



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

AVALIAÇÃO TÓXICA, CITOTÓXICA, GENOTÓXICA E MUTAGÊNICA DO
COMPOSTO 3-(2-CLORO-6-FLUOROBENZIL)-IMIDAZOLIDINA-2,4-DIONA EM
CÉLULAS EUCARIÓTICAS

MANOEL PINHEIRO LUCIO NETO

TERESINA
2011

MANOEL PINHEIRO LUCIO NETO

AVALIAÇÃO TÓXICA, CITOTÓXICA, GENOTÓXICA E MUTAGÊNICA DO
COMPOSTO 3-(2-CLORO-6-FLUOROBENZIL)-IMIDAZOLIDINA-2,4-DIONA EM
CÉLULAS EUCARIÓTICAS

Dissertação, como requisito complementar, para obter o grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas, submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Piauí.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Amélia Carvalho Melo Cavalcante

TERESINA
2011

MANOEL PINHEIRO LUCIO NETO

AVALIAÇÃO TÓXICA, CITOTÓXICA, GENOTÓXICA E MUTAGÊNICA DO
COMPOSTO 3-(2-CLORO-6-FLUOROBENZIL)-IMIDAZOLIDINA-2,4-DIONA EM
CÉLULAS EUCARIÓTICAS

BANCA EXAMINADORA:

Presidente e Primeiro Examinador Interno

Prof. Dra. Ana Amélia Melo Cavalcante

(Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas - UFPI)

Primeiro Examinador Externo

Prof. Dr. Sharbel Weidner Maluf

(Universidade Federal de Santa Catarina-UFSC)

Segundo Examinador Externo

Prof. Dr. Joaquim Costa Júnior

(Instituto Federal de Educação Tecnológica do Piauí - IFPI)

TERESINA

2011

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, pelo dom da vida e por estar sempre comigo, apoiando-me e dando-me força nos momentos difíceis.

À Profa. Dra. **Ana Amélia Melo Cavalcante**, minha orientadora, mestre, mãezona e amiga, por ter compartilhado comigo seu vasto conhecimento e dedicado todo seu empenho, sabedoria, compreensão e, acima de tudo, exigência. Gostaria de ratificar a sua competência, na participação de discussões, correções, revisões de lâminas e sugestões que fizeram com que este trabalho fosse concluído.

À parceria com o Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE, na pessoa da **Dra. Sueli Lins Galdino**, por sintetizar e disponibilizar a molécula objeto deste estudo.

Aos colegas de laboratório, **Fernanda, Joseana, Rodrigo, Debora, Alisson e Aracelli** pela sua intensa colaboração na realização de todos os testes, padronização das técnicas e dedicação durante tantas horas de experimentos, sem os quais seria impossível a realização desse trabalho.

Agradeço aos **professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas-PPGCF** e ao corpo de **funcionários do Núcleo de Tecnologia Farmacêutica (NTF)**, pela disponibilidade, convivência e apoio.

A **Marcia**, pela sua colaboração nos últimos momentos, auxiliando na revisão de todo o trabalho.

À minha mãe, **Maurileni Pinheiro de Holanda Carvalho**, exemplo de vida e determinação, por ser incansável em minha educação e felicidade.

Aos meus irmãos, **Élida, Sérgio, Clara e Anfrísio** pela cumplicidade. A vocês todo o meu amor e gratidão.

À minha esposa **Ana Carolina Machado de Oliveira Lucio**, minha grande incentivadora, pelo amor, compreensão e tolerância, que, sempre disponível e acolhedora, esteve presente em todos os momentos, contribuindo para que este trabalho seguisse adiante.

REITOR

Prof. Dr. Luiz de Sousa Santos Júnior

VICE-REITOR

Prof. Dr. Edwar de Alencar Castelo Branco

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Saulo Cunha de Serpa Brandão

**COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

Prof. Dr. Rivelilson Mendes de Freitas

**VICE-COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

Prof. Dr. Lívio César Cunha Nunes

“Toda pesquisa é um permanente início-reinício em ciclos convergentes que representam a expressão pessoal cada vez mais livre, produtiva e construtiva em prol do benefício de todos.”

Cerato SMM.

Dedico esta dissertação a minha esposa Ana Carolina Machado de Oliveira Lucio por todo seu amor, carinho, incentivo e paciência. E à todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste estudo.

SUMÁRIO

RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS	xiii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xv
1 INTRODUÇÃO	16
2 OBJETIVOS	29
2.1 Geral	19
2.2 Específicos	19
Capítulo 1	20
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
3.1 Artigo I - Derivados imidazolidínicos: usos clínicos em anestesia e na terapêutica da dor	21
3.2 Artigo II – Biomarcadores Micronúcleos e Cometa em roedores e teste <i>Allium cepa</i> na avaliação genotóxica de fármacos	39
Capítulo 2	69
4 Artigo III – Avaliação da toxicidade, citotoxicidade e mutagenicidade do composto 3-(2-cloro-6-fluorobenzil)-imidazolidina-2,4-diona com o teste <i>Allium cepa</i> .	70
Capítulo 3	86
5 Artigo IV – Estudo dos possíveis efeitos genotóxicos e mutagênicos do composto 3-(2-cloro-6-fluorobenzil)-imidazolidina-2,4-diona em medula óssea de camundongos com o ensaio cometa e o teste de micronúcleos.	87
Capítulo 4	105
6 Artigo V – Avaliação dos possíveis efeitos genotóxicos e capacidade de reparo do composto 3-(2-cloro-6-fluorobenzil)-imidazolidina-2,4-diona em sangue periférico de camundongos com o ensaio cometa.	106
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	125
REFERÊNCIAS	128

Manoel Pinheiro Lucio Neto. Orientador: Ana Amélia de Carvalho Melo Cavalcante. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFPI, 2011.

RESUMO

O composto PT-31, 3-(2-cloro-6-fluorobenzil)-imidazolidina-2,4-diona, é um novo derivado imidazolidínico, que exibe um perfil analgésico dose-dependente e ação sinérgica com a morfina, resultado da ativação dos receptores α_{2A} -adrenérgicos. Este trabalho buscou a avaliação tóxica, citotóxica, genotóxica e mutagênica do PT-31 em células eucarióticas, através do teste *Allium cepa*, ensaio cometa e teste de micronúcleos. A exposição de meristemas de raízes de *A. cepa* ao composto teste permitiu identificar sua ação tóxica e citotóxica, pela inibição do crescimento e do índice mitótico na maior dose testada (5,0 mg/mL) e ação mutagênica, pelo aumento das frequências das aberrações cromossômicas e de micronúcleos na dose de 1,0 mg/mL. Em relação à citotoxicidade observada no sistema *A. cepa*, os dados corroboram com a ação citotóxica em medula óssea de camundongos, para a dose de 5,0 mg/kg, pelo aumento na frequência de células binucleadas e na redução da relação EPC/ENC por grupo. Tais efeitos citotóxicos sugerem que o composto PT-31 pode interferir na divisão celular. Aumento de danos ao DNA em medula óssea foi identificado após 24 h de exposição, em machos e fêmeas, para a dose de 5,0 mg/kg, o que indica ação genotóxica. Além disso, a dose de 5,0 mg/kg aumentou a frequência de micronúcleos, indicando danos fixos ao material genético, sugerindo, provavelmente, que os mecanismos de reparo foram insuficientes para evitar a instabilidade genética em medula óssea. Em células sanguíneas, a partir de 30 min foi possível apontar os efeitos genotóxicos. Entretanto, após 24 h da injeção do PT-31, foi evidenciada excelente capacidade de reparo para todas as concentrações testadas. Não foi possível a identificação dos mecanismos indutores dos danos, todavia aventa-se a possibilidade de efeitos oxidativos. Em todos os testes a menor dose avaliada demonstrou-se segura, desprovida de atividades tóxicas, citotóxicas e mutagênicas aos meristemas de *A. cepa* e em mamíferos. Sugerimos estudos complementares, no sentido da elucidação dos possíveis mecanismos geradores das atividades testadas, no intuito de garantir segurança e eficácia para o PT-31, com o mínimo de riscos relacionados aos danos ao DNA dos seres humanos, como uma estratégia para a prevenção da instabilidade genética e, conseqüentemente, do câncer.

Palavras-chave: Imidazolidina; Genotoxicidade; Teste *Allium cepa*; Ensaio Cometa; Teste de Micronúcleos.

Manoel Pinheiro Lucio Neto. Orientador: Ana Amélia de Carvalho Melo Cavalcante. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFPI, 2011.

ABSTRACT

The compound PT-31, 3-(2-chloro-6-fluorobenzyl)-imidazolidine-2,4-dione, is a new imidazolidine derivative, which induces a dose-dependent analgesic profile and synergistic action with morphine, resulting in the activation of α_{2A} adrenoceptor. This study aimed to evaluate toxic, cytotoxic, genotoxic and mutagenic of the PT-31 in eukaryotic cells, through of the *Allium cepa* test, comet assay and micronucleus test. Exposure of root meristems of *A. cepa* to the compound test identified their toxic and cytotoxic action, by inhibiting the growth and mitotic index at the highest dose tested (5.0 mg/mL) and mutagenic action, by increasing the frequency of chromosomal aberrations and micronuclei in a dose of 1.0 mg/mL. Regarding the cytotoxicity observed in *A. cepa* system data corroborate the cytotoxic action on mouse bone marrow to the dose of 5.0 mg/kg, an increase in the frequency of binucleated cells and the reduction in the PCE/NCE by group. Such cytotoxic effects suggest that the compound PT-31 can interfere with cell division. Increased DNA damage in bone marrow was detected after 24 h of exposure in males and females, for a dose of 5.0 mg / kg, which indicates genotoxicity. Moreover, the dose of 5.0 mg/kg increased the frequency of micronuclei, indicating damage to genetic material fixed, suggesting probably that the repair mechanisms were not sufficient to prevent genetic instability in bone marrow. In blood cells from 30 min was possible to identify the genotoxic effects. However, 24 h after injection of the PT-31 was demonstrated excellent repair for all concentrations tested. It was not possible to identify the mechanisms that induce damage, however, suggest the possibility of oxidative effects. In all tests there was a dose-dependent profile, which showed the lowest dose evaluated to be safe, devoid of toxic activity, the cytotoxic and mutagenic meristems of *A. cepa* and mammals. We suggest further studies, towards the elucidation of possible mechanisms generating activities tested in order to ensure safety and efficacy for the PT-31, with minimal risks associated with damage to the DNA of humans as a strategy for the prevention of genetic instability and consequently cancer.

Key words: Imidazolidine; Genotoxicity; *Allium cepa* test, Comet assay, Micronucleus test.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

Artigo I

Figura 1 - A-Estrutura química do anel imidazol; B-Síntese do anel imidazol...	24
Figura 2 - Método de Debus na preparação do anel imidazol.....	24
Figura 3 - Formação da histamina a partir da histidina.....	25
Figura 4 - Estruturas químicas: (a) hidantoína (imidazolidina-2,4-diona); (b) 2-Tioxo-imidazolidin-4-ona; (c) 4-Tioxo-imidazolidin-4-ona; (d) Imidazolidina-2,4-ditona.....	26
Figura 5 - Estrutura química de fármacos derivados imidazolidínicos; A: Fenitoína (5,5-difenil-hidantoína; B: Alantoína (5-ureído-hidantoína); C: 1-[(4-nitro-fenil)-5-furfurilideno-amino]-imidazolidina-2,4-diona; D: Nifurfolina; E: Nitrofurantoína.....	27
Figura 6 - Fórmula estrutural da clonidina.....	31
Figura 7 - Estrutura química da medetomidina.....	33
Figura 8 - Estrutura química da dexmedetomidina.....	33
Figura 9 - Fórmula estrutural do 3-(2-cloro-6-fluorobenzil)-2,4-diona.....	34
Figura 10 - Mecanismo de ação do 3-(2-cloro-6-fluorobenzil)-2,4-diona.....	35

Artigo II

Figura 1 - Representação esquemática da formação de micronúcleos como consequência de uma lesão no material genético de uma célula em divisão. (a) Origem de um MN a partir de um cromossomo inteiro e fragmentos cromossômicos acêntricos na anáfase; (b) formação de uma ponte a partir de cromossomos dicêntricos, onde os centrômeros se dirigem para os lados opostos da célula.....	47
Figura 2 - Esfregaço de medula óssea de camundongos com: (A) eritrócitos normocromáticos (ENCs); (B) eritrócito policromático (EPC) e (C) eritrócito policromático micronucleado (EPCMN).....	51
Figura 3 - Formação de micronúcleos com e sem a adição de Citocalasina-B...	
Figura 4 - CbMN em células esfoliadas de mucosa oral.....	52
Figura 5 - Classificação do dano ao DNA celular em linfócitos de sangue	

periférico no Ensaio Cometa: 0 (célula sem dano) a 4 (célula com dano máximo) conforme a intensidade do dano (tamanho e forma da cauda).....	56
Figura 6 - Cariótipo de <i>Allium cepa</i> (2n =16).....	57
Figura 7 - Micronucleos (MN) em células meristemáticas de <i>Allium cepa</i> . A, C, E e F: MN em interfase; D, G e H: MN em prófase.....	60
Figura 8 - Raízes de <i>Allium cepa</i> crescidas em amostras de água do rio Parnaíba-PI do ponto 2 (verão). (A) e (B) células com micronúcleos; (C) célula com ponte e fragmento na anáfase; (D) e (E) células com atraso na anáfase; (F) célula com fragmento em anáfase.....	61

Capítulo 2

Artigo III

Figura 1 - Fórmulas estruturais do PT-31 (A) e da clonidina (B).....	72
Figura 2 - Fotomicrografias (aumento de 1000X) de aberrações cromossômicas e micronúcleos de espécimes de <i>Allium cepa</i> expostos às concentrações de 0,5; 1,0 e 5,0 mg/mL do composto PT-31.....	79

Capítulo 3

Artigo IV

Figura 1 - Fórmula estrutural do PT-31.....	89
Figura 2 - Índice de Danos (A) e Frequência de Danos (B) por grupo (média \pm desvio padrão) em células de medula óssea de camundongos, após 24 horas da administração intraperitoneal de PT-31 (0,5; 1,0 e 5,0 mg/kg). Para cada grupo n = 10 (cinco machos e cinco fêmeas). CN: controle negativo; CP (ciclofosfamida, 25mg/Kg). 100 células por animal. Diferença significativa em relação ao controle negativo ao nível de *P<0,05 e ** P<0,01 (ANOVA-Teste de Tukey).....	95
Figura 3 - Fotomicrografias (aumento de 1000X) de MN (A) e células BN (B) encontrados em medula óssea de camundongos após 24 h da administração intraperitoneal de PT-31 (0,5; 1,0 e 5,0 mg/kg).....	96
Figura 4 - Micronúcleos (A) e células binucleadas (B) por grupo (média \pm desvio padrão) em células de medula óssea de camundongos, após 24 horas da administração intraperitoneal de PT-31 (0,5; 1,0 e 5,0 mg/kg). Para cada	

grupo n = 10 (cinco machos e cinco fêmeas). CN: controle negativo; CP CP (ciclofosfamida, 25mg/Kg, i.p.). 2000 células por animal. Diferença significativa em relação ao controle negativo ao nível de *P<0,05 e ** P<0,01 (ANOVA- Teste de Tukey),..... 97

Figura 5 - Perfil fotomicrográfico (aumento de 1000X) de esfregaço de medula óssea de camundongos após 24 h da administração intraperitoneal de PT-31 nas doses de 0,5 (A, B e C); 1,0 (D, E e F) e 5,0 mg/kg (G,H e I)..... 98

Capítulo 4

Artigo V

Figura 1 - Fórmula Estrutural do PT-31..... 109

Figura 2 - Índice de Danos (ID) por grupo para células de sangue periférico de camundongos após 30 min, 12 h e 24 h da administração intraperitoneal do composto PT-31. Para cada grupo n = 10 (5 machos e 5 fêmeas). 100 células por animal. CN: DMSO 0,5%; CP: Ciclofosfamida 25 mg/kg i.p.. Diferença estatística em relação ao controle negativo ao nível de *P<0,05; ** P<0,01 e *** P<0,001 (ANOVA)..... 116

Figura 3 - Frequência de Danos (FD) por grupo para células de sangue periférico de camundongos após 30 min, 12 h e 24 h da administração intraperitoneal do composto PT-31. Para cada grupo n=10 (5 machos e 5 fêmeas). 100 células por animal. CN: DMSO; 0,5%CP: Ciclofosfamida 25 mg/kg,); Diferença estatística em relação ao controle negativo ao nível de *P<0,05; ** P<0,01 e *** P<0,001 (ANOVA)..... 116

Figura 4 - Fotomicrografia das classes de danos em linfócitos de camundongos após a administração intraperitoneal de PT-31 nas doses de 0,5 (A, B e C); 1,0 (D, E e F) e 5,0 (G, H e I) mg/kg, após 30 min (A, D e G); 12 h (B, E e H) e 24 h (C, F e I)..... 117

LISTA DE TABELAS

Capítulo 2

Artigo III

Tabela 1 - Índice mitótico e tamanho das raízes (média \pm desvio padrão) de espécimes de <i>Allium cepa</i> expostos às concentrações de 0,5; 1,0 e 5,0 mg/mL do composto PT-31.....	77
Tabela 2 - Aberrações cromossômicas e micronúcleos (média \pm desvio padrão) de espécimes de <i>Allium cepa</i> expostos às concentrações de 0,5; 1,0 e 5,0 mg/mL do composto PT-31.....	78

Capítulo 3

Artigo IV

Tabela 1 - Índice de Danos e Frequência de Danos (média \pm desvio padrão) para células de medula óssea de camundongos, após 24 horas da administração intraperitoneal de PT-31, nas concentrações de 0,5; 1,0 e 5,0 mg/kg. Para cada grupo n = 10 (cinco machos e cinco fêmeas). 100 células por animal.....	94
Tabela 2 - Determinação de micronúcleos e células binucleadas por gênero (média \pm desvio padrão) em células de medula óssea de camundongos, após 24 horas da administração intraperitoneal de PT-31, nas concentrações de 0,5; 1,0 e 5,0 mg/kg. Para cada grupo n = 10 (cinco machos e cinco fêmeas). 2000 células por animal.....	96

Capítulo 4

Artigo V

Tabela 1 - Parâmetros do Ensaio Cometa (índice de danos e frequência de danos; média \pm desvio padrão) para linfócitos de camundongos, 30 min após da administração intraperitoneal de PT-31, nas concentrações de 0,5; 1,0 e 5,0 mg/kg. Para cada grupo, n = 10 (cinco machos e cinco fêmeas). 100 células por animal.....	113
Tabela 2 - Parâmetros do Ensaio Cometa (índice de danos e frequência de danos; média \pm desvio padrão) para linfócitos de camundongos, após 12 horas da administração intraperitoneal de PT-31, nas concentrações de 0,5; 1,0 e 5,0	

mg/kg. Para cada grupo, n = 10 (cinco machos e cinco fêmeas). 100 células por animal..... 114

Tabela 3 - Parâmetros do Ensaio Cometa (índice de danos e frequência de danos; média ± desvio padrão) para linfócitos de camundongos, após 24 horas da administração intraperitoneal de PT-31, nas concentrações de 0,5; 1,0 e 5,0 mg/kg. Para cada grupo, n = 10 (cinco machos e cinco fêmeas). 100 células por animal..... 115

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC	Aberrações Cromossômicas
AMPA	Ácido 2-amino-3-(5-metil-3-oxo-1,2-oxazol-4-il)-propanoico
AMPc	Adenosina Monofosfato Cíclico
BN	Células Binucleadas
CbMN	Micronúcleo com Bloqueio de Citocinese
CDER	<i>Center for Drug Evaluation and Research</i>
CN	Controle Negativo
CP	Controle Positivo
DMSO	Dimetilssufóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DPH	Fenitoína
EPA	<i>Environmental Protection Agency</i>
ENC	Eritrócito Normocromático
EPC	Eritrócito Policromático
EPCMN	Eritrócito Policromático Micronucleado
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
FD	Frequência de Danos
FDA	<i>United States Food and Drug Administration</i>
GABA	Ácido Gama Aminobutírico
ICH	<i>International Conference on Harmonisation</i>
ID	Índice de Danos
IL-6	Interleucina-6
IM	Índice Mitótico
MN	Micronúcleos
NMDA	N-metil D-Aspartato
NPIT	Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica
OECD	<i>Organisation for Economic Co-operation and Development</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
PT-31	3-(2-cloro-6-fluorobenzil)-imidazolidina-2,4-diona
RNA	Ácido Ribonucléico
SNC	Sistema Nervoso Central
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
UFPI	Universidade Federal do Piauí
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
WHO	<i>World Health Organization</i>

1 INTRODUÇÃO

Os fármacos são substâncias usadas para impedir ou curar doenças em homens e animais. A introdução de novos fármacos na terapêutica é necessária para o aperfeiçoamento do tratamento de doenças já existentes ou recém-identificadas ou, ainda, para a implementação de tratamentos mais seguros e eficazes (OLIVEIRA et al., 2008). O desenvolvimento de um fármaco pode surgir através de experimentos com produtos naturais ou sintéticos, que tenham similaridade com compostos, com reconhecida atividade para outras doenças ou através de alvos metabólicos específicos para uma determinada célula ou órgão (FIOCRUZ, 2009). Em estatísticas da área de química medicinal, em 2001, cerca de 85% dos fármacos disponíveis na terapêutica moderna são de origem sintética, isto sem considerar aqueles oriundos de processos de semi-síntese (AMARAL et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2008).

Entre as diversas estratégias utilizadas para a introdução de novos fármacos na terapêutica, as modificações moleculares se mostram promissoras. Estas consistem na transformação química de moléculas conhecidas, com o objetivo de aumentar a potência e segurança, garantindo, assim, um melhor perfil farmacocinético e farmacodinâmico (WERMUTH, 2004). Diversas moléculas sintéticas podem ser obtidas a partir de derivações de anéis heterocíclicos, dentre as quais, destacam-se as imidazolidinas-2,4-dionas (hidantoínas), devido à sua potencialidade como protótipo para o desenvolvimento de novos fármacos. Segundo Arduengo et al. (1992), as imidazolidinas são um conjunto de compostos heterocíclicos, formados por meio da adição de quatro átomos de hidrogênio ao anel imidazol. O intermediário resultante da adição de apenas dois átomos de hidrogênio é chamado dihidroimidazol (imidazolina).

De acordo com Pitta et al. (2006), a modificação molecular das imidazolidinas por substituição de radicais produz respostas biológicas diferenciadas. Essas variações estruturais levam a alterações nas propriedades físicas e reatividade dos compostos químicos, dando origem a alterações na distribuição das células e tecidos e no acesso aos centros de enzimas ativas e receptores. As hidantoínas apresentam ação biológica diversificada, como por exemplo, antimicrobiana, anticonvulsivante, analgésica, sedativa e antiparasitária. É digno de nota que tais agentes têm causado um grande impacto na indústria farmacêutica, visto que vários fármacos contendo este anel heterocíclico são utilizados na clínica (OLIVEIRA et al., 2008).

Nesse contexto, uma nova entidade molecular, o composto PT-31, 3-(2-cloro-6-fluorobenzil)-imidazolidina-2,4-diona, foi sintetizado pelo Núcleo de Pesquisa e Inovação

Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, Brasil (NPIT–UFPE). Tal molécula é uma imidazolidina-2,4-diona, estruturalmente relacionada à clonidina, sendo que a relação estrutura-atividade entre esses dois compostos, assim como a interação com os receptores α_2A -adrenérgicos, foi demonstrada através de um modelo molecular (*software BioMed Cache* – método AM1) (SUDO et al., 2010).

Estudos recentes têm demonstrado que os fármacos agonistas dos receptores α_2 -adrenérgicos apresentam importante papel na modulação da dor, inibindo a condução nervosa (SCHNAIDER et al., 2005). Alguns α_2 -agonistas têm grande seletividade a receptores específicos, sendo usados como medicação pré-anestésica, atuando na adjuvância da anestesia geral, ou como sedativos e medicação pós-operatória (MAGALHÃES et al., 2006). O uso concomitante de agonistas dos receptores α_2 -adrenérgicos com a morfina tem sido, experimentalmente e clinicamente, reportado com o intuito de redução dos efeitos colaterais e aumento da eficácia de tal opióide (ROCHA et al. 2002; OSSIPOV et al., 1989). A dexmedetomidina, formada pelo enantiômero dextrógiro da medetomidina, atualmente é considerada como o protótipo dos agonistas alfa₂-adrenérgicos superseletivos. A clonidina é 200 vezes mais seletiva para o alfa₂ que para o alfa₁, enquanto a dexmedetomidina é 1600 vezes mais seletiva para o receptor alfa₂. A grande vantagem da dexmedetomidina é a sua maior seletividade quando comparada à clonidina, especificamente pelo receptor alfa_{2A}, responsável pelos efeitos hipnóticos e analgésicos desses fármacos (ALVES et al., 2000; BAGANTINE et al., 2002).

Em estudos realizados por Sudo et al. (2010), a administração intraperitoneal de PT-31 em camundongos produziu antinocicepção dose-dependente, sendo que a associação com a morfina potencializou tal atividade, o que caracterizou sinergismo entre os dois compostos. Evidenciou-se, também, a reversão completa dos efeitos do PT-31 com o uso de antagonistas seletivos e não-seletivos dos receptores α_2 -adrenérgicos - ioimbina e BRL 44408, respectivamente. Dessa forma, o composto PT-31 é uma nova entidade molecular que exhibe um perfil analgésico dose-dependente e ação sinérgica com a morfina, resultado da ativação dos receptores α_{2A} -adrenérgicos.

Alguns trabalhos complementares, incluído dados toxicológicos, ainda precisam ser realizados com o intuito de se traçar um perfil de segurança/eficácia para o PT-31, tendo em vista que o desenvolvimento de fármacos centra-se na avaliação da segurança, toxicidade e eficácia. O objetivo fundamental é a geração de um banco de dados científicos que suporte o perfil, eficácia e segurança, do regime de dosagem destinados à comercialização. Em média, cada molécula nova requer 12-15 anos para chegar ao paciente, e os custos de Pesquisa e

Desenvolvimento podem chegar, no Estados Unidos, a uma margem de aproximadamente 65,3 bilhões (CALIXTO; SIQUEIRA, 2008).

Nos estágios iniciais de desenvolvimento de novos fármacos tem sido dada grande ênfase aos estudos de genotoxicidade, uma vez que, dentre as várias reações adversas que um medicamento pode causar, a ocorrência de efeitos genotóxicos e carcinogênicos não pode ser excluída. A fim de se avaliar o risco de efeitos genotóxicos e cancerígenos para seres humanos, as autoridades reguladoras da Europa, Japão e EUA recomendam que estudos de genotoxicidade e de carcinogenicidade sejam realizados antes da aprovação da comercialização de produtos farmacêuticos (BRAMBILLA; MARTELLI, 2009).

O monitoramento adequado da genotoxicidade vem sendo considerado como um dos mecanismos de prevenção e controle de algumas reações adversas e efeitos colaterais importantes, o que inclui diversas desordens genéticas. Alguns biomarcadores de genotoxicidade e mutagenicidade são utilizados para a avaliação de efeitos agudos e crônicos de diversos agentes químicos, podendo predizer um perfil de segurança e eficácia de novas moléculas (MALUF; ERDITIMANN, 2003). Numerosos produtos químicos, potencialmente mutagênicos, têm sido estudados, principalmente, porque podem causar mudanças prejudiciais e herdáveis no material genético, sem serem imediatamente expressas (LEME; MARIN-MORALES et al., 2009).

Agentes genotóxicos interagem quimicamente com o material genético, formando adutos, alteração oxidativa ou mesmo quebras na molécula de DNA, com a habilidade de alterar a replicação do DNA e a transmissão genética. Na grande maioria dos casos, a lesão é reparada pelo próprio organismo ou a célula é eliminada. Caso essa lesão seja fixada, provocando alterações hereditárias (mutações), que podem se perpetuar nas células filhas durante o processo de replicação, o agente é denominado mutagênico (REKHA et al., 2006; ABHILASH et al., 2009). Os ensaios de genotoxicidade *in vivo* são ferramentas sensíveis para a detecção da genotoxicidade e da potencial carcinogenicidade de diversas moléculas (MALUF; ERDITIMANN, 2003).

Compreendendo a relevância de ensaios de genotoxicidade na avaliação da segurança de fármacos, optou-se pela escolha do novo composto analgésico 3-(2-cloro-6-fluorobenzil)-imidazolidina-2,4-diona (PT-31), que vem a ampliar o arsenal disponível na terapêutica da dor, uma vez que, em triagens farmacológicas, mostrou-se promissor e sinérgico com a morfina, aumentando a potência e reduzindo os efeitos colaterais desse opióide. Buscou-se avaliar a sua toxicidade, citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade com o uso de biomarcadores em células eucarióticas. Para tanto, foram escolhidos o sistema de teste vegetal *Alium cepa*, o ensaio cometa e o teste de micronúcleos em roedores.

REFERÊNCIAS

- ABHILASH, P.C. et al. Pesticide use and application: An Indian scenario. **Journal of Hazardous Materials**. v.165, p. 1–12. 2009.
- ALVES T.C.A. et al. Efeitos da associação da clonidina à ropivacaína na anestesia peridural. **Rev Bras Anesthesiol**, v. 52, p. 410-419, 2002.
- AMARAL, P A et al. Química combinatória: moderna ferramenta para a obtenção de candidatos a protótipos de novos fármacos. **Rev. Bras. Cienc. Farm**, v.39, n.4, p. 351-363, 2003.
- ARDUENGO, A. J et al. Electronic stabilization of nucleophilic carbenes . **J. Am. Chem. Soc.** v 11, n 9, p. 55-59, 1992.
- BAGATINI, A. et al. Dexmedetomidina: farmacologia e uso clínico. **Rev. Bras. Anesthesiol**. v.52, n.5, p. 606-617, 2002.
- BRAMBILLA, G. e MARTELLI, A. Genotoxicity and carcinogenicity studies of analgesics, anti-inflammatory drugs and antipyretics. **Pharmacological Research**, v. 60, p. 1-17, 2009.
- CALIXTO, J.B.; SIQUEIRA, J.M. Desenvolvimento de Medicamentos no Brasil. **Gaz med Bahia**. v. 78, n. 1, p. 98-106, 2008.
- FIOCRUZ (Fundação Oswaldo Cruz). A história da terapêutica da doença de chagas, 2009. Acessado em: 05 de março de 2011. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=126>.
- LEME, D. M. e MARIN-MORALES M. A. *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. **Mutat Res**, v. 682, p. 71-78. 2009.
- MAGALHAES, E. et al. A dexmedetomidina para sedação, por via venosa, não interfere com a duração dos bloqueios sensitivo e motor da raquianestesia. **Rev. Bras. Anesthesiol**. v.56, n.1, p. 01-07, 2006.
- MALUF, S.W., ERDTMANN, B. Biomonitoração do dano genético em humanos. In: SILVA, J. DA; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J. A. P. (Orgs.) **Genética toxicológica**, p. 183-205, 2003.
- OLIVEIRA, S.M. et al. Estrutura, reatividade e propriedades biológicas de hidantoínas. **Quím. Nova.**, v. 31, n.3, p. 614-622, 2008.

OSSIPOV M, Suarez L, Spaulding T: **Antinociceptive interactions between alpha2-adrenergic and opiate agonists at the spinal level in rodents.** *Anesth Analg* 68:194-200, 1989

PITTA, M. G. R. et al. New imidazolidinic bioisosters: potential candidates for antischistosomal drugs. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** v.101, p. 313-316, 2006.

