim como de recombinação mitótica;
- Análise quantitativa da indução de recombinação mitótica em relação a mutações de origem gênica e/ou cromossômica - realizada através da comparação dos dados obtidos em dois diferentes genótipos, que permitem uma análise diferencial das alterações genéticas induzidas:
 - genótipo *mwh/flr³*** - expressando a ocorrência de eventos mutagênicos e/ou recombinogênicos;
 - genótipo *mwh/TM3*** - evidenciando, exclusivamente, a ocorrência de mutações de origem gênica ou cromossômica;
- Caracterização das relações estrutura/atividade das antraciclinas em estudo, procurando identificar os grupos substituintes que contribuem de forma mais significativa para a genotoxicidade dos diferentes análogos;

- Comparação da genotoxicidade das diferentes drogas, através de valores padronizados por unidade de exposição (mM), visando estabelecer a relação entre ação em nível de topoisomerase II - venenos ou inibidores catalíticos - e potência genotóxica.

Capítulo II

Doxorubicin and two of its analogues are preferential inducers of homologous recombination compared with mutational events in somatic cells of *Drosophila melanogaster*

Mutation Research, aceito para publicação

Manuscript for *Mutation Research*

Doxorubicin and two of its analogues are preferential inducers of homologous recombination compared with mutational events in somatic cells of *Drosophila melanogaster*.

Mauricio Lehmann¹, Aline Franco¹, Knulp de Souza Prudente Vilar¹, Maria Lúiza Reguly¹ and Heloísa Helena Rodrigues de Andrade^{1,2*}

¹Laboratório de Mutagênese, Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, CP 15053, 91501-970, Porto Alegre, RS, Brasil. ²Laboratório de Diagnóstico da Toxicidade Genética – TOXIGEN, Universidade Luterana do Brasil - ULBRA/Canoas, Prédio 22, 3º andar, Rua Miguel Tostes, 101, 92420-280, Canoas, RS, Brasil.

Keywords: SMART test, genotoxicity, somatic recombination, *Drosophila melanogaster*, anthracyclines.

*Correspondence to:

Dr. Heloísa H. R. de Andrade

Universidade Luterana do Brasil – ULBRA

TOXIGEN

Prédio 22, 3º andar

Rua Miguel Tostes, 101

92420-280 – Canoas-RS

Brasil

Phone: 00 55 51 4779214

Fax: 00 55 51 4782893

e-mail: heloisa@ulbra.br

Abstract

The genotoxic effects of the anthracycline doxorubicin and two of its analogues, epirubicin and pirarubicin were studied using the wing Somatic Mutation and Recombination Test (SMART) in *Drosophila melanogaster*. These compounds are classified as topoisomerase II poisons, acting by stabilizing a topoisomerase II-cleaved DNA complex. Using the standard version of the SMART test it was possible to estimate the quantitative and qualitative genotoxic effects of these compounds, comparing the wing spot frequencies in marker- and balancer-heterozygous flies. The results obtained indicate that all three compounds induce a high frequency of spots related to homologous recombination, which is the major event responsible for their genetic toxicity. Pirarubicin was the most genotoxic anthracycline, inducing ~21 times more genetic lesions than doxorubicin, probably due to the presence of a second sugar ring in the amino sugar moiety in its chemical structure. Although the only difference between epirubicin and doxorubicin is the steric position of the amino sugar 4'-OH in the molecule, epirubicin is approximately 1.6 times as genotoxic as doxorubicin.

Introduction

No other anthracycline analogue has been proved to be more efficient against cancer than the antibiotic doxorubicin (DOX), which has been clinically used for more than 30 years, especially against solid tumours [1,2]. However, additional concerns about the long-term adverse effects shown by DOX encouraged the search for new anthracycline analogues with similar clinical efficiency but minor side effects [3]. Among them, epirubicin (EPI) and pirarubicin (THP) have yielded promising effectiveness against a wide range of human cancers [3,4].

Two principle modes of genotoxic action are imputed to these drugs: a minor activity exerted by DNA intercalation and a major mechanism related to their interference with the normal function of topoisomerase II (topo II) enzyme. By means of this last activity the drugs are capable of increasing the covalent topo II-cleaved DNA complexes concentration, which converts the enzyme into a potent cellular toxin, generating high levels of enzyme-linked breaks that are ultimately converted into permanent DNA breaks [5,6].

Several experimental investigations have reported that both DOX and EPI elicit different genotoxic lesions expressed as structural chromosomal aberrations as well as aneuploidy [7-9]. Additionally, DOX has been shown to be mutagenic in cultured strains of *Salmonella typhimurium* [7,8,13,20-23] and in V79 mammalian cell line [8,13,24].

Amplly documented studies on the potential action of topo II poisons as inducers of double strand breaks (DSBs) focused on their ability to stabilize the DNA-topo II-drug complex [11,25-28]. Since this complex may produce a DNA topology that favours the occurrence of recombinational events, these drugs can be seen as potential inducers of homologous and/or non-homologous recombination [5]. However, the recombinational action of DOX and EPI has been incompletely illustrated, in that the data available are restricted to the induction of sister chromatid exchanges (SCEs) in cultured mammalian cells [7-9,16]. Although DOX has been already tested using in the wing Somatic Mutation and Recombination Test (SMART) in *Drosophila melanogaster*, showing positive results, the studies did not quantify its recombinagenic

potential [29-31]. There appears to be no data in the literature regarding the behaviour of THP as a possible genotoxin.

The present study was designed to evaluate the mutagenic and recombinagenic potential of the three anthracyclines. All drugs were evaluated by means of the wing SMART assay, estimating their quantitative and qualitative effects as genotoxic agents and assessing homologous recombination. This *in vivo* study also focused on the structure-activity relationships in this class of compounds considering not only their cytogenetic, mutagenic and recombinagenic effects, but also their genetic toxicity as a function of exposure unit (mM).

Materials and methods

Chemicals

In the present study, Doxorubicin (CAS no. 23214-92-8) and Epirubicin (CAS no. 56420-45-2) were tested as the clinical preparations Adriblastina[®] and Farmorubicina[®] (Pharmacia & Upjohn Ltda., São Paulo, Brazil), respectively. Pirarubicin (CAS no. 72496-41-4) was provided by Dr. M. Castegnaro (International Agency for Research on Cancer - IARC, Lyon, France). Molecular structures of the test drugs are depicted in Figure 1. Solutions of these compounds were made with distilled water just before use.

Somatic Mutation and Recombination Test (SMART)

The SMART assay allows the detection of different genetic endpoints, using two different strains of *Drosophila melanogaster* which carry specific genetic markers (*mwh* and *flr³*) on the left arm of chromosome 3. Following the methods described in Graf et al. [30,32] the standard cross was used. Virgin females were collected from *flr³/In(3LR)TM3, ri p^o sep I(3)89Aa bx^{34e} e Bd⁶* fly stock and crossed with *mwh/mwh* males. More detailed information on genetic symbols can be found in Lindsley and Zimm [33]. These flies were allowed to lay eggs during 8 hours in culture bottles containing a solid agar base (3% w/v) completely covered with a layer of live fermenting yeast supplemented with sucrose. Approximately 72 hours after the end of the egg-laying stage, larvae were collected and distributed in plastic vials containing 1.5g of *Drosophila* Instant Medium (Carolina Biological Supply; Burlington, NC, USA) re-hydrated with 5 ml of the test solutions at four different concentrations. The larvae fed on this medium until the end of their development. Two experiments were performed with each compound and its concurrent negative controls. All the experiments were conducted at a temperature of $25 \pm 1^\circ\text{C}$ at a relative humidity of ~65%.

The hatching adult flies were collected from the treatment vials and stored in 70% ethanol. The wings were removed and mounted in Faure's solution on microscope slides and inspected under 400x magnification for the presence of spots. On marker-heterozygous wings (*mwh/flr³*) it is

possible to record three different categories of spots: (i) small single spots (1-2 cells in size) and (ii) large single spots (more than 2 cells), expressing either the multiple wing hairs (*mwh*) or the flare (*flr³*) phenotype, as well as (iii) twin spots, consisting of both *mwh* and *flr³* subclones. On balancer heterozygous wings (*mwh/TM3*) only *mwh* single spots can be observed as the inverted *TM3* balancer chromosome does not carry *flr³* or any other suitable marker mutation. While in the *mwh/flr³* flies mutant clones can be originated by somatic point mutation, chromosome aberration and/or mitotic recombination, in the *mwh/TM3* genotype this last genotoxic event is suppressed due to the presence of multiple inversions in the *TM3* balancer chromosome. Comparing these two genotypes it was possible to quantify the recombinogenic action of the drugs tested.

Statistical analysis

The data were evaluated according to the multiple-decision procedure of Frei and Würzler [34], which make it possible to obtain four different diagnoses: positive, weakly positive, negative or inconclusive. The frequencies of mutant clones per fly of a treated series were compared to its concurrent negative control series using the conditional binomial test according to Kastembaum and Bowman. To exclude false positive results due to overdispersion of the data the U-test of Wilcoxon, Mann and Whitney was applied [35]. The recombinogenic action of the drugs was calculated comparing the standard frequency of clones per 10^5 cells obtained from *mwh/flr³* and *mwh/TM3* genotypes [36]. For an unbiased comparison of this frequency just *mwh* clones in *mwh* single spots and in twin spots were used [37].

Results

General genotoxicity

The results obtained on the three anthracyclines by means of the analysis of both marker-heterozygous (*mwh/flr³*) and balancer-heterozygous (*mwh/TM3*) genotypes are shown in Table I. The data obtained in two individual experiments with DOX, EPI and THP, respectively, were pooled since no statistical differences were found. Additionally, pooled and historical controls from our laboratory with distilled water were also included. For significance testing, however, the number of spots in treated groups was always compared with the corresponding concurrent controls.

Prior to the genotoxicity testing, the drugs were submitted to pilot experiments to establish dose range, which revealed distinct patterns of toxicity (data not shown). After ± 48 -hour larvae chronic feeding, THP was the drug that exhibited the highest toxic effect, followed by EPI and DOX, which showed similar responses. Non-toxic concentrations were used to perform the genotoxic evaluation of these drugs. It turned out that severity of toxic effect was different for all compounds so that the three doses ranges presented in Table 1 do not overlap.

In the *mwh/flr³* genotype, with the exception of THP, the genotoxicity figures for the three compounds showed significant increases in all spot categories analysed. THP gave inconclusive responses for small single spots at the 0.0075 mM, as well as for twin clones at the 0.00375 and 0.0075 mM doses. Moreover, the increasing incidence of twin spots recovered revealed the recombinagenic properties of the three anthracyclines, since this category of mutant clones are produced exclusively by mitotic recombination. In this way, the *mwh/TM3* flies were also analysed allowing quantification of the contribution of mutagenic and recombinagenic events for the genotoxicity observed. While THP did not cause any significant increase in spot frequencies, DOX showed positive increments in the frequency of total clones at the two highest doses. At the same time, the positive mutagenicity of EPI is restricted to the frequencies of small single and total spots at the 0.25 mM dose (Table I).

Standardized genotoxicity

The different dose range used for each drug makes it difficult to compare their genotoxicity levels. Thus, following the method described by Frei and Würigler [36], the standardized clone induction frequency per millimolar unit of exposure was established. A series of calculations was made, correcting the *mwh* clone numbers in the two genotypes at each exposure level. This was done by the subtraction of the estimated frequencies of spontaneous clones to obtain the corrected frequencies of induced spots. Not only the pooled and historical control frequencies, but also the numbers of flies analysed in the different treatment series were used as the basis for this correction. Subsequently, by combining the results from the different exposure levels for each compound via linear extrapolation, an approximate average induction frequency per millimolar unit of exposure concentration was calculated. These results are given in Table II showing that THP is the strongest genotoxic drug, inducing ~768 mutant clones/ 10^5 cells/mM, followed by EPI and DOX, which showed similar values, ~58 and ~37 mutant clones/ 10^5 cells/mM, respectively.

After calculating the standardized clone induction frequency per mM unit of exposure for both genotypes, it was possible to quantify the recombinagenic action of each drug (Table II). In contrast to its general genotoxicity, THP is the drug exhibiting the least recombinagenic activity (~91%); DOX was able to induce ~96% and EPI 100% mutant clones all over their mitotic recombination action. The 100% recombinagenicity for EPI was found after correcting the frequencies of spots observed in *mwh/TM3* flies, using the corresponding historical and pooled control. As the number of spots per fly in the treated group was lower as compared to that in the control group, the standardized frequency of spots was negative, showing that the events underlying the genotoxicity of EPI were due exclusively to homologous mitotic recombination, at least in this analysis.

Discussion

Genotoxicity

The present experimental study indicates that all three anthracyclines analysed were capable of damaging the DNA of *D. melanogaster* somatic cells. Since ~91 to 100% of the genetic toxicity observed for all drugs was associated with homologous mitotic recombination, we may infer that this event is the basic cause of the significant increments observed in the SMART assay results. This conclusion is in agreement with that arrived at in previous reports, which showed a positive response of DOX, as well as a high incidence of twin spots when evaluated in this same test system [29-31]. In this way, our data present a more fully detailed genotoxic characterization not only for DOX, but also for the two other analogues.

Although few studies had been performed to detect the recombinational properties of anthracyclines, they pointed out that both DOX and EPI increased the frequencies of SCEs in cultured mammalian cells, showing a dose-dependent behaviour [7-9,16]. Our data extend and quantify the mitotic recombinagenic action of DOX, EPI and THP.

Taking into account the fact that these drugs are classified as topo II poisons, acting by stabilizing a topo II-cleaved DNA complex and enhancing DNA double strand breaks (DSBs) levels [5,6], the high recombinational activity of these drugs can be explained. In fact, the formation of this ternary DNA-topo II-drug complex may have several different consequences. Two of them, may be associated with recombinagenicity: (i) the block of DNA replication due to the attachment of topo II in both strands, leading to non-homologous recombination repair; and (ii) the unfavourable DNA topology related to the inhibition of topo II function after replication, leading to the occurrence of homologous and non-homologous recombination events [5].

When SMART data were standardized for the genotoxic potential calculations, DOX and THP were identified as inducers of both mutagenic and recombinagenic events, whereas EPI was considered as a pure recombinagenic compound. On the other hand, the results obtained for the three drugs in the *mwh/TM3* flies – detecting only chromosomal

and/or point mutations – showed that DOX was the only compound with positive responses for the two highest concentrations tested; EPI induced positive increments just at the 0.25 mM concentration and THP does not alter the frequencies of mutant clones compared to the negative control. The response of EPI and THP in this genotype and the apparent contradiction concerning the quantification of their recombinational potential, may be explained considering that this last parameter was calculated based on standardized frequencies in the two genotypes (*mwh* clones/ 10^5 cells/mM), which means that the percentage of calculated recombination is an estimation of the overall genotoxicity of the drugs and consequently it does not reflect the differences found at each different concentration tested. Briefly, then, it is clear that homologous mitotic recombination is the major event regarding the genetic toxicity of these three anthracyclines.

Genotoxic potency and chemical structure

Although mitotic recombination has proved to be the major event responsible for the genotoxicity of these three anthracyclines in the SMART assay, no fully conclusive studies have been performed to understand the correlation between their mechanism of action and the induction of this genetic end-point. Therefore, we decided to establish a correlation between their genotoxic potencies and chemical structures. Additionally, we calculated their recombinagenic potential based on the standardized clone induction frequency.

Despite having the same mechanism of action, the drugs showed some differences concerning the multiple genetic parameters detected by the SMART assay. THP was the compound with the weakest recombinagenic activity (~91%), followed by DOX and EPI, which induced respectively ~96 and 100% of homologous recombination. However, THP is the drug with a major genetic toxicity, being EPI and DOX, respectively ~13 and ~21 times less potent as inducers of DNA damage than the former.