REKHA, S.N. et al. Pesticide residue in organic and conventional food–risk analysis, **Chem. Health Safety**, v. 13, p. 12–19, 2006.

ROCHA, A.P.C.; LEMONICA, L. e BARROS, G.A.M.. Uso de medicações por via subaracnóidea no tratamento da dor crônica. **Rev. Bras. Anesthesiol**, v..52, n.5, p. 628-643, 2002.

SCHNAIDER, T. B. et al. Efeito analgésico intra-operatório da cetamina, clonidina ou dexmedetomidina, administradas por via peridural, em cirurgia de abdômen superior. **Rev. Bras. Anesthesiol**, v.55, n.5, p. 525-531, 2005.

SUDO, T. R. et. al. Interaction of Morphine With a New α_2 -Adrenoceptor Agonist in Mice. **The Journal of Pain**, v.. 11, n.1. p 71-78, 2010.

WERMUTH, C. Selective optimization of side activities: another way for drug discovery. **J. Med. Chem.**, v. 6, n. 47, p. 1303-1314, 2004.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Este trabalho buscou a avaliação dos possíveis efeitos tóxicos, citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos do composto 3-(2-cloro-6-fluorobenzil)-imidazolidina-2,4-diona (PT-31) em células eucarióticas, através do teste vegetal *Allium cepa*, além do ensaio cometa e teste de micronúcleos em camundongos.

2.2 Específicos

- Avaliar a toxicidade da PT-31 em meristemas de raízes de *A. cepa* pela inibição do crescimento de raízes;
- Avaliar a citotoxicidade da PT-31 em meristemas de raízes de *A. cepa* pela inibição da divisão mitótica;
- Detectar os possíveis efeitos mutagênicos do PT-31 em meristemas de raízes de *A. cepa* pela frequência de micronúcleos e de aberrações cromossômicas;
- Avaliar os possíveis efeitos genotóxicos do PT-31 em células de medula óssea de camundongos, aplicando-se o ensaio cometa;
- Avaliar a genotoxicidade do PT-31, e da capacidade de reparo dos possíveis danos, em sangue periférico de camundongos, através do ensaio cometa;
- Avaliar a ação mutagênica do PT-31 em células de medula óssea de camundongos com a aplicação do teste de micronúcleos;
- Correlacionar os dados obtidos com o sistema vegetal *A. cepa* com os efeitos observados em mamíferos.
- Correlacionar os dados obtidos com o ensaio cometa com os observados no teste de micronúcleos.

Capítulo 1

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Artigo I – Derivados imidazolidinicos: usos clínicos em anestesiologia e na terapia da dor

3.2 Artigo II – Biomarcadores Micronúcleos e Cometa em roedores e teste *Allium cepa* na avaliação genotóxica de fármacos

Derivados imidazolidínicos: usos clínicos em anestesiologia e na terapia da dor

LUCIO NETO, M. P.¹; MELO-CAVALCANTE, A. M.¹.

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal do Piauí - UFPI, Teresina-PI, Brasil.

Resumo

Os derivados imidazolidínicos são um conjunto de compostos heterocíclicos que têm causado grande impacto na indústria farmacêutica, por apresentarem atividade farmacológica diversificada (anticonvulsivante, antimicrobiana, analgésica e sedativa, por exemplo). Vários fármacos contendo esse anel vêm sendo sintetizados e são utilizados na clínica. Os imidazolidínicos α_2 -agonistas apresentam papel de destaque, por apresentarem importante ação analgésica, sedativa, ansiolítica e simpatolítica. Seu uso como medicação pré-anestésica, durante a anestesia, ou no período pós-operatório, promove boa estabilidade hemodinâmica. Na terapêutica da dor, esses agentes agem em sinergismo com os opióides, aumentando a sua potência e reduzindo os seus efeitos colaterais. Assim, novos fármacos α_2 -agonistas tornam-se um importante recurso adicional para a prática terapêutica da analgesia e anestesiologia, mostrando-se bastante promissores.

Palavras-chave: Imidazolidina; α_2 -agonistas; Anestesia; Analgésicos.

Abstract

Imidazolidine derivatives are a group of heterocyclic compounds that have had major impact in the pharmaceutical industry, because they have diverse pharmacological activity (anticonvulsant, antimicrobial, analgesic and sedative, for example). Several drugs containing this ring have been synthesized and are used in the clinic. The imidazolidine α_2 -agonists present role, because they have important analgesic, sedative, anxiolytic and sympatholytic. Its use as a premedication for anesthesia, or postoperatively, promotes hemodynamic stability. In pain therapy, these agents act in synergism with opioids, increasing its potency and reducing side effects. Thus, new drugs α_2 -agonists become an important additional resource for the practice of analgesia and anesthesia, proving to be very promising.

Keywords: Imidazolidine; α_2 -agonists; Anaesthesia; Analgesics.

1 Introdução

Os fármacos são substâncias usadas para impedir ou curar doenças em homens e animais. A introdução de novos fármacos na terapêutica é necessária para o aperfeiçoamento do tratamento de doenças já existentes ou recém-identificadas ou, ainda, para a implementação de tratamentos mais seguros e eficazes (OLIVEIRA et al., 2008).

O desenvolvimento de um fármaco pode surgir através de experimentos com produtos naturais ou sintéticos, que tenham similaridade com compostos com reconhecida atividade para outras doenças ou através de alvos metabólicos específicos para uma determinada célula ou órgão (FIOCRUZ, 2009). Em estatísticas da área de química medicinal, em 2001, cerca de 85% dos fármacos disponíveis na terapêutica moderna são de origem sintética, isto sem considerar aqueles oriundos de processos de semi-síntese (AMARAL et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2008).

Historicamente, a pesquisa para a descoberta de substâncias biologicamente ativas vem seguindo processo sequencial, em que a síntese dos compostos ocorre de maneira artesanal, isto é, uma molécula de cada vez, escolhendo-as a partir de substâncias de origem natural ou sintética e, depois de exaustivas etapas de isolamento, purificação e caracterização, o candidato a protótipo de fármaco é submetido a testes para detecção de eventuais atividades farmacológicas. Este processo clássico é amplamente empregado em laboratórios de pesquisa de instituições de ensino e empresas farmacêuticas, mas apresenta como desvantagem o fato de ser relativamente lento e gerar reduzido número de derivados diferentes (AMARAL et al. 2003).

O processo de pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos vem crescendo notadamente nestes últimos anos e existe uma grande necessidade do desenvolvimento de novos compostos farmacologicamente ativos, que sejam eficazes contra diferentes patologias ainda sem tratamento, ou que possam substituir os existentes em custos reduzidos e também com baixos efeitos colaterais. O problema fundamental nesse processo de descoberta de novos fármacos é a elevada taxa de reprovação nos ensaios clínicos, devido à baixa eficácia e alta toxicidade (CALIXTO; SIQUEIRA, 2008).

Entre as diversas estratégias utilizadas para a introdução de novos fármacos na terapêutica, as modificações moleculares mostram-se promissoras (WERMUTH, 2004). Essas consistem na transformação química de moléculas conhecidas a novos compostos-protótipos que atuam por um mecanismo de ação similar ao da molécula de origem (STEFANI, 2009).

O planejamento adequado de variações na estrutura de um composto bioativo pode resultar em derivados com maior interesse terapêutico, seja por apresentar maior atividade, menor toxicidade, ou ainda, por adquirir características farmacotécnicas mais adequadas (CHUNG et al., 1999). Atualmente, pode-se perceber que um número crescente de moléculas derivadas de anéis heterocíclicos vem sendo sintetizadas para uso clínico como analgésicos, sedativos, ou adjuvantes em anestesia (PEDEN et al., 2010).

Em anestesiologia e na terapêutica da dor, várias drogas têm sido utilizadas para promover sedação e analgesia em pacientes. Barbitúricos, opióides, benzodiazepínicos, entre outros, são administrados isolados ou em associação para alcançar este propósito. Entretanto, observou-se que tais drogas, apesar de ótimos analgésicos ou sedativos, não alcançam um ponto de equilíbrio entre sedação e analgesia apropriadas. Além disso, muitas destas drogas apresentam efeitos adversos importantes, limitando o seu uso (BRAGATINE et al., 2002).

Estudos têm demonstrado que os agonistas α_2 -adrenérgicos apresentam importante papel na modulação da dor, inibindo a condução nervosa. (SCHNAIDER et al., 2005). Tais agentes apresentam excelentes propriedades sedativas e analgésicas associados à ausência de depressão respiratória. Alguns α_2 -agonistas têm grande seletividade a receptores específicos, sendo usados como medicação pré-anestésica, atuando na adjuvância da anestesia geral, ou como sedativos e medicação pós-operatória. A sua associação como adjuvante em anestesia locorregional proporcionaria uma interação farmacológica sinérgica com aumento da duração de ação dos anestésicos locais, estabilidade hemodinâmica, sedação, analgesia e ausência de depressão ventilatória (MAGALHÃES et al., 2006).

Três grupos de compostos químicos são responsáveis pela ativação dos receptores α_2 -adrenérgicos: imidazolidinas, feniletilaminas e oxalozepinas (BRAGATINE et al., 2002). Dentre esses, têm papel de destaque as imidazolidinas, onde as suas modificações moleculares, por substituição de radicais, produz respostas biológicas diferenciadas. Sabe-se que as variações estruturais levam a alterações nas propriedades físicas e reatividade dos compostos químicos, dando origem a alterações na distribuição das células e tecidos e no acesso aos centros de enzimas ativas e receptores (OLIVEIRA et al., 2008).

Essa revisão tem como objetivo a descrever algumas atividades biológicas dos derivados imidazolidínicos, enfatizando-se a ação α_2 -agonista, importante mecanismo na terapêutica da dor e sedação anestésica.

2 Derivados imidazolidínicos: características e atividades biológicas

O anel heterocíclico imidazol (**Figura 1A**) foi primeiramente sintetizado por Heinrich Debus em 1858, mas vários derivados imidazolólicos foram descobertos, anteriormente, na década de 1840. Esta síntese, mostrada abaixo (**Figura 1B**), utiliza glicoxal e formaldeído na presença de amônia. O imidazol é classificado como composto aromático em função da presença de um sexteto de ligações (BROWN, 1998).

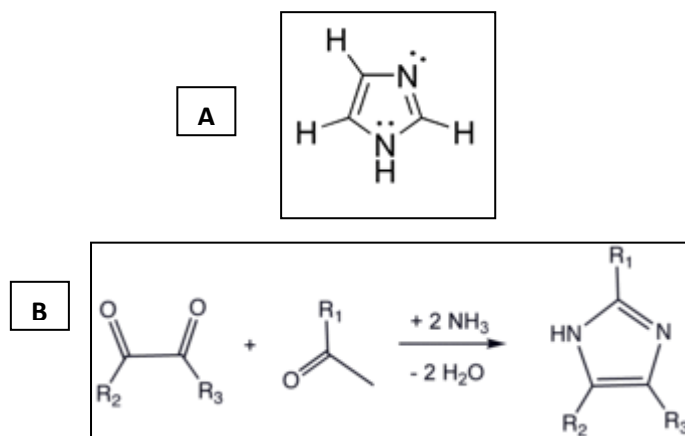


Figura 1 A-Estrutura química do anel imidazol; B-Síntese do anel imidazol. Adaptada de Brown (1998) e Grimmett (1997).

O anel imidazol pode ser sintetizado por inúmeros métodos. Na literatura, estes métodos são comumente classificados de acordo com a forma e o número de ligações que são feitas para formar o anel imidazolico. Por exemplo, o método de Debus forma as ligações (1,2), (3,4), e (1,5) utilizando cada reagente como um fragmento do anel, logo este seria um método de formação de 3 ligações (GRIMMETT, 1997), conforme pode ser visto abaixo (**Figura 2**):

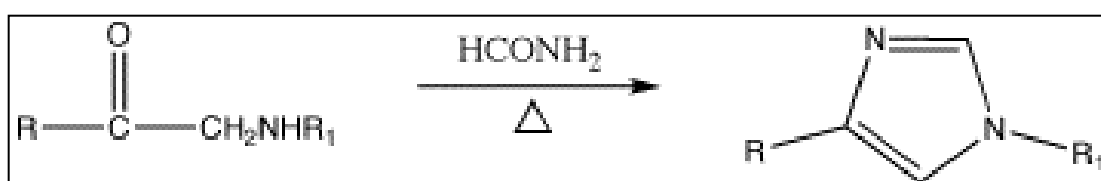


Figura 2 Método de Debus na preparação do anel imidazol. Adaptada de Grimmett (1997).

O anel imidazol está presente em várias moléculas de importância biológica, como o aminoácido histidina, que possui o anel imidazolólico em sua cadeia lateral. Histidina pode ser descarboxilada e transformada em histamina (GRIMMETT, 1997), conforme abaixo (**Figura 3**):

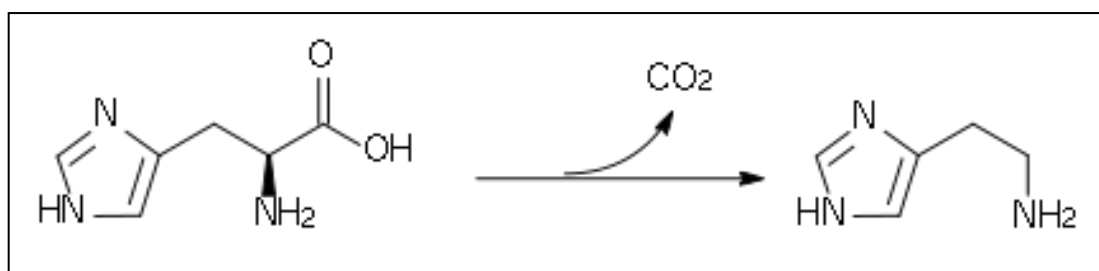


Figura 3 Formação da histamina a partir da histidina. Adaptada de Grimmett (1997).

Outra aplicação do imidazol é a purificação de proteínas recombinantes marcadas com uma cauda de histina, através de cromatografia de afinidade com ions metálicos imobilizados. O imidazol é utilizado na etapa de eluição, na qual um excesso deste composto é aplicado na coluna, competindo pela ligação com o metal através de coordenação química, libertando assim as proteínas (POZHARSKII et al., 1997).

Os derivados imidazólicos tem se tornado bastante importantes para indústria farmacêutica. Imidazoles sintéticos estão presentes em muitos fungicidas, antiprotozoários e anti-hipertensivos. Imidazol também faz parte do composto teofilina, um estimulante do sistema nervoso central, encontrado em folhas de chá e em feijões. Também está presente em fármacos anticâncer, como mercaptopurina, que interfere no genoma (GRIMMETT, 1997; POZHARSKII et al., 1997).

As imidazolidinas são um conjunto de compostos heterocíclicos, formados por meio da adição de quatro átomos de hidrogênio ao anel imidazol (ARDUENGO et al., 1992). Modificações estruturais no anel imidazolidínico podem alterar suas propriedades físico-químicas e produzir efeitos biológicos com uma grande variedade de aplicações, como por exemplo, ação antimicrobiana, anticonvulsivante, analgésica, sedativa e antiparasitária (PITTA et al., 2006).

A hidantoína corresponde ao 2,4-diceto-tetra-hidro-imidazol (**Figura 4a**), embora seja também denominada imidazolidina-2,4-diona. O sistema anelar hidantoínico tem sido, intensivamente, estudado tanto no tocante aos aspectos químicos, quanto biológicos (OLIVEIRA et al., 2008). A substituição dos átomos de oxigênio carbonílicos da hidantoína por átomos de enxofre origina três tio-derivados: a 2-tio-hidantoína (2-tioxo-imidazolidin-4-ona) (**Figura 4b**), a 4-tio-hidantoína (4-tioxo-imidazolidin-2-ona) (**Figura 4c**) e a 2,4-ditio-hidantoína (imidazolidina-2,4-ditiona) (**Figura 4d**).

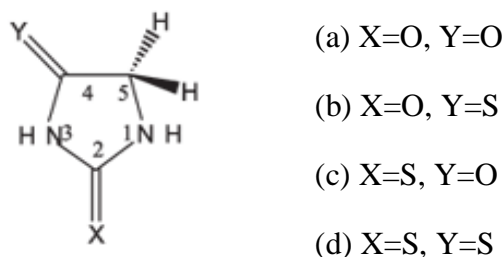


Figura 4 Estruturas químicas: (a) hidantoína (imidazolidina-2,4-diona); (b) 2-Tioxo-imidazolidin-4-ona; (c) 4-Tioxo-imidazolidin-4-ona; (d) Imidazolidina-2,4-ditiona Adaptada de Oliveira et al., (2008).

Em relação à ação anticonvulsivante, a 5,5-difenil-hidantoína, denominada genericamente de fenitoína (DPH) (**Figura 5A**) é amplamente utilizada como o anticonvulsivante de escolha no tratamento das crises epiléticas, especificamente de convulsões parciais e tônico-clônicas, mas não nas crises de ausência. A sua descoberta causou grande impacto na indústria farmacêutica (SUDO et al., 2010).

A DPH é droga de primeira linha para tratamento de muitas formas de epilepsia, tanto pela sua boa eficácia quanto pelo seu custo acessível. Seu mecanismo de ação consiste no efeito estabilizador da membrana neuronal através da inibição dos canais de sódio sensíveis à voltagem, reduzindo o fluxo iônico tanto durante o repouso quanto durante o potencial de ação. Altera concentrações locais de neurotransmissores como GABA, noradrenalina e acetilcolina. Dessa maneira, a DPH impede que haja deflagrações neuronais repetitivas provocadas pela passagem de corrente intracelular sem causar depressão geral do sistema nervoso central (SNC). De um modo geral diminui a excitação neuronal em geral. Seu uso, entretanto, não é isento de efeitos adversos, sendo o mais comum a disfunção cerebelar após intoxicação aguda, levando a sintomas como diplopia e ataxia (DEL NEGRO et al., 2000).

Existem relatos de que a DPH, durante estudos de sua bioativação *in vitro*, produz compostos reativos intermediários indutores de radicais livres e pode ter efeitos teratogênicos em camundongos, pela ação de um dos seus metabólitos epóxidos (WELLS et al., 2010). De acordo com o CDER (*Center for Drug Evaluation and Research*) a fenitoína pertence ao grupo 2B, portanto considerada como um possível carcinógeno para humanos, pela avaliação em testes citogenéticos *in vitro*, como também em testes com bactérias, em teste citogenéticos *in vivo* em roedores, incluindo também os testes de carcinogenicidade. Estudos recentes corroboram com as informações anteriores confirmando que a fenitoína pode induzir câncer de esôfago, fígado, pulmão e leucemia linfocítica (FRIEDMAN et al., 2009).

A alantoína ou 5-ureído-hidantoína (**Figura 5B**) possui propriedade cicatrizante, sendo largamente empregada na clínica. Fármacos contendo o anel hidantoínico, como os genéricos

nifurfolina, nifurtoinol e nitrofurantoína (**Figuras 5C, D e E**, respectivamente), apresentam propriedades antibacteriana e antisséptica. A nitrofurantoína, mais utilizada como antisséptico, devido a sua capacidade de inibir a desidrogenase bacteriana, provocando a inibição da síntese proteica, é amplamente comercializada em diversos países no mundo (OLIVEIRA et al., 2008).

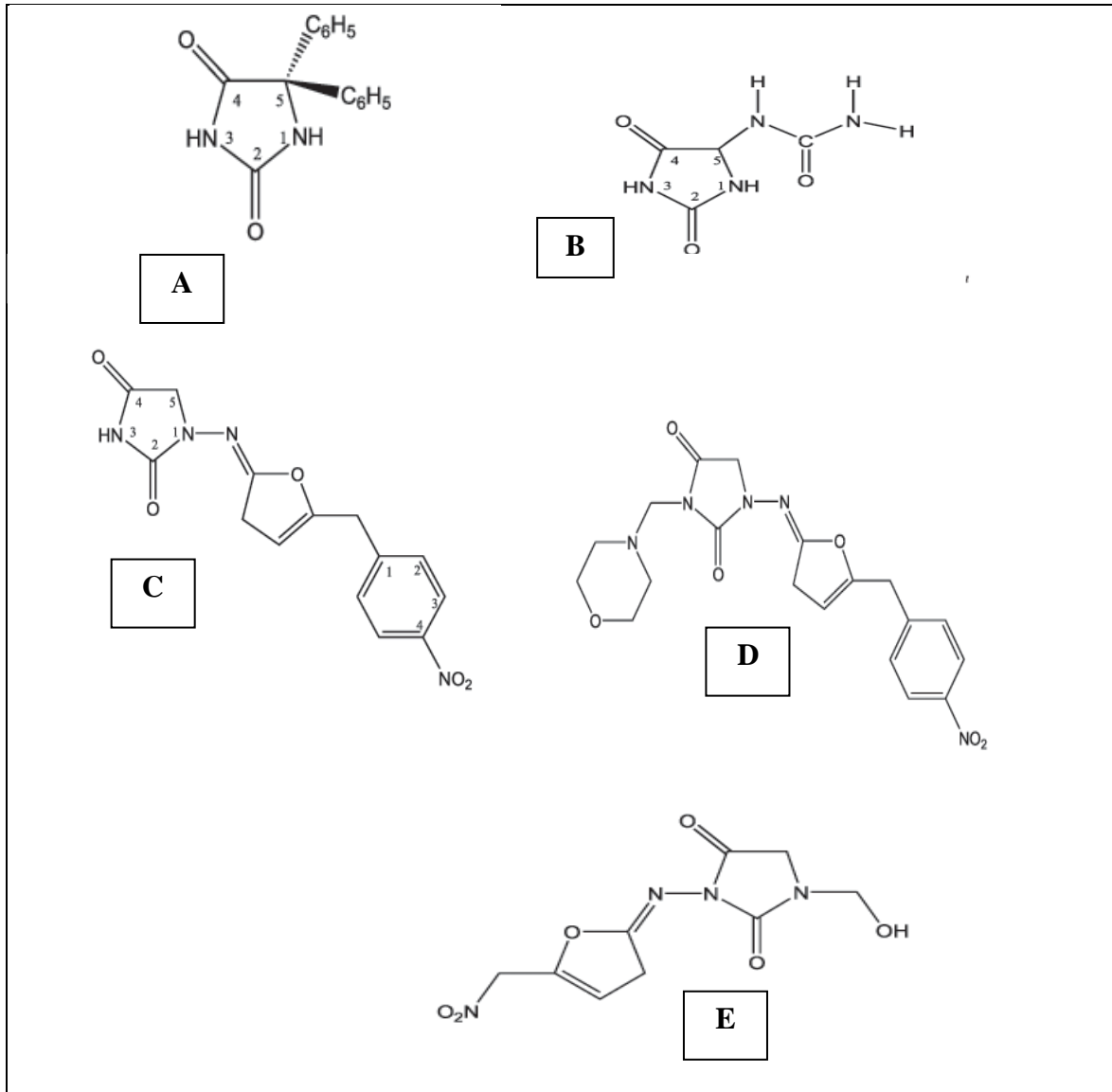


Figura 5 Estrutura química de fármacos derivados imidazolidínicos: A: Fenitoína (5,5-difenil-hidantoína); B: Alantoína (5-ureído-hidantoína); C: 1-[(4-nitro-fenil)-5-furfurilideno-amino]-imidazolidina-2,4-diona; D: Nifurfolina; E: Nitrofurantoína. Adaptada de Oliveira et al. (2008).

Compostos contendo o sistema imidazolidínico possuem propriedade antifúngica e antibacteriana. A iprodiona [3-(3,5-diclorofenil)-*N*-isopropil-2,4-dioxo-imidazolidina carboxiamida] constitui o fungicida hidantoínico mais importante, inibindo ao mesmo tempo

a germinação de esporos e o crescimento de micélios de fungos. Por outro lado, as moléculas 5-(aril-metileno)-hidantoínas e 5-(aril-metileno)-2-tio-hidantoínas, obtidas pela condensação de aldeídos aromáticos com hidantoínas ou tio-hidantoínas, apresentam atividades fungicida e bactericida. Na década de 90, pesquisadores demonstraram que parâmetros lipofílicos e eletrônicos explicam a variância das atividades biológicas hipoglicemiantes de uma série de hidantoínas e tiazolidinas (OLIVEIRA et al. 2008).

3 Ação analgésica resultante da ativação dos receptores α_2 -adrenérgicos

Atualmente, a busca por novas moléculas com efeito analgésico sobre o sistema nervoso central tem se mostrado clinicamente relevante, tendo em vista o número limitado de drogas disponíveis com essa propriedade (SUDO et al., 2010). Vários fármacos têm sido utilizados para promover sedação e analgesia em pacientes. Barbitúricos, opióides, benzodiazepínicos, entre outros, são administrados isolados ou em associação para alcançar este propósito. Entretanto, verifica-se que tais drogas, apesar de ótimos analgésicos ou sedativos, não alcançam um ponto de equilíbrio entre sedação e analgesia apropriados. Além disso, muitas dessas drogas apresentam efeitos adversos importantes, limitando o seu uso (BAGANTINE et al., 2002). Muitos receptores e substâncias que modulam a transmissão da dor têm sido identificados. Existe enorme variedade de agentes que atuam especificamente ou não em receptores e é provável que a sua utilização, isolada ou combinada, implique maior controle dos sintomas álgicos com menor ocorrência de efeitos indesejáveis (SCHOLZ et al., 2000).

Diversos estudos têm demonstrado que os agonistas α_2 -adrenérgicos apresentam importante papel na modulação da dor, inibindo a condução nervosa (TAYLOR et al., 2005). Tais agentes apresentam excelentes propriedades sedativas e analgésicas associados à ausência de depressão respiratória. Alguns α_2 -agonistas têm grande seletividade a receptores específicos, sendo usados como medicação pré-anestésica, atuando na adjuvância da anestesia geral, ou como sedativos e medicação pós-operatória. A sua associação como adjuvante em anestesia locorregional proporcionaria uma interação farmacológica sinérgica com aumento da duração de ação dos anestésicos locais, estabilidade hemodinâmica, sedação, analgesia e ausência de depressão ventilatória (MAGALHÃES et al., 2006).

A estrutura dos α_2 -adrenorreceptores é similar à maioria dos outros receptores neuronais, incluindo outros receptores adrenérgicos como α_1 , β , muscarínico, dopamina,

opióide, adenosina e serotonina. Cada receptor é composto por uma cadeia polipeptídica que atravessa a membrana celular. A porção intermembranosa hidrofóbica de cada receptor adrenérgico é similar em sua estrutura primária, de modo que esta porção hidrofóbica é provavelmente o sítio no qual a norepinefrina é reconhecida. No citoplasma celular, entretanto, as proteínas dos receptores adrenérgicos apresentam consideráveis diferenças em sua estrutura. As características das respostas adrenérgicas são atribuídas às características estruturais dos receptores, especialmente na maneira com que eles promovem seus contatos com os nucleotídeos de guanina (proteína G). Nesta os α_2 -receptores estão funcionalmente ligados (BRAGATINE et al., 2002). Os receptores α_2 são encontrados tanto nos sistemas nervoso central e periférico quanto em tecidos não-neuronais como plaquetas, hepatócitos e células musculares lisa, podendo ser pré e pós-sinápticos. Os pré-sinápticos modulam a liberação de noradrenalina e adenosina trifosfato por meio de mecanismo de retroalimentação inibitório. Com relação aos pós-sinápticos, como os situados na musculatura lisa dos vasos, causam liberação de transmissores quando ativados (VIEIRA et al., 2004).

Duas nomenclaturas distintas, baseadas em suas propriedades farmacológicas ou molecular biológica, concordam com a existência de no mínimo três diferentes tipos de α_2 -receptores. A nomenclatura que se baseia em estudos farmacológicos subdivide o receptor α_2 em: α_2 A, α_2 B, α_2 C. Já a nomenclatura de estudos de biologia molecular, que usa como critério a localização cromossômica do gene, subdivide o receptor a em: α_2 C2, α_2 C4, α_2 C10 (DOCHERTY et al., 1998). O funcionamento dos receptores quando ativados por um agonista é o de inibir a enzima adenilato ciclase, que causa conseqüentemente diminuição do AMP cíclico (AMPC) intracelular. A diminuição do AMPC é um dos mecanismos pelo qual os efeitos dos α_2 -adrenorreceptores é mediado. Uma diminuição no AMPC causa atenuação da ativação das proteínas alvo reguladoras, impedindo sua fosforilação, que, por sua vez, altera a resposta biológica celular. Outro mecanismo é através da saída de potássio (K^+) do meio intracelular através de um canal ativado. A ativação dos α_2 -adrenorreceptores pré-sinápticos pode, ainda, bloquear a entrada de cálcio no terminal nervoso. Este fato pode ser responsável pelos efeitos inibitórios que os agonistas α_2 exercem sobre a exocitose de neurotransmissores como a noradrenalina (SCHNAIDER et al., 2005).

Diversos estudos indicam que os fármacos agonistas dos receptores α_2 -adrenérgicos apresentam importante papel na modulação da dor, inibindo a condução nervosa. O uso concomitante de agonistas dos receptores α_2 -adrenérgicos com a morfina tem sido experimentalmente e clinicamente reportado com o intuito de redução dos efeitos colaterais e aumento da eficácia de tal opióide (BRAGATINE et al., 2002).

A morfina é a única droga aprovada pela *United States Food and Drug Administration* (FDA) para uso contínuo no espaço subaracnóideo. Entretanto, estudos clínicos e em animais têm sido realizados no intuito de propor novas alternativas para o uso de opióides. Estes estão associados a efeitos colaterais indesejáveis e a um estigma fortíssimo entre leigos ou mesmo entre médicos, fatos que têm contribuído para a busca de novos medicamentos analgésicos adjuvantes. Desta forma, tem sido proposto o uso de outras classes de fármacos para o manuseio da dor. Muitos receptores e substâncias que modulam a transmissão da dor têm sido identificados. Existe enorme variedade de agentes que atuam especificamente ou não em receptores e é provável que a sua utilização, isolada ou combinada, implique em maior controle dos sintomas algícos com menor ocorrência de efeitos indesejáveis (SCHOLZ et. al., 2000).

Alguns α_2 -agonistas, por via subaracnóidea, têm sido utilizados em combinação com diferentes opióides, o que provoca potencialização dos efeitos anestésicos e analgésicos (EBERHART et al., 2000). A intensificação da atividade anestésica local é decorrente do bloqueio do impulso nervoso nas fibras A-delta e C, aumento na condutância ao potássio em neurônios isolados, hiperpolarizando-os e por um mecanismo de vasoconstrição mediado por receptores α_2 -adrenérgicos pós-sinápticos reduzindo a absorção e permitindo maior tempo de contato do anestésico com o tecido neural (BAIN et al., 1999; EGER et al., 2000; STOCHE et al., 2002). Como os opióides lipofílicos, é possível conseguir analgesia pela administração sistêmica, peridural ou subaracnóidea da clonidina. No entanto, a analgesia é mais potente após a administração neuroaxial indicando o local de ação espinal e favorecendo a administração por essa via (BAIN et al., 1999). A combinação de fármacos α_2 -adrenérgicos com opióides, por via subaracnóidea, é capaz de prolongar a duração da analgesia (EISENACH et al., 1996).

A analgesia é decorrente de sua ação em locais periféricos, supraespinhais e, sobretudo, espinhais, por meio da ativação de receptores α_2 -pós-sinápticos das vias descendentes noradrenérgicas, ativação de neurônios colinérgicos, mediados pela acetilcolina, liberação de óxido nítrico, havendo forte correlação entre a concentração de clonidina no líquido cefalorraquidiano e a atividade analgésica (PAECH et al., 2004; ROELANTS et al., 2005). A ação analgésica inibe o aparecimento da sensibilização central produzida pela estimulação repetida de fibras aferentes C, o que resulta em liberação central de substância P, neurocinina A, glutamato e aspartato, que uma vez liberados podem agir em receptores AMPA, NMDA e metabotrópico, impedindo o fenômeno de facilitação central na medula espinal e de plasticidade sináptica (FONSECA e OLIVEIRA, 2001).

As citocinas pró-inflamatórias podem modular a dor indiretamente, alterando a transmissão de substâncias neuroativas, como óxido nítrico, radicais livres, prostaglandinas e aminoácidos excitatórios da micróglia e astrócitos. A interleucina-6 (IL-6), a principal citocina pró-inflamatória, é produzida, precocemente, duas a quatro horas após a lesão tecidual e representa o estímulo primário na fase aguda, que dura 24 a 36 horas. Os agonistas α_2 -adrenérgicos diminuem os níveis de IL-6 porque reduz a atividade da adenilciclase, reduzindo os níveis de monofosfato cíclico de adenosina (WU et al., 2004). A atividade antinociceptiva ocorre para a dor somática e visceral (BENHAMOUR et al., 1998; BRAZ et al., 2003).

Os seguintes grupos de compostos químicos são responsáveis pela ativação dos receptores α_2 -adrenérgicos: imidazolidinas, feniletilaminas e oxalozepinas (BAGATINE et al., 2002). Nesse grupo, os derivados imidazolínicos têm papel de destaque, uma vez que têm alta afinidade pelos receptores α_2 -adrenérgicos, podendo estimular receptores pré-sinápticos dos centros de controle cardiovascular do sistema nervoso central, determinando a inibição da atividade simpática cerebral (BUCARETCHI et al., 2003).

A clonidina, N-(2,6-diclorofenil)-4,5-diidro-1H-imidazol-2-amina, (**Figura 6**), é o composto imidazolidínico protótipo dos α_2 -agonistas adrenérgicos. Tem efeito anti-hipertensivo, sedativo, inibidor de hiperatividade adrenérgica, bem como potente propriedade analgésica, antissialogoga e de diminuição da pressão intraocular. A clonidina como medicação pré-anestésica reduz a incidência de isquemia miocárdica intraoperatória, melhora o controle metabólico em pacientes diabéticos, reduz a incidência de náuseas e vômitos no pós-operatório e reduz ou abole os tremores no pós-operatório (CRUZ et al., 2009).

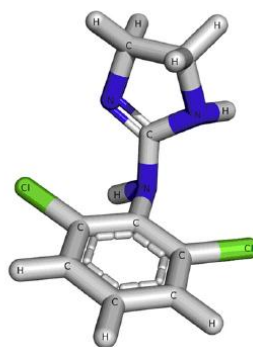


Figura 6 Fórmula estrutural da clonidina. Adaptada de Sudo et al. (2010)

A clonidina é rápida e completamente absorvida após administração oral, apresentando pico de concentração plasmática entre 60 e 90 minutos, por esta via. Por ser altamente lipossolúvel atravessa com facilidade a barreira hematoencefálica, distribuindo-se

pelo sistema nervoso central, interagindo com os receptores α_2 -adrenérgicos medular e supra-medular. Pode ser usada também por via transdérmica, porém necessita de pelo menos dois dias para que a concentração terapêutica seja alcançada. A meia-vida de eliminação da clonidina situa-se entre 9 e 12 horas. Aproximadamente 50 % da droga é metabolizada no fígado em metabólitos inativos, sendo que o restante da droga é excretada inalterada por via renal. Os espaços peridurais e subaracnóides são sítios onde também se faz o uso da clonidina (ALVES et al., 2002). Apresenta por estas vias uma correlação muito forte entre intensidade do efeito e a concentração da droga no fluido cérebro-espinhal. Comparativamente às vias de administração, venosa, muscular, oral, peridural e retal, usando-se concentrações semelhantes, observam-se efeitos mais pronunciados quando é feito uso da droga pela via subaracnóidea. Na criança pode ser usada por via retal com uma biodisponibilidade maior do que 90 % (BAGATINE et al., 2002).

Como adjuvante das técnicas neuroaxiais, a clonidina aumenta de maneira dose-dependente a duração dos bloqueios sensitivos e motores, por um mecanismo que afeta, principalmente, os receptores adrenérgicos sinápticos e tem propriedades antinociceptivas. No controle da dor pós-operatória, pode ser usada como fármaco adjuvante tanto para opióides sistêmicos como espinhais (FRIEDBERG, 2000).

A sua segurança na prática anestésica já foi amplamente estudada e confirmada. Quando usada como medicação pré-anestésica, proporciona redução na demanda de anestésicos inalatórios e venosos. A adição de fármacos aos anestésicos locais é utilizada para melhorar a qualidade da anestesia subaracnóidea (STOCHE et al., 2004).

A clonidina diminuiu a pressão arterial, inibindo a atividade neural simpática pré-ganglionar da medula espinhal e por ação no tronco encefálico (KLINSCHA et al., 1995). Em anestesia obstétrica, as doses de clonidina variam de 15 a 200 μg e produzem efeitos hipotensivos, porque ela é ligeiramente hipobárica à temperatura corporal, ocorrendo difusão rostral, sobretudo após a injeção subaracnóidea (STREBEL et al., 2004). A hipotensão arterial por α_2 -agonista é corrigida com facilidade pela administração de α_1 -adrenérgicos, como a efedrina, que apresenta resposta vasoconstritora aumentada na presença desse fármaco (BRAZ et al., 2003).

A medetomidina, 1,2,3-dimetilfeniletil-imidazol (**Figura 7**), é um exemplo de α_2 -adrenorreceptores agonistas superseletivos. É extremamente potente, sendo que concentrações nanomolares pequeníssimas são suficientes para evidenciar seu efeito. Em comparação com a clonidina, apresenta uma seletividade muito maior em relação aos receptores α_2 -adrenérgicos (BAGATINE et al., 2002).

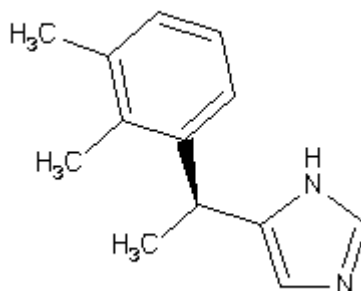


Figura 7 Estrutura química da medetomidina. Adaptada de Bagantine et al. (2002)

A dexmedetomidina, 4(S)-[1-2,3-dimetilfenil[etil]imidazol (**Figura 8**), é o isômero *d* da medetomidina. A ação desse fármaco ocorre, sobretudo, nos receptores α_2 pré-sinápticos, inibindo a liberação de noradrenalina por retroalimentação negativa e na região pós-sináptica em diversos locais do organismo, levando a efeitos como contração da musculatura lisa dos vasos, hipertensão arterial, bradicardia, sedação e analgesia. Em decorrência da relação de especificidade, baixas doses apresentam potente ação sedativa, sem que se observem os efeitos indesejáveis cardiovasculares originados pela ativação dos receptores α_1 . Inicialmente, a dexmedetomidina foi aprovada pelo *Food and Drug Administration* (FDA) para sedação em Unidades de Terapia Intensiva (UTI), porém seu perfil farmacológico e suas diversas áreas de ação fizeram dela um agente que vem sendo utilizado com crescente frequência como fármaco adjuvante em Anestesiologia, proporcionando boa estabilidade hemodinâmica durante o ato anestésico-cirúrgico (HERBERT et al., 2007).

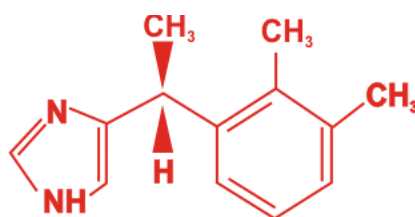


Figura 8 Estrutura química da dexmedetomidina. Adaptada de Herbert et al. (2007)

O composto PT-31 é uma imidazolidina-2,4-diona, relacionado, estruturalmente, com a clonidina, cuja fórmula química é: 3-(2-cloro-6-fluorobenzil)-imidazolidina-2,4-diona (**Figura 9**).

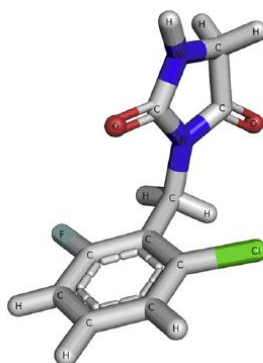


Figura 9 Fórmula estrutural do PT-31. Adaptada de Sudo et al.(2010).

A síntese química do PT-31 foi realizada por Sudo et al. (2010) no Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica (NPIT) da Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, PE, Brasil. No processo de síntese, a 3-alkilação do anel imidazolidina ocorre em duas etapas: a posição três é ativada pela formação de sal sódico ou potássico seguida pela condensação com cloreto de 2-cloro -6-fluorobenzil a quente. Em resumo, o processo é descrito a seguir.

Uma solução de hidróxido de sódio (1,2 g, 0,03 mol) em 70% de etanol (20 mL) foi adicionada, gota a gota, a uma suspensão agitada de imidazolidina-2,4-diona (3 g, 0,03 mol) em 70% de etanol (5 mL). Decorridos 10 minutos, o radical 2-cloro-6-fluorobenzil cloreto (3,83 mL, 0,03 mol) foi adicionado. A mistura da reação foi agitada por 5 minutos e depois deixada em repouso por 15 horas. Após o resfriamento, o precipitado obtido foi filtrado e cristalizado com 95% de etanol e purificado por cromatografia em sílica com n-hexano.

Em estudos realizados por Sudo et al. (2010), evidenciou-se a atividade antinociceptiva e o sinergismo com a morfina do PT-31. A administração intraperitoneal de PT-31 em camundongos produziu antinocicepção dose-dependente nas doses de 1,5,10 e 15 mg/kg, evidenciada no teste da placa quente. A sua associação com a morfina potencializou a atividade antinociceptiva, sendo que a sinergia entre esses dois compostos foi demonstrada através de análise de isoblograma. Evidenciou-se, também, a reversão dos efeitos do PT-31, com o uso de antagonistas seletivos e não-seletivos dos receptores α_2 -adrenérgicos (ioimbina e BRL 44408, respectivamente), determinando-se que o seu mecanismo de ação seria a interação com os receptores α_2A adrenérgicos. Foi realizada, também, análise conformacional através do *Software BioMedCache* pelo método AM1, determinando-se uma afinidade relevante do PT-31 pelos receptores α_2A adrenérgicos, quando em comparação com a clonidina (**Figura 10**). O mecanismo aventado pelo modelo molecular foi a formação de uma ponte de hidrogênio entre o PT-31 e o resíduo IL-190 do receptor α_2A adrenérgico.

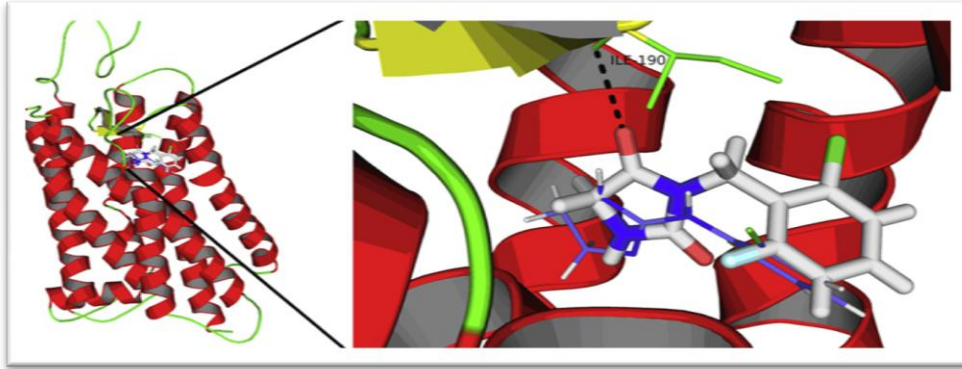


Figura 10 Mecanismo de ação do PT-31. Adaptada de Sudo et al. (2010)

Alguns estudos complementares, incluindo dados de dose-tolerabilidade, ainda são necessários, com o intuito do estabelecimento de um potencial clínico para o PT-31.

6 Considerações Finais

Sem sombra de dúvidas, é crescente o interesse na pesquisa e desenvolvimento farmacêutico de novas imidazolidinas, tendo em vista as suas atividades biológicas diversificadas. No que diz respeito às atividades analgésica e sedativa, novos fármacos imidazolidínicos com propriedades α_2 -agonistas tornam-se um recurso adicional para a prática clínica da anestesiologia e analgesia, mostrando-se bastante promissores.

Referências

- ALVES T.C.A. et al. Efeitos da associação da clonidina à ropivacaína na anestesia peridural. **Rev. Bras. Anesthesiol.**, v. 52, p. 410-419, 2002.
- AMARAL, P A et al. Química combinatória: moderna ferramenta para a obtenção de candidatos a protótipos de novos fármacos. **Rev. Bras. Cienc. Farm**, v.39, n.4, p. 351-363, 2003.
- ARDUENGO, A. J et al. Electronic stabilization of nucleophilic carbenes . **J. Am. Chem. Soc.** v 11, n 9, p. 55-59, 1992.
- BAGATINI, A. et al. Dexmedetomidina: farmacologia e uso clínico. **Rev. Bras. Anesthesiol.** v.52, n.5, p. 606-617, 2002.
- BAIN J. et al Day surgery in Scotland: patient satisfaction and outcomes. **Qual Health Care**, v. 8 p. 86-91, 1999.

BRAZ J.R.C., KOGUTI E.S., BRAZ L.G. et al. Efeitos da associação da clonidina à bupivacaína hiperbárica na anestesia subaracnóidea alta. **Rev Bras Anesthesiol**, v. 53, p. 561-572, 2003.

BENHAMOU D., THORIN D., BRICHANT J.F. et al. Intrathecal clonidine and fentanyl with hyperbaric bupivacaine improves analgesia during cesarean section. **Anesth Analg.**, v.87, p. 609-613, 1998.

BROWN, E.G. Ring Nitrogen and Key Biomolecules. **Academic Press**, v.23, n.4, p. 353-367, 1998.

BUCARETCHI, F. et al. Exposição aguda a derivados imidazolínicos em crianças. **J. Pediatria**, v.79, n.6, p. 519-524, 2003.

CALIXTO, J.B.; SIQUEIRA, J.M. Desenvolvimento de Medicamentos no Brasil. **Gaz med Bahia**. v. 78, n. 1, p. 98-106, 2008.

CHUNG, M.C. et al. O processo de latenciação do planejamento de fármacos. **Quím. Nova.**, v. 1, n. 22, p. 75-84, 1999.

CRUZ, J. R. S. et al. Clonidina como medicação pré-anestésica em facectomias: comparação entre as doses de 100 µg e 200 µg. **Rev. Bras. Anesthesiol**. v. 59, n.6, p. 694-703, 2009.

DEL NEGRO, A. et al. Relação dose-dependente do uso crônico de fenitoína e atrofia cerebelar em pacientes com epilepsia. **Arq. Neuro-Psiquiatr**. v..58, n.2A, p. 276-281, 2000.

DOCHERTY J.R. Subtypes of functional α_1 - and α_2 -adrenoceptors. **Eur J Pharmacol**, v.361; p.1-15, 1998.

EBERHART L.H. et al. Clonidine compared to midazolam for intravenous premedication for ambulatory procedures. A controlled double blind study in ASA I patients. **Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzthe**, v. 35, p. 388-393, 2000.

EGER E.I. et al. Clinical and economic factors important to anaesthetic choice for day-case surgery. **Pharmacoeconomics**, v. 17, p. 245-262, 2000.

EISENACH J.C. et al. Alpha 2-adrenergic agonists for regional anesthesia: a clinical review of clonidine (1984-1995). **Anesthesiology**, v. 85, p. 655-674, 1996.

FIOCRUZ (Fundação Oswaldo Cruz). A história da terapêutica da doença de chagas, 2009. Acessado em: 05 de março de 2011. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=126>.

FONSECA N.M, OLIVEIRA C.A. Efeito da clonidina associada à bupivacaína a 0,5% hiperbárica na anestesia subaracnóidea. **Rev Bras Anesthesiol**, v.51, p. 483-492, 2001.

FRIEDBERG B.L. et al. Clonidine premedication decreases propofol consumption during bispectral index (BIS) monitored propofol-ketamine technique for office-based surgery. **Dermatol Surg**, v.26,p.848-852, 2000.

FRIEDMAN, G.D. et al. Epidemiologic evaluation of pharmaceuticals with limited evidence of carcinogenicity. **Int J Cancer**. v. 125, n. 9, p. 2173–2178, 2009.

GRIMMETT, M. R. Imidazole and Benzimidazole Synthesis. **Academic Press**, v.31, n.3, p. 313-321, 1997.

HERBERT, B.A.G. et al. Uso de dexmedetomidina em neurocirurgia. **Rev. Bras. Anesthesiol**. v.57, n.2, p. 223-231, 2007.

KLIMSCHA W., CHIARI A., KRAFFT P. et al. Hemodynamic and analgesic effects of clonidine added repetitively to continuous epidural and spinal blocks. **Anesth Analg**, v. 80, p.322-327,1995.

MAGALHAES, E. et al. A dexmedetomidina para sedação, por via venosa, não interfere com a duração dos bloqueios sensitivo e motor da raquianestesia. **Rev. Bras. Anesthesiol**. v.56, n.1, p. 01-07, 2006.

OLIVEIRA, S. M. et al. Estrutura, reatividade e propriedades biológicas de hidantoínas. **Quím. Nova** v.31, n.3, p. 614-622, 2008.

PAECH M.J., PAVY T.J.G., ORLIKOWSKI C.E.P. et al Postcesarean analgesia with spinal morphine, clonidine, or their combination. **Anesth Analg**, v. 98, p. 1460-1466, 2004.

PEDEN C. J. et al. The effect of intravenous dexmedetomidine premedication on the dose requirement of propofol to induce loss of consciousness in patients receiving alfentanil. **Anaesthesia**, v. 56, p. 408-413, 2010.

PITTA, M. G. R. et al. New imidazolidinic bioisosters: potential candidates for antischistosomal drugs. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. v.101, suppl.1, p. 313-316, 2006.

POZHARSKII, A.F, et.al. Heterocycles in Life and Society. **John Wiley & Sons**, v. 21, p 81-88, 1997.

ROELANTS F. et al. Epidural administration of neostigmine and clonidine to induce labor analgesia. **Anesthesiology**, v. 102, p.1205-1210, 2005.

TAYLOR, S. B. et al. Efeito analgésico intra-operatório da cetamina, clonidina ou dexmedetomidina, administradas por via peridural, em cirurgia de abdômen superior. **Rev. Bras. Anesthesiol**, v.55, n.5, p. 525-531, 2005.

SCHOLZ J. et al. Alpha-2 adrenoceptor agonists in anaesthesia: a new paradigm. **Curr Opin Anaesthesiol**, v. 13: 437-442, 2000.

SUDO, T. R. et. al. Interaction of Morphine With a New α_2 -Adrenoceptor Agonist in Mice. **The Journal of Pain**, v.. 11, n.1. p 71-78, 2010.

STEFANI, H. A. **Introdução à Química dos Compostos Heterocíclicos**. 1 ed. Guanabara Koogan, 2009, 286p.

STOCCHÉ, R.M. et al. Influência da clonidina por via venosa no custo de anestesia com sevoflurano em cirurgias de ouvido médio em regime ambulatorial. **Rev. Bras. Anesthesiol**. v 54, n.1, p. 91-98, 2004.

STREBEL S., GURZELER J.A., SCHNEIDER M.C. et al. Small-dose intrathecal clonidine and isobaric bupivacaine for orthopedic surgery: a dose-response study. **Anesth Analg**, v. 99, p. 1231-1238, 2004.

VIEIRA, A. M. et al. **Clonidina e dexmedetomidina por via peridural para analgesia e sedação pós-operatória de colecistectomia**. **Rev. Bras. Anesthesiol**. v..54, n.4, p. 473-478, 2004.

WELLS, P.G. et al. Oxidative stress in developmental origins of disease: teratogenesis, neurodevelopmental deficits, and cancer. **Toxicol Sci**. v.108, p. 4-18, 2010.

WERMUTH, C. Selective optimization of side activities: another way for drug discovery. **J. Med. Chem.**, v. 6, n. 47, p. 1303-1314, 2004.

WU C.T., JAO S.W., BOREL C.O. et al. The effect of epidural clonidine on perioperative cytokine response, postoperative pain, and bowel function in patients undergoing colorectal surgery. **Anesth Analg**, v. 92; p. 502-509, 2004.

Biomarcadores Micronúcleos e Cometa em roedores e teste *Allium cepa* na avaliação genotóxica de fármacos

LUCIO NETO, M.P.¹; MELO-CAVALCANTE, A.M.¹.

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal do Piauí - UFPI, Teresina-PI, Brasil.

Resumo

A preocupação dos efeitos mutagênicos e carcinogênicos induzidos por fármacos sobre a população humana é cada vez maior. O monitoramento adequado de tais agentes vem sendo considerado como um dos mecanismos de prevenção e controle de algumas reações adversas e efeitos colaterais, o que inclui diversas desordens genéticas. Alguns biomarcadores de genotoxicidade e mutagenicidade são utilizados para a avaliação de efeitos agudos e crônicos de fármacos, podendo predizer um perfil de segurança e eficácia de novas moléculas. Nesse contexto, alguns bioensaios têm sido utilizados. O Teste de Micronúcleos é internacionalmente aceito como parte da bateria de testes recomendada para a avaliação mutagênica e registro de novos fármacos que entram, anualmente, no mercado mundial. Outro teste aceito é o Ensaio do Cometa, que tem sido empregado em biomonitoramento de populações, para avaliar genotoxicidade e capacidade de reparo de danos ao DNA em humanos, animais e populações de plantas, fármacos, bem como em aplicações clínicas. No que diz respeito aos sistemas vegetais, o teste com a cebola *Allium cepa* é o mais antigo relatado na literatura. As vantagens no uso de *A. cepa* se encontram em ser uma espécie com pequeno número de cromossomos, ter um ciclo celular relativamente curto e controlável em condições estáveis, envolver um método barato, rápido e de fácil manuseio e, sobretudo, por fornecer boa concordância com outros bioensaios de genotoxicidade. Nessas condições, verifica-se que, dentre os diversos bioensaios de genotoxicidade e mutagenicidade a fármacos, o Ensaio Cometa, o Teste de Micronúcleos e *A. cepa*, cada um com suas especificidades, vantagens e desvantagens, vêm sendo bastante utilizados, sendo importantes para o diagnóstico de possíveis efeitos mutagênicos e genotóxicos, reparo celular e na prevenção de riscos a curto ou a longo prazo de exposição. Correlações entre esses bioensaios podem contribuir para o entendimento da complexidade molecular da exposição a fármacos em estudos de genética toxicológica.

Palavras-chave: Fármacos; Mutagenicidade; Genotoxicidade; Teste *Allium cepa*; Ensaio Cometa; Teste de Micronúcleos.

Abstract

The concern of the mutagenic and carcinogenic effects induced by drugs on the human population is increasing. Adequate monitoring of these agents has been considered as one of the mechanisms of prevention and control of some adverse reactions and side effects, including various genetic disorders. Some biomarkers of genotoxicity and mutagenicity are used for the evaluation of acute and chronic effects of drugs, one can predict the safety profile and efficacy of new molecules. In this context, some bioassays have been used. The Micronucleus test is internationally accepted as part of the battery of tests recommended for the evaluation and registration of new mutagenic Pharmacy entering annually in the world market. Another test is the accepted test of the Comet, which has been used in biomonitoring of populations, to evaluate genotoxicity and ability to repair DNA damage in human, animal and plant populations, drugs, and clinical applications. With regard to plant systems, the test with the onion *Allium cepa* is the oldest reported in the literature. The advantages in the use of *Allium cepa* are found to be species with a small number of chromosomes, have a relatively short cell cycle in a stable and controllable, involve an inexpensive, quick and easy to handle and, above all, to provide good agreement with other bioassays for genotoxicity. Under these conditions, it appears that among the various bioassays for genotoxicity and mutagenicity of drug, the Comet assay, the Micronucleus test and *Allium cepa*, each with its specific features, advantages and disadvantages, have been widely used, is important for the diagnosis of possible mutagenic and genotoxic, cellular repair and prevention of risks in the short or long term exposure. Correlations between these bioassays can contribute to understanding the molecular complexity of exposure to drugs in genetic toxicology studies.

Keywords: Drugs; Mutagenicity; Genotoxicity; *Allium cepa* test; Comet assay; Micronuclei test.

1 Introdução

A espécie humana, durante toda a sua evolução, vem sendo exposta a uma infinidade de agentes químicos, seja pela ingestão de alimentos, bebidas, consumo de medicamentos entre outros. A exposição a agentes químicos genotóxicos em nosso ambiente pode causar uma variedade de efeitos danosos à saúde. Alguns desses efeitos se expressam imediatamente, enquanto outros levam anos para se manifestar. Efeitos tardios bem conhecidos incluem a indução do câncer, doenças genéticas nas gerações seguintes, entre outros (MALUF e ERDTMANN, 2003).

As lesões do DNA em sítios específicos do genoma podem levar a mudanças na sequência de nucleotídeos, através de processos tais como síntese translesão ou de recombinação, causando mutagênese e respostas celulares inesperadas. Agentes mutagênicos são capazes de invadir as células e dirigirem-se ao núcleo causando alterações no material genético, podendo desregular o ciclo celular. Isso faz com que a célula se reproduza descontroladamente, invadindo tecidos adjacentes. Alguns tipos de lesões ao DNA podem ser revertidas diretamente, retornando-se para a sequência original. Entretanto, na maioria dos casos, o DNA danificado é processado por um ou mais dos vários mecanismos de reparo celular. A localização do dano e a eficiência do reparo em certas sequências de DNA podem ter diferentes efeitos críticos sobre parâmetros biológicos, tais como mutações, transformação ou morte celular, distribuição dos danos por todo o genoma ou o seu reparo. Conhecer os componentes físicos, químicos e biológicos, que causam alterações gênicas, é necessário para melhor preservar a saúde humana (ALBERTS et al., 2002; SPIVAK et al., 2009).

O termo mutação consiste em alterações súbitas e herdáveis na estrutura do genoma e, como tal, é uma fonte extremamente importante de variabilidade genética nas populações de seres vivos (BURNS e BOTTINO, 1991). Entretanto, a curto prazo e do ponto de vista de um único organismo, a alteração genética é quase sempre prejudicial, especialmente em organismos multicelulares, nos quais a alteração genética está mais inclinada a perturbar o desenvolvimento e a fisiologia extremamente complexos e, finalmente, sintonizados, de um organismo (SPIVAK et al., 2009).

As mutações são detectadas, frequentemente, através da expressão fenotípica, causada por uma mudança súbita e hereditária no genótipo de um organismo, alterando suas características. A ocorrência de mutações, no entanto, depende da natureza da lesão e das respostas celulares aos danos no DNA. Basicamente, as mutações são divididas em duas grandes categorias: mutações gênicas e cromossômicas. As mutações gênicas são alterações

que ocorrem na sequência de nucleotídeos do DNA e as cromossômicas, são as que produzem alterações no número ou na estrutura dos cromossomos e são detectadas por análises citogenéticas celular (RIBEIRO et al., 2003).

Alterações na dinâmica do genoma são indicativos de câncer, as quais refletem em mutações que acometem genes importantes para manutenção celular, produzindo ganho (oncogene) ou perda de função (genes supressores tumorais). Várias evidências indicam que a tumorigênese em humanos é um processo que envolve vários passos e que esses refletem em alterações genéticas que guiam a progressiva transformação de células humanas. Algumas alterações como sinais de crescimento autossuficientes, não sensibilidade a inibidores de crescimento, perda da morte celular programada (apoptose), potencial replicativo sem limite, angiogênese sustentada, invasão tecidual e metástase, são essenciais e podem explicar a grande diversidade de cânceres e tumores, as quais determinariam o crescimento maligno (HANAHAN e WEINBERG, 2000).

Vários estudos epidemiológicos relatam que, em sua maioria, os cânceres são originados pela exposição contínua a agentes mutagênicos e carcinogênicos, sendo que a suscetibilidade individual pode depender da predisposição genética, de diferenças no hábito nutricional e no estilo de vida (ROBERTS, 1997). Conforme os dados mais recentes levantados pela Organização Mundial da Saúde (OMS), o câncer será a primeira causa de mortalidade no mundo nas próximas décadas. Associado a este fato, o câncer possui um forte impacto na sociedade, debilitando indivíduos produtivos, tanto no âmbito social e no econômico, além de constituir sério problema de saúde pública (ALMEIDA et al., 2005).

Dentre os agentes químicos, potencialmente danosos ao DNA, destacam-se os fármacos, tais como os compostos alquilantes, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, bifenois e aminas heterocíclicas. O DNA também é o alvo de drogas metabólicas que reagem diretamente com o DNA ou indiretamente com a incorporação de nucleotídeos análogos, ou bloqueando funções metabólicas do DNA, tais como as DNA polimerases e topoisomerases. Duas estratégias estão envolvidas nas respostas aos danos ao DNA: os danos são reparados ou tolerados, ou as células são removidas por apoptose. O não reparo leva a consequências tais como: aberrações cromossômicas, mutações em genes e transformações malignas (KULTZ, 2005).

Tendo em vista o exposto, a segurança é um dos parâmetros de grande importância no desenvolvimento de novos fármacos. Os testes de toxicidade celular fornecem as primeiras informações sobre a segurança dos compostos em teste. Muitas moléculas promissoras são descartadas logo de início, devido à sua toxicidade. Além disso, nos estágios iniciais de desenvolvimento de novos fármacos, tem sido dada grande ênfase aos estudos de

genotoxicidade. Os agentes genotóxicos podem ser definidos funcionalmente por possuírem a habilidade de alterar a replicação do DNA e a transmissão genética. Dessa forma, as medidas de genotoxicidade incluem, principalmente, danos no DNA, mutações e aberrações cromossômicas. Os ensaios de genotoxicidade *in vivo* e *in vitro* são ferramentas sensíveis para a detecção da genotoxicidade e da potencial carcinogenicidade de diversas moléculas (COOMBES, 1992).

Segundo Brambilla e Martelli (2009), dentre as várias reações adversas que um medicamento pode causar, a ocorrência de efeitos genotóxicos e carcinogênicos não pode ser excluída. A fim de se avaliar o risco de efeitos genotóxicos e cancerígenos para seres humanos, as autoridades reguladoras da Europa, Japão e EUA recomendam que estudos de genotoxicidade e de carcinogenicidade sejam realizados antes da aprovação da comercialização de produtos farmacêuticos.

De acordo com o ICH (*International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*) os ensaios de genotoxicidade de fármacos devem seguir uma bateria de três testes-padrão: (i) teste de mutação genética em bactérias, (ii) um teste citogenético para avaliação de dano cromossomal (teste de aberração cromossômica na metáfase *in vitro* ou teste de micronúcleos *in vitro*) ou um teste *in vitro* de mutação genética de linfoma *tk* de rato e (iii) um teste *in vivo* para genotoxicidade, geralmente um teste de dano cromossomal utilizando células hematopoiéticas de roedores, também para micronúcleos ou aberrações cromossômicas em células na metáfase. As abordagens atualmente aceitas para a avaliação das mutações genéticas de células de mamíferos envolvem também o locus *hprt*, usando-se células CHO ou V79, e o locus *gpt*, usando células AS52 (MULLER et al., 1999). Testes adicionais de genotoxicidade em modelos adequados podem ser efetuados para medicamentos que apresentarem resultados negativos nos 3-testes-padrão, mas que demonstraram alguns efeitos nos ensaios de carcinogenicidade com nenhuma evidência clara de um mecanismo de genotoxicidade. Tais testes podem incluir condições modificadas para a ativação metabólica *in vitro*, ou em ensaios *in vivo* de aferição de danos genéticos nos órgãos alvos de indução de tumor, por exemplo, a fragmentação do DNA das células hepáticas (BRAMBILLA e MARTELLI, 2009).