Typically, anticancer compounds are analysed and compared for their cytotoxic potential, and much research has been made on the properties of the anthracycline family [38-40]. In this respect, THP

showed to be more cytotoxic than DOX when administered to M5076 ovarian mice sarcoma cells not only in reference to its increased intracellular concentration but also concerning its nuclear uptake. Both factors are related to the more intense antitumour activity associated with THP [40,41] and could be related to its higher genotoxicity in the imaginal wing cells of *D. melanogaster*.

Although the chemical structures of the three drugs are very similar, there are different molecular arrangements restricted to the amino sugar portion of the molecule. The first point to be considered concerns EPI or 4'-epidoxorubicin, which differs from DOX in the steric position of the amino sugar 4'-OH group [4,16]. This unique difference confers a genotoxic activity ~56% more intense to EPI than that exhibited by DOX, mainly in terms of recombinational increments. Additionally, THP or 4'-tetrahydropyranyl-doxorubicin is a disaccharide analogue to DOX, which presented a superior genotoxic profile in the SMART test. Several reports have shown that not only a second sugar residue but also substitutions at the 4'-position enhances the biological activity of anthracyclines [42,43]. Another important finding, which could be associated to the genotoxic differences observed in the present study, is related to the DNA-enzyme-drug complex, since the anthracycline molecule is positioned in the DNA-protein interface, wherein the amino sugar of anthracyclines is one of the non-intercalating chemical moieties that could influence the formation and stabilisation of this complex [44,45].

Conclusions

Although EPI and THP have been clinically used in the treatment of a variety of malignancies and have shown similar responses as anti-cancer agents, they are less cardiotoxic than DOX [4,40,46,47]. In spite of the similarity concerning therapeutical effectiveness, they showed increased genotoxic effects expressed as loss of heterozygosity (LOH) in somatic cells of *D. melanogaster* especially in terms of homologous recombination (HR). All in all these findings underline the importance of genotoxic studies as a tool for the clinical use of these new analogues as an alternative to the classical anthracycline DOX.

Acknowledgements

We are grateful to Dr. M. Castegnaro of the International Agency for Research on Cancer - IARC, Lyon, France for the sample of Pirarubicin. Our sincere thanks go to Dr. Hansjörg Frei for his suggestions about data evaluation. This study was supported by the following Brazilian Agencies: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) and Fundação e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

References

- [1] F. Arcamone, F. Animati, G. Capranico, P. Lombardi, G. Pratesi, S. Manzini, R. Supino, F. Zunino, New developments in antitumour anthracyclines, *Pharmacol. Ther.* 76 (1997) 117-124.
- [2] K.R. Hande, Clinical applications of anticancer drugs targeted to topoisomerase II, *Biochim. Biophys. Acta* 1400 (1998) 173-184.
- [3] C. Monneret, Recent developments in the field of antitumour anthracyclines, *Eur. J. Med. Chem.* 36 (2001) 483-493.
- [4] F.M. Arcamone, From the pigments of the actinomycetes to third generation antitumour anthracyclines, *Biochimie.* 80 (1998) 201-206.
- [5] B.C. Baguley, L.R. Ferguson, Mutagenic properties of topoisomerase-targeted drugs, *Biochim. Biophys. Acta* 1400 (1998) 213-222.
- [6] J.M. Fortune, N. Osheroff, Topoisomerase II as a target for anticancer drugs: when enzymes stop being nice, *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 64 (2000) 221-253.
- [7] W. Au, M.A. Butler, T.S. Matney, T.L. Loo, Comparative structure-genotoxicity study of three aminoanthraquinone drugs and daunorubicin, *Cancer Res.* 41 (1981) 376-379.
- [8] B.K. Bhuyan, D.M. Zimmer, J.H. Mazurek, R.J. Trzos, P.R. Harbach, V.S. Shu, M.A. Johnson, Comparative genotoxicity of adriamycin and menogarol, two anthracycline antitumour agents, *Cancer Res.* 43 (1983) 5293-5297.
- [9] E. Noviello, M.G. Aluigi, G. Cimoli, E. Rovini, A. Mazzoni, S. Parodi, F. De Sessa, P. Russo, Sister-chromatid exchanges, chromosomal aberrations and cytotoxicity produced by topoisomerase II-targeted drugs in sensitive (A2780) and resistant (A2780-DX3) human ovarian cancer cells: correlations with the formation of DNA double-strand breaks, *Mutat. Res.* 311 (1994) 21-29.
- [10] H. Susuki, S. Nakane, Differential induction of chromosomal-aberrations by topoisomerase inhibitors in cultured Chinese-hamster cells, *Biol. Pharm. Bull.* 17 (1994) 222-226.
- [11] H. Susuki, T. Ikeda, T. Yamagishi, S. Nakaike, S. Nakane, M. Ohsawa, Efficient induction of chromosome-type aberrations by

- topoisomerase II inhibitors closely associated with stabilisation of the cleavable complex in cultured fibroblastic cells, *Mutat. Res.* 328 (1995) 151-161.
- [12] B. Jeremic, Y. Shibamoto, M. Abe, Assessment of micronucleus induction in murine SCCVII cells treated with various anticancer agents, *Chemotherapy* 42 (1996) 266-272.
- [13] G. Mazue, G.M. Willians, M.J. Iatropoulos, A.J. Newman, U. Sammartini, R. Pulci, S. Castellino, G. Scampini, M. Brughera, A.R. Imondi, A. Podesta, Anthracyclines: review of genotoxicity and carcinogenicity studies, *Int. J. Oncol.* 8 (1996) 525-536.
- [14] F. Duffaud, T. Orsiere, M. Baciuchka-Palmaro, L. Digue, R. Favre, A. Botta, Genotoxicity of doxorubicin and cisplatin: determination of a positive control for the micronucleus test, *Ann. Biol. Clin.- Paris* 56 (1998) 183-187.
- [15] P. Villani, T. Orsiere, F. Duffaud, L. Digue, G. Bouvenot, A. Botta, Genotoxic and clastogenic effects of doxorubicin, *Therapie* 53 (1998) 391-395.
- [16] O. El-Mahdy Sayed Othman, Cytogenetic effect of the anticancer drug epirubicin on Chinese hamster cell line in vitro, *Mutat. Res.* 468 (2000) 109-115.
- [17] G.C. Jagetia, V. Nayak, Effect of doxorubicin on cell survival and micronuclei formation in HeLa cells exposed to different doses of gamma-radiation, *Strahlenther. Onkol.* 176 (2000) 422-428.
- [18] R.D. Snyder, M.R. Arnone, Putative identification of functional interactions between DNA intercalating agents and topoisomerase II using the V79 in vitro micronucleus assay, *Mutat. Res.* 503 (2002) 21-35.
- [19] W.W. Au, T.C. Hsu, The genotoxic effects of adriamycin in somatic and germinal cells of the mouse, *Mutat. Res.* 79 (1980) 351-361.
- [20] W. Andrivon, F. Callais, J. Nafziger, C. Monneret, J.J. Guillosson, A new anthracycline with potent antileukemic activity exhibits reduced mutagenicity, *Mutat. Res.* 344 (1995) 135-140.

- [21] J.M. Gentile, S. Rahimi, J. Zwiesler, G.J. Gentile, L.R. Ferguson, Effect of selected antimutagens on the genotoxicity of antitumour agents, *Mutat. Res.* 402 (1998) 289-298.
- [22] W.J. MACKAY and L.A. PHELPS, The induction of GC to AT transition mutations with adriamycin in the bacterium *Salmonella typhimurium*, *Tex. J. Sci.* 53 (2001) 239-246.
- [23] J.M. Brumfield and W.J. Mackay, Mutagenic activity of idarubicin and epirubicin in the bacterium *Salmonella typhimurium*, *Tex. J. Sci.* 54 (2002) 249-260.
- [24] M. Dickins, K. Wright, M. Phillips, N. Todd, Toxicity and mutagenicity tests of 4 anti-cancer drugs in cultured Chinese-hamster cells, *Mutat. Res.* 143 (1985) 149-154.
- [25] P.B. Jensen, B.S. Sorensen, M. Sehested, E.J.F. Demant, E. Kjeldsen, E. Friche, H.H. Hansen, Different modes of anthracycline interaction with topoisomerase II, *Biochem. Pharmacol.* 45 (1993) 2025-2035.
- [26] W. Andrivon, J.M. Saucier, C. Auclair., C. Monneret, J.C. Florent, J.J. Guillosson, J. Nafziger, Enhanced topoisomerase II-induced DNA breaks and free radical production by a new anthracycline with potent antileukemic activity, *Leukemia Res.* 20 (1996) 119-126.
- [27] M. Binaschi, R. Farinosi, C.A. Austin, M. Fisher, F. Zunino, G. Capranico, Human DNA topoisomerase II α -dependent DNA cleavage and yeast cell killing by anthracycline analogues, *Cancer Res.* 58 (1998) 1886-1892.
- [28] M.E. Borgnetto, S. Tinelli, L. Carminati, G. Capranico, Genomic sites of topoisomerase II activity determined by comparing DNA breakage enhanced by three distinct poisons, *J. Mol. Biol.* 285 (1999) 545-554.
- [29] H. Frei, F.E. Würgler, H. Juon, C.B. Hall, U. Graf, Aristolochic acid is mutagenic and recombinogenic in *Drosophila* genotoxicity tests, *Arch. Toxicol.* 56 (1985) 158-166.
- [30] U. Graf, H. Frei, A. Kägi, A.J. Katz, F.E. Würgler, Thirty compounds

- tested in the *Drosophila* wing spot test, *Mutat. Res.* 222 (1989) 359-373.
- [31] J. Clements, D. Howe, M. Phillips, N.K. Todd, The *Drosophila* wing test - A comparison of the sensitivity of different strains, *Mutat. Res.* 203 (1988) 117-123.
- [32] U. Graf, F.E. Würigler, A.J. Katz, H. Frei, H. Juon, C.B. Hall, P.G. Kale, Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.* 271 (1984), 59-67.
- [33] D.L. Lindsley, G.G. Zimm (Eds.), *The Genome of Drosophila melanogaster*, Academic Press, New York, 1992, 1133p.
- [34] H. Frei, F.E. Würigler, Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative or inconclusive result, *Mutat. Res.* 203 (1988) 97-308.
- [35] H. Frei, F.E. Würigler, Optimal experimental design and sample size for the statistical evaluation of data from somatic mutation and recombination tests (SMART) in *Drosophila*, *Mutat. Res.* 334 (1995) 247-258.
- [36] H. Frei, F.E. Würigler, Induction of somatic mutation and recombination by four inhibitors of eukaryotic topoisomerases assayed in the wing spot test of *Drosophila melanogaster*, *Mutagenesis* 11 (1996) 315-325.
- [37] H. Frei, J. Clements, D. Howe, F.E. Würigler, The genotoxicity of the anticancer drug mitoxantrone in somatic and germ-cells of *Drosophila melanogaster*, *Mutat. Res.* 279 (1992) 21-33.
- [38] D.S. Richardson, S.A. Johnson, Anthracyclines in haematology: preclinical studies, toxicity and delivery systems, *Blood Rev.* 11 (1997) 201-223.
- [39] J.L. Teillaud, N. Gruel, J. Moncuit, Z. Mishal, W.H. Fridman, T.J. Lampidis, H. Tapiero, Structurally different anthracyclines provoke different effects on cell cycle and tumor B cell differentiation, *Biomed. Pharmacother.* 52 (1998) 282-290.
- [40] T. Sugiyama, Y. Sadzuka, K. Nagasawa, N. Ohnishi, T. Yokoyama, T. Sonome, Membrane transport and antitumor activity of pirarubicin, and comparison with those of doxorubicin, *Jpn. J. Cancer Res.* 90 (1999), 775-780.

- [41] K. Nagai, K. Nagasawa, Y. Sadzuka, M. Tsujimoto, K. Takara, N. Ohnishi, T. Yokoyama, S. Fujimoto, Relationships between the in vitro cytotoxicity and transport characteristics of pirarubicin and doxorubicin in M5076 ovarian carcinoma cells, and comparison with those in Ehrlich ascites carcinoma cells, *Cancer Chemoth. Pharm.* 49 (2002) 244-250.
- [42] F. Arcamone, F. Animati, M. Bigioni, G. Capranico, C. Caserini, A. Cipollone, M. De Cesare, A. Ettore, F. Guano, S. Manzini, E. Monteagudo, G. Pratesi, C. Salvatore, R. Supino, F. Zunino, Configurational requirements of the sugar moiety for the pharmacological activity of anthracycline disaccharides, *Biochem. Pharmacol.* 57 (1999) 1133-1139.
- [43] F. Zunino, G. Pratesi, P. Perego, Role of the sugar moiety in the pharmacological activity of anthracyclines: development of a novel series of disaccharide analogs, *Biochem. Pharmacol.* 61 (2001) 933-938.
- [44] A. Cipollone, M. Berettoni, M. Bigioni, M. Binaschi, C. Cermele, E. Monteagudo, L. Olivieri, D. Palomba, F. Animati, C. Goso, C.A. Maggi, (2002) Novel anthracycline oligosaccharides: influence of chemical modifications of the carbohydrate moiety on biological activity, *Bioorg. Med. Chem.* 10 (2002) 1459-1470.
- [45] M. Binaschi, G. Capranico, L. Dal Bo, F. Zunino, Relationship between lethal effects and topoisomerase II-mediated double-stranded DNA breaks produced by anthracyclines with different sequence specificity, *Mol. Pharmacol.* 51 (1997) 1053-1059.
- [46] G.L. Plosker, D. Faulds, Epirubicin - A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic use in cancer-chemotherapy, *Drugs* 45 (1993) 788-856.
- [47] M. Trudeau, O. Pagani, Epirubicin in combination with the taxanes, *Semin. Oncol.* 28 (2001) 41-50.

Legend to figure

Fig. 1. Chemical structures of DOX, EPI and THP. An arrow indicates structural differences.

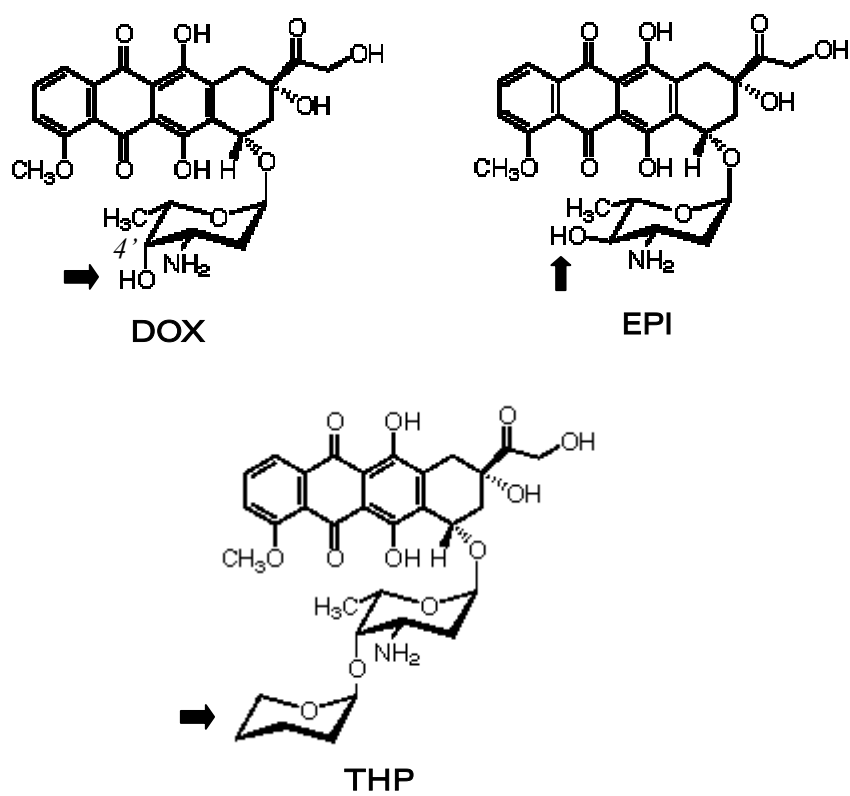


Fig. 1

Table I. Fly spot data obtained after exposure of marker and balancer-heterozygous larvae of *D. melanogaster* to DOX, EPI and THP.