Na avaliação de danos genotóxicos, diversas variáveis devem ser consideradas, além dos polimorfismos genéticos. Fatores tais como idade, estilo de vida e saúde individual devem ser considerados na interpretação dos dados resultantes do uso de biomarcadores (MALUF, 2004). É crescente a preocupação sobre o efeito mutagênico e carcinogênico de agentes genotóxicos em populações expostas ocupacionalmente, acidentalmente ou por estilo de vida. Torna-se necessário conhecer as substâncias químicas com o objetivo de prevenir ou

minimizar a incidência de mortes ou doenças decorrentes da interação desses produtos com o organismo humano. A avaliação da exposição pode ser feita pela medida da concentração do agente químico em amostras ambientais, como o ar (monitorização ambiental) ou através da medida de parâmetros biológicos (monitorização biológica), que são denominados indicadores biológicos ou biomarcadores. Os biomarcadores têm sido categorizados em três tipos principais: de exposição, de suscetibilidade e de resposta ou efeito (AMORIM, 2003).

Conforme Maffei et al. (2008), nos últimos anos estudos de carcinogênese em seres humanos têm promovido a investigação de biomarcadores que permitam a detecção de indivíduos com risco aumentado de desenvolvimento de câncer. Alguns estudos de caso-controle demonstraram que a sensibilidade positiva de alguns biomarcadores está associada ao risco para o desenvolvimento de diferentes tumores, como os do trato digestivo superior, cabeça e pescoço, pulmão e fígado. Foi também proposto que os biomarcadores podem ser utilizados para avaliar o risco de lesão pré-maligna e para predizer as respostas e os resultados em pacientes submetidos à quimioterapia e à radioterapia.

Os biomarcadores de exposição ou dose interna correspondem à expressão de um agente ambiental ou de seus metabólitos no meio interno dos indivíduos. Estes consistem em medidas quantitativas de substâncias químicas ou de seus metabólitos em fluídos biológicos ou a medida de uma alteração bioquímica precoce e reversível em fluídos biológicos que reflita a exposição (AMORIM, 2003).

O biomarcador de efeito é um parâmetro biológico, medido no organismo, o qual reflete a interação da substância química com os receptores biológicos. Na prática diária, biomarcadores de efeito são usados para confirmar um diagnóstico clínico. Mas, para a prevenção, um biomarcador de efeito considerado ideal, é aquele que mede uma alteração biológica em um estágio ainda reversível (ou precoce), quando ainda não representa agravo à saúde (RÜDIGER, 1999). Por princípio, os indicadores de efeito servem para avaliar as consequências e, indiretamente, a intensidade da exposição, ou seja, no momento em que os valores dessas análises se distanciam dos valores estabelecidos como normais representam o desfecho de um processo de exposição. Os biomarcadores de efeito ou de resposta indicam alterações presentes em tumores; são tardios e permitem avaliar o prognóstico da doença. Os mais utilizados são as aberrações cromossômicas, troca de cromátides irmãs e micronúcleos (PERES et al., 2005).

Os biomarcadores de suscetibilidade podem refletir fatores genéticos ou adquiridos que influenciam na resposta do organismo a uma determinada exposição química. Indicam, ainda, quais fatores podem aumentar ou diminuir um risco individual no desenvolvimento da resposta do organismo decorrente da exposição a agentes químicos ambientais. Entre os

biomarcadores de suscetibilidade, destacam-se a Glutathione-S-transferase e a Paroxonase (AMORIM, 2003).

Os métodos que são mais amplamente empregados para detecção de mutações gênicas são aqueles que utilizam as bactérias (*Salmonella typhimurium* e *Escherichia coli*). Estes são relativamente simples, reproduzíveis e onde se obtém resultados confiáveis de interação do produto com o DNA. Contudo, as bactérias são organismos simples, e os resultados obtidos nem sempre são válidos para células animais ou outros eucariotos. Para se obter dados sobre mutação gênica em eucariotos, há testes em leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*), em células de culturas de mamíferos, em *Drosophila*, ou mesmo mutações somáticas em mamíferos pelo teste de HGPRT (gene de hipoxantina-guanina phosphoribosil-transferase, ligado ao cromossomo X dos mamíferos), ou o *mouse spot test* (alteração da cor do pelo em camundongos tratados durante a embriogênese). Para detecção de mutações cromossômicas, os testes mais utilizados incluem as aberrações cromossômicas e micronúcleos, sendo que estes testes exigem que as células estejam em estado proliferativo (TICE et al., 1988; LE CURIEUX et al., 1993).

O estudo de aberrações cromossômicas possibilita a identificação de quase todas as alterações na estrutura do cariótipo, escapando apenas as bem pequenas, não visíveis ao microscópio. Mas, hoje em dia por haver técnicas para detecção de mutações cromossômicas mais rápidas e simples, como o Teste de Micronúcleos, o estudo de aberrações cromossômicas é apenas utilizado em situações recomendadas, como dirimir dúvidas, definir os tipos de mutação e validar outras metodologias. Estes testes têm um sistema de validação internacional e podem ser desenvolvidos tanto *in vitro* como *in vivo*, desde que se conheça adequadamente a biologia do organismo-teste. Recentemente, o teste alcalino eletroforético de célula-única ou Ensaio Cometa, que detecta quebras no DNA, tem sido recomendado para o biomonitoramento ambiental sendo um teste realizado em células individuais não proliferativas (FARBAIRN et al., 1995; TICE, 1988).

No que diz respeito aos sistemas vegetais, o teste com a cebola *Allium cepa* é o mais antigo relatado na literatura. As vantagens no uso de *Allium cepa* se encontram em ser uma espécie com pequeno número de cromossomos, ter um ciclo celular relativamente curto e controlável em condições estáveis, envolver um método barato, rápido e de fácil manuseio e, sobretudo, por fornecer boa concordância com outros bioensaios de genotoxicidade (FATIMA et al., 2006; TURKOGU et al., 2008).

Este trabalho de revisão teve por objetivo analisar a importância dos bioensaios Micronúcleos, Cometa e *Allium cepa* como biomarcadores de genotoxicidade e mutagenicidade induzida por fármacos. A metodologia empregada foi levantamento

sistemático em referências relacionadas e publicadas nas bases de dados Pubmed, Scielo, ScienceDirect, LILACs na qual se utilizou como palavras chave: fármacos; mutagenicidade; genotoxicidade; teste *Allium cepa*; Ensaio Cometa; Teste de Micronúcleos.

4 Teste de Micronúcleos

Uma das metodologias bastante utilizadas para avaliação de possíveis danos mutagênicos causados por fármacos nos organismos é o Teste de Micronúcleos (MN), inicialmente desenvolvido em eritrócitos de medula óssea de camundongos. Esse tipo de teste tem sido recomendado para estudos de biomonitoramento, principalmente por sua capacidade de detectar agentes clastogênicos (quebra de cromossomos), e de agentes aneugênicos (segregação cromossômica anormal) requerendo, no entanto, proliferação celular para a observação do biomarcador de efeito (FENECH, 2000; RIBEIRO et al., 2003).

O teste de MN é um teste citogenético que pode ser usado como biomarcador para avaliação de efeitos aneugênicos e clastogênicos em diversos organismos vivos. Este teste vem sendo usado, desde 1980, para demonstrar danos citogenéticos induzidos por radiações, contaminantes ambientais, ocupacionais, estilo de vida, deficiências em nutrientes e outras doenças. É importante ressaltar que o teste de MN é um dos testes para avaliação de genotoxicidade menos invasivo e que causa poucos transtornos aos pacientes, quando comparados com os que necessitam de biopsia (STICH et al., 1998; PASTOR et al., 2003).

O ensaio *in vitro* é amplamente utilizado como *screening* de avaliação dos danos citogenéticos em células de mamíferos. Sua popularidade é, em grande parte, devido ao fato de que ele pode ser executado com menos conhecimentos técnicos relativos à análise de aberrações cromossômicas, além de ser capaz de detectar aneugênias e clastogênias. Assim, tem havido forte pesquisa na automação da aferição do ponto de extremidade de micronúcleos *in vitro*, uma meta que poderia potencialmente reduzir o trabalho e os custos. Além dos benefícios da maior capacidade de produção, algumas plataformas multi-paramétricas de análise oferecem a possibilidade de integrar a citotoxicidade de *endpoint* (s) para o ensaio, ajudando, assim, a evitar ou reduzir o risco de resultados falso-positivos (CELIK e KANIK, 2006).

O teste de MN em medula óssea de roedores *in vivo* é amplamente aceito pelas agências internacionais e instituições governamentais, como parte de uma bateria de testes recomendados para se estabelecer avaliação e registro de novos produtos químicos e farmacêuticos que entram anualmente no mercado mundial (CHOY, 2001). Este teste foi

desenvolvido de início, em eritrócitos de medula óssea de camundongos, porém é também realizado em ratos (TAKAHASHI et al., 2004).

Alguns agentes contêm substâncias que acarretam a ocorrência de mutações. Por isso, há necessidade de estudá-los, fazendo-se testes que detectem o efeito mutagênico como o Teste de Micronúcleos. Atualmente, o Teste de Micronúcleos é utilizado como padrão de teste de mutagenicidade OECD –*Guidelines for the testing of chemicals/ section 4: Health Effects – Mammalian Erythrocytes Micronucleus Test: nº 474 e recomendado pelo Gene-Tox Program, Environmental Protection Agency – EPA/US*. O teste *in vivo* é especialmente relevante para avaliar a genotoxicidade pela detecção de clastogenicidade e a aneugenicidade (KRISHMA e HAYASHI, 2000).

Os micronúcleos são pequenos corpúsculos nucleares representando o material genético que foi perdido pelo núcleo principal como consequência de um dano genético. Após a separação das cromátides, no processo mitótico, dois núcleos são reconstituídos, um em cada polo. A membrana nuclear é refeita ao redor destes dois conjuntos cromossômicos. Mas se um cromossomo inteiro ou um fragmento cromossômico acêntrico não se integra ao novo núcleo (por não estar unido ao fuso), este também pode constituir um pequeno núcleo individual (**Figura 1**) (FENECH et al., 1999; IARMARCOVAI et al., 2007; HOLLAND et al., 2008).

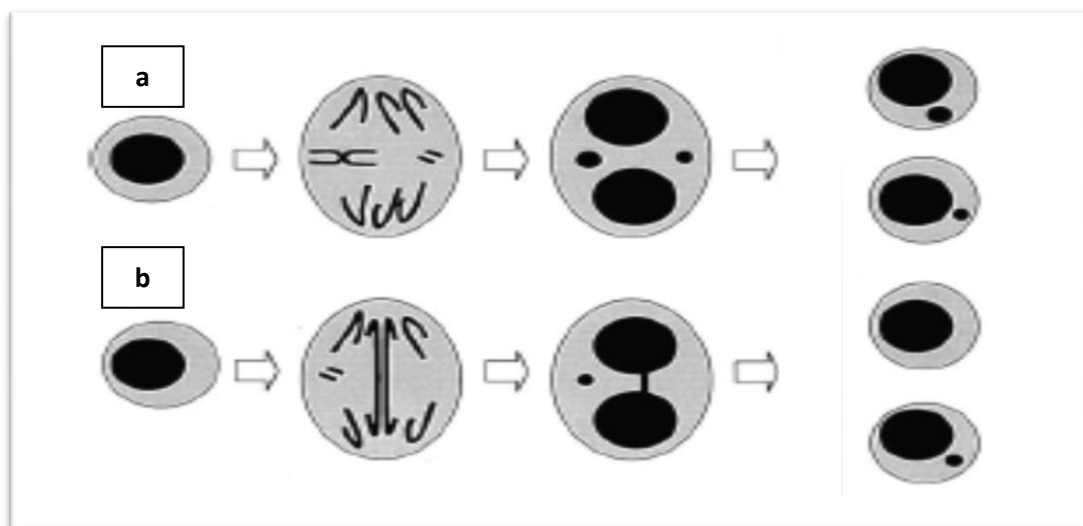


Figura 1. Representação esquemática da formação de micronúcleos como consequência de uma lesão no material genético de uma célula em divisão. (a) Origem de um MN a partir de um cromossomo inteiro e fragmentos cromossômicos acêntricos na anáfase; (b) formação de uma ponte a partir de cromossomos dicêntricos, onde os centrômeros se dirigem para os lados opostos da célula. Adaptada de Fenech, 2000.

A formação dos MNs se deve a alterações estruturais cromossômicas espontâneas ou decorrentes de fatores ambientais ou, ainda, a falhas no fuso mitótico, sendo, portanto, excluído do novo núcleo formado na telófase. Os MNs podem ser únicos ou múltiplos e devem preencher os seguintes critérios: 1. Estrutura da cromatina similar e intensidade de cor semelhante ou mais fraca do que a do núcleo principal; 2. Borda evidente, sugerindo membrana nuclear; 3. Ter formato arredondado; 4. Localização intracitoplasmática; 5. Diâmetro menor do que 1/5 do núcleo principal. Os critérios 1, 2 e 3 tem a intenção de excluir das contagens estruturas não relacionadas a dano genotóxico, como os grânulos de ceratohialina, que aparecem em células esfoliadas em função do processo de maturação epitelial, especialmente em tecidos ceratinizados ou parcialmente ceratinizados como a mucosa bucal (BONASSI et al., 2007).

Os MNs podem ser gerados de diferentes processos oriundos de quebras ou perdas de cromossomos (FENECH, 2007). Embora os mecanismos de reparo celular sejam extremamente eficientes, a sensibilidade da estrutura cromossômica permite a atuação de agentes clastogênicos e aneugênicos durante a mitose e a meiose. A atuação de agentes clastogênicos e aneugênicos, dentre outras formas, é responsável pela origem das aberrações cromossômicas estruturais e numéricas (CARVALHO et al., 2002). A hipótese de associação entre a ocorrência de micronúcleos e o desenvolvimento de câncer é baseada na alta frequência desse biomarcador em pacientes oncológicos não tratados e na inversa correlação entre sua frequência em células sanguíneas com os micronutrientes da dieta (BONASSI et al., 2007).

A formação de micronúcleos é extensivamente usada em epidemiologia molecular como um biomarcador de danos nos cromossomos, instabilidade genética e, eventualmente, risco de câncer. A ocorrência dos micronúcleos representa uma resposta integrada de instabilidade de cromossomos, fenótipos e alterações celulares causadas por defeitos genéticos e ou exposição exógena a agentes genotóxicos, refletindo inúmeras alterações cromossômicas importantes para a carcinogênese. Existem relatos de associações entre polimorfismos genéticos e formação de micronúcleos e que variantes genéticas podem modular os efeitos da exposição ambiental aos agentes genotóxicos, bem como idade, características de estilo de vida (álcool, fumo, folatos) e doenças (cardiovasculares, câncer). Os efeitos do polimorfismo genético na formação de micronúcleos são complexos, influenciados por polimorfismos de várias enzimas envolvidas no metabolismo de xenobióticos, proteínas de reparo de DNA e enzimas envolvidas no metabolismo de folatos. Polimorfismo da EPHX, GSTT1 e GSTM1 têm especial importância na modulação de danos nos cromossomos em populações expostas e não expostas aos agentes genotóxicos. Variantes

dos genes ALDH2 são consistentes com a associação com micronúcleos induzidos pelo álcool. Mutações em BRCA1 e BRCA2 mostram aumento na sensibilidade para clastogenos. Além disso, os genes XRCC1 e XRCC3, envolvidos em reparo de DNA; e os genes MTHFR (metabolismo de folatos) também influenciam na formação de micronúcleos. Assim, as variantes genéticas influenciam na interação com os fatores ambientais e podem ter consequências na frequência de micronúcleos em humanos (IAMARCOVAI et al., 2008).

A resposta individual ao estresse pode variar de acordo com várias condições, tais como a função particular e a combinação de genes, a absorção e metabolismo, morte celular (apoptose/necrose, controle do ciclo celular, reparo de DNA e resposta imune e deficiências em micronutrientes (GOODE et al., 2002). A formação de MN durante a divisão celular é resultado da quebra de cromossomos devido a lesões não reparadas ou reparadas ou reparadas de forma incorreta, ou, ainda, devido a má segregação dos cromossomos e má função mitótica. Esses eventos podem ser induzidos por estresse oxidativo, exposição aos agentes clastogênicos e aneugêncios. Essa heterogeneidade reflete a presença de múltiplas exposições externa e interna e ao grande número de alterações cromossômicas que, eventualmente, resulta na formação de micronúcleos (FENECH, 2006). Dessa forma, os micronúcleos são usados como biomarcadores de instabilidade cromossômica, fixação de mutações e suscetibilidade genética e polimorfismos genético, fatores que podem explicar a sua associação com os riscos de câncer.

Aumento na frequência de MN com idade e gênero foi observada por Kirsch-Voldere et al. (2006). Imperfeições no sistema celular de defesa que protege contra a fixação de danos ao DNA tais como os danos induzidos ao DNA pelas espécies reativas de oxigênio (ERO's) decrescem a eficácia do reparo de DNA e pode levar ao acúmulo de mutações que, em combinação com a idade, podem contribuir para o envelhecimento e o desenvolvimento de patologias relacionadas com idade (GORBUNOVA, 2005).

Existem evidências de interações entre gênero e genótipo em relação às defesas antioxidantes da enzima glutathione peroxidase (BASTAKI et al., 2006). As quebras e perdas dos cromossomos envolvem diferentes disfunções celulares como fragmentos de cromossomos acêntricos, resultando em quebras duplas, que podem levar à formação de micronúcleos que pode ser afetada por co-fatores como magnésio e cálcio; e polimorfismos genéticos de enzimas que controlam a aneugênese (inibidores de tubulina e topoisomerases e ciclinas) ou interferências em genes envolvidos no controle do ciclo celular (hCDC4) (MATEUCA et al., 2006). Estudos recentes também mostram adicional contribuição do gene XRCC3 na indução de micronúcleos oriundos da perda de cromossomos via má segregação e amplificação de centrômeros (GORBUNOVA, 2005).

A análise de frequência de micronúcleos em eritrócitos policromáticos de medula óssea de mamíferos foi estabelecida, na década de 70, por Schmid e, ainda hoje, é um dos mais utilizados como padrão de aberrações cromossômicas em eucariotos. Os eritrócitos, células abundantes na medula óssea e sangue periférico de mamíferos, são, particularmente, propícios por sua alta rotatividade, ausência de núcleo e possibilidade de diferenciar eritrócitos jovens pela presença de RNA (WILD, 1978).

O eritrócito recém-formado contém RNA ribossomal, responsável pela síntese das hemoglobinas. Devido a isso, pode ser corado diferencialmente com corante para ácidos nucleicos, como por exemplo o Giemsa, sendo desta forma denominados de eritrócitos policromáticos (EPC). Este tipo celular jovem pode permanecer estável por mais ou menos 24 horas após a expulsão do núcleo nas células dos mamíferos. Já os eritrócitos maduros são denominados de normocromáticos (ENC), por apresentarem mais hemoglobina (**Figura 2**) (SALAMONE e HEDDLE, 1983; HAYASHI et al., 1994; MAVOURIN et al., 1990).

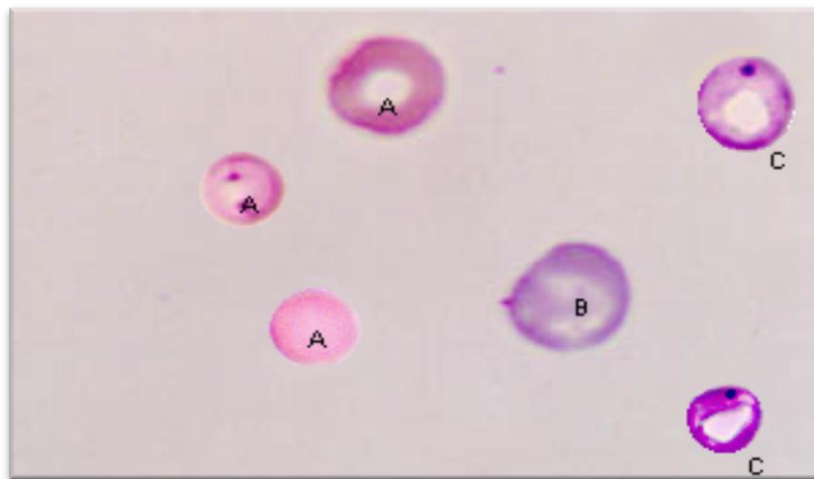


Figura 2. Esfregaço de medula óssea de camundongos com: (A) eritrócitos normocromáticos (ENCs); (B) eritrócito policromático (EPC) e (C) eritrócito policromático micronucleado (EPCMN). Adaptada de Mavourin et al.(1990).

O teste de MN também pode ser feito com bloqueio de citocinese, como um sistema compreensivo para mensurar danos ao DNA e citocinese (HUAWEI et al., 2009). O teste pode mensurar: (1) as pontes nucleoplasmáticas, que indicam o rearranjo de cromossomos que ocorre quando os centrômeros de cromossomos dicêntricos ou cromátides são puxados para os pólos da célula durante a anáfase ou fusão de telômeros depois de quebras duplas de fita do DNA e (2) brotos, que representam um mecanismo o qual a célula remove amplificação de DNA que é considerado como um marcador de amplificação de

genes, originada de fragmentos acêntricos terminal ou intersticial (UMEGAKI e FENECH, LINDBERG et al., 2007).

A metodologia de MN com bloqueio de citocinese (CbMN) é desenvolvida com o uso da citocalasina B para identificar células que se dividem em cultura (**Figura 3**). A citocalasina B é um inibidor de polimerização de actina, a qual é requerida para a formação do anel que divide o citoplasma durante a citocinese. Os danos induzidos por agentes químicos e/ou físicos podem, dependendo do agente, induzir ou inibir necroses e/ou apoptose. A indução de necrose pode resultar na liberação de enzimas degradativas que podem causar a digestão parcial de DNA. A inibição da apoptose pode ser descrita por significantes danos ao DNA que sobreviveram nas células mutantes micronucleadas (FENECH, 2000; FENECH et al., 2006). A apoptose pode ser identificada como morte e ou suicídio celular caracterizada, morfológicamente, por processos ativos, genes regulados envolvendo condensação e fragmentação de DNA. A morte celular não é somente importante no desenvolvimento embrionário e no desenvolvimento de tecidos adultos, mas também em crescimento de tecidos de tumores (ARENDS et al., 1990).

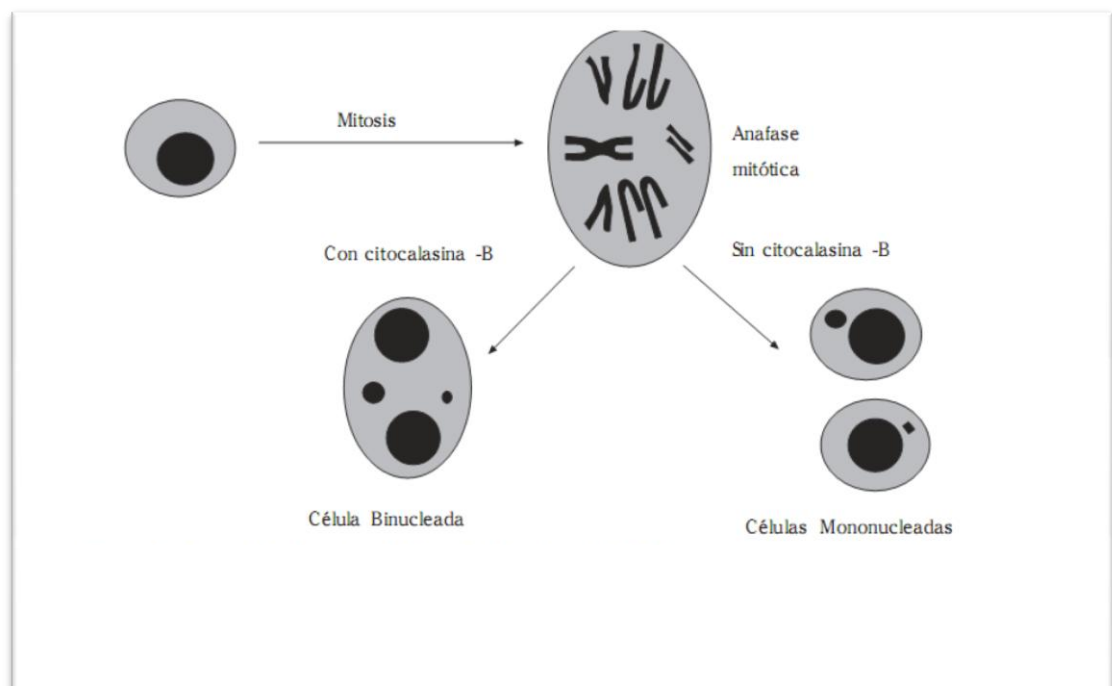


Figura 3. Formação de micronúcleos com e sem a adição de Citocalasina-B. Adaptada de Dercordier et al. (2009).

Os micronúcleos podem ser identificados em qualquer tipo de célula, desde que esta tenha tido uma divisão celular após o evento mutagênico. Por isso, precisa-se fazer cultivo celular, ou usar células que estão se multiplicando constantemente, como medula óssea

(HOLLAND et al., 2008). Os MN de células esfoliadas de mucosa bucal (**Figura 4**) e de outras mucosas originadas de divisões no tecido epitelial são obtidas rapidamente, sem a necessidade de divisões *ex vivo*, como as células oriundas de culturas celulares, para análise de metáfases, como ocorre no teste de aberrações cromossômicas, que necessita do uso da citocalasina para bloquear a proliferação de linfócitos (FENECH et al., 1999). Cabe enfatizar que a redução na eficiência de reparo e acúmulo de mutações devido ao envelhecimento podem aumentar o nível de micronúcleos. Os micronúcleos são estruturas cromatínicas coradas e são formados pela exclusão de cromossomos ou de fragmentos de cromossomos durante a divisão celular (MISIK, 2006).

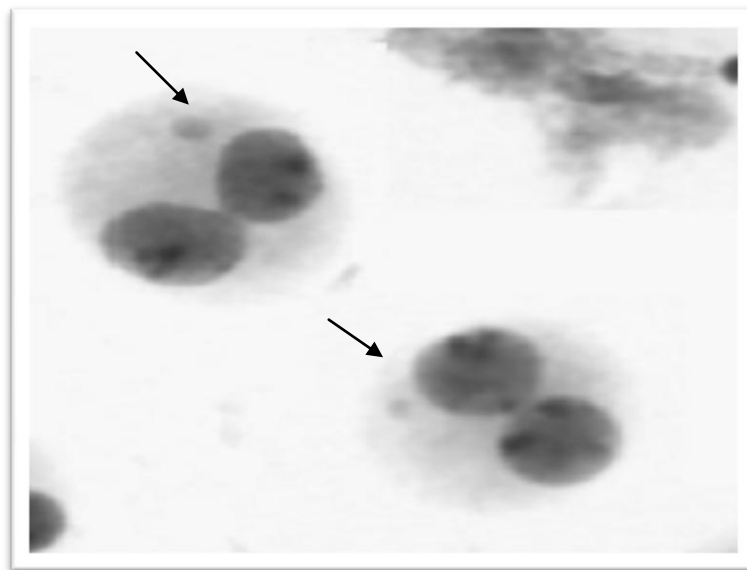


Figura 4. CB-MN em linfócitos de sangue periférico.
Adaptada de Dercordier et al. (2009).

Algumas desvantagens do teste de MN se devem à completa relação do aparecimento dos micronúcleos com a divisão celular. Os micronúcleos só aparecem quando a célula alvo se divide. Além disso, o teste não detecta a não disjunção mitótica, quando não há perda de cromossomo na anáfase. Aberrações por rearranjos cromossômicos, tipo translocações ou inversões, não são detectados no teste. Dessa forma, informações sobre a extensão do dano cromossômico não são exatas (FENECH, 2000; RIBEIRO et al., 2003).

Apesar das desvantagens, métodos citogenéticos baseados na formação de micronúcleos são extensivamente usados para monitoramento biológico de populações expostas a agentes mutagênicos e carcinogênicos. O Teste de Micronúcleos apresenta vantagens sobre a análise cromossômica clássica por ser um procedimento simples, eficaz e realizado a baixo custo. Além disso, a frequência de micronúcleos aparece elevada em tecidos

expostos bem antes que qualquer sintoma clínico seja evidente, tornando-o valiosa ferramenta na prevenção da carcinogênese (GARAJ-VRHOVAC e KOPJAR, 2001).

3 Teste *Single cell gel eletrophoresis* (SCGE) – Ensaio Cometa

Outro teste de avaliação genotóxica bastante aceito é o Ensaio do Cometa (eletroforese em gel de células individuais), que tem sido largamente empregado, desde meados da década de 80, com uma vasta aplicação em biomonitoramento de populações, para se testar agentes genotóxicos oriundos de dejetos industriais, domésticos e agrícolas, poluentes ambientais e compostos terapêuticos, como também na determinação da capacidade reparo de danos ao DNA em humanos, animais e populações de plantas, bem como em aplicações clínicas (HARTMANN et al., 2003). As vantagens do Ensaio Cometa incluem a sua simplicidade, rápida performance e sua alta sensibilidade para vários tipos de danos no DNA (DA SILVA et al., 2003; GONÇALVES et al., 2003; SPIVAK, et al., 2009).

Desde a sua invenção, o ensaio cometa vem sendo utilizado como uma técnica para a direta visualização de danos ao DNA e reparo em cada uma das pilhas, provou ser um método muito útil para o estudo de genotoxicidade em células expostas *in vitro* ou *in vivo* a uma variedade de agentes físicos e químicos. Apesar das suas aplicações e ampla popularidade, não existe ainda um método padrão estatístico para detectar e comparar o comportamento das diferentes células a diferentes agentes. Os resultados do Ensaio Cometa são, em geral, apresentados sob a forma de histogramas, indicando o número (frequência) de células em função de alguma propriedade dessas, por exemplo, momento da cauda ou % DNA na cauda (ERDTMANN, 2003).

O Ensaio Cometa é uma técnica rápida e eficiente quando usada para quantificar as lesões e detectar os efeitos do reparo no DNA em células individualizadas de mamíferos. Essa metodologia apresenta algumas vantagens sobre os testes bioquímicos e citogenéticos, entre as quais a utilização de um pequeno número de células que não necessariamente estejam em divisão. As células, englobadas em gel e espalhadas sobre uma lâmina, são submetidas a uma corrente elétrica que age como uma força proporcionando a migração dos segmentos de DNA livres, resultantes de quebras, para fora do núcleo. Após a eletroforese, as células que apresentam um núcleo redondo são identificadas como normais, sem dano detectável no DNA. Por outro lado, as células lesadas são identificadas, visualmente, por uma espécie de cauda, similar a um cometa, formada pelos fragmentos de DNA. Estes fragmentos podem se apresentar em diferentes tamanhos, e ainda estar associados ao núcleo por uma cadeia simples (DA SILVA et al., 2003; GONÇALVES et al., 2003; SPIVAK et al., 2009).