Controls and compounds Genotypes	Conc. (mM)	No. of flies (N)	Spots per fly (no. of spots) statistical diagnosis ^a				Total <i>mwh</i> clones ^c (n)
			Small single spots (1-2 cells) ^b m = 2	Large single spots (> 2 cells) ^b m = 5	Twin spots m = 5	Total spots m = 2	
Water (historical and pooled controls)							
<i>mwh / flr³</i>		385	0.50 (194)	0.06 (23)	0.04 (16)	0.61 (233)	233
<i>mwh / TM3</i>		378	0.32 (122)	0.03 (11)	^d	0.35 (133)	133
DOX							
<i>mwh / flr³</i>	0	20	0.80 (16)	0.05 (01)	0.00 (0)	0.85 (17)	17
	0.25	20	4.95 (99) ^f	2.35 (47) ^f	2.30 (46) ^f	9.60 (192) ^f	190
	0.5	20	9.05 (181) ^f	7.40 (148) ^f	7.35 (147) ^f	23.80 (476) ^f	464
	1.0	20	7.70 (154) ^f	9.55 (191) ^f	9.05 (181) ^f	26.30 (526) ^f	510
	2.5	20	4.30 (86) ^f	10.15 (203) ^f	7.95 (159) ^f	22.40 (448) ^f	421
<i>mwh / TM3</i>	0	30	0.57 (17)	0.00 (0)	^d	0.57 (17)	17
	0.25	30	0.60 (18) -	0.17 (05) +		0.77 (23) i	23
	0.5	30	1.07 (32) +	0.07 (02) i		1.13 (34) +	34
	1.0	30	1.23 (37) ^f	0.33 (10) ^f		1.57 (47) ^f	47
	2.5	30	1.03 (31) +	0.33 (10) ^f		1.37 (41) ^f	41
EPI							
<i>mwh / flr³</i>	0	30	0.33 (10)	0.07 (02)	0.03 (01)	0.43 (13)	13
	0.0625	20	1.15 (23) ^f	2.80 (56) ^f	2.20 (44) ^f	6.15 (123) ^f	114
	0.125	20	1.40 (28) ^f	5.70 (114) ^f	2.60 (52) ^f	9.70 (194) ^f	184
	0.25	20	1.30 (26) ^f	4.65 (93) ^f	1.45 (29) ^f	7.40 (148) ^f	139
	0.5	20	1.25 (25) ^f	5.20 (104) ^f	0.85 (17) ^f	7.30 (146) ^f	140
<i>mwh / TM3</i>	0	30	0.07 (02)	0.03 (01)	^d	0.10 (03)	03
	0.0625	30	0.17 (05) i	0.10 (03) i		0.27 (08) i	08
	0.125	30	0.17 (05) i	0.10 (03) i		0.27 (08) i	08
	0.25	30	0.30 (09) ^e	0.07 (02) i		0.37 (11) ^e	11
	0.5	30	0.10 (03) i	0.23 (07) +		0.33 (10) +	10
THP							
<i>mwh / flr³</i>	0	30	0.73 (22)	0.03 (01)	0.17 (05)	0.93 (28)	28
	0.00375	20	1.30 (26) ^e	0.40 (08) ^f	0.20 (04) i	1.90 (38) ^e	38
	0.0075	20	0.90 (18) i	0.55 (11) ^f	0.35 (07) i	1.80 (36) ^f	36
	0.015	20	1.55 (31) ^e	0.75 (15) ^f	0.70 (14) ^f	3.00 (60) ^f	59
	0.03	20	7.30 (146) ^f	4.20 (84) ^f	5.65 (113) ^f	17.15 (343) ^f	337

<i>mwh</i> / <i>TM3</i>	0	30	0.67 (20)	0.03 (01)	^d	0.70 (21)	21
	0.00375	30	0.63 (19) -	0.07 (02) i		0.70 (21) -	21
	0.0075	30	0.73 (22) -	0.13 (04) i		0.87 (26) i	26
	0.015	30	0.67 (20) -	0.07 (02) i		0.73 (22) -	22
	0.03	30	1.07 (32) i	0.03 (01) i		1.10 (33) i	33

^aStatistical diagnoses according to Frei and Würzler [34]: +, positive; -, negative; i, inconclusive; *m*, multiplication factor for the assessment of significantly negative results. Significance levels $\alpha=\beta=0.05$; ^bIncluding rare *flr³* spots; ^cConsidering *mwh* clones from *mwh* single spots and from twin spots. ^dOnly *mwh* single spots can be observed in *mwh/TM3* heterozygotes as the balancer chromosome *TM3* does not carry the *flr³* mutation. ^e. ^fPositive diagnosis confirmed by the *U*-test: ^e $P \leq 0.05$, ^f $P \leq 0.01$.

Table II. Standardized *mwh* clone induction frequencies per millimolar unit of exposure concentration and the prevalence of recombinational events^a

Compounds	<i>mwh/flr³</i> marker trans-heterozygotes				<i>mwh/TM3</i> -inversion heterozygotes				Recombination (%)
	Standardized frequency ^b (<i>mwh</i> clones per 10 ⁵ cells per mM) (f_t)	Mean clone size class (\bar{i}_t)	Geometric mean of clone size ^c (2^{t-1})	Standardized frequency per 10 ⁵ cells, corrected for clone size ^d ($f_t = 2^{t-2} \times f_t$)	Standardized frequency ^b (<i>mwh</i> clones per 10 ⁵ cells per mM) (f_h)	Mean clone size class (\bar{i}_h)	Geometric mean of clone size ^c (2^{h-1})	Standardized frequency per 10 ⁵ cells, corrected for clone size ^d ($f_h = 2^{h-2} \times f_h$)	
DOX	37.04	3.41	5.30	98.17	1.65	2.03	2.04	1.68	95.54
EPI	57.77	5.49	22.43	648.01	-0.38	-5.83	0.01	0.00	100.00
THP	767.91	2.88	3.69	1416.80	72.59	1.58	1.50	54.26	90,55

^aAll values are control-corrected. Frequencies in *mwh/flr³* marker-heterozygotes are calculated with and without clone size correction; accordingly, somewhat different estimates are obtained for the relative contributions of recombination to the totals of clone induction; ^bClone frequencies per fly divided by the number of cells examined per fly (48 800) estimate frequencies per cell and per cell division in chronic exposure experiments [34]; ^cGeometric mean and ^dCorrections calculated according to Frei *et al.* [37].

Capítulo III

The influence of topoisomerase inhibitory activity on the somatic genotoxicity of daunorubicin, idarubicin and aclarubicin

Environmental and Molecular Mutagenesis,
enviado para publicação

Manuscript for *Environmental and Molecular Mutagenesis*

The influence of topoisomerase inhibitory activity on the somatic genotoxicity of daunorubicin, idarubicin and aclarubicin

Running title: **Genotoxicity of anthracyclines**

Mauricio Lehmann¹, Knulp de Souza Prudente Vilar¹, Aline Franco¹, Maria Luíza Reguly¹ and Heloísa Helena Rodrigues de Andrade^{1,2*}

¹Laboratório de Mutagênese, Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

²Laboratório de Diagnóstico da Toxicidade Genética – TOXIGEN, Universidade Luterana do Brasil - ULBRA, Canoas, RS, Brasil.

*Correspondence to and present address: Heloísa H. R. de Andrade, Laboratório de Diagnóstico da Toxicidade Genética – TOXIGEN, Universidade Luterana do Brasil - ULBRA, Prédio 22, 3º andar, Rua Miguel Tostes, 101, 92420-280, Canoas, RS, Brasil. Tel: + 55 51 4779214; Fax: + 55 51 4782893. E-mail: heloisa@ulbra.br

Abstract

Anthracyclines have been widely used as anticancer drugs, mainly due to their multiple effects against different types of human cancers. Due to the latter secondary effects this class of drugs presents, imputed to their genotoxicity, the search for new analogues has been promoted with a view to obtain chemotherapeutic anthracyclines with minor genetic toxicity. The present study evaluated the mutagenic and recombinogenic properties of two topoisomerase II (topo II) poisons - daunorubicin (DNR) and idarubicin (IDA) - as well as the topo II catalytic inhibitor aclarubicin (ACLA), using the wing Somatic Mutation and Recombination Test (SMART) in *Drosophila melanogaster*. The data indicate that the three anthracyclines studied were genotoxic in this bioassay, inducing mainly mitotic homologous recombinational events. Besides their positive effects, ACLA was the strongest genotoxin, promoting ~2 and ~5.4 times more DNA damages than DNR and IDA, respectively. Additionally, the figures for spot size distribution as well as the recombinogenic activity of ACLA were compared to those obtained for topo II poisons. While recombinational DNA damages account for ~91 and ~86% of DNR and IDA genotoxicity, ~62% of this activity was observed for ACLA. Recently, ACLA has been classified as an agent acting not only as a catalytic inhibitor of topo II, but also as a topoisomerase I (topo I) poison. This dual topo I and II inhibitory effect, associated with its DNA-intercalating activity could explain the high genotoxic activity of this drug in the SMART assay.

Key Words: anthracyclines; topoisomerase; *Drosophila melanogaster*; SMART test; mitotic recombination; genotoxicity

Introduction

Due to their vital role in the curative and palliative treatment of several cancer types, anthracyclines have been widely used in cancer chemotherapy for more than 30 years [Hande, 1998; Gewirtz, 1999]. Although anthracyclines produce a wide range of biological reactions, their primary mechanism of tumor cytotoxicity has been ascribed to the inhibition of topoisomerase II (topo II) enzyme [Nielsen et al., 1996; Arcamone et al., 1997].

In this respect, two groups of topo II inhibitors can be distinguished according to their effects on the enzyme functionality. The first one comprises the topo II poisons, able to convert this essential enzyme into a potent cellular toxin through their ability to maintain the covalent topo II-cleaved DNA complex. The second group interacts with topo II, inhibiting its overall catalytic action, preventing the DNA-enzyme linkage or its DNA release after the breakage/rejoining reaction mediated by topo II [Fortune and Osheroff, 2000; Topcu, 2001].

Among the anthracyclines commercially available for cancer treatment, aclarubicin (ACLA) is the unique drug acting as a topo II catalytic inhibitor [Monneret, 2001] - undermining both catalytic and structural roles of the enzyme [Nitiss et al., 1997, Fortune and Osheroff, 2000]. In contrast, the other two anthracyclines assessed in the present study - daunorubicin (DNR) and its analogue idarubicin (IDA) - behave as topo II poisons [Binaschi et al., 1997].

Additional concerns about hazardous side effects of anthracycline chemotherapy [Baguley and Ferguson, 1998; Hande, 1998] - represented by the development of secondary tumors originated from cells that were not originally neoplastic [Felix et al., 1995; Wolden et al., 1998; Baguley and Ferguson, 1998; Harousseau, 1999] - open a new field for investigations based on the ability of these drugs to disturb the genomic integrity.

The capacity of DNR and IDA to induce different genetic lesions has been confirmed in several *in vivo* and *in vitro* bioassays, which pick up gene mutations [Westendorf et al., 1984], as well as aneugenic and clastogenic effects [Stopper et al., 1999; González-Cid et al., 2002; Nebel

et al., 2002]. IDA was also identified as an inducer of direct DNA strand breaks, oxidation and methylation in the alkaline Comet test [Blasiak et al., 2002a,b]. As opposed to IDA, ACLA displayed no mutagenic effect in V79 Chinese Hamster cells and in the Salmonella-microsome assay [Westendorf et al., 1984], being able to induce only chromatid-type aberrations in rat bone marrow and Chinese hamster lung cells [Nersessian et al., 1991; Suzuki and Nakane, 1994].

The outlining of this study focused on two specific points concerning the anthracyclines, DNR, IDA and ACLA. The first point centralized in their behavior as able to induce genic and chromosomal mutation, as well as mitotic recombination, trying to establish a correlation between these genetic parameters and the different mode of topo II-interaction of the anthracyclines analyzed. The second point focused on the fact that up to now no study has either described the recombinational activity of topo II catalytic inhibitors or compared the genotoxic potential of topo2 poisons with the former. We purpose to raise these questions applying the wing Somatic Mutation and Recombination Test (SMART) in *Drosophila melanogaster*, which allows not only to quantitatively and qualitatively assess genotoxicity, but also to establish the relationship between chemical structures and/or mode of action with genetic toxicity potencies.

Materials and Methods

Chemicals

Aclarubicin (CAS no. 57576-44-0) was provided by Dr. M. Castegnaro (International Agency for Research on Cancer - IARC, Lyon, France). Daunorubicin (CAS no. 20830-81-3) and Idarubicin (CAS no. 58957-92-9) were tested as the clinical preparations Daunoblastina[®] and Zavedos[®] (Pharmacia & Upjohn Ltda., São Paulo, Brazil), respectively. The chemical structures of anthracyclines are given in Figure 1. All drugs were dissolved in distilled water just before use.

Somatic Mutation and Recombination Test (SMART)

Following the methods described in Graf et al. [1984, 1989], two different strains of *Drosophila melanogaster*, carrying gene markers on the left arm of chromosome 3, were used. Virgin females of the strain *flr³/In(3LR)TM3, ri p^o sep l(3)89Aa bx^{34e} e Bd⁶* were crossed with *mwh/mwh* males. More detailed description of the genetic symbols used can be found in Lindsley and Zimm [1992]. Both genders were kept in culture vials for 8 h, containing a solid agar base (3% w/v) completely covered with a layer of live fermenting yeast supplemented with sucrose, allowing the females to lay eggs. After three days, the larvae were washed out of the vials with tap water, collected in a stainless steel strainer and transferred to plastic vials containing 1.5 g of *Drosophila* Instant Medium (Carolina Biological Supply; Burlington, NC, USA) rehydrated with 5 ml of the test solutions at four different concentrations. The larvae fed on this medium until the end of their development. Two experiments were performed with each compound and its concurrent negative controls. All the experiments were conducted at a temperature of $25 \pm 1^\circ\text{C}$ and at a relative humidity of ~65%.

After the end of metamorphosis period, two offspring genotypes emerged from the pupa: (i) marker-heterozygous (*mwh/flr³*) and (ii) balancer-heterozygous (*mwh/TM3*) flies, which were stored in 70% ethanol. Their wings were mounted in Faure's solution (gum arabic 30 g, glycerol 20 ml, chloral hydrate 50 g, water 50 ml) on slides and scored under a compound microscope at 400X magnification for the presence of

cell clones showing malformed wing hairs. The size of a spot was determined by counting the number of cells exhibiting the *mwh* or the *flr³* phenotype. On *mwh/flr³* genotype it is possible to record three different categories of spots: (i) small single spots (1-2 cells in size) and (ii) large single spots (more than 2 cells), expressing either the multiple wing hairs (*mwh*) or the flare (*flr³*) phenotype, as well as (iii) twin spots, consisting of both *mwh* and *flr³* subclones. On balancer-heterozygous wings only *mwh* single spots can be observed, as the inverted *TM3* balancer chromosome does not carry *flr³* or any other suitable marker mutation. These differences are explained by the fact that in marker heterozygous flies the mutant spots can be originated by somatic point mutation, chromosome aberration and/or mitotic recombination, while in *mwh/TM3* genotype this last genotoxic event involving the balancer chromosome and its structurally normal homologue is a lethal event. By comparing the number of spots obtained in both genotypes it is possible to quantify the recombinagenic action of the compounds studied.

Statistical analysis

To statistically assess the differences observed in the frequencies of each type of spot from a treated series compared with its concurrent negative control, the conditional binomial test according to Kastembaum and Bowman [1970] was used. Applying the multiple-decision procedure of Frei and Würgler [1988], it is possible to obtain four different diagnoses: positive, weakly positive, negative or inconclusive. Considering that false positive results might occur if the data are overdispersed, the non-parametric U-test of Wilcoxon, Mann and Whitney was used for the final statistical diagnosis of all positive outcomes [Frei and Würgler, 1995]. To calculate the recombinagenic action of the drugs, we compared the standard frequency of clones per 10^5 cells obtained from *mwh/flr³* and *mwh/TM3* genotypes [Frei and Würgler, 1996]. For an unbiased comparison, this analysis was done using the frequency of just *mwh* clones observed in *mwh* single spots and in twin spots [Frei et al., 1992].

Results

Genetic toxicity

The individual genotoxic evaluation of DNR, IDA and ACLA after two chronic and independent experimental proceedings is shown in Table I and Figure 2, which includes the data observed after the analysis of marker-heterozygous (*mwh/flr³*) and balancer-heterozygous (*mwh/TM3*) genotypes. Since no statistical differences were found between experiments, the data were pooled. The pooled and historical negative control were also included, and used to calculate the genotoxic potency represented in Table II. However, for significance testing the frequency of spots in treated groups was always compared with the corresponding concurrent control.

The non-toxic dose range used to test the genotoxicity of these compounds was chosen based on the results obtained in pilot experiments (data not shown). While DNR and IDA showed similar toxicity patterns, ACLA displayed the highest toxic effect, which explains the different dose range used.

Considering the *mwh/flr³* genotype, the only compound displaying significant increase for all spot categories in all doses tested was DNR. In spite of having some inconclusive responses in single (small or large) as well as twin spots categories at the two lowest doses, IDA and ACLA exhibited positive outcomes for the total spots in all concentrations tested. These data not only confirm the genotoxic activity of the three anthracyclines, but also indicate their capacity to induce mitotic recombination by means of the positive increments observed in twin spots (Table I). Subsequently, in an attempt to quantify and confirm the recombinagenic potential of these drugs, we performed the analysis of *mwh/TM3* flies. Although the frequency of spots induced in this genotype has been extremely reduced compared to *mwh/flr³* genotype (Figure 2), our results indicate that DNR and ACLA induced statistically significant increase in the total spots at the three highest concentrations tested, while IDA showed the same result only at the two highest doses (Table I).

Standardized genotoxic activity

After analyzing the individual genotoxic patterns, our objective was to accomplish a quantitative comparison between these three anthracyclines. This comparative analysis was done using the standardized clone induction frequency per millimolar unit of exposure, calculated according to Frei and Würgler [1996]. The *mwh* clone numbers (Table I) of each concentration tested were corrected using the historical and pooled control frequencies. By means of these corrected values an approximate average figure for spot induction frequency per exposure unit (mM) was calculated via linear extrapolation. The results obtained are summarized in Table II, indicating that ACLA was the drug with the highest genotoxic potency, followed by DNR and IDA, which induced ~2 and ~5.4 times less genotoxic events, respectively.

Subsequently, by comparing the standardized clone induction frequencies in the two genotypes, the contribution of mitotic recombination was obtained as opposed to genic and chromosomal mutations to the genotoxicity observed (Table II). While for DNR and IDA, recombination was responsible for approximately 91 and 86% of the wing spot induction, for ACLA only ~62% of the DNA damages were due to this genetic endpoint. It means that ~38% of ACLA's genotoxicity is of non-recombinational origin.

Clone size distribution

When the graphs in Figure 3, as well as the mean clone size class and geometric mean of clone size values showed in Table II were analyzed, a clear difference was observed in spot size distribution between ACLA and the two other compounds. DNR and IDA showed similar spot size distribution, inducing clones larger than expected (mean *mwh* clone size of ~2 cells, according to Frei et al. [1992]). In fact, in marker-heterozygous flies both drugs produced spots formed on average by ~7 cells, which leads to increased standardized frequencies after the clone size correction. Differently, the clones induced by ACLA are almost all included in the expected number of cells (2 cells). Taking into account that small single spots (1-2 cells in size) are produced in the two last mitotic division in the pupa, comprising about 75% of the spot frequency

in an ideal situation, the lesser incidence of small clones induced by DNR and IDA could indicate that these drugs were not acting throughout all the mitotic divisions, which means they are not so stable as ACLA [Frei and Würzler, 1996].

In *mwh/TM3* balancer-heterozygous genotype the frequency of *mwh* spots was smaller than that observed in *mwh/flr³* flies for the three drugs studied. This reduced spot induction in balancer-heterozygous flies, mainly regarding large spots, has been credited to the absence of clones originated from recombinational events in contrast to the supposed high incidence of spots composed of segmentally aneuploid cells, which leads to clones that divide poorly, if at all [Frei et al., 1992].

Discussion

The results obtained in the present study show that the three anthracyclines tested in the SMART assay induced a high incidence of DNA damage in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. Additionally, by comparing the *mwh/flr³* and *mwh/TM3* genotypes, it was possible to determine that their genotoxicities were mainly associated to recombinational events, although for ACLA almost 38% of its genetic toxicity was due to genic and chromosomal mutations. Our data are in agreement with two other reports, which have characterized DNR as a genotoxic agent using the same bioassay [Clements and Vogel, 1988; Graf et al., 1989]. However, our study provides a more complete genotoxic assessment not only for this drug, but also for the two other anthracyclines analyzed.

Although many authors have proposed the involvement of topo II inhibitors with recombinational events [Baguley and Ferguson, 1998; Ferguson, 1998; Arnaudeau et al., 2000], there is almost no data reporting the recombinagenic potentialities of this group of compounds – since the bioassays employed to assess genotoxic parameters mainly focused on point mutations or chromosome aberrations. In this way, the SMART proved to be an appropriate tool to detect and quantify the recombinagenic action of this compound group.

Despite their ability to intercalate into the DNA, DNR, IDA and ACLA exert their tumor toxicity by inhibiting the topo II activity, an enzyme essential to almost all cellular DNA process [Fortune and Osheroff, 2000]. In this respect, the drugs studied represent two classes of topo II inhibitors: (i) topo II poisons (DNR and IDA) and (ii) topo II catalytic inhibitors (ACLA).

Topoisomerase II poisons

By comparing the genotoxic figures of DNR and its analogue IDA in the wing SMART assay it is possible to observe similar responses, concerning clone size distribution (Figure 3) and mean clone size class (Table II) in both genotypes analyzed. This same behavior is also observed when the percentage of recombination induced by both drugs

was considered (Table II). In contrast, when the number of DNA damages is taken into account, DNR was markedly more genotoxic than IDA, inducing ~2.7 times more *mwh* clones per 10^5 cells per mM. This difference can be associated to their chemical structures, in which DNR and IDA differ only in the aglycone ring due to the lack of a methoxy group in the latter (Figure 1).

As already proved, both compounds were genotoxic in different test systems, inducing frameshift and base-substitution transition mutations in TA98, TA7004 and TA7001 cultured strains of *Salmonella typhimurium* [Mackay et al., 2000; Brumfield and Mackay, 2002], as well as chromosomal mutations. In this respect, DNR and IDA have shown to be potent inducers of micronuclei in three different human T-lymphoblastoid cell lines [Stopper et al., 1999]. Nebel et al. [2002] obtained positive outcomes when this drug was administered to mice using the Micronucleus test, as well as the Comet assay. Similar results were also obtained when normal human lymphocytes were exposed to IDA, regarding the induction of chromosome aberrations [González-Cid et al., 2002], and the occurrence of DNA strand breaks detected by means of the Comet assay under alkaline conditions [Blasiak et al., 2002a,b; Nebel et al., 2002].

Although DNR and IDA induced chromosomal and point mutations, our data pointed out that on average ~90% of their genotoxic activity was due to homologous mitotic recombination. In order to explain this high recombinational activity some effects associated to topo II poisoning must be called forth. By disrupting the enzyme activity after DNA replication, topo II poisons may lead to unfavorable DNA topology, favoring the occurrence of homologous and non-homologous recombination [Baguley and Ferguson, 1998; Fortune and Osheroff, 2000]. This same genotoxic figure was also observed for three other topo II poisons, analogues of DNR and IDA, tested by our research group [Lehmann et al., *submitted*].

Topoisomerase II catalytic inhibitor

Although ACLA has shown weak or no genotoxic activity in different test systems, it induces a clear positive response in the wing

SMART bioassay. This drug was not mutagenic when administered to *Salmonella typhimurium* and V79 Chinese hamster cells [Westendorf et al., 1984], inducing only chromatid-type aberrations both *in vitro* [Suzuki and Nakane, 1994] and *in vivo* test systems [Nersessian et al., 1991].

Concerning our ACLA data, two different toxic genetic behaviors can be distinguished in comparison to the other two topo II poisons presently studied. First, ACLA was clearly more genotoxic than DNR and IDA but showed lower recombinational activity (Table II). Additionally, regarding the clone size distribution (Figure 3), it induced mainly small single spots (1-2 cells in size), while for DNR and IDA, large clones with 3 to 8 cells in size were preponderantly induced.

In a simplistic view, we could attribute these genetic toxicity differences to ACLA mode of action. It must be emphasized that ACLA is not able to stabilize the DNA-topo II cleavage complex (as the two other anthracyclines studied), since it acts directly on topo II preventing its binding to DNA [Sehested and Jensen, 1996; Fortune and Osheroff, 2000]. Thus, considering the mechanistic basis that could explain the genotoxicity of ACLA, as well as the differences in its results when compared to topo II poisons, some aspects must be discussed.

Actually, topoisomerases have been described as enzymes that generally act in cells to reduce recombination rates [Baguley and Ferguson, 1998; Nitiss, 1998]. This conclusion was taken from studies demonstrating that both *top1* and *top2* gene mutations lead to a hyper-recombination phenotype in yeast cells [Christman et al., 1988]. Additionally, Nitiss et al. [1997] showed that yeast strains lacking topoisomerase I (topo I) were more resistant to the cytotoxic action of ACLA than isogenic strains with wild-type topo I. Subsequently, they demonstrated, via a direct cleavage assay, that incubation of topo I and DNA in the presence of ACLA led to enhanced levels of DNA damage. By means of these data, ACLA was classified as an agent that acts as a catalytic inhibitor of topo II and as a topo I poison.

Moreover, considering that ACLA is also a DNA intercalating agent, we could not discard this activity as a possible mechanism involved in its genotoxicity. However, we must be cautious in this assumption, since

DNA intercalation is not always sufficient to confer genetic toxicity [Snyder and Arnone, 2002; Snyder and Gillies, 2002].

In the light of all these arguments it is possible to attribute the high genotoxicity of ACLA in the SMART assay to its multiple modes of action: (i) acting as a topo I poison, this drug stabilizes the DNA-topo I cleavage complex, leading to the same deleterious consequences as described earlier for topo II poisoning activity; (ii) preventing topo II-DNA binding, ACLA could also favor the occurrence of recombinational events [Baguley and Ferguson, 1998; Ferguson, 1998].

With respect to topo I inhibitors, three previous reports using the wing SMART test have shown that this class of compounds were genotoxic [Frei and Würigler, 1996; Torres et al., 1998; Cunha et al., 2002]. Additionally, Frei and Würigler [1996] compared the genotoxicity of four different topoisomerase inhibitors: three of them were topo II inhibitors, and one, camptothecin (CPT), was a topo I poison. This comparison showed CPT as the compound with the higher genotoxic potential, which could reinforce the notion that ACLA-topo I poisoning activity was related to the data obtained in our approach.

Genotoxicity and chemical structures

In an attempt to correlate the chemical structures of anthracyclines with their genetic toxicity we compared the results obtained in this study with a previous report developed by our research group [Lehmann et al., *submitted*], in which three topo II poisons were analyzed: doxorubicin (DOX), epirubicin (EPI) and pirarubicin (THP). Actually, these three compounds, in conjunction with the drugs studied here, comprise all the anthracyclines currently in clinical use for cancer treatment.

The first aspect to be mentioned refers to the number of DNA damages induced, since we observed a large variation, ranging from ~768 and ~719 for THP (Lehmann et al., *submitted*) and ACLA, respectively, to ~37 *mwh* clones per 10^5 cells per mM for DOX (Lehmann et al., *submitted*). Many assumptions could be made in order to explain these differences, but the main point to be discussed refers to the high genotoxicity of the two compounds composed by two (THP) and three (ACLA) sugar residues instead of one, present in the other analogues

(Figure 1). In fact, several studies have pointed out the importance of the sugar moiety in many aspects of the biological activity of these drugs [Binaschi et al., 1997; Arcamone et al., 1999; Guano et al., 1999; Zunino et al., 2001]. However, not only the number of sugar residues, but also the amino sugar configuration, have been considered to be directly related to cytotoxicity, DNA binding as well as to topoisomerase inhibitory ability of these drugs [Arcamone et al., 1999; Cipollone et al., 2002].

Additionally, it was possible to observe that the addition, removal or substitution of different drug substituents caused more differences in the genetic toxicity of the anthracyclines than a positional modification did. The removal of a methoxy group in IDA compared with DNR, the lack of a hydroxyl group in DNR, as well as the removal of a methoxy and hydroxide groups in IDA in relation to DOX and EPI were more effective in producing genotoxic lesions, than did a single modification in the steric position of the amino sugar hydroxide group in EPI in relation to DOX (Figure 1). In contrast, these substitutions did not alter the recombinagenic action of these drugs, since no significant differences on mitotic recombinational action were observed among the topo II poisons: DOX, EPI, DNR, IDA and THP. Otherwise, we observed that ACLA showed a minor capacity in inducing recombinational events, which could be imputed to multiple chemical alterations in its molecular structure compared to the other topo II inhibitors. Differences related to *in vivo* DNA cleavage sequence selectivity have already been correlated to the chemical structure of anthracyclines [Binaschi et al., 1997, 2000; Capranico et al., 1997].

Conclusions

The data here presented, associated with previous reports [Frei and Würigler, 1996; Torres et al., 1998; Cunha et al., 2002; Lehmann et al., *submitted*] - characterizing the genotoxic activity of topoisomerase inhibitors in the wing *Drosophila* SMART test - not only confirm the ability of this bioassay to assess the genetic toxicity associated to this class of compounds, but also demonstrate its capacity to detect different

genotoxic behaviors related to the mode of action of topoisomerase inhibitors.

All these findings highlight the importance of performing an amply genotoxic evaluation of these group of drugs, considering not only point and chromosomal mutations, but also recombinagenic potentialities. In fact, homologous recombination (HR) has been considered an important event involved in many human diseases, especially cancer [Bishop and Schiestl, 2001], which leads to the assumption that topoisomerase inhibitors could be associated with the occurrence of secondary tumors after cancer chemotherapy [Pedersen-Bjergaard and Philip, 1991; Felix et al., 1995; Ferguson and Pearson, 1996; Harousseau, 1999; Linch et al., 2000; Kadan-Lottick et al., 2002; Pulsoni et al., 2002; Zwaan et al., 2002].