Para alguns autores, o tamanho da cauda é proporcional à dimensão do dano que foi causado, mas é de consenso que a simples visualização do “cometa” já significa que danos estão presentes no DNA, podendo ser quebras de fita simples, duplas, *crosslinks*, sítios de reparo por excisão e/ou lesões álcali-lábeis. A identificação do dano no DNA pode ser feita por diferentes maneiras, como por exemplo, medir o comprimento do DNA migrante com a ajuda de uma ocular de medidas, ou ainda classificar, visualmente, em diferentes níveis de dano, as células analisadas, podendo se obter um valor arbitrário que expresse o dano geral sofrido por uma população de células. O Ensaio Cometa é utilizado amplamente na genética médica, genética toxicológica ecotoxicológica, em diagnósticos e tratamentos médicos, medicina ambiental, ocupacional, biomonitoramento ambiental, além de outras aplicações (SILVA, 2007).

A simplicidade e sensibilidade do Ensaio do Cometa fazem dele um sistema adequado de teste para biomonitoramento de níveis crônicos de exposição, podendo ser utilizado em inúmeras análises onde se podem avaliar células viáveis. Além das vantagens citadas e do relativo baixo custo, o Ensaio do Cometa difere de outros ensaios que detectam danos no DNA por requerer células viáveis, mas não em divisão, permitindo, assim, sua aplicação a qualquer tipo de tecido dos quais células vivas possam ser obtidas (COLLINS et al., 1997; RIBEIRO et al., 2003). Como complemento à bateria de testes padrão de genotoxicidade, o Ensaio Cometa *in vivo* é usado para selecionar candidatos potenciais de fármacos no início do desenvolvimento. Devido à sua flexibilidade, ele pode ser combinado ou incorporado à maioria das baterias de testes padrão para fornecer dados sem despesas adicionais de tempo e recursos exigidos por um estudo independente (VASQUEZ, 2010).

O uso de linfócitos periféricos é muito conveniente porque as células já se encontram em suspensão (sangue) e não necessitam da ação de enzimas ou de processo mecânico para seu isolamento. Esses processos, principalmente o enzimático, podem causar danos adicionais ao DNA. Outras vantagens do uso de linfócitos são a facilidade de sua obtenção em grande número, dispensando a fase de cultura celular, o fato de as células estarem quase todas na mesma fase do ciclo e, finalmente, por refletirem o estado do organismo como um todo. As medidas dos cometas realizadas visualmente são imprecisas devido à subjetividade do observador. Em consequência, têm menor uniformidade e baixa reprodutibilidade em diferentes laboratórios. A variabilidade relativamente alta dessas medidas impede a detecção de pequenos efeitos genotóxicos. Para evitar esta limitação, há necessidade de amostras celulares mais numerosas. (BRIANEZI et al., 2009).

Há duas versões do Ensaio Cometa: a neutra que é considerada menos sensível porque detecta apenas lesão de fita dupla de DNA; e a alcalina, descrita por Singh et al. a qual é

adotada pela maioria dos laboratórios por detectar maior variedade de lesões de DNA, como quebra de fita simples, lesões de sítios alcalinos lábeis e locais de reparos incompletos e *crosslinks*. Os cometas resultantes da corrida eletroforética do DNA necessitam passar por um processo de coloração, que pode ser feito alternativamente por técnicas de fluorescência, usando brometo de etídio, iodeto de propídio e *cyber Green*; ou por histotécnica convencional com sal de prata. Esses métodos apresentam diferentes vantagens e limitações. As maiores limitações da fluorescência são a necessidade de microscópio próprio para análise de material fluorescente e a impossibilidade de armazenamento das lâminas para observação posterior, porque a coloração se desbota em um dia. Já sob coloração com sal de prata, a análise pode ser feita com microscópio óptico convencional e as lâminas podem ser armazenadas para análise posterior. Outra desvantagem da coloração fluorescente é a toxicidade de alguns reagentes, como o brometo de etídio, que é mutagênico e, sob exposição crônica, pode ser cancerígeno. Quando comparadas, as duas colorações não diferem com relação aos resultados das imagens obtidas, sendo, portanto, equivalentes (DUSINSKA e COLLINS, 2008; BRIANEZI et al., 2009).

Nesta técnica de microgel para eletroforese, as células são embebidas em gel de agarose em lâminas para microscopia, lisadas sob condições alcalinas (ou neutras), fazendo-se passar uma corrente elétrica, que faz migrar para fora do núcleo os segmentos de DNA livres, resultantes das quebras. Após a eletroforese, as células que apresentam um núcleo redondo são identificadas como normais, sem dano reconhecível no DNA. As células lesadas são identificadas, visualmente, por uma espécie de cauda, como de um cometa, formada pelos fragmentos de DNA. Esses fragmentos podem se apresentar em diferentes tamanhos e ainda estar associados ao núcleo por uma cadeia simples (FAIRBAIRN et al., 1995).

As principais limitações deste teste são: (i) não é um teste de mutagênese, pois o dano pode ser reparado; (ii) por ser muito sensível, deve-se ter cautela, além de um bom controle para análise dos resultados e (iii) o tempo decorrido entre exposição ao mutágeno e a preparação das lâminas, até a lise, deve ser curto (24 hs no máximo). Para a visualização do dano ao DNA, em geral, são analisadas 100 células por participante. As lâminas são feitas em duplicata, sendo contadas 50 células de cada lâmina, para que se tenha um total de 100 células para cada indivíduo. As lâminas são analisadas em aumento de 40x com microscópio óptico. As células observadas recebem uma classificação de dano no DNA que pode variar de 0 (célula sem dano) a 4 (célula com dano máximo), conforme a intensidade do dano (tamanho e forma da cauda) (**Figura 5**). O score total para as 100 células pode ser

de 0 (todas as células sem dano) à 400 (todas as células com dano máximo) (VILELLA et al., 2003).

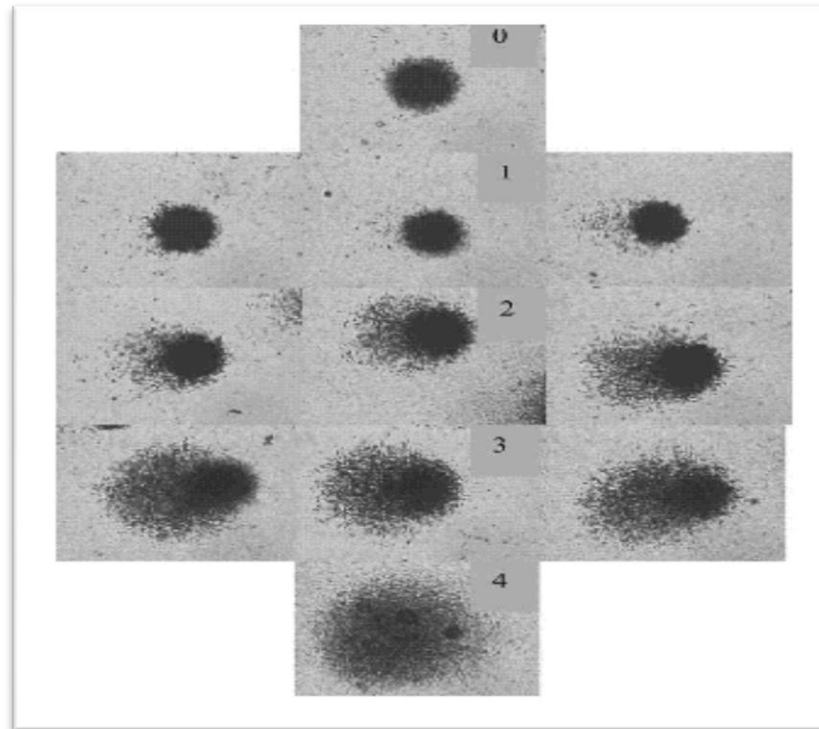


Figura 5 Classificação do dano ao DNA celular em linfócitos de sangue periférico no Ensaio Cometa: 0 (célula sem dano) a 4 (célula com dano máximo) conforme a intensidade do dano (tamanho e forma da cauda). Adaptada de Garcia et al. (2007).

Enquanto o Ensaio do Cometa detecta lesões reversíveis, o Teste de Micronúcleos detecta lesões mais persistentes no DNA ou efeitos aneugênicos que não podem ser reparados (HARTMANN et al., 2003). Os danos mensurados pelo ensaio cometa aparecem mais cedo do que os micronúcleos, que requerem uma divisão celular para serem visualizados (DUSINSKA e COLLINS, 2008).

O Ensaio Cometa vem sendo proposto para estudos de toxicogenética devido a sua peculiaridade e vantagens, quando comparado a outros testes para detecção de substâncias genotóxicas. O Ensaio Cometa é um teste molecular, não utilizado para detectar mutações, mas sim lesões genômicas que, após serem processadas, podem resultar em mutação. Este teste também pode ser utilizado para estudos de reparo de DNA, visto que as lesões detectadas pelo Ensaio Cometa são passíveis de correção. Embora impossibilite inferir a fidelidade do processo de reparo, pode trazer informações importantes sobre a cinética e o tipo de lesão reparada (TICE, 2000; SILVA et al., 2007).

4 Teste *Allium cepa*

Dentre os ensaios com eucariotos, vários são os bioensaios que utilizam plantas superiores (WANG 1991; RODRIGUES et al., 1997; MONARCA et al., 2003). Plantas superiores são reconhecidas como excelentes modelos genéticos para detectar agentes mutagênicos e são frequentemente usadas em diversos estudos de biomonitoramento (MAJER et al., 2005). Os resultados de bioensaios de plantas são extremamente relevantes, considerando-se que uma substância química capaz de induzir danos a cromossomos de plantas, também pode oferecer riscos a outros eucariontes (FERNANDES et al., 2007).

Dentre estes, o teste com a cebola ou *Allium cepa* é o mais antigo relatado na literatura. Em 1938, Levan publicou um trabalho sobre o efeito da colchicina na mitose de células das raízes de *Allium cepa*. Desde então elas vêm sendo muito usadas na detecção de mutágenos, seja de produtos isolados (UNYAYAR et al., 2006; SETH et al., 2008), seja de misturas complexas presentes em amostras ambientais (tanto de águas, ar, solo ou sedimento), ou para avaliação de citotoxicidade (análise do índice mitótico) ou de genotoxicidade (análise de aberrações cromossômicas ou formação de micronúcleos). O teste *Allium cepa* é considerado favorável devido a algumas condições, como a presença de cromossomos grandes e em número reduzido ($2n = 16$) (**Figura 6**) (MISIK et al., 2006; LEME e MARIN-MORALES, 2009).

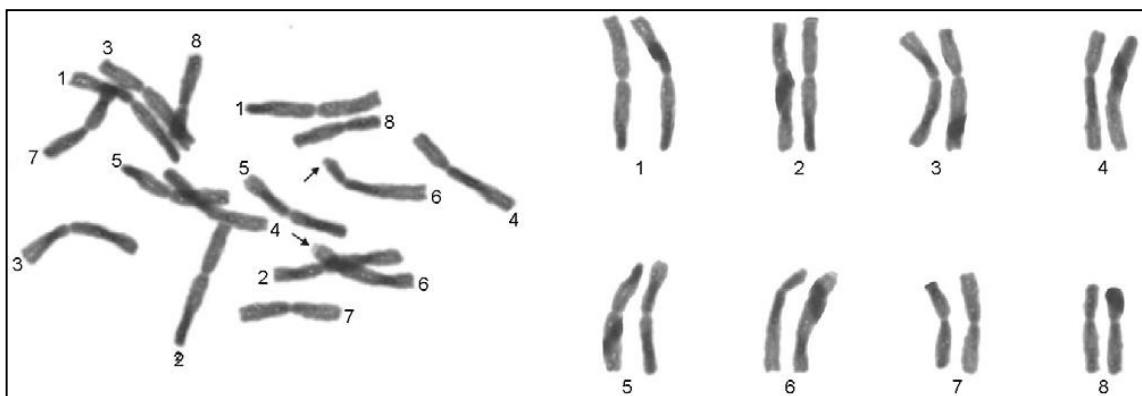


Figura 6 Cariótipo de *Allium cepa* ($2n=16$). Adaptada de Leme e Marin-Morales (2009).

A grande vantagem do uso de plantas superiores sobre os outros sistemas se dá, sobretudo, pelo fato de seus cromossomos serem grandes e das plantas responderem aos mutágenos de maneira similar aos mamíferos e outros eucariotos (SETH et al., 2008). Especificamente para *Allium cepa*, a vantagem se encontra em ser uma espécie com pequeno

número de cromossomos ($2n = 16$), ter um ciclo celular relativamente curto e controlável em condições estáveis (de cerca de 14 horas a 25 °C), envolver um método barato, rápido e de fácil manuseio (FISKESJÖ, 1985; RANK, 2003) e, sobretudo, por fornecer boa concordância com outros bioensaios de genotoxicidade (FATIMA e AHMAD, 2006).

Apesar de ser um ensaio muito usado, desde os anos 30, somente em 1985 um protocolo foi estabelecido (FISKESJÖ, 1985). Este protocolo preconiza o uso de bulbos com 1,5 a 2 cm de diâmetro, tubos de vidro para cultivo com 1,5 cm de diâmetro e 10 cm de comprimento, água de torneira de boa qualidade (sem íons tóxicos) como controle negativo e que o experimento deva ser feito à temperatura de 20°C no escuro. Segundo este protocolo, o Teste *Allium cepa* pode ser feito da forma original ou da forma modificada. Na forma original, os bulbos são colocados para germinar antes do tratamento por 4 ou 24 h, enquanto que na forma modificada, os bulbos são colocados diretamente no tratamento sem germinação prévia. A amostra de água de tratamento deve ser trocada a cada dia ou, se disponível em pouca quantidade, apenas completada. Para análise da conformação cromossômica, o protocolo sugere o uso da colchicina a 0,1%. A coloração por Reação de Feulgen pode ser usada, mas a orceína fornece melhores resultados, além de ser mais rápida. Estabelece como parâmetros microscópicos o índice mitótico (IM), com análise de 400 células/lâmina e aberrações em metáfases e anáfases (100/lâmina) tais como: *stickness*, pontes e fragmentos, cromossomos vagantes e mitose colchicínica. Como parâmetros macroscópicos sugere tamanho e forma das raízes, turgescência e alterações na cor. O efeito de concentração (EC) também deve ser estimado através de uma curva com EC10, 50 e 90 representando, 10, 50 e 90% de redução no crescimento das raízes (FISKESJÖ, 1985).

Modificações técnicas no teste *A. cepa* foram feitas a fim de permitir uma avaliação mais abrangente de produtos químicos, como misturas complexas, que compreendem a maioria das amostras ambientais e das substâncias puras (RANK, 2003; LEME e MARIN-MORALES, 2009). O teste *A. cepa* também permite a avaliação de diferentes parâmetros: as frequências de aberrações cromossômicas e de micronúcleos têm sido as mais utilizadas para detecção de mutagenicidade, enquanto que o índice mitótico e algumas anomalias nucleares são utilizadas para avaliar a citotoxicidade (MAJER et al., 2005; TURKOGLU et al., 2008). Além disso, o sistema de teste *A. cepa* fornece informações importantes para a identificação dos mecanismos de ação de um agente sobre o material genético (clastogênicos e/ou aneugênicos) (RIBEIRO, 2003).

De acordo com Leme e Marin-Morales (2009), a análise do Índice Mitótico (IM) foi utilizada em diferentes estudos e a maioria deles mostrou resultados satisfatórios para as análises propostas. O IM constitui um parâmetro importante para a avaliação da toxicidade

celular de diversas substâncias, onde a citotoxicidade de determinado agente químico pode ser determinada pelo aumento ou pela diminuição do IM. Índices mitóticos maiores que o controle negativo são resultados de um aumento na divisão celular, que pode ser prejudicial para as células, levando a uma proliferação celular desordenada e até mesmo para a formação de tecidos tumorais. A redução significativa do IM em relação ao controle negativo pode indicar alterações, derivadas da ação química do agente sobre o crescimento e desenvolvimento do organismo exposto (LEME e MARIN-MORALES, 2009). Conforme Turkoglu (2008), a redução do IM pode ser devida a uma inibição da síntese do DNA ou a um bloqueio da Fase G₂ do ciclo celular, impedindo que a célula entre em mitose.

Em 1995, Ma e colaboradores publicaram um protocolo enfatizando a análise mutagênica na formação de micronúcleos em *Allium cepa*. Segundo os autores, os micronúcleos são revelados nas gerações subsequentes das células que sofreram danos no seu material genético, em um grupo de células denominadas F1. Para tanto, um período de recuperação, cobrindo dois ciclos de divisão, seria requerido, após o tratamento das raízes com a amostra em análise. Portanto, com a realização desse procedimento, a probabilidade de observação de células micronucleadas seria maximizada. Durante a elaboração desse protocolo, diferentes tempos de recuperação foram testados em resposta à exposição a raios X. Um pico de sensibilidade foi observado para o tempo de recuperação de 44 horas, após exposições crônicas de 6 horas. O mesmo procedimento foi testado para os agentes químicos sacarina e hidrazida maleica, e também foram encontrados resultados positivos. Contudo, a mesma eficiência na análise da frequência de micronúcleos na região F1 não foi observada para análise de poluentes presentes na água, sugerindo a utilização do protocolo para estudos de mutagênese induzida por agentes químicos e físicos.

A frequência de micronúcleos também sugere mutagenicidade (RANK e NIELSEN, 1993; LEME e MARIN-MORALES, 2009). De acordo com Fenech (2000), os micronúcleos são definidos como pequenas massas esféricas, extranucleares, constituídas de cromatina não incorporada ao núcleo principal da célula durante as etapas finais da mitose, visualizáveis apenas em células em divisão (**Figura 7**). Podem ser originados pela não incorporação ao núcleo celular, de fragmentos cromossômicos acêntricos, originados por eventos clastogênicos (que promovem quebra na molécula de DNA) ou por cromossomos inteiros com origem aneugênica (causados por distúrbios no fuso mitótico) (IAMARCOVAI, 2008). A ocorrência dos micronúcleos representa uma resposta integrada de instabilidade de cromossomos, fenótipos e alterações celulares causadas por defeitos genéticos e/ou exposição exógena a agentes genotóxicos, refletindo inúmeras alterações cromossômicas importantes para a carcinogênese (FENECH, 2000; FERNANDES et al., 2007).

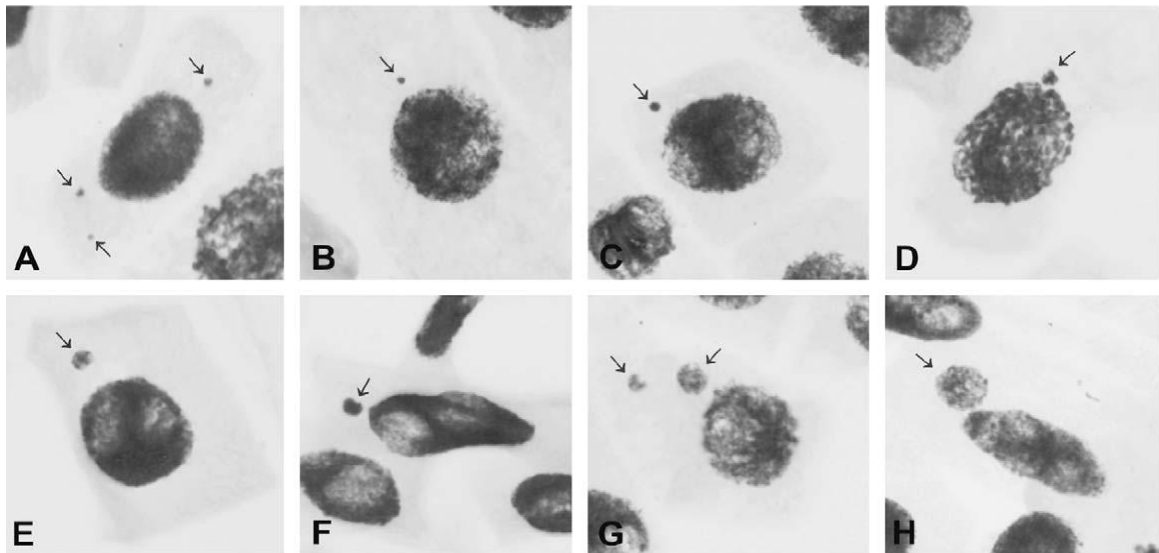


Figura 7 Micronúcleos (MN) em células meristemáticas de *Allium cepa*. A, C, E e F: MN em interfase; D, G e H: MN em prófase. Adaptada de Leme e Marin-Morales (2009).

Em 2003, Rank propôs o método para análise de aberrações em anáfase e telófase. Esse método seria uma versão modificada do protocolo de Fiskesjö (1985), em que os bulbos seriam colocados para germinar por 24 horas e, em seguida, suas raízes seriam expostas durante um período de tratamento de 48 horas. Após a preparação das lâminas, duas categorias de aberrações cromossômicas mais frequentes seriam analisadas: as indicativas de atividade clastogênica (fragmentos cromossômicos e pontes) e as promovidas por interação com o fuso mitótico (cromossomos atrasados *-laggards* e vagantes). Outras categorias de aberrações menos frequentes como anáfase c-mitótica, multipolaridades, poliploidia e cromossomos pulverizados também poderiam ser analisados.

A análise da frequência de aberrações mitóticas tem se destacado como marcador de danos ao material genético mais utilizado em *A. cepa*. Entre essas alterações citológicas, as aberrações em metáfase e anáfase são as mais empregadas nas análises de genotoxicidade, seguidas das aberrações em telófase. Para os estudos de genotoxicidade, as aberrações cromossômicas podem ser reunidas em um único grupo, de acordo com a fase do ciclo, ou ainda serem classificadas com base na sua origem, em aberrações de origem clastogênica ou aneugênica (RIBEIRO, 2003). A classificação diferencial de cada tipo de aberração também pode ser realizada, e é particularmente interessante em estudos que buscam compreender o mecanismo de ação do agente de interesse. Nesse tipo de análise, as alterações mais frequentemente encontradas são: c-mitose, cromossomos *stickness*, cromossomos atrasados, cromossomos vagantes, multipolaridades, pontes anafásicas, anáfases precoces, poliploidia e fragmentos cromossômicos (LEME e MARIN-MORALES, 2009).

A presença dessas alterações celulares não significa obrigatoriamente a ocorrência de danos permanentes na célula, uma vez que podem ser alvo de sistemas enzimáticos que garantem a integridade do genoma da célula (MA et al., 1995). Já os micronúcleos, que também são alterações que ocorrem na composição cromossômica da célula, são posteriores à ação dos mecanismos de proteção do genoma celular e têm, portanto, caráter irreversível. Além de ser um indicativo de perda cromossômica, a análise da frequência de micronúcleos, comparada às análises de aberrações cromossômicas, apresenta as vantagens de ser menos laboriosa e mais rápida (MAJER et al., 2005; TURKOGLU et al., 2008).

Entre as aberrações cromossômicas, as quebras e os cromossomos atrasados são indicativos de formação de micronúcleos por clastogenicidade ou aneugenicidade, respectivamente. Portanto, a presença de alguns tipos de aberrações cromossômicas pode não significar a ocorrência de eventos que promovem mudanças no conteúdo genético da célula, enquanto outros tipos têm apenas caráter preditivo. Como as pontes representam somente um atraso mitótico, células normais podem ser geradas não predizendo assim a formação de micronúcleos. Por esta razão, não serão indicativas de mutagenicidade (MAJER et al., 2003). Estudos realizados em amostras ambientais demonstram diferentes tipos de indicativos de mutagenicidade, pela presença de micronúcleos e de aberrações cromossômicas (**Figura 8**), como identificado por CRONEMBERG et al. (2008).

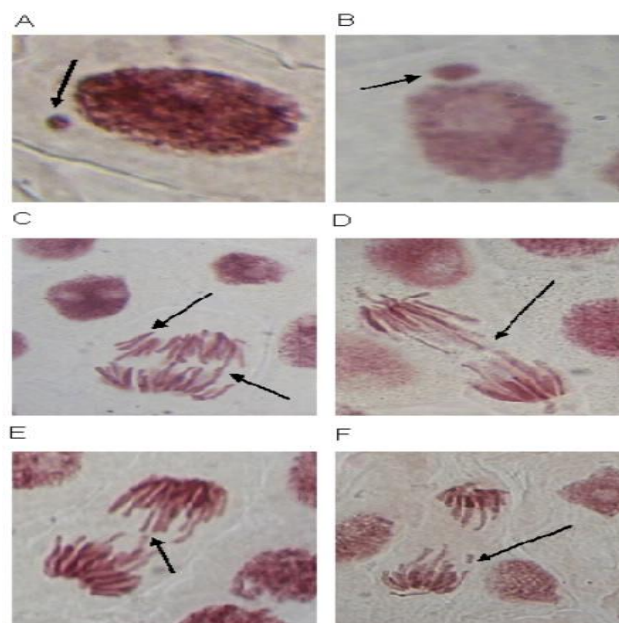


Figura 8 Raízes de *Allium cepa* crescidas em amostras de água do rio Parnaíba-PI do ponto 2 (verão). (A) e (B) células com micronúcleos; (C) célula com ponte e fragmento na anáfase; (D) e (E) células com atraso na anáfase; (F) célula com fragmento em anáfase. Adaptada de Cronemberg et al., 2008).

Uma das vantagens de *A. cepa* teste é a possibilidade de expor o organismo teste diretamente em misturas complexas sem a necessidade do tratamento prévio da amostra

(RANK e NIELSEN, 1993; RANK, 2003). Alguns processos de extração e concentração de amostras são necessários para execução de alguns bioensaios, como o teste de Ames (RANK, 2003). Outra vantagem deste sistema de teste é a presença de um sistema enzimático oxidase, que é essencial para avaliações pré-mutagênicas (FISKESJÖ, 1985). Assim, enquanto outros ensaios, como o teste de Ames, requerem adição da mistura S9 (fração S9 do fígado de ratos), o *A. cepa* apresenta capacidade metabólica para ativar pro-mutagenes sem a adição prévia de nenhum sistema metabólico exógeno (FATIMA e AHMAD, 2006; LEME e MARIN-MORALES, 2009).

O teste *A. cepa* tem mostrado alta sensibilidade e boa correlação quando comparado com outros sistemas de teste, por exemplo, em mamíferos, apesar do sistema enzimático oxidase das plantas superiores apresentar baixa concentração e uma limitação na especificidade aos diversos substratos, em relação ao citocromo P450 dos mamíferos (RANK e NIELSEN, 1997). De acordo com Leme e Marin-Morales (2009), de 148 produtos químicos avaliados pelo teste *A. cepa*, 76% apresentaram resultados positivos, o que levou o autor a sugerir a sua inclusão como um teste padrão para determinar danos em cromossomos induzidos por produtos químicos. Fiskesjö (1985) relatou que a sensibilidade do teste *A. cepa* foi praticamente a mesma que a observada para testes em linfócitos humanos. Posteriormente, Rank e Nielsen (1994) relataram uma correlação de 82% entre o teste *A. cepa* e os testes de carcinogenicidade em roedores. Os mesmos autores também mostraram que, nessa comparação, o teste de *A. cepa* foi mais sensível que os testes de Ames e de *Microscreen*.

5 Considerações Finais

É crescente a preocupação sobre o efeito mutagênico e carcinogênico de fármacos em benefícios à saúde humana. Conforme inúmeros relatos, os fármacos podem induzir danos ao DNA avaliados por baterias de biomarcadores de genotoxicidade. Associado a este fato, também existem evidências sobre as atividades de fármacos na indução da expressão de genes envolvidos em cascatas metabólicas para o desenvolvimento do câncer, podendo ter forte impacto na sociedade, debilitando indivíduos produtivos, tanto no âmbito social quanto no econômico, além de constituir sério problema de saúde pública.

Os agentes mutagênicos podem interferir alterando diretamente a estrutura do DNA, ou pela interação com as enzimas que estão envolvidas, direta ou indiretamente, com o metabolismo do genoma celular. As mutações podem ser definidas como alterações de bases nucleotídicas do DNA que, quando são replicadas e transmitidas à descendência das células, tornam-se permanentes. Essas alterações podem ser induzidas por agentes mutagênicos

externos, mas também ocorrem espontaneamente, em cada célula ao longo da vida de um organismo, como um processo natural de evolução, que também está fortemente ligado à carcinogênese.

Diante do exposto e da revisão relatada, verifica-se que, dentre os diversos bioensaios de genotoxicidade e mutagenicidade a fármacos, o Ensaio Cometa, o Teste de Micronúcleos e *Allium cepa*, cada um com suas especificidades, vantagens e desvantagens, vêm sendo bastante utilizados, sendo importantes para o diagnóstico de possíveis efeitos mutagênicos e genotóxicos, reparo celular e na prevenção de riscos a curto ou em longo prazo de exposição e que correlações entre esses bioensaios podem contribuir para o entendimento da complexidade molecular da exposição a fármacos em estudos de genética toxicológica.

Referências

- ALBERTS, B. et al. **Fundamentos da Biologia Celular**. 2. ed. Porto Alegre: Artemed, 2002.
- ALMEIDA, V. et al. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova**, v. 28, p. 118-129, 2005.
- AMORIM, L. C. A. Os biomarcadores e sua aplicação na avaliação da exposição aos agentes químicos ambientais. **Rev. bras. epidemiol.** v. 6, n.2, p. 158-170, 2003.
- ARENDS, M. J. et al. Apoptosis; the role or the endonuclease. **J. Path.** v. 1, n. 136, p. 593-608, 1990.
- BASTAKI, M. et al. Genotype-activity relationship for Mn-superoxide dismutase, glutathione peroxidase 1 and catalase in humans. **Pharmacogenet. Genomics** v. 16, p. 279–286, 2006.
- BONASSI S, A. et al. An increased micro-nucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. **Carcinogenesis**. v. 28, p. 625-631, 2007.
- BRAMBILLA, G. e MARTELLI, A. Genotoxicity and carcinogenicity studies of analgesics, anti-inflammatory drugs and antipyretics. **Pharmacological Research**, v. 60, p. 1-17, 2009.
- BRIANEZI, G. et al. Desenvolvimento e validação de técnica quantitativa de análise de imagem para avaliação do teste do cometa corado pela prata. **J. Bras. Patol. Med. Lab.** v.45, n.4, p. 325-334, 2009.
- BURNS, G. W. e BOTTINO, P. J. **Genética**. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991.
- CARVALHO, M. B. et al. Relationship between the outcome and the frequency of micronuclei in cells of patients with oral and oropharyngeal carcinoma, **Assoc. Med. Bras**, v. 48, p. 317–322, 2002.