Acknowledgements

We are grateful to Dr. M. Castegnaro of the International Agency for Research on Cancer - IARC, Lyon, France for the sample of Aclarubicin. This study was supported by the following Brazilian Agencies: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) and Fundação e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

References

- Arcamone F, Animati F, Bigioni M, Capranico G, Caserini C, Cipollone A, De Cesare M, Ettore A, Guano F, Manzini S, Monteagudo E, Pratesi G, Salvatore C, Supino R, Zunino F. 1999. Configurational requirements of the sugar moiety for the pharmacological activity of anthracycline disaccharides. *Biochem Pharmacol* 57: 1133-1139.
- Arcamone F, Animati F, Capranico G, Lombardi P, Pratesi G, Manzini S, Supino R, Zunino F. 1997. New developments in antitumour anthracyclines. *Pharmacol Ther* 76: 117-124.
- Arnaudeau C, Miranda ET, Jenssen D, Helleday T. 2000. Inhibition of DNA synthesis is a potent mechanism by which cytostatic drugs induce homologous recombination in mammalian cells. *Mutat Res* 461: 221-228.
- Baguley BC, Ferguson LR. 1998. Mutagenic properties of topoisomerase-targeted drugs. *Biochim Biophys Acta* 1400: 213-222.
- Binaschi M, Capranico G, Dal Bo L, Zunino F. 1997. Relationship between lethal effects and topoisomerase II-mediated double-stranded DNA breaks produced by anthracyclines with different sequence specificity. *Mol Pharmacol* 51: 1053-1059.
- Binaschi M, Farinosi R, Borgnetto ME, Capranico G. 2000. *In vivo* site specificity and human isoenzyme selectivity of two topoisomerase II-poisoning anthracyclines. *Cancer Res* 60: 3770-3776.
- Bishop AJR, Schiestl RH. 2001. Homologous recombination as a mechanism of carcinogenesis. *Biochim Biophys Acta* 1471: M109-M121.
- Blasiak J, Gloc E, Warszawski M. 2002a. A comparison of the *in vitro* genotoxicity of anticancer drugs idarubicin and mitoxantrone. *Acta Biochim Pol* 49: 145-155.
- Blasiak J, Gloc E, Wozniak K, Mlynarski W, Stolarska M, Skórski T, Majsterek I. 2002b. Genotoxicity of idarubicin and its modulation by vitamins C and E and amifostine. *Chem-Biol Interact* 140: 1-18.
- Brumfield JM, Mackay WJ. 2002. Mutagenic activity of idarubicin and epirubicin in the bacterium *Salmonella typhimurium*. *Tex J Sci* 54: 249-260.

- Capranico G, Binaschi M, Borgnetto ME, Zunino F, Palumbo M. 1997. A protein-mediated mechanism for the DNA sequence-specific action of topoisomerase II poisons. *Trends Pharmacol Sci* 18: 323-329.
- Cipollone A, Berettoni M, Bigioni M, Binaschi M, Cermele C, Monteagudo E, Olivieri L, Palomba D, Animati F, Goso C, Maggi CA. 2002. Novel anthracycline oligosaccharides: influence of chemical modifications of the carbohydrate moiety on biological activity. *Bioorgan Med Chem* 10: 1459-1470.
- Clements J, Vogel EW. 1988. Somatic recombination and mutation assays in *Drosophila* - A comparison of the response of two different strains to four mutagens. *Mutat Res* 209: 1-5.
- Christman MF, Dietrich FS, Fink GR. 1988. Mitotic recombination in the rDNA of *S. cerevisiae* is suppressed by the combined action of DNA topoisomerases I and II. *Cell* 55: 413-425.
- Cunha KS, Reguly ML, Graf U, Andrade HHR. 2002. Comparison of camptothecin derivatives presently in clinical trials: genotoxic potency and mitotic recombination. *Mutagenesis* 17: 141-147.
- Felix CA, Hosler MR, Winick NJ, Masterson M, Wilson AE, Lange BJ. 1995. ALL-1 Gene rearrangements in DNA topoisomerase-II inhibitor-related leukemia in children. *Blood* 85: 3250-3256.
- Ferguson LR. 1998. Inhibitors of topoisomerase II enzymes: a unique group of environmental mutagens and carcinogens. *Mutat Res* 400: 271-278.
- Ferguson LR, Pearson AE. 1996. The clinical use of mutagenic anticancer drugs. *Mutat Res* 355: 1-12.
- Fortune JM, Osheroff N. 2000. Topoisomerase II as a target for anticancer drugs: when enzymes stop being nice. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 64: 221-253.
- Frei H, Würigler FE. 1988. Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative or inconclusive result. *Mutat Res* 203: 97-308.
- Frei H, Würigler FE. 1995. Optimal experimental design and sample size for the statistical evaluation of data from somatic mutation and recombination tests (SMART) in *Drosophila*. *Mutat Res* 334: 247-258.

- Frei H, Würgler FE. 1996. Induction of somatic mutation and recombination by four inhibitors of eukaryotic topoisomerases assayed in the wing spot test of *Drosophila melanogaster*. *Mutagenesis* 11: 315-325.
- Frei H, Clements J, Howe D, Würgler FE. 1992. The genotoxicity of the anticancer drug mitoxantrone in somatic and germ-cells of *Drosophila melanogaster*. *Mutat Res* 279: 21-33.
- Gewirtz DA. 1999. A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumour effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. *Biochem Pharmacol* 57: 727-741.
- González-Cid M, Fundia AF, Cuello MT, Larripa I. 2002. Correlation between chromosome damage and apoptosis induced by fludarabine and idarubicin in normal human lymphocytes. *Toxicology* 171: 215-222.
- Graf U, Frei H, Kägi A, Katz AJ, Würgler FE. 1989. Thirty compounds tested in the *Drosophila* wing spot test. *Mutat Res* 222: 359-373.
- Graf U, Würgler FE, Katz AJ, Frei H, Juon H, Hall CB, Kale PG. 1984. Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Mutat Res* 271: 59-67.
- Guano F, Pourquier P, Tinelli S, Binaschi M, Bigioni M, Animatei F, Manzini S, Zunino F, Kohlhagen G, Pommier Y, Capranico G. 1999. Topoisomerase poisoning activity of novel disaccharide anthracyclines. *Mol Pharmacol* 56: 77-84.
- Hande KR. 1998. Clinical applications of anticancer drugs targeted to topoisomerase II. *Biochim Biophys Acta* 1400: 173-184.
- Harousseau JL. 1999. Chemoinduced leukemias (Les leucémies induites par les chimiothérapies anticancéreuses). *Bull Cancer* 86: 929-937.
- Kadan-Lottick NS, Robison LL, Gurney JG, Neglia JP, Yasui Y, Hayashi R, Hudson M, Greenberg M, Mertens AC. 2002. Childhood cancer survivors' knowledge about their past diagnosis and treatment - Childhood cancer survivor study. *JAMA* 287: 1832-1839.
- Kastenbaum MA, Bowman KO. 1970. Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies. *Mutat Res* 9: 527-549.

- Lehmann M, Franco A, Vilar KSP, Reguly ML, Andrade HHR. 2003. Doxorubicin and two of its analogues are preferential inducers of homologous recombinational compared with mutational events in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Mutat Res submitted*.
- Linch DC, Gosden RG, Tulandi T, Tan SL, Hancock SL. 2000. Hodgkin's lymphoma: choice of therapy and late complications. *Hematology* 2000: 205-221.
- Lindsley DL, Zimm GG. 1992. The genome of *Drosophila melanogaster*. San Diego, CA: Academic Press. 1133 p.
- Mackay WJ, Phelps LA, Cauchi AA, Weaver LT. 2000. The mutagenic effects of anthracyclines in the bacterium *Salmonella typhimurium*: induction of transition mutations with daunomycin. *Texas J Sci* 52: 223-229.
- Monneret C. 2001. Recent developments in the field of antitumour anthracyclines. *Eur J Med Chem* 36: 483-493.
- Nebel MC, Larripa I, González-Cid M. 2002. Differential antigenotoxic and cytoprotective effect of amifostine in idarubicin-treated mice. *Environ Mol Mutagen* 39: 3-9.
- Nersessian AK, Zilfian VN, Koumkoumdjian VA. 1991. Inhibitory effect of rat immunization with tularemia vaccine on the *in vivo* clastogenicity of 4 anthracycline antibiotics. *Mutat Res* 260: 215-218.
- Nielsen D, Maare C, Skovsgaard T. 1996. Cellular resistance to anthracyclines. *Gen Pharmac* 27: 251-255.
- Nitiss JL. 1998. Investigating the biological functions of DNA topoisomerases in eukaryotic cells. *Biochim Biophys Acta* 1400: 63-81.
- Nitiss JL, Pourquier P, Pommier Y. 1997. Aclacinomycin A stabilizes topoisomerase I covalent complexes. *Cancer Res* 57: 4564-4569.
- Pedersen-Bjergaard J, Philip P. 1991. Balanced translocations involving chromosome bands 11q23 and 21q22 are highly characteristic of myelodysplasia and leukemia following therapy with cytostatic agents targeting at DNA-topoisomerase II. *Blood* 78: 1147-1148.
- Pulsoni A, Pagano L, Lo Coco F, Avvisati G, Mele L, Di Bona E, Invernizzi R, Leoni F, Marmont F, Mele A, Melillo L, Nosari AM, Pogliani EM, Vignetti M, Visani G, Zagonel V, Leone G, Mandelli F. 2002.

- Clinicobiological features and outcome of acute promyelocytic leukemia occurring as a second tumor: the GIMEMA experience. *Blood* 15: 1972-1976.
- Sehested M, Jensen PB. 1996. Mapping of DNA topoisomerase II poisons (etoposide, clerocidin) and catalytic inhibitors (acliarubicin, ICRF-187) to four distinct steps in the topoisomerase II catalytic cycle. *Biochem Pharmacol* 51: 879-886.
- Snyder RD, Arnone MR. 2002. Putative identification of functional interactions between DNA intercalating agents and topoisomerase II using the V79 in vitro micronucleus assay. *Mutat Res* 503: 21-35.
- Snyder RD, Gillies PJ. 2002. Evaluation of the clastogenic, DNA intercalative, and topoisomerase II-interactive properties of bioflavonoids in Chinese hamster V79 cells. *Environ Mol Mutagen* 40: 266-276.
- Suzuki H, Nakane S. 1994. Differential induction of chromosomal-aberrations by topoisomerase inhibitors in cultured Chinese-hamster cells. *Biol Pharm Bull* 17: 222-226.
- Stopper H, Boos G, Clark M, Gieseler F. 1999. Are topoisomerase II inhibitor-induced micronuclei *in vitro* a predictive marker for the compounds' ability to cause secondary leukemias after treatment? *Toxicol Lett* 104: 103-110.
- Topcu Z. 2001. DNA topoisomerases as targets for anticancer drugs. *J Clin Pharm Ther* 26: 405-416.
- Torres C, Creus A, Marcos R. 1998. Genotoxic activity of four inhibitors of DNA topoisomerases in larval cells of *Drosophila melanogaster* as measured in the wing spot assay. *Mutat Res* 413: 191-203.
- Westendorf J, Marquardt H, Marquardt H. 1984. Structure-activity relationship of anthracycline-induced genotoxicity *in vitro*. *Cancer Res* 44: 5599-5604.
- Wolden SL, Lamborn KR, Cleary SF, Tate DJ, Donaldson SS. 1998. Second cancer following pediatric Hodgkin's disease. *J Clin Oncol* 16: 536-544.
- Zunino F, Pratesi G, Perego P. 2001. Role of the sugar moiety in the pharmacological activity of anthracyclines: development of a novel series of disaccharide analogs. *Biochem Pharmacol* 61: 933-938.

Zwaan CM, Kaspers GJL, Pieters R, Hahlen K, Janka-Schaub GE, van Zantwijk CH, Huismans DR, de Vries E, Rots MG, Peters GJ, Jansen G, Creutzig U, Veerman AJP. 2002. Different drug sensitivity profiles of acute myeloid and lymphoblastic leukemia and normal peripheral blood mononuclear cells in children with and without Down syndrome. *Blood* 99: 245-251.

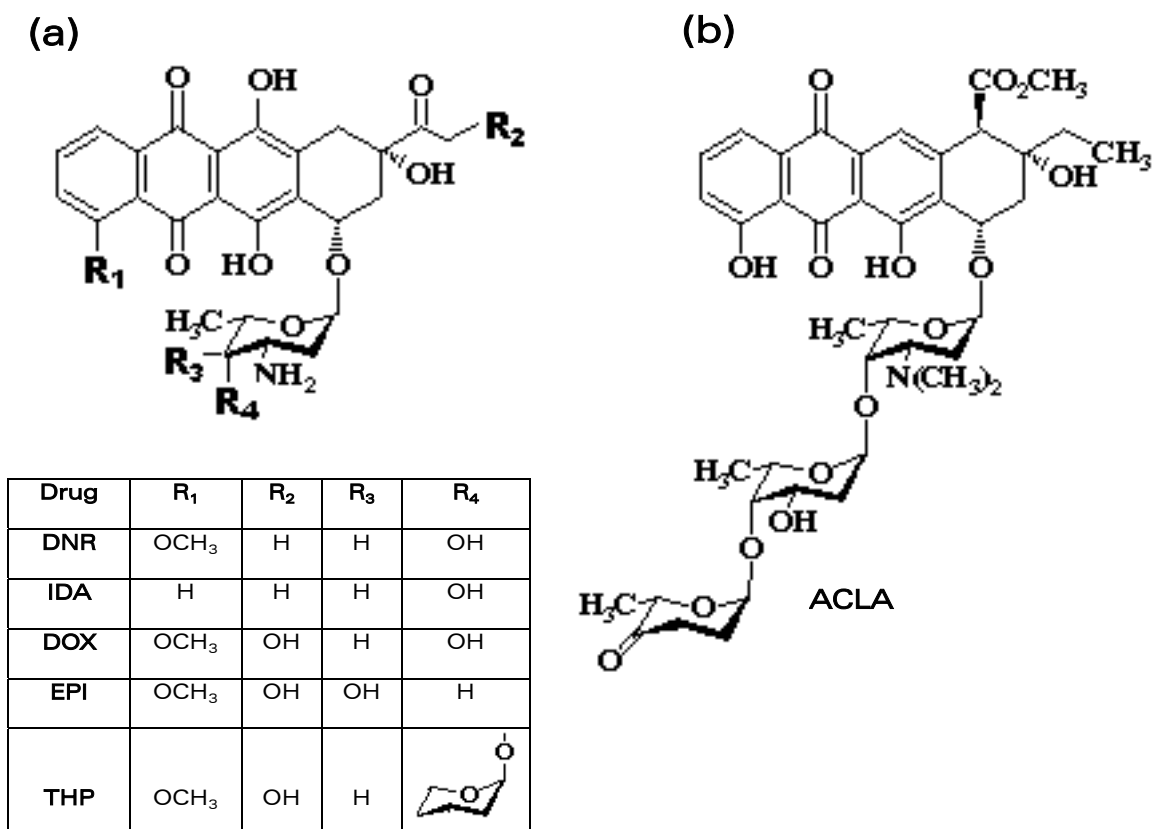


Fig. 1. Chemical structures of anthracyclines: **(a)** daunorubicin (DNR), idarubicin (IDA), doxorubicin (DOX), epirubicin (EPI), pirarubicin (THP) and **(b)** aclarubicin (ACLA).