- CELIK, A. e KANIK A. Genotoxicity of occupational exposure to wood dust. Micronucleus frequency and nuclear changes in exfoliated buccal cells. **Environ. Mol. Mutagen**, v. 47, n. 9, p. 693-8, 2006.
- CHOY, W. N. **Regulatory genetic toxicology tests**. In: CHOY, W. N.; DEKKER, M. (Ed.). Genetic Toxicology and Cancer Risk Assessment. New York, p.93-113, 2001.
- COLLINS, A.R. et al. The comet assay: what can it really tell us? **Mutation Research**, n° 375, p.183-193, 1997.
- COOMBES, R.D. Genotoxicity testing: recent advances and future trends. **Chemistry & Industry**, v. 24, p. 950-954, 1992.
- CRONEMBERGER, M. G. O. **Avaliação das atividades tóxicas e mutagênicas de amostras de água e de sedimentos do Rio Parnaíba que sofrem influência de resíduos de curtume**. Dissertação de mestrado. Canoas, 2008.
- DA SILVA, J. et al. Evaluation of the genotoxic effect of rutin and quercetin by comet assay and micronucleus test. **Food and Chemical Toxicology**, N° 40, p. 941-947, 2003.
- DECORDIER, I. et al. Automated image analysis of cytokinesis-blocked micronuclei: an adapted protocol and a validated scoring procedure for biomonitoring. **Mutagenesis**, v. 24, n. 1, p. 85–93, 2009.
- DUSINSKA, M. & COLLINS, A.R. The comet assay in human biomonitoring: gene–environment interactions. **Mutagenesis**, vol. 23, n. 3, p. 191–205, 2008
- ERDTMANN, B. A genotoxicidade nossa de todos os dias. In: SILVA, Juliana da; Erdtmann, Bernardo; Henriques, João Antonio da Silva. (ORG) **Genética Toxicológica**. Alcance, 2003.
- FATIMA, R.A. e AHMAD, M. Genotoxicity of industrial wastewaters obtained from two different pollution sources in northern India: a comparison of three bioassays, **Mutat. Res**, v. 609, p.81–91, 2006.
- FARBAIN D.W. et al. The Comet assay: a comprehensive review. **Mutation Res**,v. 339, p. 37-59, 1995.
- FENECH, M. et al. Necrosis, apoptosis, cytostasis and DNA damage in human lymphocytes measured simultaneously within the cytokinesis block micronucleous assay: description of the method and results for hydrogen peroxide. **Mutagenesis**, vol. 14, n. 6, p.605- 612, 1999.
- FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. *Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of*. **Mutagenesis**, v. 455, n. 1-2, p. 81-95, 2000.
- FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a “cytome” assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death, **Mutat. Res**, v. 600, p. 58–66 e 40-42, 2006.
- FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay, **Nat. Protoc**, v.2, p.1084-1104, 2007.

FERNANDES, T. C. C. et al. Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. **Pestic. Biochem. Phys.**, v. 88, p. 252–259, 2007.

FISKESJO, G. The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. **Hereditas**, v.102, n.1, p.99-112. 1985.

GARAJ-VRHOVAC, V. et al. Cytogenetic monitoring of Croatian population occupationally exposed to a complex mixture of pesticides. **Toxicology**, v. 165, p. 153-162, 2001.

GARCIA et al. Measurements of DNA damage on silver cometa using Internet software. **Mut. Res.**, v. 627, p. 186-190, 2007.

GORBUNOVA, V. et al. Making ends meet in old age: DSB repair and aging, **Mech. Ageing Dev**, v. 126, p. 621–628, 2005.

GONÇALVES, L .M. et al. **Avaliação do potencial genotóxico das águas do Rio Itajaí-Açú e zona costeira sobre os hemócitos do mexilhão *Perna perna* através do Ensaio do Cometa.** In: II SIMPÓSIO BRASILEIRO DE ENGENHARIA AMBIENTAL. Livro de Resumos. Vol.1, UNIVALI, p. 384, 2003.

GOODE, R. et al. Polymorphisms in DNA repair genes and associations with cancer risk, **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.**, v. 11, p. 1513–1530, 2002.

HAYASHI M. et al. *In vivo* rodent erythrocyte Micronucleus assay. **Mutation Res**, v. 312, p. 293-304, 1994.

HANAHAHAN, D., WEINBERG, R.A. The hallmarks of cancer. **Genes to cells**, v. 100, p. 57-70, 2000.

HARTMANN, A. et al. Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline Comet assay. **Mutagenesis**, V. 18, n. 1, p. 45-51, 2003.

HOLLAND, N. et al. The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for biomonitoring DNA damage: the HUMN project perspective on current status and knowledge gaps. **Mutation Research**, v. 659, p. 93-108, 2008.

IARMARCOVAI, G. et al. Genetic polymorphisms and micronucleus formation: A review of the literature. **Mutation Research**, v. 658, p. 215-233, 2008.

KIRSCH-VOLDERS et al. Inclusion of micronuclei in non-divided mononuclear lymphocytes and necrosis/ apoptosis may provide a more comprehensive cytokinesis block micronucleus assay for biomonitoring purposes. **Mutagenesis**, v. 16, p. 51-58, 2006.

KULTZ, D. Molecular and evolutionary basis of the cellular stress response. **Annu. Rev. Physiol**, v. 67, p. 225-257, 2005.

- LE CURIEUX F. et al. Comparison of three short-term assays: results of seven chemicals. potential contribution to the control of water genotoxicity. **Mutation Res**, v. 319, p. 223-236, 1993.
- LEME, D. M. e MARIN-MORALES M. A. *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. **Mutat Res**, v. 682, p. 71-78. 2009.
- MA, T. H., XU, Z. et al. The improved *Allium/Vicia* root tip micronucleus assay for clastogenicity of environmental pollutants. **Mutat Res**, v.334, n.2, p.185-95, 1995.
- MAFFEI, F. et al. Biomarkers to assess the genetic damage induced by alcohol abuse in human lymphocytes. **Mutat. Res**, v. 514, p. 49-58, 2002.
- MAJER, B.J. et al. Use of plant bioassays for the detection of genotoxins in the aquatic environment. **Acta Hydroch. Hydrob**, v. 33, p. 45–55, 2005.
- MALUF, S.W. Monitoring DNA damage following radiation exposure using cytokinesis-block micronucleus method and alkaline single-cell gel electrophoresis. **Clinica Chimica Acta**, v. 347, p. 15-24, 2004.
- MALUF, S.W., ERDTMANN, B. Biomonitoração do dano genético em humanos. In: SILVA, J. DA; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J. A. P. (Orgs.) **Genética toxicológica**, p. 183-205, 2003.
- MATEUCA, R. et al. Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring, **Biochimie**, v. 88, p. 1515–1531, 2006.
- MAVOURNIN KH, et al .The in vivo Micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the U.S. Environmental Protection Agency. Gene-Tox Program. **Mutation Res**, v. 239, p. 29-80, 1990.
- MISIK, M. et al. In situ monitoring of clastogenicity of ambient air in Bratislava, Slovakia using the *Tradescantia* micronucleus assay and pollen abortion assays. **Mutat Res**, v.605, n.1-2, p.1-6, 2006.
- MONARCA S, et al. Genotoxicity of surface water treated with different disinfectants using in situ plant tests. **Environ Mol Mutagen**, v. 41, n. 5, p. 353-9, 2003.
- MULLER, L.Y. et al. ICH-harmonized guidance on genotoxicity testing of pharmaceuticals: evolution, reasoning and impact, **Mutat. Res**, v. 436, p. 195–225, 1999.
- PASTOR, S. et al. Biomonitoring of four European populations occupationally exposed to pesticides: use of micronuclei as biomarkers. **Mutagenesis**, v. 18, n. 3, p. 249–58, 2003.
- PERES, F. et al. Desafios ao estudo da contaminação humana e ambiental por agrotóxicos. **Ciênc. saúde coletiva** .v.10, p. 27-37, 2005.

RANK, J. ;NIELSEN, M.H. A modified *Allium* test as a tool in the screening of the genotoxicity of complex mixtures, **Hereditas**, v.18, p. 49–53, 1993.

RANK J AND NIELSEN MH. *Allium cepa* anaphase-telophase root tip chromosome aberration assay on N-methyl-N-nitrosourea, maleic hydrazide, sodium azide, and ethyl methanesulfonate. **Mutation Research**, v. 397, p.121-127, 1997.

RANK J. The method of *Allium* anaphase-telophase chromosome aberration assay, **Ekologija**, p. 38–42, 2003.

RIBEIRO, L. R. et al. **Mutagênese Ambiental**. 1ª ed. Canoas: Editora Ulbra, 2003.

ROBERTS, W. C. A unique heart disease associated with a unique cancer: carcinoid heart disease. **Am J Cardiol**, v. 80, p. 6 - 251, 1997.

RODRIGUES, G.S. et al. Tradescantia bioassays as monitoring systems for environmental mutagenesis: a review. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v.16, n.4, p.325-359. 1997.

RÜDIGER, H.W. Biomonitoring in occupational medicine. In: Marquart H, Schäfer SG, McClellan R, Welsch F (eds.). **Toxicology**, p.1027-39, 1999.

SALAMONE MF, HEDDLE JA. The Bone Marrow Micronucleus Assay: Rationale for a Revised Protocol. **Chemical Mutagen**, v. 8, p. 111-149, 1983.

SETH, C. S. et al. Genotoxicity of cadmium on root meristem cells of *Allium cepa*: cytogenetic and Comet assay approach. **Ecotoxicol Environ Saf**, v. 19. 2008.

SLVA, J. O uso do ensaio cometa para o ensino de genética toxicológica. **SBG**, v. 02, n .02. p. 30-33. 2007.

SPIVAK, G. et al. New applications of the Comet assay: Comet-FISH and transcription-coupled DNA repair. **Mutation Research**. Nº 681. p. 44-50, 2009.

STICH, H.F., et al. Remission of oral leukoplakias and micronuclei in tobacco/betel quid chewers treated with beta-carotene and with beta-carotene plus vitamin A. **International Journal of Cancer**, v. 42, p. 195–199, 1998.

TAKAHASHI, C. S., et al. **Teste do micronúcleo em eritrócito de medula óssea de camundongo**. Disponível em: <http://www.sbmcta.org.br/index.php?arq=doc01>. Acessado em 05 de junho de 2010.

TICE RR, et al. Environmental biomonitoring with feral rodent species. In: Application of Short-Term Bioassays in the Analysis of Complex Environmental Mixtures (Sandhu S, Waters MD, eds.). **Plenum Publishing Co**, p. 175-180, 1988.

TICE, R.R. et al. Single cell gel/Comet assay; guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 25, p. 206-221, 2000.

TURKOGLU, S. Evaluation of genotoxic effects of sodium propionate, calcium propionate and potassium propionate on the root meristem cells of *Allium cepa*. **Food and Chemical Toxicology**, v 27, p. 55-61, 2008.

UMEGAKI, K. AND FENECH, M. Cytokinesis-blockmicronucleus assay in WIL2-NS cells: a sensitive system to detect chromosomal damage induced by reactive oxygen species and activated human neutrophils, **Mutagenesis**, v. 15, p. 261–269, 2000.

UNYAYAR, S., A. CELIK, et al. Cadmium-induced genotoxicity, cytotoxicity and lipid peroxidation in *Allium sativum* and *Vicia faba*. **Mutagenesis**, v.21, n.1, p.77-81, 2006.

VASQUEZ, M. Z. Combining the in vivo comet and micronucleus assays: a practical approach to genotoxicity testing and data interpretation. **Mutagenesis**, v.25, n. 2, p.187-199, 2010.

VILLELA, I.V. et al. **Bioensaios para o Monitoramento de Genotoxicidade Ambiental**. In: Silva J., ERDTMANN B & HENRIQUES J. A.P. (organizadores) *Genética Toxicológica*. Ed. Alcance. Porto Alegre, p. 147-163, 2003.

WANG W.C. Literature review on higher-plants for toxicity testing. **Water air and soil pollution**, v. 59 (3-4), p. 381-400, 1991.

WILD D. Cytogenetic effects in the mouse of 17 chemical mutagens and carcinogens evaluated by micronucleus test. **Mutation Res**, v. 56, p. 319-327, 1978.

Capítulo 2

4 Artigo III – Avaliação da toxicidade, citotoxicidade e mutagenicidade do composto 3-(2-cloro-6-fluorobenzil)-imidazolidina-2,4-diona com o teste *Allium cepa*.

Artigo submetido à revista *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*

Avaliação da toxicidade, citotoxicidade e mutagenicidade do composto 3-(2-cloro-6-fluorobenzil)-imidazolidina-2,4-diona com o teste *Allium cepa*

LUCIO NETO, M.P.¹; DANTAS, A. F.¹; GOMES, D.C.V.^{1,2}; CARVALHO, R.M.²; SAMPAIO, F.A.¹; LEITÃO, J¹ E MELO-CAVALCANTE, A.M.^{1,2}

¹Departamento de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Piauí – UFPI, Teresina, PI, Brasil.

²Faculdade NOVAFAPI, Teresina, PI, Brasil.

Resumo

PT-31, 3-(2-cloro-6-fluorobenzil)-imidazolidina-2,4-diona, é um derivado imidazolidínico promissor, com comprovada atividade agonista dos receptores α_{2A} -adrenérgicos, que exibe perfil analgésico dose-dependente e ação sinérgica com a morfina. Este estudo avalia a toxicidade, citotoxicidade e mutagenicidade do PT-31, usando-se o teste *Allium cepa*. Foram realizadas diluições do composto teste nas doses de 0,5; 1,0 e 5,0 mg/mL, sendo utilizado um controle negativo (água sem cloro) e um controle positivo (sulfato de cobre 0,0006 mg/mL). Após 72 horas de exposição, as raízes foram mensuradas e removidas. As análises do crescimento das raízes e do índice mitótico foram utilizadas para avaliação da toxicidade e citotoxicidade. A mutagenicidade foi identificada pelas frequências de aberrações cromossômicas e de micronúcleos. O PT-31 inibiu o índice mitótico e crescimento das raízes na dose de 5,0 mg/mL ($P < 0,001$) e aumentou as frequências das aberrações cromossômicas e micronúcleos na dose de 1,0 mg/mL ($P < 0,05$). Esses dados indicam toxicidade e citotoxicidade e mutagenicidade do PT-31. Tendo em vista o potencial clínico do PT-31, sugerimos estudos complementares para elucidação dos mecanismos geradores dos efeitos observados. O teste *A. cepa*, assim como o ensaio de Ames, pode ser usado em análises pré-clínicas relacionadas à toxicidade, citotoxicidade e mutagenicidade, podendo predizer um perfil inicial de segurança e eficácia de novas moléculas.

Palavras chave: *Allium cepa*; Toxicidade; Citotoxicidade; Mutagenicidade; Imidazolidina.

Abstract

PT-31, 3-(2-chloro-6-fluorobenzyl)-imidazolidine-2,4-dione, is a imidazolidine derivative promising, with proven agonist activity α_{2A} -adrenergic receptor, which displays dose-dependent analgesic profile and synergistic action with morphine. This study evaluates the toxicity, cytotoxicity and mutagenicity of the PT-31, using the *Allium cepa* test. Dilutions were performed the test compound at doses of 0.5, 1.0 and 5.0 mg/mL, and used a negative control (dechlorinated water) and a positive control (copper sulphate 0.0006 mg/mL). After 72 hours of exposure, the roots were measured and removed. The analysis of root growth and mitotic index were used to assess the toxicity and cytotoxicity. Mutagenicity was identified by the frequencies of chromosomal aberrations and micronuclei. The PT-31 inhibited the mitotic index and root growth at a dose of 5.0 mg/mL ($P < 0.001$) and increased frequencies of chromosomal aberrations and micronuclei in a dose of 1.0 mg/mL ($P < 0.05$). These data indicate toxicity and cytotoxicity and mutagenicity of the PT-31. Given the clinical potential of the PT-31, we suggest additional studies to elucidate the mechanisms that generate the effects observed. The *Allium cepa* test as well as the Ames test, can be used to pre-clinical tests related to toxicity, cytotoxicity and mutagenicity, may predict an initial profile of safety and efficacy of new molecules.

Palavras chave: *Allium cepa*; Toxicity; Citotoxicity; Mutagenicity; Imidazolidine.

1 Introdução

O composto PT-31, 3-(2-cloro-6-fluorobenzil)-imidazolidina-2,4-diona, é um derivado imidazolidínico, análogo estrutural da clonidina (**Figura 1**). Estudos realizados por Sudo et al. (2010) revelaram que o PT-31 tem alta afinidade para o sítio ativo dos receptores α_2 -adrenérgico e que pode gerar antinocicepção dose-dependente, agindo em sinergismo com o opióide morfina, o que o torna uma interessante substância com potencial clínico na terapia da dor e em anestesiologia. As vantagens clínicas dos agonistas α_2 -adrenérgicos para terapia da dor são claras, porém poucas drogas exibem tal atividade farmacológica (OLIVER et al., 1999).

A identificação de novos compostos com este perfil é clinicamente relevante. As primeiras drogas α_2 -agonistas foram sintetizadas no início da década de 60 e utilizadas, na prática clínica, inicialmente, como descongestionantes nasais e agentes anti-hipertensivos (BUCKLIN et al., 1991). Estudos subsequentes atribuíram a esse grupo, também, atividades analgésica, sedativa, ansiolítica e simpaticomimética (OLIVER et al., 1999; KAMIBAYASHI e MAZE, 2000).

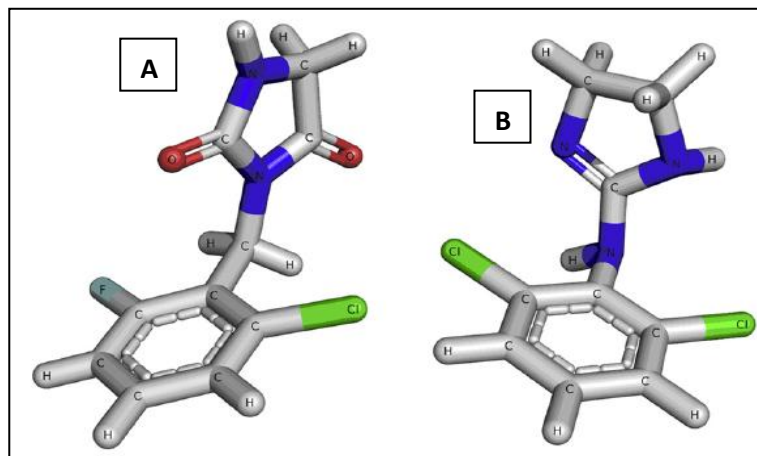


Figura 1 Fórmulas estruturais do PT-31 (A) e da clonidina (B). Adaptada de Sudo et al.(2010).

Na prescrição de um fármaco, o conhecimento da relação risco/benefício é de fundamental importância. Entre as várias reações adversas que um medicamento pode causar, a ocorrência de efeitos genotóxicos e mutagênicos é clinicamente relevante (BRAMBILLA e MARTELLI, 2009), tendo em vista a sua relação direta com o aumento da incidência de câncer, doenças crônico-degenerativas, envelhecimento precoce, problemas de esterilidade,

desordens endócrinas, neurológicas e comportamentais (REKHA et al., 2006; ABHILASH et al., 2009).

O DNA pode ser alvo de drogas metabólicas que reagem diretamente, ou indiretamente, com a incorporação de nucleotídeos análogos, ou bloqueando funções metabólicas do DNA tais como as DNA polimerases e topoisomerases. Duas estratégias estão envolvidas na respostas aos danos ao DNA: os danos são reparados ou tolerados, ou as células são removidas por apoptose. O não reparo leva a consequências tais como as aberrações cromossômicas, mutações em genes e transformações malignas (KULTZ, 2005).

Plantas superiores são reconhecidas como excelentes modelos genéticos para detectar agentes mutagênicos e são frequentemente usadas em diversos estudos de biomonitoramento (MAJER et al., 2005). Os resultados de bioensaios de plantas são extremamente relevantes, considerando-se que uma substância química capaz de induzir danos a cromossomos de plantas, também pode oferecer riscos a outros eucariontes (FERNANDES et al., 2007).

Entre as espécies de plantas, *Alium cepa* tem sido reportada para avaliar os danos ao DNA, como aberrações cromossômicas, micronúcleos e distúrbios no ciclo mitótico, induzidos por um grande número de agentes químicos (LEME e MARIN-MORALES, 2009). O teste *A. cepa* é considerado favorável devido a algumas condições, como a presença de cromossomos grandes e em número reduzido ($2n = 16$) (FISKEJÖ, 1985).

Modificações técnicas no teste *A. cepa* foram feitas a fim de permitir uma avaliação mais abrangente de produtos químicos, como misturas complexas, que compreendem a maioria das amostras ambientais e das substâncias puras (RANK, 2003; LEME e MARIN-MORALES, 2009). O teste *A. cepa* também permite a avaliação de diferentes parâmetros: as frequências de aberrações cromossômicas e de micronúcleos têm sido as mais utilizadas para detecção de mutagenicidade, enquanto que o índice mitótico e algumas anomalias nucleares são utilizadas para avaliar a citotoxicidade (FISKEJÖ, 1993; MAJER et al., 2005; TURKOGLU et al., 2008). Além disso, o sistema de teste *A. cepa* fornece informações importantes para a identificação dos mecanismos de ação de um agente sobre o material genético (clastogênicos e/ou aneugênicos) (RIBEIRO, 2003).

Uma das vantagens de *A. cepa* teste é a possibilidade de expor o organismo teste diretamente em misturas complexas sem a necessidade do tratamento prévio da amostra (RANK e NIELSEN, 1993; RANK, 2003). Alguns processos de extração e concentração de amostras são necessários para execução de alguns bioensaios, como o teste de Ames (RANK, 2003). Outra vantagem deste sistema de teste é a presença de um sistema enzimático oxidase, que é essencial para avaliações pré-mutagênicas (FISKEJÖ, 1985).

Assim, enquanto outros ensaios, como o teste de Ames, requerem adição da mistura S9 (fração S9 do fígado de ratos), o *A. cepa* apresenta capacidade metabólica para ativar promutagenes sem a adição prévia de nenhum sistema metabólico exógeno (FATIMA e AHMAD, 2006; LEME e MARIN-MORALES, 2009).

Os testes de genotoxicidade e mutagenicidade *in vivo* são ferramentas sensíveis para detecção da ação lesiva ao material genético e do potencial carcinogênico de várias moléculas (MALUF e ERDTIMANN, 2003). Em se tratando de novos produtos farmacêuticos, as autoridades sanitárias da maioria dos países preconizam a realização de tais testes anteriormente aos ensaios clínicos (BRAMBILLA e MARTELLI, 2009). Esse trabalho tem como objetivo a investigação dos possíveis efeitos tóxicos, citotóxicos e mutagênicos do derivado imidazolidínico PT-31, através do teste *A. cepa*.

2 Materiais e Métodos

2.1 Síntese Química do PT-31

O derivado imidazolidínico PT-31 foi sintetizado por Sudo et al. (2010) no Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, PE, Brasil. O composto foi gentilmente fornecido ao Núcleo de Tecnologia Farmacêutica da Universidade Federal do Piauí – UFPI, Teresina, Piauí, Brasil para avaliações pré-clínicas.

2.2 Teste *Allium cepa*

2.2.1 Condições de crescimento das raízes, concentrações do ensaio e tratamentos

O teste *Allium cepa* foi realizado segundo descrição de Fiskesjö (1985), com algumas adaptações, conforme descrito por Mitteregger et al. (2007). Cada grupo experimental constou de diluições do composto PT-31 nas doses de 0,5; 1,0 e 5,0 mg/mL, além de uma solução de DMSO 0,5% (solvente). Como controle negativo (água desclorificada) e controle positivo (sulfato de cobre 0,0006 mg/mL).

Bulbos de cebolas da espécie *A. cepa* L. ($2n = 16$; diâmetro: 20 a 30 mm e peso: 5 a 10 g), com catafilos externos brancos, mesmas origens, não germinados e saudáveis, foram adquiridos comercialmente de supermercados em Teresina-PI, Brasil, sendo mantidos em

local livre de umidade e ao abrigo da luz. Antes do teste, os catafilos externos secos foram removidos com bisturi, cuidando-se para que a área radicular não fosse danificada. Em seguida, os bulbos foram postos em água de torneira por duas horas para reduzir os efeitos de possíveis inibidores do brotamento.

Cada experimento constou de 05 (cinco) bulbos. Cada solução ou substrato teste foi distribuída em recipientes de vidro, previamente esterilizados, de capacidade de 5 mL e um bulbo foi colocado em cada recipiente com a área radicular em contato com a solução, sendo deixado para germinar a 18–22 °C (KOVALCHUK et al., 1998).

O volume de solução absorvido era repostado diariamente, objetivando a manutenção das raízes mergulhadas. Após 72 horas de exposição, as raízes foram medidas com o auxílio de régua sendo desprezadas aquelas muito curtas ou muito longas, sendo o tamanho das raízes utilizado como avaliação de toxicidade. Após a mensuração, foram colocadas em solução fixadora de Carnoy (etanol 99%/ ácido acético glacial– 3: 1 v/v) durante 24h e, após, em etanol 70%, conservando-se sob refrigeração até o momento da preparação histológica das lâminas. O teste foi conduzido em temperatura controlada de 20 °C, sobre bancada sem vibrações e sem iluminação direta (FISKEJÖ, 1985).

2.2.2 Preparo das lâminas

Para o preparo das lâminas, duas a três raízes foram retiradas do etanol 70%, lavadas em água destilada (3 banhos de 5 min) e hidrolizadas em HCl 1M a 60 °C por 8 min. Em seguida, transferiu-se as raízes para frascos escuros (âmbar), contendo o reativo de *Schiff* (fuccina básica/metabissulfito de sódio – 3:1 p/p), por aproximadamente 2 horas. Com auxílio de uma pinça e de uma lâmina de bisturi, a coifa (porção apical da raiz) de aproximadamente 1 mm a 2 mm de comprimento foi retirada, desprezando o restante da raiz. Adicionou-se duas gotas de carmim acético 2% e deixou-se corar durante 10 minutos. Logo, em seguida, os ápices de raízes foram transferidos para uma lâmina. A lamínula foi então colocada sobre a lâmina e feito o *squash* (esmagamento) com o dedo polegar, com razoável pressão. O material preparado foi então levado ao microscópio óptico para observação no aumento de 1000X e, posteriormente, fotografado para melhor e mais eficiente leitura.

2.2.3 Análises tóxica, citotóxica e mutagênica

Um total de 5000 células por grupo teste foram examinadas. Os seguintes parâmetros foram observados: (a) índice mitótico (IM) (1000 células por bulbo); (b) aberrações cromossômicas (AC's) no ciclo mitótico (1000 células por bulbo); e (c) presença de micronúcleos (MN) (1000 células por bulbo). O IM corresponde à relação do número de células em divisão e total de células observadas, em porcentagem, sendo analisada a presença de prófase, metáfase, anáfase e telófase.

Para a análise de AC's, vários tipos de aberrações, tais como: cromossomos soltos e fragmentos cromossômicos em todas as fases do ciclo celular (prófase, metáfase, anáfase e telófase), além de pontes e atrasos anafásicos, sendo todos os registros reunidos em uma só categoria para possibilitar a avaliação das AC's como um único *endpoint*.

2.3 Análise Estatística

A análise estatística foi conduzida utilizando-se o programa Graph PRISMA versão 5.00, por meio de estatística descritiva e ANOVA não paramétrica, com o teste de Tukey, para múltiplas comparações entre os grupos do sistema teste, com níveis de significâncias de *P < 0,05, **P < 0,01 e ***P < 0,001.

3 Resultados

Os resultados para as análises tóxica, citotóxica do PT-31 em meristemas de raízes de *Allium cepa* encontram-se expressos na **Tabela 1**. Os efeitos do PT-31 nas doses de 0,5; 1,0 e 5,0 mg/mL sobre o crescimento dos meristemas de raízes de *A. cepa* indicam que as doses de 0,5 e 1,0 mg/mL não apresentaram redução significativa do crescimento de raízes, o que não foi observado para a dose de 5.0 mg/mL, onde foi evidenciada diferença estatisticamente significativa (P < 0,001) em relação ao controle negativo, sugerindo ação tóxica do PT-31.

De forma similar ao observado no crescimento de raízes, o PT-31 também inibiu, significativamente (P < 0,001), o índice mitótico de meristemas de *A. cepa* somente para a concentração de 5.0 mg/mL, em relação ao controle negativo, o que sugere que nessa dose a molécula apresenta efeitos citotóxicos.

Tabela 1 Índice mitótico e tamanho das raízes (média \pm desvio padrão) de espécimes de *Allium cepa* expostos às concentrações de 0,5; 1,0 e 5,0 mg/mL do composto PT-31.

Grupo	Índice Mitótico (células em processo de divisão/1000)	Tamanho das Raízes (cm)
Controle Negativo ^a	80,90 \pm 10,45	0,66 \pm 0,25
Controle Positivo ^b	37,00 \pm 8,07***	0,32 \pm 0,06***
DMSO 0,5% ^c	78,40 \pm 4,41	0,71 \pm 0,24
PT-31 0,5 mg/mL	73,20 \pm 5,59	0,65 \pm 0,12
PT-31 1.0 mg/mL	72,06 \pm 6,30	0,45 \pm 0,11
PT-31 5.0 mg/mL	46,16 \pm 8,42***	0,30 \pm 0,04***

^a Água sem cloro;

^b Sulfato de cobre, 0.0006 mg/mL;

^c Solvente do PT-31.

Diferença significativa em relação ao controle negativo e ao DMSO ao nível de *** $P < 0,001$ (ANOVA- Teste de Tukey).

Os resultados para os parâmetros mutagênicos – frequência de aberrações cromossômicas e de micronúcleos – encontram-se expressos na **Tabela 2**. Nas análises microscópicas foram observadas as seguintes aberrações cromossômicas: cromossomos soltos e em atrasos, pontes e fragmentos cromossômicos em anáfases (**Figura 2**).

Observou-se significativa ($P < 0,05$) aumento da frequência global de aberrações apenas para a dose de 1,0 mg/mL. De forma similar ao exposto, significativa ($P < 0,05$) aumento na frequência global de micronúcleos foi verificado apenas para a dose de 1,0 mg/mL. Isso sugere possíveis efeitos mutagênicos do composto PT-31 nessa concentração em meristemas de *A. cepa*.

Tabela 2 Aberrações cromossômicas e micronúcleos (média \pm desvio padrão) de espécimes de *Allium cepa* expostos às concentrações de 0,5; 1,0 e 5,0 mg/mL do composto PT-31.

Grupo	Aberrações Cromossômicas				Células micronucleadas (MN/1000)
	Pontes anafásicas	Fragmentos cromossômicos	Atrasos anafásicos	Frequência de AC ^d	
Controle Negativo^a	0,02 \pm 0,04	0,08 \pm 0,08	0,04 \pm 0,05	0,12 \pm 0,08	0,02 \pm 0,04
Controle Positivo^b	0,02 \pm 0,04	0,06 \pm 0,05	0,02 \pm 0,04	0,96 \pm 0,53*	0,48 \pm 0,16*
DMSO 0,5%^c	0,01 \pm 0,03	0,24 \pm 0,36	0,06 \pm 0,09	0,20 \pm 0,14	0,04 \pm 0,05
PT-31 0,5 mg/mL	0,06 \pm 0,13	0,00 \pm 0,00	0,22 \pm 0,13	0,38 \pm 0,31	0,12 \pm 0,18
PT-31 1,0 mg/mL	0,18 \pm 0,20	0,12 \pm 0,22	0,26 \pm 0,27	0,98 \pm 0,70*	0,34 \pm 0,18*
PT-31 5,0 mg/mL	NO	NO	NO	NO	0,14 \pm 0,09

^a Água sem cloro;

^b Sulfato de cobre, 0,0006 mg/mL;

^c Solvente do PT-31;

^d Incluindo pontes, atrasos anafásicos e fragmentos;

NO: não observado

Diferença significativa em relação ao controle negativo ao nível de *P<0,05; (ANOVA- Teste de Tukey).