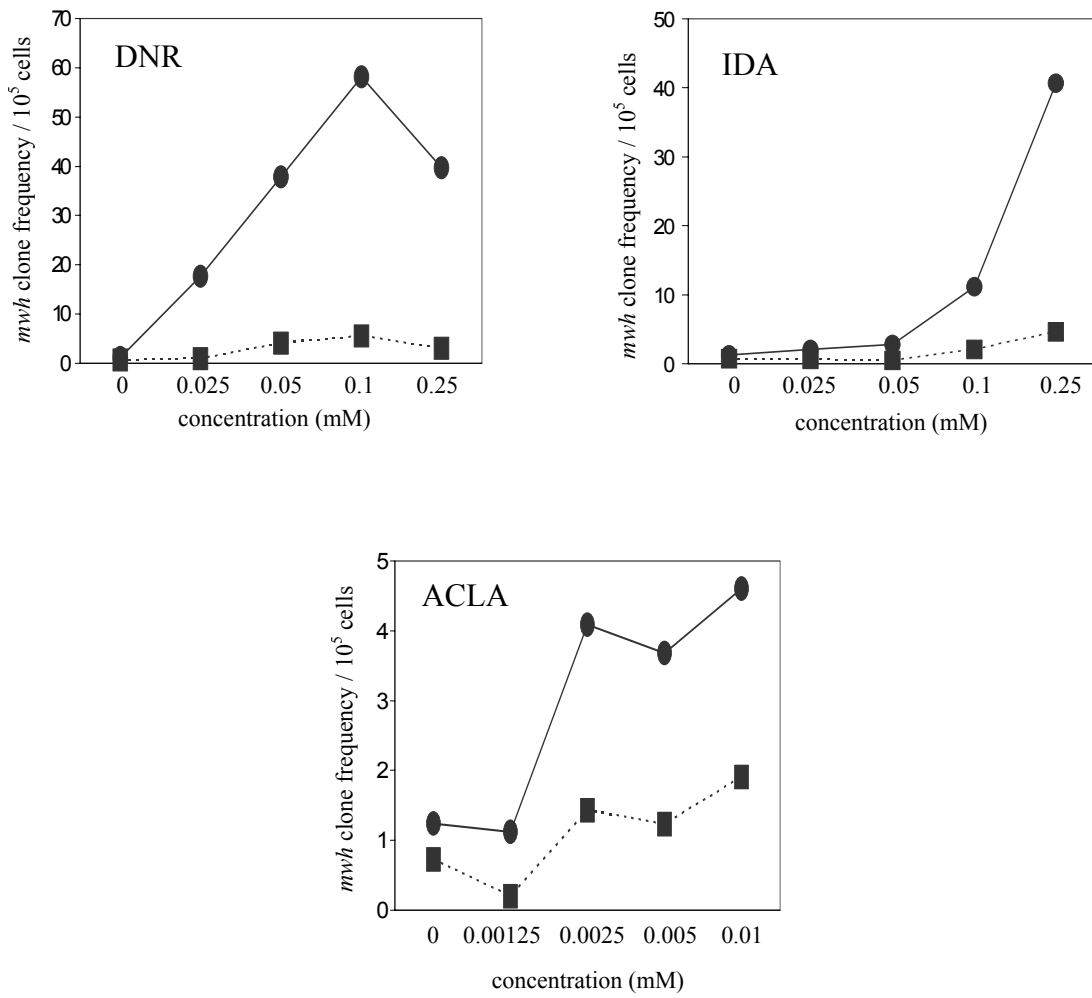


Fig. 2. Dose-response relationships for clone formation frequencies per 10⁵ cells recorded on marker-heterozygous (circles) and balancer-heterozygous (squares) flies after chronic feeding with different concentrations of DNR, IDA and ACLA.

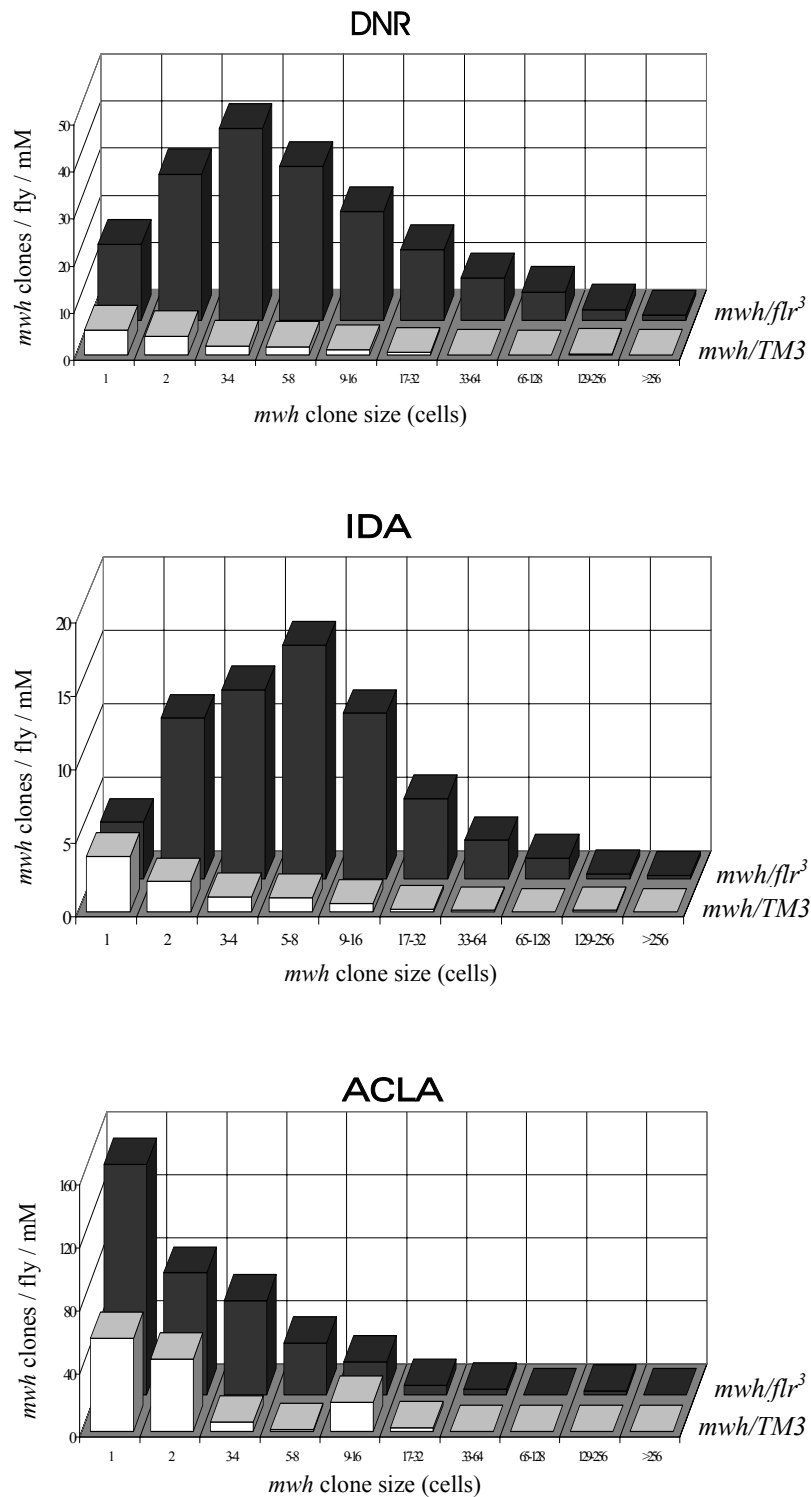


Fig. 3. Clone size distribution and *mwh* clone induction frequencies standardized to mM exposure concentration units in marker- (*mwh/flr*³) and balancer-heterozygous (*mwh/TM3*) flies. Frequencies are control-corrected.

Table I. Fly spot data obtained after exposure of marker and balancer-heterozygous larvae of *D. melanogaster* to DNR, IDA and ACLA.

Controls and compounds	Conc. (mM)	No. of Flies (N)	Spots per fly (no. of spots) statistical diagnosis ^a				Total spots <i>m</i> = 2	Total <i>mwh</i> clones ^c (n)
			Small single spots (1-2 cells) ^b <i>m</i> = 2	Large single spots (> 2 cells) ^b <i>m</i> = 5	Twin spots <i>m</i> = 5	Total spots		
Water (historical and pooled controls)								
<i>mwh / flr³</i>		385	0.50 (194)	0.06 (23)	0.04 (16)	0.61 (233)	233	
<i>mwh / TM3</i>		378	0.32 (122)	0.03 (11)	^d	0.35 (133)	133	
DNR								
<i>mwh / flr³</i>	0	20	0.60 (12)	0.00 (00)	0.00 (00)	0.60 (12)	12	
	0.025	20	3.50 (70) ^f	4.00 (80) ^f	2.15 (43) ^f	9.65 (193) ^f	184	
	0.05	20	6.25 (125) ^f	8.90 (178) ^f	5.15 (103) ^f	20.30 (406) ^f	381	
	0.1	20	7.15 (143) ^f	15.75 (315) ^f	8.20 (164) ^f	31.10 (622) ^f	580	
	0.25	20	4.40 (88) ^f	14.75 (295) ^f	2.45 (49) ^f	21.60 (432) ^f	399	
<i>mwh / TM3</i>	0	20	0.30 (06)	0.05 (01) ^d		0.35 (07)	07	
	0.025	20	0.60 (12) ⁱ	0.20 (04) ⁱ		0.80 (16) ⁺	16	
	0.05	20	1.85 (37) ^f	0.50 (10) ^f		2.35 (47) ^f	47	
	0.1	20	1.85 (37) ^f	1.20 (24) ^f		3.05 (61) ^f	61	
	0.25	20	0.95 (19) ^f	0.85 (17) ^f		1.80 (36) ^f	36	
IDA								
<i>mwh / flr³</i>	0	20	0.80 (16)	0.05 (01)	0.05 (01)	0.90 (18)	18	
	0.025	20	0.85 (17) ⁱ	0.55 (11) ^f	0.25 (05) ⁱ	1.65 (33) ^e	32	
	0.05	20	1.10 (22) ⁱ	0.60 (12) ^e	0.40 (08) ^f	2.10 (42) ^f	39	
	0.1	20	2.00 (40) ^f	2.35 (47) ^f	1.90 (38) ^f	6.25 (125) ^f	121	
	0.25	20	4.40 (88) ^f	10.95 (219) ^f	5.80 (116) ^f	21.15 (423) ^f	409	
<i>mwh / TM3</i>	0	20	0.65 (13)	0.00 (00) ^d		0.65 (13)	13	
	0.025	20	0.60 (12) ⁻	0.05 (01) ⁱ		0.65 (13) ⁱ	13	
	0.05	20	0.60 (12) ⁻	0.00 (00) ⁱ		0.60 (12) ⁻	12	
	0.1	20	0.90 (18) ⁱ	0.45 (09) ^f		1.35 (27) ^e	27	
	0.25	20	1.65 (33) ^f	0.95 (19) ^f		2.60 (52) ^f	52	

ACLA

<i>mwh</i> / <i>flr</i> ³	0	30	0.43 (13)	0.13 (04)	0.07 (02)	0.63 (19)	19
	0.00125	20	0.95 (19) + ^e	0.05 (01) i	0.20 (04) i	1.20 (24) + ^e	23
	0.0025	20	1.75 (35) + ^e	0.65 (13) + ^e	0.25 (05) i	2.65 (53) + ^f	52
	0.005	20	1.55 (31) + ^f	0.55 (11) + ^e	0.30 (06) + ^e	2.40 (48) + ^f	48
	0.01	20	2.05 (41) + ^f	0.45 (09) +	0.40 (08) + ^e	2.90 (58) + ^f	57
<i>mwh</i> / <i>TM3</i>	0	30	0.30 (09)	0.03 (01)	^d	0.33 (10)	10
	0.00125	20	0.45 (09) i	0.00 (00) i		0.45 (09) i	09
	0.0025	20	0.95 (19) +	0.10 (02) i		1.05 (21) + ^e	21
	0.005	20	0.80 (16) + ^e	0.15 (03) i		0.95 (19) + ^e	19
	0.01	15	0.93 (14) + ^e	0.47 (07) + ^f		1.40 (21) + ^f	21

^aStatistical diagnoses according to Frei and Würgler [1988]: +, positive; -, negative; i, inconclusive; *m*, multiplication factor for the assessment of significantly negative results. Significance levels $\alpha = \beta = 0.05$; ^bIncluding rare *flr*³ spots; ^cConsidering *mwh* clones from *mwh* single spots and from twin spots. ^dOnly *mwh* single spots can be observed in *mwh/TM3* heterozygotes as the balancer chromosome *TM3* does not carry the *flr*³ mutation. ^e, ^fPositive diagnosis confirmed by the *U*-test: ^e $P \leq 0.05$, ^f $P \leq 0.01$.

Table II. Standardized *mwh* clone induction frequencies per millimolar unit of exposure concentration and the prevalence of recombinational events^a

Compounds	<i>mwh/flr³</i> marker trans-heterozygotes				<i>mwh/TM3</i> balancer heterozygotes				Recombination (%)
	Standardized frequency ^b (<i>mwh</i> clones per 10 ⁵ cells per mM) (<i>f_t</i>)	Mean clone size class (<i>i_t</i>)	Geometric mean of clone size ^c (2 ^{<i>i_t</i>-1})	Standardized frequency per 10 ⁵ cells, corrected for clone size ^d (<i>f_t'</i> = 2 ^{<i>i_t</i>-2} x <i>f_t</i>)	Standardized frequency ^b (<i>mwh</i> clones per 10 ⁵ cells per mM) (<i>f_h</i>)	Mean clone size class (<i>i_h</i>)	Geometric mean of clone size ^c (2 ^{<i>i_h</i>-1})	Standardized frequency per 10 ⁵ cells, corrected for clone size ^d (<i>f_h'</i> = 2 ^{<i>i_h</i>-2} x <i>f_h</i>)	
DNR	360.56	3.83	7.12	1283.45	31.79	2.65	3.14	49.85	91.18
IDA	133.22	3.88	7.39	491.98	18.29	2.36	2.57	23.53	86.27
ACLA	719.04	2.30	2.46	885.45	274.98	2.11	2.15	296.26	61.76

^aAll values are control-corrected. Frequencies in *mwh/flr³* marker-heterozygotes are calculated with and without clone size correction; accordingly, somewhat different estimates are obtained for the relative contributions of recombination to the totals of clone induction; ^bClone frequencies per fly divided by the number of cells examined per fly (48 800) estimate frequencies per cell and per cell division in chronic exposure experiments [Frei and Würgler, 1988]; ^cGeometric mean and ^dCorrections calculated according to Frei et al. [1992].

Capítulo IV

Discussão Geral

O aumento na taxa de sobrevivência dos pacientes submetidos aos mais diversos tipos de tratamento do câncer tem revelado um aspecto adverso da terapêutica desta doença: a indução de tumores malignos secundários – que, na maioria das vezes, apresentam um índice de cura menor em comparação ao tumor primário (Rheingold *et al.*, 2000). Dentre o arsenal de quimioterápicos disponíveis, as antraciclinas destacam-se como potenciais indutoras de tumores secundários, especialmente de leucemias associadas à presença de translocações e deleções - cuja origem vem sendo atribuída à recombinação mitótica induzida por esta família de compostos (Bishop e Schielst, 2001).

Diante da importância da recombinação mitótica no processo de transformação neoplásica provocado pelo tratamento quimioterápico, procurou-se não apenas avaliar a atividade genotóxica de seis antraciclinas em uso clínico, mas também estabelecer uma correlação entre mecanismos de ação e estrutura química - associando-os a parâmetros como potência tóxico-genética e tipo de lesão induzida no DNA de células somáticas de *Drosophila melanogaster*.

4.1. Genotoxicidade das antraciclinas

A análise individualizada das seis drogas estudadas revelou que todas induziram aumentos significativos no número de danos genéticos, principalmente quando se considera o número total de manchas observado no genótipo trans-heterozigoto. Por outro lado, os resultados obtidos através da análise do genótipo heterozigoto para o cromossomo *TM3*, revelaram uma incidência de lesões inferior àquela encontrada nas moscas trans-heterozigotas (*mwh/flr³*). Esta baixa indução, associada à alta incidência de manchas gêmeas nos indivíduos trans-heterozigotos – que são originadas exclusivamente por recombinação somática – é o primeiro indicativo da alta atividade recombinacional das antraciclinas em estudo.

Quando os dados observados para as diferentes concentrações utilizadas foram padronizados por unidade de exposição (mM) – de acordo com a metodologia descrita por Frei e Würigler (1996) – foram obtidos valores que refletem a potência genotóxica das antraciclinas,

expressos como número de manchas *mwh* induzidas em 10^5 células por 1 mM de droga (Tabela 2, pág 73). Estes resultados refletem a potência genotóxica destes compostos, ao mesmo tempo em que permitem diferenciar a contribuição da recombinação mitótica e dos eventos mutagênicos para a toxicidade genética das drogas – quando se comparam as respostas de ambos os genótipos analisados. De posse destas informações, é possível diagnosticar uma ampla variação de potência genotóxica entre os análogos. Por outro lado, verifica-se uma relativa homogeneidade no que se refere aos índices de recombinação induzidos pelas drogas DOX, EPI, IDA, DNR e THP - com uma variação compreendida dentro da faixa de ~86 a 100%. Isto significa dizer que a recombinação mitótica contribui de forma preponderante para o espectro genotóxico de cada composto – sendo o evento responsável pelo maior número de danos. Deve-se ressaltar que tais valores de padronização são uma aproximação e, portanto, não refletem a real indução de dano genético – já que a caracterização da EPI como um agente capaz de induzir 100% de recombinação, não significa que este composto não seja capaz de gerar lesões mutacionais. De fato, os resultados referentes ao genótipo *mwh/TM3* evidenciam que a EPI se comporta como um agente mutagênico – já que foi observado um resultado estatisticamente significativo para o total de manchas, na concentração de 0,25 mM.