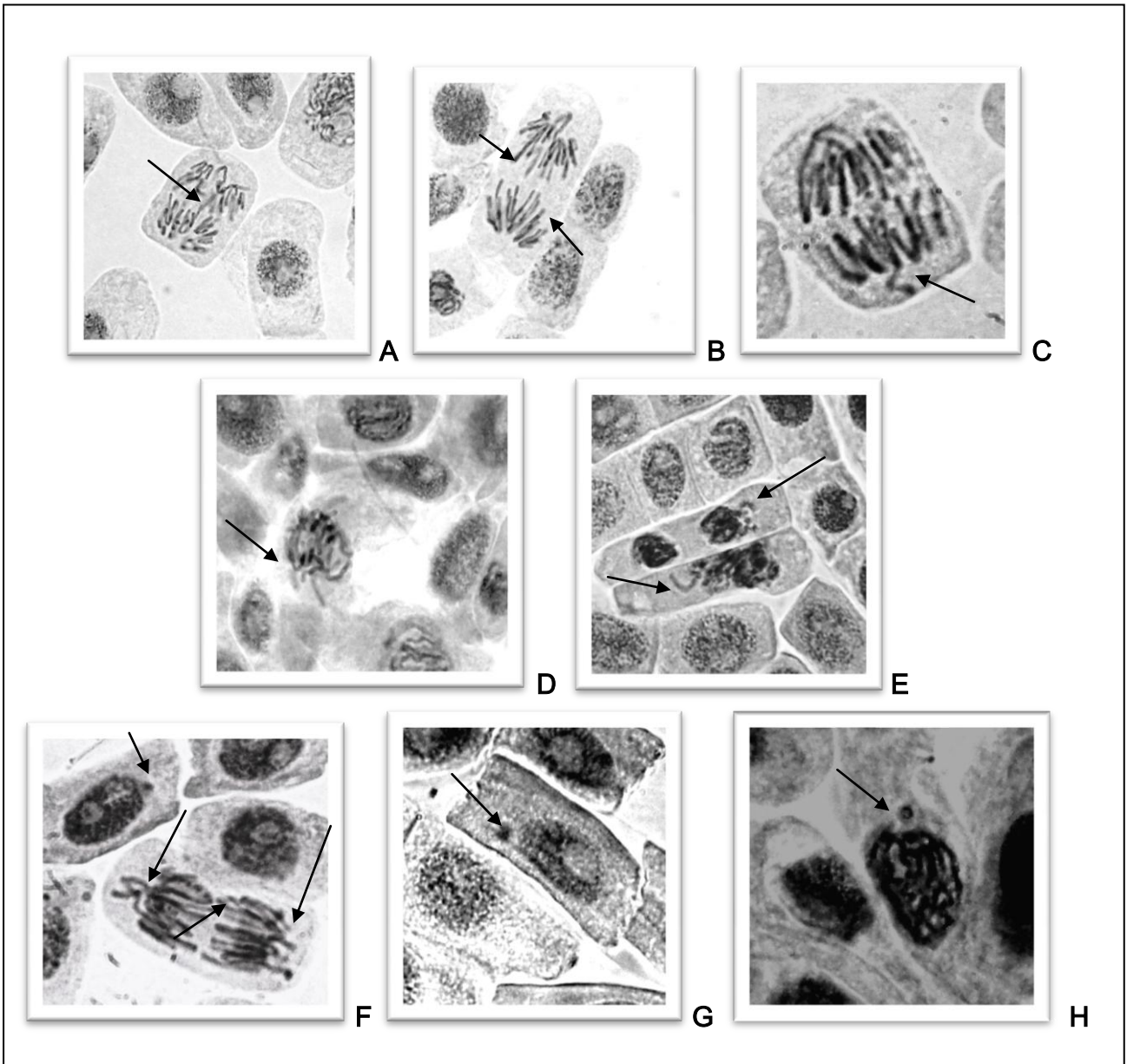


Figura 2 Fotomicrografias (aumento de 1000X) de aberrações cromossômicas (A-F) e micronúcleos (F, G e H) de espécimes de *Allium cepa* expostos às concentrações de 0,5; 1,0 e 5,0 mg/mL do composto PT-31.

4 Discussão

O teste *A. cepa* tem mostrado alta sensibilidade e boa correlação quando comparado com outros sistemas de teste, por exemplo, em mamíferos, apesar do sistema enzimático oxidase das plantas superiores apresentar baixa concentração e uma limitação na especificidade aos diversos substratos, em relação ao citocromo P450 dos mamíferos (RANK e NIELSEN, 1997). De acordo com Grant (1982), de 148 produtos químicos avaliados pelo

teste *A. cepa*, 76% apresentaram resultados positivos, o que levou o autor a sugerir a sua inclusão como um teste padrão para determinar danos em cromossomos induzidos por produtos químicos. Fiskesjö (1985) relatou que a sensibilidade do teste *A. cepa* foi praticamente a mesma que a observada para testes em linfócitos humanos. Posteriormente, Rank e Nielsen (1994) relataram uma correlação de 82% entre o teste *A. cepa* e os testes de carcinogenicidade em roedores. Os mesmos autores também mostraram que, nessa comparação, o teste de *A. cepa* foi mais sensível que os testes de Ames e de *Microscreen*.

Nos experimentos, observou-se inibição significativa do crescimento das raízes e do índice mitótico em meristemas de *Allium cepa* apenas para dose de 5.0 mg/mL ($P < 0,001$), o que sugere que o composto PT-31, nessa concentração, apresenta efeitos tóxicos e citotóxicos (**Tabela 1**). De acordo com Leme e Marin-Morales (2009), a análise do Índice Mitótico (IM) foi utilizada em diferentes estudos e a maioria deles mostrou resultados satisfatórios para as análises propostas. O IM constitui um parâmetro importante para a avaliação da toxicidade celular de diversas substâncias, onde a citotoxicidade de determinado agente químico pode ser determinada pelo aumento ou pela diminuição do IM. Índices mitóticos maiores que o controle negativo são resultados de um aumento na divisão celular, que pode ser prejudicial para as células, levando a uma proliferação celular desordenada e até mesmo para a formação de tecidos tumorais. A redução significativa do IM em relação ao controle negativo pode indicar alterações, derivadas da ação química do agente sobre o crescimento e desenvolvimento do organismo exposto (HOSHINA, 2002). Conforme Turkoglu (2008), a redução do IM pode ser devida a uma inibição da síntese do DNA ou a um bloqueio da Fase G₂ do ciclo celular, impedindo que a célula entre em mitose.

No experimento realizado, a análise do tamanho das raízes dos organismos expostos foi condizente com a inibição do IM, o que vem constatar que a inibição do IM induziu uma redução no crescimento das raízes. Dessa forma, tais parâmetros sugerem indícios de toxicidade e citotoxicidade celular para a dose de 5,0 mg/mL e indicam que essa concentração interfere no processo de síntese do DNA. A citotoxicidade ainda não é bem conhecida como resposta aos agentes genotóxicos, isto porque as respostas aos danos genotóxicos é complexa, podendo levar desde reparos, fixação de danos, mutações, eliminações de danos e morte celular (KAINA, 2003; FRITZ e KAINA, 2006). Convém ressaltar que a clonidina, uma imidazolidina-2,4-diona, análoga estrutural do composto PT-31, não se mostrou carcinogênica, apresentando resultados negativos em alguns ensaios de genotoxicidade e mutagenicidade (*S. typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537, mutação reversa; *E. coli* uvrA de WP2, mutação reversa; UDS, hepatócitos de rato *in vivo*) (BRAMBILLA e MARTELLI, 2009). Entretanto, existem relatos de que a fenitoína, pertencente ao mesmo

grupo das imidazolidinas-2,4-dionas, durante estudos de sua bioativação *in vitro* produz compostos reativos intermediários indutores de radicais livres (WELLS et al., 2010) e pode ter efeitos teratogênicos em camundongos pela ação de um dos seus metabólitos epóxidos (FRIEDMAN et al., 2009).

Nas análises microscópicas foram observadas as seguintes aberrações cromossômicas (AC): cromossomos soltos e em atrasos, pontes e fragmentos cromossômicos em anáfases (**Figura 2**). Os resultados apresentados na **Tabela 2** mostram que o PT-31 possui atividade mutagênica em meristemas de *Allium cepa* somente na concentração de 1,0 mg/mL, como indicado pelo aumento significativo ($P < 0,05$) da frequência global de aberrações cromossômicas. Aberrações cromossômicas são caracterizadas como alterações na estrutura ou no número total de cromossomos, podendo ocorrer espontaneamente ou como resultado a exposições a agentes físicos e químicos (ALBERTINE, 2000).

Alterações estruturais em cromossomos podem ser induzidas por vários fatores, como: quebras e inibição da síntese do DNA ou replicação do DNA alterado. Alterações numéricas, por exemplo: aneuploidia e poliploidia podem ocorrer de forma espontânea ou pela ação de agentes aneugênicos (RUSSEL, 2002). A análise da frequência de aberrações mitóticas tem se destacado como marcador de danos ao material genético mais utilizado em *A. cepa*. A presença dessas alterações celulares não significa, obrigatoriamente, a ocorrência de danos permanentes na célula, uma vez que podem ser alvo de sistemas enzimáticos que garantem a integridade do genoma da célula (MA et al., 1995).

Pontes de cromossomos ou conexões intercromátides são formadas por fibras de cromatina que unem cromátides irmãs na metáfase e as mantêm juntas até a anáfase ou telófase (HOSHINA, 2002). Cromossomos em atraso são resultantes de um atraso devido à falha no deslocamento para um dos pólos da célula. Cromossomos soltos podem ser resultado de cromossomos inteiros, com origem aneugênica, que permaneceram como retardatários. Fragmentos podem ser oriundos da ação de agentes químicos que induzem quebras cromossômicas (clastogênicos) e sua interferência nos cromossomos está associada a quebras na molécula de DNA (TURKOGLU, 2008). Apesar da significância observada para a dose 1.0 mg/mL na frequência de AC, não foram significantes os dados relativos aos tipos de ACs.

De forma similar ao exposto com as ACs, significativo ($P < 0,05$), aumento na frequência de micronúcleos foi observado apenas na concentração de 1,0 mg/mL (**Tabela 2**). Isso sugere possíveis efeitos aneugênicos /clastogênicos da PT-31 nessa concentração em meristemas de *A. cepa*. De acordo com Fenech (2000), os micronúcleos (MN) são definidos como pequenas massas esféricas, extranucleares, constituídas de cromatina não incorporada

ao núcleo principal da célula durante as etapas finais da mitose, visualizáveis apenas em células em divisão. Alguns MN encontrados nas análises encontram-se expressos na **Figura 2**. A sua formação é, extensivamente, usada em epidemiologia molecular como um biomarcador de danos nos cromossomos, instabilidade genética e, eventualmente, risco de câncer.

A ocorrência dos micronúcleos representa uma resposta integrada de instabilidade de cromossomos, fenótipos e alterações celulares causadas por defeitos genéticos e/ou exposição exógena a agentes genotóxicos, refletindo inúmeras alterações cromossômicas importantes para a carcinogênese (FENECH, 2000; FENECH, 2006; FERNANDES et al., 2007). Dessa forma, a concentração de 1,0 mg/mL PT-31 é capaz de induzir aumento na frequência de micronúcleos, de forma similar ao seu análogo, fenitoína, que pode induzir danos oxidativos em roedores. De acordo com o “*Center for Drug Evaluation and Research*” a fenitoína pertence ao grupo 2B, portanto considerada como um possível carcinógeno para humanos, pela avaliação em testes citogenéticos *in vitro*, como também em testes com bactérias, em testes citogenéticos *in vivo* em roedores, incluindo também os testes de carcinogenicidade. Estudos recentes corroboram com as informações anteriores confirmando que a fenitoína pode induzir câncer de esôfago, fígado, pulmão e leucemia linfocítica (FRIEDMAN et al., 2009).

Em conclusão, o novo derivado imidazolidínico PT-31, agonista dos receptores $\alpha 2A$ -adrenérgicos, apresentou indícios de toxicidade e citotoxicidade para a dose de 5,0 mg/mL e mutagenicidade para a dose de 1,0 mg/mL. A menor concentração testada (0,5 mg/mL) demonstrou segura, não apresentando em nenhum dos parâmetros avaliados diferença estatística em relação ao grupo controle negativo. Esses resultados sugerem que o composto PT-31, na concentração de 5,0 mg/mL, pode provavelmente inibir a síntese do DNA ou bloquear da Fase G_2 do ciclo celular, impedindo que a célula entre em mitose; e na concentração de 1,0 mg/mL pode causar danos aneugênicos ou clastogênicos nas células das raízes de *A. cepa*. No que diz respeito ao sistema de teste *A. cepa*, observa-se que esse, assim como o teste de Ames, pode ser utilizado como um método pré-clínico para a triagem e análise de parâmetros relacionados à toxicidade, citotoxicidade e mutagenicidade, sendo preditivo de um perfil inicial de segurança e eficácia de novas moléculas.

Agradecimentos

Nós agradecemos ao Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, Recife, Brasil, que sintetizou e cedeu a molécula PT-31, permitindo, assim, a realização deste trabalho.

Referências

- ABHILASH, P.C. et al. Pesticide use and application: An Indian scenario. **Journal of Hazardous Materials**, v. 165, p.1–12, 2009.
- ALBERTINI ,R.J., ANDERSON D., DOUGLAS G.R. et al. IPCS guideline for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans, International Programme on Chemical Safety, **Mutat. Res.** v. 463; p. 111–172, 2000.
- BRAMBILLA G. e MARTELLI, A. Genotoxicity and carcinogenicity studies of analgesics, anti-inflammatory drugs and antipyretics. **Pharmacological Research.** v.60, p. 1–17, 2009.
- BUCKLIN B., EISENACH J.C., TUCKER B. et al. Pharmacokinetics and dynamic studies of intrathecal, epidural and intravenous dexmedetomidine. **Anesthesiology**, v.75, p. 662, 1991.
- KAMIBAYASHI T. e MAZE, M. Clinical uses of α_2 -adrenergic agonists. **Anesthesiology**, v.93, p. 345-1349, 2000.
- FATIMA R.A. e AHMAD M. Genotoxicity of industrial wastewaters obtained from two different pollution sources in northern India: a comparison of three bioassays, **Mutation Research.** v. 609, p. 81–91, 2006.
- FERNANDES, T.C.C., MAZZEO, D.E.C., MARIN-MORALES, M.A. et al. Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. **Pestic. Biochem. Phys.** v.88, p.252–259, 2007.
- FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research.** v.455, p.81-95, 2000.
- FENECH M. Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a “cytome” assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death, **Mutat. Res.** v. 600, p.58–66, 2006.
- FISKEJO, G. The *Allium test* as standard in environmental monitoring. **Hereditas.** v.102, p. 99-112, 1985.
- FISKEJO, G. The *Allium cepa* in wastewater monitoring. **Environ. Toxicol. Water.** v.8, p. 291–298, 1993.
- FRIEDMAN, G.D. et al. Epidemiologic evaluation of pharmaceuticals with limited evidence of carcinogenicity. **Int J Cancer.** v. 125, n. 9, p. 2173–2178, 2009.
- FRITZ, G. e KAINA, B. Rho GTPases: promising cellular targets for novel anticancer drugs. **Curr. Cancer Drug Targets**, v.6, p.1–142, 2006.

GRANT W.F. Chromosome aberration assays in *Allium*. A report of the U. S. Environmental Protection Agency Gen-Tox Program. **Mutation Res.** v.99, p.273-291, 1982.

HOSHINA, M.M. Avaliação da possível contaminação das águas do Ribeirão Claro-município de Rio Claro, pertencente à bacia do rio Corumbataí, por meio de testes de mutagenicidade em *Allium cepa*, Trabalho de conclusão (Bacharel Licenciatura - Ciências Biológicas), Universidade Estadual Paulista, Rio Claro/SP, 52 p, 2002.

KAINA, B. DNA damage-triggered apoptosis: critical role of DNA repair, double-strand breaks, cell proliferation and signaling. **Biochem. Pharmacol.** v.66, 1547–1554, 2003.

KAMIBAYASHI, T. e MAZE, M. Clinical uses of α_2 -adrenergic agonists. **Anesthesiology** v. 93:1345-1349, 2000.

KOVALCHUK, O.; KOVALCHUK, I.; ARKHIPOV, A. et al. The *Allium cepa* chromosome aberration test reliably measures genotoxicity of soils of inhabited areas in the Ukraine contaminated by the Chernobyl accident. **Mutat. Res.** v.415, p.47–57, 1998.

KULTZ, D. Molecular and evolutionary basis of the cellular stress response. **Annu. Rev. Physiol.** v. 67, p. 225-257, 2005.

LEME, D. M. e MARIN-MORALES M. A. *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. **Mutat Res**, v. 682, p. 71-78. 2009.

MA, T. H., XU, Z. et al. The improved *Allium/Vicia* root tip micronucleus assay for clastogenicity of environmental pollutants. **Mutat Res**, v.334, n.2, p.185-95, 1995.

MALUF, S.W., ERDTMANN, B. Biomonitoração do dano genético em humanos. In: SILVA, J. DA; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J. A. P. (Orgs.) **Genética toxicológica**, p. 183-205, 2003.

MAJER B.J., et al. Use of plant bioassays for the detection of genotoxins in the aquatic environment. **Acta Hydroch. Hydrob.** v.33, p. 45–55, 2005.

MITTEREGGER H.J. et al. Evaluation of genotoxicity and toxicity of water and sediment samples from a Brazilian stream influenced by tannery industries. **Chemosphere** p.1211–1217, 2007.

OLIVER M., GOLDMAN L., JULIAN D. et al. Effect of mivazerol on perioperative cardiac complications during non-cardiac surgery in patients with coronary heart disease: the European Mivazerol Trial (EMIT). **Anesthesiology** v.91, p.951-961, 1999.

RANK J. The method of *Allium* anaphase-telophase chromosome aberration assay, **Ekologija** p.38–42, 2003.

RANK J. e NIELSEN M.H. A modified *Allium* test as a tool in the screening of genotoxicity of complex mixtures. **Hereditas** v. 118, p.49–53, 1993.

RANK J. e NIELSEN M.H. Evaluation of the *Allium* anaphase–telophase test in relation to genotoxicity screening of industrial wastewater. **Mutat. Res.** v.312, p.17–24, 1994.

RANK J. e NIELSEN M.H.. *Allium cepa* anaphase-telophase root tip chromosome aberration assay on N-methyl-N-nitrosourea, maleic hydrazide, sodium azide, and ethyl methanesulfonate. **Mutation Research** v. 397, p.121-127, 1997.

REKHA, S.N. NAIK, R. P. Pesticide residue in organic and conventional food–risk analysis, **Chem. Health Safety** v.13, p.12–19, 2006.

RIBEIRO L.R. **Teste do micronúcleo em medula óssea de roedores *in vivo***, in: L.R. Ribeiro, D.M.F. Salvadori, E.K. Marques (Eds.), *Mutagênese Ambiental*, Ulbra, Canoas, pp. 201–219, 2003.

RUSSEL P.J. **Chromosomal mutation**, in: B. Cummings (Ed.), *Genetics*, Pearson Education Inc., San Francisco, p. 595–621, 2002.

SUDO T.R. et. al. Interaction of Morphine With a New α_2 -Adrenoceptor Agonist in Mice. *The Journal of Pain* 2010; 11; 71-78.

TURKOGLU S. et al. Evaluation of genotoxic effects of sodium propionate, calcium propionate and potassium propionate on the root meristem cells of *Allium cepa*. **Food and Chemical Toxicology** p.1-7, 2008.

WELLS, P.G. et al. Oxidative stress in developmental origins of disease: teratogenesis, neurodevelopmental deficits, and cancer. **Toxicol Sci.** v.108, p. 4-18, 2010.

Capítulo 3

5 Artigo IV – Estudo dos possíveis efeitos genotóxicos e mutagênicos do composto 3-(2-cloro-6-fluorobenzil)-imidazolidina-2,4-diona em medula óssea de camundongos com o ensaio cometa e o teste de micronúcleos.

Artigo submetido à revista *Mutation Research Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*

Estudo dos possíveis efeitos genotóxicos e mutagênicos do composto 3-(2-cloro-6-fluorobenzil)-imidazolidina-2,4-diona em medula óssea de camundongos com o ensaio cometa e o teste de micronúcleos.

LUCIO NETO, M.P.¹; DANTAS, A.F.¹; GOMES, D.C.V.^{1,2}; CARVALHO, R.M.²; LEITE, A.³; PAZ, M.⁴; LEITÃO, J.¹ e MELO-CAVALCANTE, ANA AMÉLIA^{1,2}

¹ Departamento de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Piauí – UFPI – Teresina – PI - Brasil.

² Faculdade NOVAFAPI – Teresina – PI - Brasil.

³ Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Piauí, Floriano – PI – Brasil.

⁴ Universidade Luterana do Brasil – ULBRA – Canoas – RS – Brasil.

Resumo

PT-31 é um novo derivado imidazolidínico que exibe um perfil analgésico, resultado da ativação dos receptores α_{2A} adrenérgicos. Esse estudo visa à identificação dos possíveis efeitos genotóxicos e mutagênicos do PT-31 em células de medula óssea de camundongos usando-se o ensaio cometa e o teste de micronúcleos. Dez camundongos por grupo (cinco machos e cinco fêmeas) foram tratados com a injeção intraperitoneal do composto teste, nas doses de 0,5; 1,0 e 5,0 mg/kg, além de um controle negativo (solvente) e um controle positivo (ciclofosfamida, 25 mg/kg). Após 24 horas de exposição, os animais foram sacrificados e procedeu-se com a coleta das células da medula óssea. No ensaio cometa, um total de 100 células foram analisadas randomicamente por tratamento, considerando-se dois parâmetros, o índice de danos (0 - 400) e a frequência de danos (0 – 100%). Para o teste de micronúcleos, a incidência de micronúcleos e células binucleadas foi observada em 2000 eritrócitos policromáticos. Os dados obtidos indicaram significativo aumento para a frequência de micronúcleos em 1,0 mg/kg para fêmeas ($P < 0,05$) e em 5,0 mg/kg para machos ($P < 0,05$) e fêmeas ($P < 0,001$). Os resultados foram similares para as frequências de células binucleadas em 2000 eritrócitos policromáticos de cada animal e para cada grupo. A relação de EPC/ENC foi significativa ($P < 0,001$), para citotoxicidade, na dose 5,0 mg/Kg. Aumento significativo ($P < 0,001$) foi observado para as frequências e índices de danos em machos e fêmeas para a dose de 5,0 mg/kg, como avaliado com o ensaio cometa. Assim, o estudo aponta que o composto PT-31 na dose de 5,0 mg/kg é mutagênico, genotóxico e citotóxico. Sugerimos trabalhos complementares, antes dos estudos clínicos, visando à identificação dos

mecanismos das atividades observadas em medula óssea de camundongos, para que seja implementado o uso farmacêutico do composto em foco.

Palavras-chave: Genotoxicidade; Mutagenicidade; Ensaio Cometa; Teste de Micronúcleos; Imidazolidina.

Abstract

PT-31 is a new imidazolidine derivative that exhibits analgesic profile, resulting from activation of α_{2A} -adrenoceptor. This study aims to identify the possible genotoxic and mutagenic effects of the PT-31 in bone marrow cells of mice using the comet assay and micronucleus test. Ten mice per group (five males and five females) were treated with intraperitoneal injection of test compound at doses of 0.5, 1.0 and 5.0 mg/kg, and a negative control (solvent) and a control positive (cyclophosphamide, 25 mg/kg). After 24 hours of exposure, the animals were sacrificed and proceeded with the collection of bone marrow cells. In the comet assay, a total of 100 cells per treatment were randomly analyzed, considering two parameters, the rate of damage (000-400) and the frequency of damage (0-100%). For the micronucleus test, and the incidence of micronucleated binucleated cells was observed in 2000 polychromatic erythrocytes. The data obtained indicated a significant increase to the frequency of micronuclei in 1.0 mg/kg for females ($P < 0.05$) and 5.0 mg/kg for males ($P < 0.05$) and females ($P < 0.001$). The results were similar for the frequencies of binucleated cells in 2000 polychromatic erythrocytes from each animal and for each group. The ratio of PCE/NCE was significant ($P < 0.001$), for cytotoxicity at a dose 5.0 mg/kg. Significant increase ($P < 0.001$) was observed for the frequencies and levels of damage in males and females to the dose of 5.0 mg/kg, as assessed with the comet assay. Thus, the study indicates that the compound PT-31 at a dose of 5.0 mg/kg is mutagenic, genotoxic and cytotoxic. We suggest further work before the clinical studies aimed at identifying the mechanisms of activity observed in mouse bone marrow, which is implemented for pharmaceutical use of the compound in focus.

Keywords: Genotoxicity; Mutagenicity; Comet assay, Micronucleus test; Imidazolidine.

1 Introdução

O composto PT-31 é uma imidazolidina-2,4-diona, cuja fórmula química é 3-(2-cloro-6-fluorobenzil)-imidazolidina-2,4-diona (**Figura 1**). As imidazolidinas são um conjunto de compostos heterocíclicos, formados por meio da adição de quatro átomos de hidrogênio ao anel imidazol (ARDUENGO et al., 1992). Os derivados imidazolidínicos apresentam ação biológica diversificada, como por exemplo, antimicrobiana, anti-convulsivante, analgésica, sedativa e antiparasitária. Tais compostos têm causado um grande impacto na indústria farmacêutica, visto que vários fármacos contendo esse anel heterocíclico são utilizados na clínica (OLIVEIRA et al., 2008).

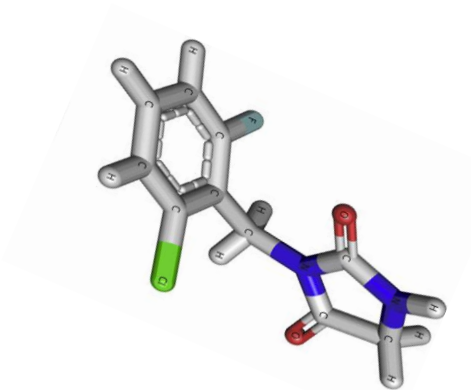


Figura 1 Fórmula estrutural do PT-31. Adaptada de Sudo et al.(2010).

Estudos *in vivo* em camundongos e um modelo molecular (*software BioMedCache – método AM1*) demonstraram ação analgésica dose-dependente do PT-31 e sinergismo com o opióide morfina, resultado da ativação dos receptores α_2 -adrenérgicos (SUDO et al., 2010). Sabe-se que os fármacos agonistas dos receptores α_2 -adrenérgicos apresentam importante papel na modulação da dor, inibindo a condução nervosa (SCHNAIDER et al., 2005). O uso concomitante de agonistas dos receptores α_2 -adrenérgicos com a morfina tem sido, experimentalmente e clinicamente, reportado com o intuito de redução dos efeitos colaterais e aumento da eficácia de tal opióide (ROCHA et al., 2002). Dessa forma, o composto PT-31 vem ampliar o arsenal disponível na terapêutica da dor, uma vez que, em triagens farmacológicas, mostrou-se promissor e sinérgico com a morfina, aumentando a potência e reduzindo os efeitos colaterais desse opióide. Alguns trabalhos complementares são necessários com o intuito do estabelecimento de um perfil de segurança e eficácia para o PT-31.

Nos estágios iniciais de desenvolvimento de novos fármacos tem sido dada grande ênfase aos estudos de genotoxicidade, uma vez que, dentre as várias reações adversas que um

medicamento pode causar a ocorrência de efeitos genotóxicos e carcinogênicos não pode ser excluída. A fim de avaliar-se o risco de efeitos genotóxicos e cancerígenos para seres humanos, as autoridades reguladoras da Europa, Japão e EUA recomendam que estudos de genotoxicidade e de carcinogenicidade sejam realizados antes da aprovação da comercialização de produtos farmacêuticos (BRAMBILLA e MARTELLI, 2009). Dois testes bastante utilizados na avaliação genotóxica e mutagênica de produtos químicos são o ensaio cometa e o teste de micronúcleos (CARVALHO et al., 2010).

O teste de micronúcleos em medula óssea de roedores *in vivo* é amplamente aceito pelas agências internacionais e instituições governamentais, como parte de uma bateria de testes recomendados para se estabelecer avaliação e registro de novos produtos químicos e farmacêuticos que entram anualmente no mercado mundial (CHOY, 2001). Este teste foi desenvolvido de início, em eritrócitos de medula. O ensaio é utilizado como padrão de teste de mutagenicidade OECD –“Guidelines for the testing of chemicals/ section 4: Health Effects – Mammalian Erythrocytes Micronucleos Test: nº 474 e recomendado pelo Gene-Tox Program, Environmental Protection Agency – EPA/US”. O teste *in vivo* é especialmente relevante para avaliar a genotoxicidade pela detecção de clastogenicidade e a aneugenicidade (KRISHMA e HAYASHI, 2000).

O ensaio cometa é uma técnica consolidada para mensurar e analisar as lesões em células individuais expostas a agentes genotóxicos. Os danos mais facilmente detectados no DNA são quebras (simples ou duplas), danos alcali-lábeis, *crosslinks* e quebras resultantes de reparo por excisão. Este teste pode ser utilizado para qualquer tipo de células (qualquer tecido que possam ser extraídas células nucleadas), sendo necessário apenas um pequeno número das mesmas e de não requerer células em divisão (TICE et al., 2000; SILVA et al., 2000). Como complemento à bateria de testes padrão de genotoxicidade, o ensaio cometa *in vivo* é usado para selecionar candidatos potenciais de fármacos no início do desenvolvimento. Devido à sua flexibilidade, ele pode ser combinado ou incorporado à maioria das baterias de testes padrão para fornecer dados sem despesas adicionais de tempo e recursos exigidos por um estudo independente (VASQUEZ, 2009).

Este trabalho objetiva a avaliação *in vivo* dos possíveis efeitos mutagênicos e genotóxicos do composto PT-31 em células de medula óssea de camundongos, utilizando-se o ensaio cometa e o teste de micronúcleos.

2 Material e Métodos

2.1 Síntese química do PT-31

O composto PT-31 foi gentilmente cedido para realização desses testes pré-clínicos pelo Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil.

2.2 Animais e Tratamentos

Nos experimentos foram utilizados camundongos da espécie *Mus musculos*, com 20 a 30 g de peso, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Piauí – UFPI, Teresina-PI, Brasil, concedidos após aprovação pelo Comitê de Ética e Pesquisa dessa instituição (Protocolo nº0106/10). Em todos os experimentos realizados, o número de camundongos por grupo foi igual a 10 (dez), sendo 05 (cinco) machos e 05 (cinco) fêmeas, que foram tratados através da administração intraperitoneal de PT-31, nas concentrações de 0,5; 1,0 e 5,0 mg/kg, além de um controle negativo (DMSO 0,5%, solvente utilizado na diluição do PT-31) e um controle positivo (ciclofosfamida, 25 mg/kg). Experimentos prévios não demonstraram diferença estatística entre o DMSO 0,5% e a água destilada, comprovando que o solvente não interfere nos resultados obtidos para as concentrações testadas do PT-31. As concentrações finais de todas as soluções foram ajustadas para 2,5 mL/kg para a administração nos camundongos.

Todos os animais foram mantidos sem restrições alimentar (ração Labine-PURINE) e de ingestão de líquidos, durante todo o experimento, garantida sua adaptação em sala climatizada a 22 ± 3 °C e umidade de 50 - 60 %, com ciclo claro/escuro de 12 h, e em caixas de polipropileno adequadas a sua manutenção.

2.3 Ensaio Cometa

O ensaio cometa foi realizado de acordo com o protocolo de Singh et al. (1988), com pequenas alterações (TICE, 1995). Após um intervalo de 24 horas dos tratamentos, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e procedeu-se a coleta da medula óssea. As células da medula foram extraídas dos dois fêmures, com 2 mL de soro bovino fetal, sendo preparadas duas lâminas por animal.

As lâminas foram previamente cobertas com 200 µL de agarose com ponto de fusão normal – NMA - (0,75%, v/v, 90L) - em tampão fosfato salino livre de cálcio e magnésio

(PBS) e estocadas em câmara escura, úmida a 4 °C, até o momento do uso (dentro de 24 h). Após a incubação, 10 µL da suspensão celular foram adicionados em 90 µL de agarose de baixo ponto de fusão (1,5%, v/v), LMPA, em 35 °C e a mistura foi adicionada a uma lâmina de microscópio pré-revestida com NMA e coberta com uma lamínula. Depois da solidificação da agarose (5 min em uma bandeja de metal sob refrigeração), as lâminas foram mergulhadas em solução de lise recém-preparada e resfriada (10% DMSO, 1% Triton X-100, 2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, pH 10,0 – 10,5) por 72 h a 4 °C.