Ao se comparar os resultados obtidos para os venenos de topo II, representados pela DOX, EPI, IDA, DNR e THP, fica evidente que a THP é a antraciclina com maior potência genotóxica, - induzindo, aproximadamente, 768 clones *mwh*/ 10^5 células/mM. Quando este valor é confrontado com o obtido para a DOX – o análogo menos potente - observa-se que a THP é cerca de 21 vezes mais genotóxica. Este achado não se restringe apenas à resposta do teste SMART em *D. melanogaster*, mas também aos dados obtidos através do teste de Ames em *Salmonella typhimurium* – já que a DOX foi diagnosticada como a droga com menor atividade mutagênica em relação a EPI, DNR e IDA (Brumfield e Mackay, 2002).

Tabela 2. Potência genotóxica das antraciclinas e porcentagem de indução de recombinação *versus* mutação gênica e cromossômica.

Drogas	Potência genotóxica padronizada ^a (clones <i>mwh</i> /10 ⁵ células/mM)	Recombinação (%)	Mutação gênica e cromossômica (%)
DOX	37,04	95,54	4,46
EPI	57,77	100	-
IDA	133,22	86,27	13,73
DNR	360,56	91,18	8,82
ACLA	719,04	61,76	38,24
THP	767,91	90,55	9,45

^aAs freqüências de clones por célula e por divisão celular são estimadas através da divisão das freqüências de manchas por mosca pelo número de células examinadas por mosca (48.800) (Frei e Würigler, 1988).

Com relação aos dados da literatura, no que se refere à ação tóxico-genética das antraciclinas, observa-se que estas drogas induzem diferentes tipos de danos genéticos, como mutações cromossômicas e TCIs, em diferentes bioensaios, tanto *in vivo* quanto *in vitro* (Au e Hsu, 1980; Bhuyan *et al.*, 1983; Nersessian *et al.*, 1991; Motimaya *et al.*, 1994; Jeremic *et al.*, 1996; Mazue *et al.*, 1996; Jagetia *et al.*, 1998; Villani *et al.*, 1998, 2001; Stopper *et al.*, 1999; El-Mahdy Sayed Othman, 2000; Jagetia e Nayak, 2000; Blasiak *et al.*, 2002a,b; González-Cid *et al.*, 2002; Nebel *et al.*, 2002; Snyder e Gillies, 2002). Entretanto, no que se refere à THP, não foram encontradas referências bibliográficas quanto à sua ação genotóxica. Considerando que estes dados mostram alta heterogeneidade no que se refere à dose, organismo experimental ou célula alvo utilizada, torna-se inviável qualquer tipo de comparação entre estes análogos, visando estimar suas potências genotóxicas.

Um outro aspecto importante, relacionado à atividade terapêutica destas drogas, refere-se aos mecanismos que envolvem tanto a cinética como a dinâmica farmacológica. Estas abordagens, centradas na triagem clínica de novos agentes antineoplásicos, visam caracterizar não apenas

a distribuição destas drogas nos diferentes alvos celulares, como também a sua eliminação - fornecendo dados concretos quanto às concentrações observadas nos fluidos biológicos e à dose máxima tolerada, objetivando diminuir os efeitos colaterais (Danesi *et al.*, 2002). Na tentativa de associar os dados da bibliografia, referentes à cinética e dinâmica farmacológicas, com os do presente estudo, destaca-se o trabalho de Sugiyama *et al.* (1999). Estes autores apontam para maiores índices de concentração citoplasmática e nuclear da THP em relação ao análogo DOX - o que explicaria a maior citotoxicidade da THP, evidenciada em cultura de células de sarcoma ovariano de camundongos (M5076). Esta maior concentração nuclear pode ser apontada como uma das causas da alta taxa de indução de danos genéticos observadas para a THP em relação à DOX - quando o teste SMART foi empregado.

Outro fator que deve ser considerado refere-se à predominante atividade recombinacional dos venenos de topo II, apontada na presente investigação. De fato, esta alta indução de eventos ligados à recombinação mitótica pode ser diretamente correlacionada ao mecanismo de ação deste grupo de compostos. Ao estabilizar o complexo clivado DNA-topo II, as antraciclinas fixam as quebras duplas de DNA induzidas por esta enzima, favorecendo a ocorrência de eventos, direta ou indiretamente, associados à recombinação mitótica (Baguley e Ferguson, 1998). Assim, seja através do mecanismo de reparo recombinacional ou da inibição dos processos de replicação, a recombinação é o mecanismo preponderante na gênese dos danos genéticos induzidos por estas drogas em células somáticas de *D. melanogaster*.

Com relação aos dados obtidos para a ACLA - a única droga deste grupo a exercer inibição catalítica sobre a topo II -, observa-se uma alta potência genotóxica, que envolve ~38% de mutações e ~62% de recombinação - ao contrário dos demais análogos, que exercem a sua toxicidade genética às expensas de 86 a 100% de recombinação mitótica. Além disso, deve-se ressaltar a diferença observada com relação ao tamanho das manchas mutantes induzidas por esta droga quando comparada aos venenos de topo II. A ACLA gerou clones de células mutantes contendo, preferencialmente, 1 a 2 células. Este

comportamento pode ser atribuído à estabilidade da droga, já que compostos quimicamente estáveis atuam durante todo o processo embriogênico. Como as manchas pequenas formam-se nos últimos ciclos de divisão mitótica das células do disco imaginal da asa, quando o número de células alvo está atingindo o seu valor máximo, justifica-se que drogas quimicamente estáveis sejam indutoras de uma maior frequência de manchas contendo uma ou duas células mutantes. Outro ponto que deve ser considerado relaciona-se ao comportamento de drogas que induzem perda de cromossomos e/ou grandes deleções. No teste SMART, tais agentes caracterizam-se por induzir preferencialmente clones pequenos, em função da reduzida taxa de divisão mitótica presente nas células que sofreram aneugênese e/ou clastogênese (Graf *et al.*, 1984; Frei e Würzler, 1996). Apesar da ausência de informações relativas à ação da ACLA como indutora de mutações cromossômicas, parece provável que a estabilidade química seja a responsável pela maior incidência de manchas pequenas - visto que esta droga também foi capaz de aumentar, de forma significativa, o número de manchas grandes, o que descarta a sua possível atividade aneugênica.

Considerando que a ACLA exerce sua atividade inibitória sobre a enzima topo II através do bloqueio do acesso desta enzima ao DNA, a sua alta potência genotóxica não poderia ser atribuída à indução de quebras duplas no DNA - uma vez que tais quebras são geradas pela estabilização do complexo clivado DNA-topo II. Entretanto, deve-se ressaltar que, no momento em que a topo II não exerce as suas funções de relaxamento da supertorção do DNA, são originadas instabilidades genômicas, que levam à ocorrência de quebras duplas no material genético (Baguley e Ferguson, 1998).

Outro ponto relevante se relaciona à recente demonstração de que a ACLA atua não apenas sobre a enzima topo II, mas também sobre a topo I. Nitiss *et al.* (1997) demonstraram que linhagens de levedura deficientes na enzima topo I são mais resistentes ao tratamento com esta droga do que cepas isogênicas, que expressam atividades normais desta enzima. Adicionalmente, estes autores verificaram que a incubação de DNA e topo I, na presença da ACLA, levou ao aumento nos níveis de clivagem do DNA. Conseqüentemente, a ACLA é capaz de inibir

cataliticamente a enzima topo II, ao mesmo tempo em que atua como veneno de topo I. Estes dois mecanismos de inibição, somados à capacidade intercalante deste composto no DNA, explicam a sua atividade genotóxica.

Estudos recentes desenvolvidos em nosso laboratório, apontam para a alta toxicidade genética de inibidores de topo I no teste SMART. De fato, ao estudar a camptotecina (CPT) e dois de seus derivados - topotecano (TPT) e irinotecano (CPT-11) - Cunha *et al.* (2002) encontraram valores de indução de danos extremamente elevados, principalmente no que se refere ao TPT. Da mesma forma, Frei e Würigler (1996) verificaram que a CPT foi o composto mais genotóxico quando comparado a três diferentes venenos de topo II. Entretanto, quando os dados referentes à recombinação de todas estas drogas são analisados, verifica-se que a ACLA é o inibidor de topoisomerase que apresenta o menor índice de indução deste evento genético. Enquanto as drogas CPT, TPT e CPT-11 induziram, respectivamente, ~94, ~83 e ~78% de eventos recombinogênicos, a contribuição da recombinação para a genotoxicidade total da ACLA foi de ~62%. Valores de ação recombinogênica semelhantes aos observados por Cunha *et al.* (2002) para bloqueadores de topo I, também foram encontrados para os demais inibidores de topo II avaliados no presente estudo.

4.2. Estrutura química e toxicidade genética

Apesar de apresentarem uma estrutura química bastante semelhante, principalmente no que se refere aos venenos de topo II (Figura 3), as antraciclina mostraram uma grande variação de resposta genotóxica - que pode ser associada a determinados grupos substituintes. Os análogos DOX, DNR, EPI e IDA evidenciaram uma grande variação no número de clones *mwh*, induzidos por 1 mM de droga em 10^5 células - distribuindo-se dentro de valores incluídos na faixa de 37,04 a 360,56. Na verdade, este comportamento pode ser associado a modificações na estrutura destas drogas, incluindo: (i) a alteração espacial dos grupos substituintes OH e H na EPI, quando comparada à DOX, causando uma pequena variação na potência

genotóxica destes dois análogos – expressa por um aumento de 1,6 vezes na ação tóxico-genética da EPI; (ii) a remoção de um grupo metóxi na IDA em relação à DNR, provocando uma diminuição de 2,7 vezes na potência genotóxica da IDA; e (iii) a ausência dos grupos metóxi e hidroxila na IDA, quando comparada à DOX e EPI, assim como a falta de um grupo hidroxila na DNR em relação à DOX, levando ao aumento de, respectivamente, 3,5, 2,3 e 9,7 vezes na indução de danos genéticos – sendo esta última modificação a responsável pela maior variação encontrada.

Outro aspecto a ser considerado refere-se à THP, que, em comparação à DOX, é 21 vezes mais genotóxica. Este incremento se deve à adição de um segundo anel sacarídico no amino-açúcar deste composto. Ao associar esta informação às modificações estruturais na ACLA, pode-se inferir que a adição de anéis sacarídicos no amino-açúcar foi a responsável pela grande incidência de danos genéticos induzidos pelas antraciclinas estudadas – apesar de a ACLA apresentar outras modificações, restritas ao cromóforo. A importância do amino-açúcar, em muitos aspectos da atividade biológica destas drogas, já foi previamente enfatizada por diferentes pesquisadores (Binaschi *et al.*, 1997; Arcamone *et al.*, 1999; Guano *et al.*, 1999; Zunino *et al.*, 2001). A avaliação de vários análogos, mono, bi e trissacarídicos, pertencentes à família das antraciclinas – no que tange à ação citotóxica e inibitória sobre a topo II, assim como à capacidade de ligação ao DNA – evidenciou que não apenas o número de anéis sacarídicos, mas também modificações específicas dentro do amino-açúcar podem conduzir a diferenças no comportamento biológico destes compostos (Arcamone *et al.*, 1999; Cipollone *et al.*, 2002). Ao mesmo tempo, foi observado que tal atividade requer que o amino-açúcar se posicione de forma precisa, ocupando a interface formada entre o DNA e a enzima topo II (Zunino *et al.*, 2001).

Cabe ainda ressaltar que as modificações estruturais presentes nos análogos DOX, DNR, EPI, IDA e THP não alteraram a sua ação recombinogênica. No entanto, no que se refere à ACLA, observaram-se decréscimos significativos na indução de recombinação mitótica – que podem ser atribuídos às múltiplas substituições presentes, tanto no grupamento amino-açúcar quanto no cromóforo.

A avaliação do risco tóxico-genético imposto por esta família de drogas - incluindo-se a detecção de mutações gênicas e cromossômicas, com ênfase principal na recombinação entre cromossomos homólogos - ressalta a importância de serem avaliados simultaneamente os diferentes tipos de danos que contribuem para a genotoxicidade das antraciclinas em uso clínico. Este diagnóstico, associado à comparação paralela entre potência genotóxica e alterações nas estruturas químicas, fornece subsídios para a escolha de análogos efetivos no combate ao câncer, porém com menor risco para os pacientes. Ao mesmo tempo, qualifica o teste SMART como uma ferramenta para a análise de novas antraciclinas, que tenham sido qualificadas como eficientes quimioterápicos, buscando drogas com menor espectro genotóxico.

Capítulo V

Bibliografia Geral

- ANDRIVON, W., F.CALLAIS, J.NAFZIGER, C.MONNERET & J.J.GUILLOSSON, 1995. A new anthracycline with potent antileukemic activity exhibits reduced mutagenicity. *Mutat. Res.* 344:135-140.
- ARCAMONE, F.M., 1998. From the pigments of the actinomycetes to third generation antitumour anthracyclines. *Biochemie* 80 :201-206.
- ARCAMONE, F., F.ANIMATI, M.BIGIONI, G.CAPRANICO, C.CASERINI, A.CIPOLLONE, M.DE CESARE, A.ETTORRE, F.GUANO, S.MANZINI, E.MONTEAGUDO, G.PRATESI, C.SALVATORE, R.SUPINO & F.ZUNINO, 1999. Configurational requirements of the sugar moiety for the pharmacological activity of anthracycline disaccharides. *Biochem. Pharmacol.* 57:1133-1139.
- ARCAMONE, F., F.ANIMATI, G.CAPRANICO, P.LOMBARDI, G.PRATESI, S.MANZINI, R.SUPINO & F.ZUNINO, 1997. New developments in antitumour anthracyclines. *Pharmacol. Ther.* 76 :117-124.
- ARNAUDEAU, C., E.T.MIRANDA, D.JENSSEN & T.HELLEDAY, 2000. Inhibition of DNA synthesis is a potent mechanism by which cytostatic drugs induce homologous recombination in mammalian cells. *Mutat. Res.* 461:221-228.
- AU, W., M.A.BUTLER, T.S.MATNEY & T.L.LOO, 1981. Comparative structure-genotoxicity study of three aminoanthraquinone drugs and daunorubicin. *Cancer Res.* 41:376-379.
- AU, W.W. & T.C.HSU, 1980. The genotoxic effects of adriamycin in somatic and germinal cells of the mouse. *Mutat. Res.* 79:351-361.
- BAGULEY, B.C. & L.R.FERGUSON, 1998. Mutagenic properties of topoisomerase-targeted drugs. *Biochim. Biophys. Acta.* 1400:213-222.
- BERGER, J.M., 1998. Structure of DNA topoisomerases. *Biochim. Biophys. Acta.* 1400:3-18.
- BHUYAN, B.K., D.M.ZIMMER, J.H.MAZUREK, R.J.TRZOS, P.R.HARBACH, V.S.SHU & M.A.JOHNSON, 1983. Comparative genotoxicity of adriamycin and menogarol, two anthracycline antitumour agents. *Cancer Res.* 43:5293-5297.
- BINASCHI, M., G.CAPRANICO, L.DAL BO & F.ZUNINO, 1997. Relationship between lethal effects and topoisomerase II-mediated

- double-stranded DNA breaks produced by anthracyclines with different sequence specificity. *Mol. Pharmacol.* 51:1053-1059.
- BISHOP, A.J.R. & R.H.SCHIELSTL, 2001. Homologous recombination as a mechanism of carcinogenesis. *Biochim. Biophys. Acta.* 1471:M109-M121.
- BLASIAK, J., E.GLOC & M.WARSZAWSKI, 2002a. A comparison of the in vitro genotoxicity of anticancer drugs idarubicin and mitoxantrone. *Acta Biochim. Pol.* 49:145-155.
- BLASIAK, J., E.GLOC, K.WOZNIAK, W.MLYNARSKI, M.STOLARSKA, T.SKÓRSKI & I.MAJSTEREK, 2002b. Genotoxicity of idarubicin and its modulation by vitamins C and E and amifostine. *Chem-Biol. Interact.* 140:1-18.
- BRUMFIELD, J.M. & W.J.MACKAY, 2002. Mutagenic activity of idarubicin and epirubicin in the bacterium *Salmonella typhimurium*. *Tex. J. Sci.* 54:249-260.
- CAPRANICO, G., M.BINASCHI, M.E.BORGNETTO, F.ZUNINO & M.PALUMBO, 1997. A protein-mediated mechanism for the DNA sequence-specific action of topoisomerase II poisons. *Trends Pharmacol.Sci.* 18:323-329.
- CIPOLLONE, A., M.BERETTONI, M.BIGIONI, M.BINASCHI, C.CERMELE, E.MONTEAGUDO, L.OLIVIERI, D.PALOMBA, F.ANIMATI, C.GOSO & C.A.MAGGI, 2002. Novel anthracycline oligosaccharides: influence of chemical modifications of the carbohydrate moiety on biological activity. *Bioorgan. Med. Chem.* 10:1459-1470.
- CLEMENTS, J. & E.W.VOGEL, 1988. Somatic recombination and mutation assays in *Drosophila* - A comparison of the response of two different strains to four mutagens. *Mutat. Res.* 209:1-5.
- CLEMENTS, J., D.HOWE, M.PHILLIPS & N.K.TODD, 1988. The *Drosophila* wing test - A comparison of the sensitivity of different strains. *Mutat. Res.* 203:117-123.
- CUNHA, K.S., M.L.REGULY, U.GRAF & H.H.R.ANDRADE, 2002. Comparison of camptothecin derivatives presently in clinical trials: genotoxic potency and mitotic recombination. *Mutagenesis* 17:141-147.

- DANESI, R., S.FOGLI, A.GENNARI, P.CONTE & M. DEL TACCA, 2002. Pharmacokinetic-pharmacodynamic relationships of the anthracycline anticancer drugs. *Clin. Pharmacokinet.* 41:431-444.
- DICKINS, M., K.WRIGHT, M.PHILLIPS & N.TODD, 1985. Toxicity and mutagenicity tests of 4 anti-cancer drugs in cultured Chinese-hamster cells. *Mutat. Res.* 143:149-154.
- EL-MAHDY SAYED OTHMAN, O., 2000. Cytogenetic effect of the anticancer drug epirubicin on Chinese hamster cell line in vitro. *Mutat. Res.* 468:109-115.
- FELIX, C.A., M.R.HOSLER, N.J.WINICK, M.MASTERSON, A.E.WILSON & B.J.LANGE, 1995. ALL-1 Gene rearrangements in DNA topoisomerase-II inhibitor-related leukemia in children. *Blood* 85:3250-3256.
- FERGUSON, L.R., 1998. Inhibitors of topoisomerase II enzymes: a unique group of environmental mutagens and carcinogens. *Mutat. Res.* 400:271-278.
- FERGUSON, L.R. & A.E.PEARSON, 1996. The clinical use of mutagenic anticancer drugs. *Mutat. Res.* 355:1-12.
- FORTUNE, J.M. & N.OSHEROFF, 2000. Topoisomerase II as a target for anticancer drugs: when enzymes stop being nice. *Prog. Nucleic Acid. Res. Mol. Biol.* 64:221-253.
- FREI, H. & F.E.WÜRGLER, 1988. Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative or inconclusive result. *Mutat. Res.* 203:97-308.
- FREI, H. & F.E.WÜRGLER, 1996. Induction of somatic mutation and recombination by four inhibitors of eukaryotic topoisomerases assayed in the wing spot test of *Drosophila melanogaster*. *Mutagenesis* 11:315-325.
- FREI, H., F.E.WÜRGLER, H.JUON, C.B.HALL & U.GRAF, 1985. Aristolochic acid is mutagenic and recombinogenic in *Drosophila* genotoxicity tests. *Arch. Toxicol.* 56:158-166.
- GASIOROWSKI, K., K.SZYBA, B.BROKOS & A.KOZUBEK, 1996. Antimutagenic activity of alkylresorcinols from cereal grains. *Mutat. Res.* 106:109-116.

- GENTILE, J.M., S.RAHIMI, J.ZWIESLER, G.J.GENTILE & L.R.FERGUSON, 1998. Effect of selected antimutagens on the genotoxicity of antitumour agents. *Mutat. Res.* 402:289-298.
- GONZÁLEZ-CID, M., A.F.FUNDIA, M.T.CUELLO & I.LARRIPA, 2002. Correlation between chromosome damage and apoptosis induced by fludarabine and idarubicin in normal human lymphocytes. *Toxicology* 171:215-222.
- GRAF, U., 1995. Analysis of the relationship between age of larvae at mutagen treatment and frequency and size of spots in the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Experientia* 51:168-173.
- GRAF, U., H.FREI, A.KÄGI, A.J.KATZ & F.E.WÜRGLER, 1989. Thirty compounds tested in the *Drosophila* wing spot test. *Mutat. Res.* 222:359-373.
- GRAF, U., F.E.WÜRGLER, A.J.KATZ, H.FREI, H.JUON, C.B.HALL & P.G.KALE, 1984. Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.* 271:59-67.
- GUANO, F., P.POURQUIER, S.TINELLI, M.BINASCHI, M.BIGIONI, F.ANIMATI, S.MANZINI, F.ZUNINO, G.KOHLHAGEN, Y.POMMIER & G.CAPRANICO, 1999. Topoisomerase poisoning activity of novel disaccharide anthracyclines. *Mol. Pharmacol.* 56:77-84.
- HANDE, K.R., 1998. Clinical applications of anticancer drugs targeted to topoisomerase II. *Biochim. Biophys. Acta* 1400:173-184.
- HAROUSSEAU, J.L., 1999. Chemoinduced leukemias (Les leucémies induites par les chimiothérapies anticancéreuses). *Bull. Cancer* 86:929-937.
- HERNÁNDEZ-CERUELOS, A., E.MADRIGAL-BUJAJIDAR & C.DE LA CRUZ, 2002. Inhibitory effect of chamomile essential oil on the sister chromatid exchanges induced by daunorubicin and methylmethanesulfonate in mouse bone marrow. *Toxicol. Lett.* 135:103-110.
- INCA, 2002. <http://www.inca.org.br/cancer/epidemiologia/estimativa2002>.
- JACKSON, S.P., 2002. Sensing and repairing DNA double-strand breaks. *Carcinogenesis* 23:687-696.
- JAGETIA, G.C. & V.NAYAK, 2000. Effect of doxorubicin on cell survival

- and micronuclei formation in HeLa cells exposed to different doses of gamma-radiation. *Strahlenther. Onkol.* 176:422-428.
- JAGETIA, G.C., V.NAYAK & M.S.VIDYASAGAR, 1998. Evaluation of the antineoplastic activity of guduchi (*Tinospora cordifolia*) in cultured HeLa cells. *Cancer Lett.* 127:71-82.
- JENSEN, P.B. & M.SEHESTED, 1997. DNA topoisomerase II rescue by catalytic inhibitors: a new strategy to improve the antitumor selectivity of etoposide. *Biochem. Pharmacol.* 54:755-759.
- JEREMIC, B., Y.SHIBAMOTO & M.ABE, 1996. Assessment of micronucleus induction in murine SCCVII cells treated with various anticancer agents. *Chemotherapy* 42:266-272.
- KINGMA, P.S. & N.OSHEROFF, 1998. The response of eukaryotic topoisomerases to DNA damage. *Biochim. Biophys. Acta* 1400:223-232.
- KÖBERLE, B. & G.SPEIT, 1990. The effect of glutathione depletion on sister-chromatid exchange induction by cytostatic drugs. *Mutat. Res.* 243:225-231.
- LARSEN, A.K., C.GOBERT, C.GILBERT, J.MARKOVITS, K.BOJANOWSKI & A.SKLDANOWSKI, 1998. DNA topoisomerases as repair enzymes: mechanism(s) of action and regulation by p53. *Acta Biochim. Pol.* 45:535-544.
- MACKAY, W.J. & L.A.PHELPS, 2001. The induction of GC to AT transition mutations with adriamycin in the bacterium *Salmonella typhimurium*. *Tex. J. Sci.* 53:239-246.
- MACKAY, W.J., L.A.PHELPS, A.A.CAUCHI & L.T.WEAVER, 2000. The mutagenic effects of anthracyclines in the bacterium *Salmonella typhimurium*: induction of transition mutations with daunomycin. *Tex. J. Sci.* 52:223-229.
- MAZUE, G., G.M.WILLIAMS, M.J.IATROPOULOS, A.J.NEWMAN, U.SAMMARTINI, R.PULCI, S.CASTELLINO, G.SCAMPINI, M.BRUGHERA, A.R.IMONDI & A.PODESTA, 1996. Anthracyclines: review of genotoxicity and carcinogenicity studies. *Int. J. Oncol.* 8:525-536.
- MONNERET, C., 2001. Recent developments in the field of antitumour anthracyclines. *Eur. J. Med. Chem.* 36:483-493.

- MOTIMAYA, A.M., K.S.SUBRAMANYA, P.T.CURRY & R.M.KITCHIN, 1994. Evaluation of the genotoxic potential of selected anti-AIDS treatment drugs at clinical doses in vivo in mice. *Toxicol. Lett.* 70:171-183.
- NEBEL, M.C., I.LARRIPA & M.GONZÁLEZ-CID, 2002. Differential antigenotoxic and cytoprotective effect of amifostine in idarubicin-treated mice. *Environ. Mol. Mutagen.* 39:3-9.
- NERSESSIAN, A.K., V.N.ZILFIAN & V.A.KOUMKOUMADJIAN, 1991. Inhibitory effect of rat immunization with tularemia vaccine on the in vivo clastogenicity of 4 anthracycline antibiotics. *Mutat. Res.* 260:215-218.
- NIH, 2001. Cancer Progress Report 2001. NIH Publication no. 02-5045. National Cancer Institute, USA, p.80.
- NITISS, J.L., P.POURQUIER & Y.POMMIER, 1997. Aclacinomycin A stabilizes topoisomerase I covalent complexes. *Cancer Res.* 57:4564-4569.
- NOVIELLO, E., M.G.ALUIGI, G.CIMOLI, E.ROVINI, A.MAZZONI, S.PARODI, F.DE SESSA & P.RUSSO, 1994. Sister-chromatid exchanges, chromosomal aberrations and cytotoxicity produced by topoisomerase II-targeted drugs in sensitive (A2780) and resistant (A2780-DX3) human ovarian cancer cells: correlations with the formation of DNA double-strand breaks. *Mutat. Res.* 311:21-29.
- OSHEROFF, N., 1998. DNA topoisomerases. *Biochim. Biophys. Acta.* 1400:1-2.
- RHEINGOLD, S.R., A.I.NEUGUT & A.T.MEADOWS, 2000. Secondary cancers: incidence, risk factors, and management. In: R.C.BAST JR., D.W.KUFE, R.E.POLLOCK, R.R,WEICHSELBAUM, J.F.HOLLAND & E.FREI II (eds.). *Cancer Medicine*. B. C. Decker Inc., Hamilton, pp.2399-2406.
- RUBIN, E.H. & W.N.HAIT, 2000. Anthracyclines and DNA intercalators/epipodophylotoxins/DNA topoisomerases. In: R.C.BAST JR., D.W.KUFE, R.E.POLLOCK, R.R,WEICHSELBAUM, J.F.HOLLAND & E.FREI II (eds.). *Cancer Medicine*. B. C. Decker Inc., Hamilton, pp.283-297.

- SHINOZAKI, T., H.WATANABE, T.YANAGAWA, K.SHIRAKURA & K.TAKAGISHI, 2002. Pirarubicin-based versus doxorubicin-based osteosarcoma chemotherapy. *Ann. Pharmacother.* 36:996-999.
- SNYDER, R.D. & P.J.GILLIES, 2002. Evaluation of the clastogenic, DNA intercalative, and topoisomerase II-interactive properties of bioflavonoids in Chinese hamster V79 cells. *Environ. Mol. Mutagen.* 40:266-276.
- STOPPER H., G.BOOS, M.CLARK & F.GIESELER, 1999. Are topoisomerase II inhibitor-induced micronuclei in vitro a predictive marker for the compounds' ability to cause secondary leukemias after treatment? *Toxicol. Lett.* 104:103-110.
- SUGIYAMA, T., Y.SADZUKA, K.NAGASAWA, N.OHNISHI, T.YOKOYAMA & T.SONOME, 1999. Membrane transport and antitumor activity of pirarubicin, and comparison with those of doxorubicin. *Jpn. J. Cancer Res.* 90:775-780.
- SUZUKI, H. & S.NAKANE, 1994. Differential induction of chromosomal-aberrations by topoisomerase inhibitors in cultured Chinese-hamster cells. *Biol. Pharm. Bull.* 17:222-226.
- THUN, M.J. & P.A.WINGO, 2000. Cancer epidemiology. In: R.C.BAST JR., D.W.KUFE, R.E.POLLOCK, R.R.WEICHSELBAUM, J.F.HOLLAND & E.FREI II (eds.). *Cancer Medicine*. B. C. Decker Inc., Hamilton, pp.283-297.
- TICKOO, S. & S.RUSSEL, 2002. *Drosophila melanogaster* as a model system for drug discovery and pathway screening. *Curr. Opin. Pharmacol.* 2:555-560.
- TOPCU, Z., 2001. DNA topoisomerases as targets for anticancer drugs. *J. Clin. Pharm. Ther.* 26:405-416.
- VILLANI, P., T.ORSIERE, F.DUFFAUD, L.DIGUE, G.BOUVENOT & A.BOTTA, 1998. Genotoxic and clastogenic effects of doxorubicin. *Therapie* 53:391-395.
- VILLANI, P., T.ORSIERE, I.SARI-MINODIER, G.BOUVENOT & A.BOTTA, 2001. Antimutagenic effects of alphahederin in vitro. *Ann. Biol. Clin.-Paris* 59:285-289.

- VOGEL, E.W. & M.J.M.NIVARD, 1993. Performance of 181 chemicals in a *Drosophila* assay predominantly monitoring interchromosomal mitotic recombination. *Mutagenesis* 8:57-81.
- VOGEL, E.W., U.GRAF, H.J.FREI & M.J.M.NIVARD, 1999. The results of assays in *Drosophila* as indicators of exposure to carcinogens. In: D.B.McGregor, J.M.Rice & S.Venitt (eds.). *The Use of Short- and Medium-term Tests for Carcinogens and Data on Genetic Effects in Carcinogenic Hazard Evaluation*. IARC Scientific Publications No. 146, International Agency for Research on Cancer, Lyon, pp.427-470.
- WESTENDORF, J., H.MARQUARDT & H.MARQUARDT, 1984. Structure-activity relationship of anthracycline-induced genotoxicity in vitro. *Cancer Res.* 44:5599-5604.
- YU, Y.J., Z.D.XU & A.W.HSIE, 1994. Adriamycin induces large deletions as a major type of mutation in CHO cells. *Mutat. Res.* 325:91-98.
- ZUNINO, F., G.PRATESI & P.PEREGO, 2001. Role of the sugar moiety in the pharmacological activity of anthracyclines: development of a novel series of disaccharide analogs. *Biochem. Pharmacol.* 61:933-938.