Posteriormente, as lâminas foram acondicionadas em cuba de eletroforese horizontal e cobertas com tampão de eletroforese fresco (0.0075 M, 1mM EDTA, pH 13) por 20 min. A eletroforese foi realizada por 15 min a 25 V e 300 mA. Após a eletroforese, as lâminas foram neutralizadas com solução de Tris 400 Mm (pH 7,5), fixadas (15%, v/v, ácido tricloroacético, 5%, v/v, sulfato de zinco, glicerol 5%), lavadas com água destilada e postas para secar durante a noite. Os géis foram re-hidratados por 5 minutos em água destilada e corados por 15 min (37 °C) com uma solução contendo a seguinte sequência: 34 mL de solução B (0,2%, v/v, amonionitrato, 0,2%, v/v, nitrato de prata, 0,5%, v/v, ácido tungstosalisílico, 0,15%, v/v, formaldeído, 5%, v/v, carbonato de sódio) e 66 mL de solução A (carbonato de sódio 5 %). A coloração foi interrompida com uma solução de ácido acético 1 % e os géis postos para secar à temperatura ambiente.

Um total de 100 células foram analisadas randomicamente por tratamento. Foram considerados dois parâmetros o índice de danos –ID (0-400) e frequência de danos – FD (0-100%). Para o cálculo ID, as células foram, visualmente, classificadas em cinco classes, de acordo com o tamanho da cauda dos cometas (0 = sem cauda; 4 = máximo comprimento da cauda), o que resultou em um escore único de danos ao DNA de cada amostra e, conseqüentemente, para cada grupo estudado. A FD em % foi calculada para cada amostra, com base no número de células com cauda em relação às células com dano 0. Todas as lâminas foram codificadas para análise cega.

2.4 Teste de Micronúcleos

O teste de micronúcleos (MN) foi realizado conforme recomendações de Mavournin et al. (1990), e algumas modificações propostas por Da Silva et al. (2009). Decorridas 24 horas da administração das soluções teste, procedeu-se a extração das células da medula óssea dos animais, através dos dois fêmures, com 2 mL de soro bovino fetal. Foram feitos dois esfregaços por animal, os quais foram confeccionados diretamente nas lâminas. Após 24 horas, as lâminas foram fixadas com metanol:ácido acético (3:1) e coradas com uma mistura

de azul de metileno (Giemsa:May-Grünwald) e 0,2 M de tampão fosfato (pH 5,8), na proporção de 60:30:10, respectivamente. A análise do material foi realizada em microscópio óptico comum a uma resolução de 10X100. As lâminas foram codificadas para análise cega. Os critérios de identificação de micronúcleos foram os descritos por Sarto et al. (1987) e por Tolbert et al. (1991,1992), como estruturas que apresentem distribuição cromatínica e coloração igual (ou mais clara) do que a do núcleo, que estejam no mesmo plano que este, apresentem limites definidos e semelhantes aos nucleares e o seu tamanho não ultrapasse 1/3 do tamanho do núcleo. Foram computadas apenas células apresentando citoplasma íntegro. Como anormalidade nuclear pertinente à citotoxicidade considerou-se a presença de células binucleadas (BN) de acordo com Holland et al. (2008). Para evitar resultados falso-positivos e como um índice de citotoxicidade à medula, foi calculada a relação entre eritrócitos policromáticos e eritrócitos normocromáticos (EPC/ENC) em 1000 células. A incidência de MN e BN foi observada em 2000 EPC (1000 em cada lâmina preparada por animal).

2.5 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada pelo programa Graph PRISMA versão 5.00, por meio de estatística descritiva e ANOVA não paramétrica, com o teste de Tukey, para múltiplas comparações entre os grupos do sistema teste, com níveis de significâncias de * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$.

3 Resultados

A **Tabela 1** apresenta os resultados de ID e FD para as células de medula óssea de camunongos, por gênero, após 24 h da injeção intraperitoneal das soluções teste de PT-31 (0,5; 1,0 e 5,0 mg/kg). O controle positivo demonstrou significância estatística para o ID e o FD, em comparação ao controle negativo. Para o composto PT-31, apenas a concentração de 5,0 mg/kg apresentou um significativo ($P < 0,001$) aumento nos valores do ID e FD, em machos e fêmeas, em relação ao controle negativo. Na **Figura 2**, verifica-se que na avaliação por grupo houve diferença estatística em relação ao solvente, apenas da FD para as concentrações de 1,0 mg/kg e 5,0 mg/kg.

Tabela 1 Índice de Danos e Frequência de Danos (média \pm desvio padrão) para células de medula óssea de camundongos, após 24 horas da administração intraperitoneal de PT-31, nas concentrações de 0,5; 1,0 e 5,0 mg/kg. Para cada grupo n=10 (cinco machos e cinco fêmeas). 100 células por animal.

Grupo	Gênero	Índice de Danos	Frequência de Danos
Controle Negativo^a	Machos	15.00 \pm 3.60	12.40 \pm 2.07
	Fêmeas	17.20 \pm 3.83	14.80 \pm 3.42
Controle Positivo^b	Machos	120.20 \pm 10.83***	98.80 \pm 1.30***
	Fêmeas	158.00 \pm 5.21***	98.60 \pm 1.34***
PT-31 0,5 mg/kg	Machos	26.00 \pm 4.36	27.40 \pm 6.02
	Fêmeas	38.38 \pm 19.27	33.60 \pm 15.18
PT-31 1,0 mg/kg	Machos	28.80 \pm 9.73	27.00 \pm 4.85
	Fêmeas	50.80 \pm 25.31	33.80 \pm 15.07
PT-31 5,0 mg/kg	Machos	47.40 \pm 11.50***	45.80 \pm 16.72***
	Fêmeas	89.20 \pm 29.86***	50.60 \pm 14.54***

^a DMSO 0,5%;

^b Ciclofosfamida, 25 mg/kg;

Diferença significativa em relação ao controle negativo ao nível de *** P<0,001 (ANOVA-Teste de Tukey).

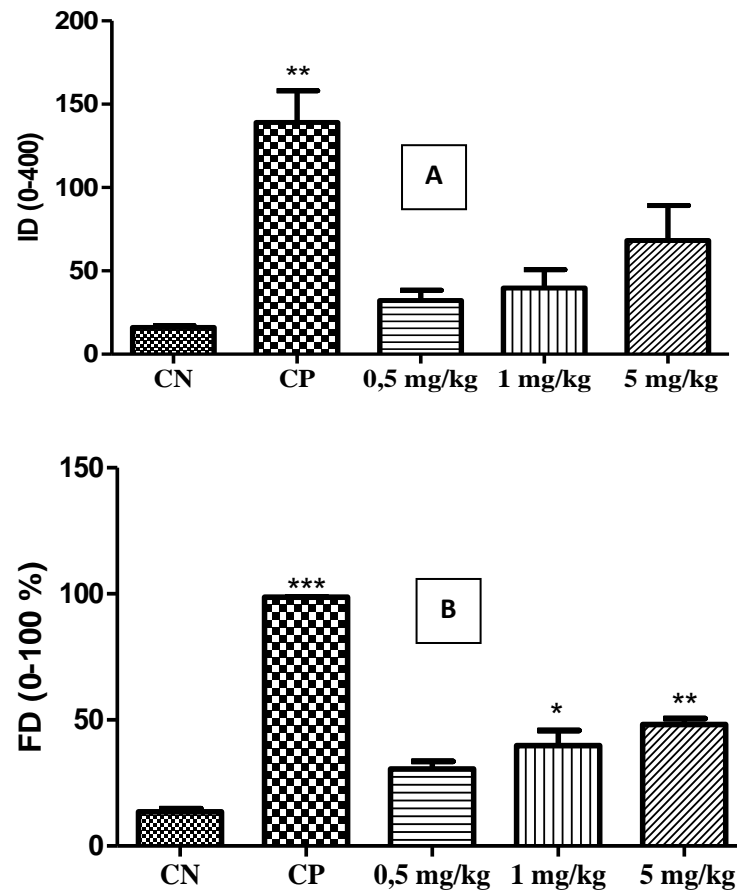


Figura 2 Índice de Danos (A) e Frequência de Danos (B) por grupo (média \pm desvio padrão) em células de medula óssea de camundongos, após 24 horas da administração intraperitoneal de PT-31 (0,5; 1,0 e 5,0 mg/kg). Para cada grupo $n = 10$ (cinco machos e cinco fêmeas). CN: controle negativo (DMSO, 0,5%); CP: controle positivo (Ciclofosfamida, 25 mg/kg). 100 células por animal. Diferença significativa em relação ao controle negativo ao nível de * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$ (ANOVA-Teste de Tukey).

A **Tabela 2** apresenta os resultados do teste de MN, onde foram identificadas e contadas as células micronucleadas e binucleadas, como também a relação EPC/NPC. O perfil das anormalidades referidas está apresentado na **Figura 3**. O teste de Tukey revelou que o controle positivo demonstrou diferença estatística em relação ao controle negativo para a incidência de MN e células BN. Houve significância estatística para as frequências de MN e BN, quando comparadas com o controle negativo, para a dose de 1,0 mg/kg em fêmeas e para dose de 5,0 mg/kg em ambos os sexos. A avaliação por grupo demonstrou que houve diferença estatística em relação ao controle negativo apenas para incidência de BN na dose de 5,0 mg/kg (**Figura 4**).

Tabela 2 Determinação de micronúcleos e células binucleadas por gênero (média±desvio padrão) em células de medula óssea de camundongos, após 24 horas da administração intraperitoneal de PT-31, nas concentrações de 0,5; 1,0 e 5,0 mg/kg. Para cada grupo n=10 (cinco machos e cinco fêmeas). 2000 células por animal.

Grupo	Gênero	Micronúcleos	Binucleadas	Relação (PCE:NCE ^a) Por grupo
Controle Negativo^b	Machos	2.80±0.45	18.60±4.16	1.24±0.23
	Fêmeas	3.20±0.45	13.20±4.81	
Controle Positivo^c	Machos	11.20±1.48***	158.00±25.88***	0.80± 0.08***
	Fêmeas	15.00±2.45***	121.00±19.49***	
PT-31 0,5 mg/kg	Machos	4.00±0.71	24.00±10.84	1.15±0.10
	Fêmeas	5.60±1.51	15.80±5.90	
PT-31 1,0 mg/kg	Machos	4.80±1.10	30.80±9.47	1.12±0.05
	Fêmeas	9.00±2.00*	63.00±15.25***	
PT-31 5,0 mg/kg	Machos	6.40±3.36*	123.0±29.50**	0.82±0.03***
	Fêmeas	9.80±3.96**	113.00±38.18***	

^a PCE, eritrócitos policromáticos; NCE, eritrócitos normocromáticos

^b DMSO 0,5%

^c Ciclofosfamida, 25 mg/kg.

Diferença significativa em relação ao controle negativo ao nível de *P<0,05; ** P<0,01 e *** P<0,001 (ANOVA- Teste de Tukey).

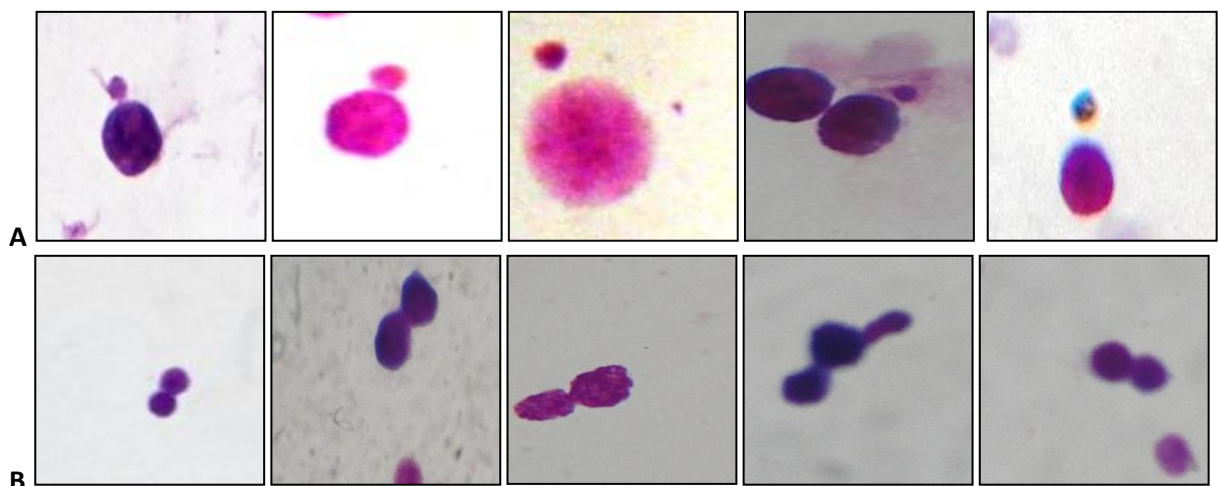


Figura 3 Fotomicrografias (aumento de 1000X) de MN (A) e células BN (B) encontrados em medula óssea de camundongos após 24 h da administração intraperitoneal de PT-31 (0,5; 1,0 e 5,0 mg/kg).

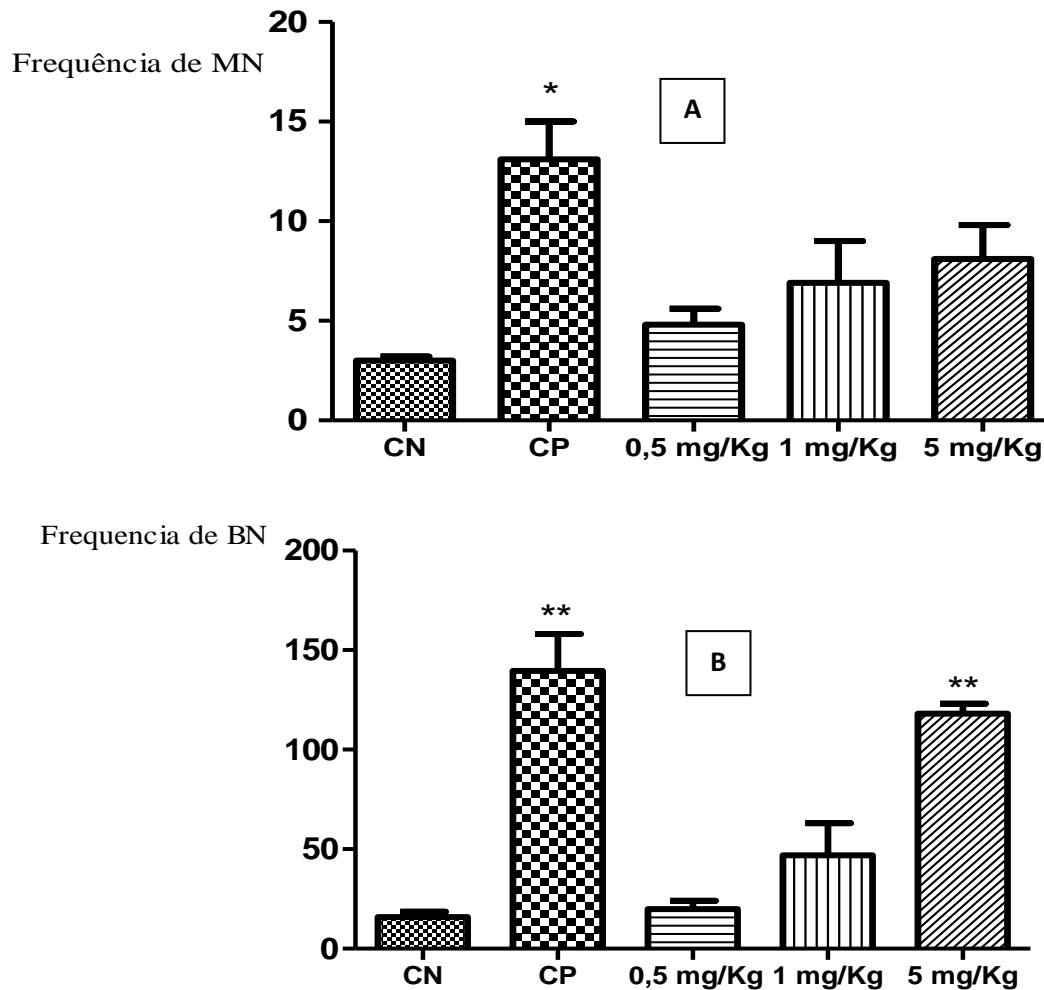


Figura 4 Micronúcleos (A) e células binucleadas (B) por grupo (média±desvio padrão) em células de medula óssea de camundongos, após 24 horas da administração intraperitoneal de PT-31 (0,5; 1,0 e 5,0 mg/kg). Para cada grupo n = 10 (cinco machos e cinco fêmeas). CN: controle negativo; CP: controle positivo (Ciclofosfamida). 2000 células por animal. Diferença significativa em relação ao controle negativo ao nível de *P<0,05 e ** P<0,01 (ANOVA- Teste de Tukey).

A **Figura 5** apresenta um perfil fotomicrográfico (aumento de 1000 X) de esfregaços de medula óssea de camundongos após 24 h da administração intraperitoneal de PT-31 (0,5; 1,0 e 5,0 mg/kg).

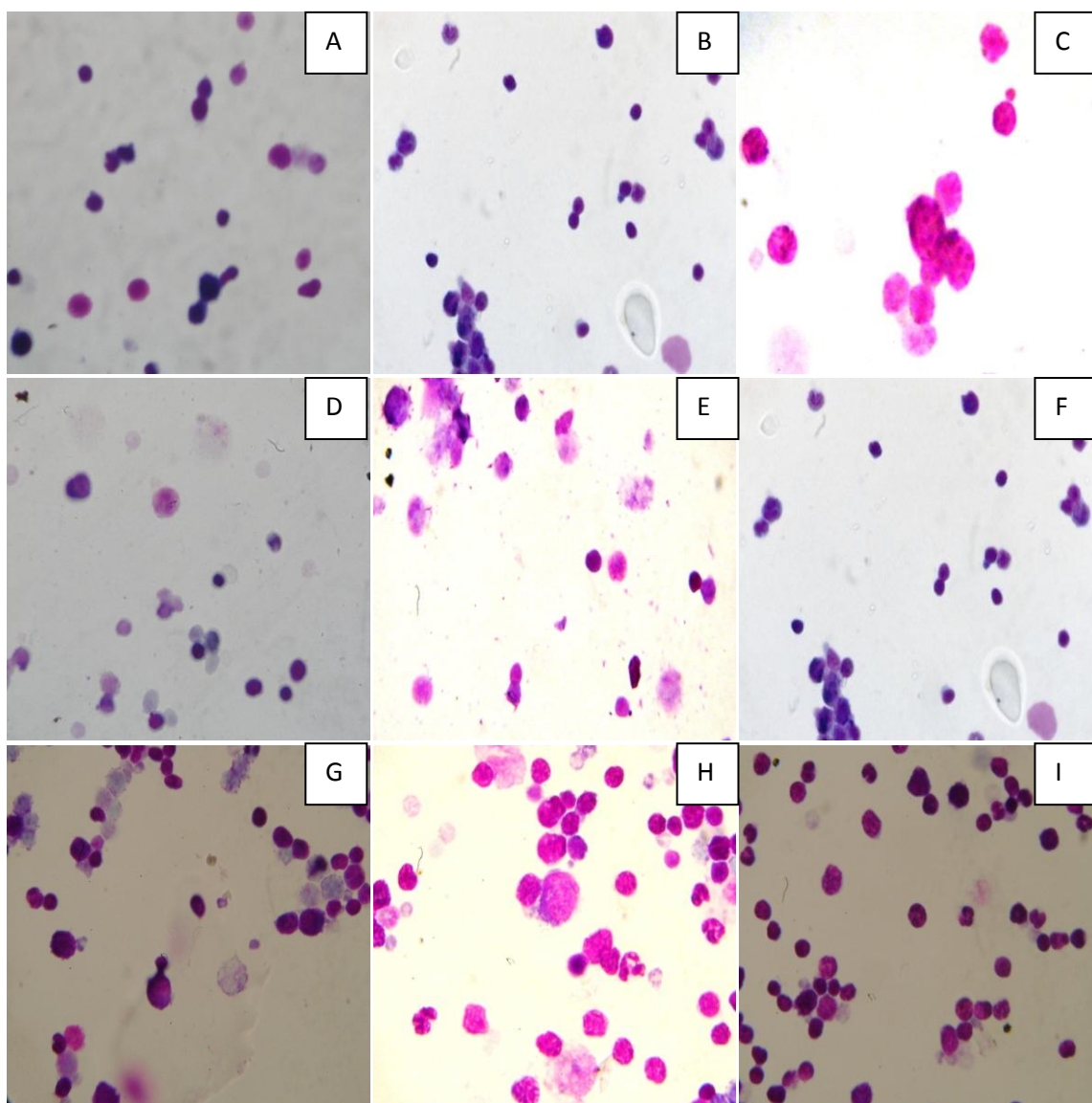


Figura 5 Perfil fotomicrográfico (aumento de 1000X) de esfregaço de medula óssea de camundongos após 24 h da administração intraperitoneal de PT-31 nas doses de 0,5 (A, B e C); 1,0 (D, E e F) e 5,0 mg/kg (G,H e I).

4 Discussão

Tendo em vista que o ensaio cometa é um biomarcador de genotoxicidade que indica danos recentes ao DNA, com ações da maquinaria de reparo (COLLINS, 2008), o presente estudo com a aplicação do referido ensaio, na versão alcalina, identificou os possíveis danos em células de medula óssea de camundongos induzidos pelo composto PT-31. Com os parâmetros do ensaio cometa (ID e FD) por gênero verificou-se a ocorrência de danos ao DNA, em medula óssea de machos e fêmeas, apenas para a concentração de 5,0 mg/kg (**Tabela 1**). Na avaliação por grupo, observou-se aumento de danos apenas em relação ao FD

para as doses de 1,0 e 5,0 mg/kg (**Figura 2**). A menor concentração testada (0,5 mg/kg) não apresentou aumento de danos em relação ao controle negativo, em nenhum dos parâmetros avaliados, demonstrando ausência de efeitos genotóxicos. Os resultados indicam possível ação genotóxica do PT-31 em células de medula óssea de camundongos, nas doses de 1,0 mg/kg (por grupo) e 5,0 mg/kg (por grupo e por gênero). Vale ressaltar que a clonidina, um derivado imidazolidínico, análoga estrutural do composto PT-31, não se mostrou carcinogênica, apresentando resultados negativos em alguns ensaios de genotoxicidade e mutagenicidade (*S. typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537, mutação reversa; *E. coli* uvrA de WP2, mutação reversa; UDS, hepatócitos de rato *in vivo*) (BRAMBILLA e MARTELLI, 2009). Entretanto, existem relatos de que a fenitoína, pertencente ao mesmo grupo das imidazolidinas-2,4-dionas, durante estudos de sua bioativação *in vitro* produz compostos reativos intermediários indutores de radicais livres (WELLS et al., 2010) e pode ter efeitos teratogênicos em camundongos pela ação de um dos seus metabólitos epóxidos (FRIEDMAN et al., 2009).

Dessa forma, o PT-31 é um composto análogo à fenitoína, ainda não avaliado quanto aos aspectos tóxicos e genotóxicos. A fenitoína pode induzir danos oxidativos (KUBOL e WELLS, 1989). Os danos oxidativos puderam ser identificados no ensaio realizado, uma vez que são possíveis de serem detectados na versão alcalina do teste do cometa. Os danos observados, no presente estudo, podem ser, provavelmente, relacionados às quebras simples e duplas, formação de adutos ao DNA e pontes intra e inter cadeias possíveis de serem pontuadas na versão alcalina do ensaio cometa, como relatado por Kultz (2005).

Vale ressaltar que duas estratégias estão envolvidas nas respostas aos danos ao DNA: os danos são reparados ou tolerados, ou as células são removidas por apoptose e o não reparo leva às consequências tais como as aberrações cromossômicas, mutações em genes e transformações malignas (KULTZ, 2005; VASQUEZ, 2010). Entretanto, no presente estudo, não foi realizado avaliações de reparo. Mas, para melhor investigar os efeitos do composto PT-31, investigou-se suas possíveis ações em células em divisão, com o teste de micronúcleos em medula óssea, como uma estratégia para observação de prováveis efeitos clastogênicos e/ou aneugênicos, pois para Hartmann et al. (2003) uma das desvantagens do ensaio cometa é a não detecção dos efeitos citados.

Os micronúcleos são marcadores da exposição humana a genotóxicos e têm sido, extensivamente, usados para identificar agentes mutagênicos. Sua incidência pode indicar instabilidade cromossomal e sua alta frequência ocorre em células tumorais e em células com defeitos em reparo de DNA os disruptão do checkpoint no ciclo celular. Recentemente, evidências acumuladas sugerem indução de parada no ciclo celular ocasionando a indução de

apoptose (TERRADAS et al., 2010). A **Tabela 2** apresenta os resultados do teste de micronúcleos por gênero. Identifica-se um aumento na incidência de micronúcleos para a dose de 1,0 mg/kg (apenas em fêmeas) e 5,0 mg/kg (em machos e fêmeas). Entretanto, a avaliação por grupo não demonstrou diferença estatística entre nenhum grupo teste e o controle negativo (**Figura 2**). Apesar da não significância de nenhuma dose por grupo, nossos resultados indicam possível ação mutagênica do PT-31 para células de medula óssea de camundongos. Alguns micronúcleos, identificados nos experimentos realizados, encontram-se expressos na **Figura 3A**.

Tal efeito pode ser devido à possível ação clastogênica ou aneugênica do composto PT-31, uma vez que os micronúcleos podem ser gerados de diferentes processos, oriundos de quebras ou perdas de cromossomos (FENECH, 2007). Agentes clastogênicos são aqueles capazes de provocar quebra cromossômica, enquanto aneugênicos são aqueles que podem interferir no fuso mitótico. A atuação desses agentes, dentre outras formas, é responsável pela origem das aberrações cromossômicas estruturais e numéricas (TERRADAS et al., 2010).

A formação de micronúcleos é extensivamente usada em epidemiologia molecular como um biomarcador de danos nos cromossomos, instabilidade genética e, eventualmente, risco de câncer. A ocorrência dos micronúcleos representa uma resposta integrada de instabilidade de cromossomos, fenótipos e alterações celulares causadas por defeitos genéticos e ou exposição exógena a agentes genotóxicos, refletindo inúmeras alterações cromossômicas importantes para a carcinogênese. Existem relatos de associações entre polimorfismos genéticos e formação de micronúcleos e que variantes genéticas podem modular os efeitos da exposição ambiental aos agentes genotóxicos, bem como idade, características de estilo de vida (álcool, fumo, folatos) e doenças (cardiovasculares, câncer) (BONASSI, et. al., 2007). O composto em foco induz aumento na frequência de micronúcleos nas maiores doses testadas, de forma similar ao seu análogo, fenitoína, que pode induzir danos oxidativos em roedores. De acordo com o “*Center for Drug Evaluation and Research*” a fenitoína pertence ao grupo 2B, portanto considerada como um possível carcinógeno para humanos, pela avaliação em testes citogenéticos *in vitro*, como também em testes com bactérias, em teste citogenéticos *in vivo* em roedores, incluindo também os testes de carcinogenicidade. Estudos recentes corroboram com as informações anteriores confirmando que a fenitoína pode induzir câncer de esôfago, fígado, pulmão e leucemia linfocítica (FRIEDMAN et al., 2009).

Quanto às células binucleadas, estas são indicativas de citotoxicidade decorrentes numa falha no processo de citocinese (HOLLAND et al. 2008). O aumento na sua incidência

pode prever uma falha no mecanismo de diferenciação celular ou ser secundária a agentes genotóxicos. Os processos subjacentes ao aparecimento dessas anormalidades não são ainda totalmente compreendidos. Porém, existe um grande número de publicações que se referem a esses critérios (OZKUL et al., 1997; GONSEBATT et al.,1997; BURGAZ et al., 1999; REVAZOVA et al.,2001; CELIK et al., 2003; BASU et al.,2002; CARVALHO et al., 2002). Dessa forma, os resultados encontrados (**Tabela 2** e **Figura 2**) indicam possível ação citotóxica do PT-31, para células de medula óssea de camundongos, nas concentrações de 1,0 mg/kg (em fêmeas) e de 5,0 mg/kg (em ambos os sexos e por grupo). Algumas células binucleadas, identificadas nas análises, encontram-se expressas na **Figura 3B**.

A citotoxicidade ainda não é bem conhecida como resposta aos agentes genotóxicos, isto porque as respostas aos danos genotóxicos é complexa podendo levar desde reparos, fixação de danos, mutações, eliminações de danos e morte celular (KAINA, 2003; FRITZ e KAINA, 2006). Observa-se que houve diferença estatística com significância de $P < 0,001$ entre a relação ENC/EPC na concentração de 5,0 mg/Kg. Esse dado corrobora com as observações relatadas sobre a frequência de células binucleadas em medula óssea (**Tabela 2**). A **Figura 4** apresenta o perfil fotomicrográfico de esfregaço de medula óssea de camundongos após 24 h da administração intraperitoneal de PT-31 nas doses de 0,5 (A, B e C); 1,0 (D, E e F) e 5,0 mg/kg (G,H e I).

Diante do exposto, é possível indicar os riscos da aplicação clínica do composto PT-31 em doses acima de 1,0 mg/Kg, devido às atividades observadas para genotoxicidade e mutagenicidade. Entretanto, novos testes devem ser feitos para melhor averiguar os mecanismos de indução de danos ao material genético pelo composto em foco, tendo em vista inúmeros relatos sobre a ação de lesões ao DNA, tais como adutos, quebras e inativação de genes de reparo de vários fármacos com atividades carcinogênicas (BRAMBILLA e MARTELLI, 2009).

Em conclusão, nossos resultados demonstram que a injeção intraperitoneal de PT-31 em camundongos nas doses de 1,0 e 5,0 mg/kg pode estar associada a possíveis riscos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos às células da medula óssea. Alguns estudos complementares devem ser realizados no sentido de confirmação dos resultados e elucidação dos possíveis mecanismos causadores dos danos.

Agradecimentos

Nós agradecemos ao Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, Recife, Brasil, que sintetizou e cedeu a molécula PT-31, permitindo, assim, a realização deste trabalho.

Referências

ARDUENGO, A. J. et al. Electronic stabilization of nucleophilic carbenes . **J. Am. Chem. Soc.** v. 114: 5530, 1992.

BASU A. et al., Enhanced frequency of micronuclei in individuals exposed to arsenic through drinking water in West Bengal, India, **Mutat. Res.**, v.516, p.29–40, 2002.

BONASSI S, A. et al. An increased micro-nucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. **Carcinogenesis**. v. 28, p. 625-631, 2007.

BRAMBILLA, G. e MARTELLI, A. Genotoxicity and carcinogenicity studies of antihypertensive agents. **Mutation Research** v.612, p.115–149, 2009.

BURGAZ S. et al. Urinary cyclophosphamide excretion and micronuclei frequencies in peripheral lymphocytes and in exfoliated buccal epithelial cells of nurses handling antineoplastics, **Mutat. Res** v.439, p. 97–104, 1999.

CARVALHO, M. B. et al. Relationship between the outcome and the frequency of micronuclei in cells of patients with oral and oropharyngeal carcinoma, **Assoc. Med. Bras**, v. 48, p. 317–322, 2002.

CARVALHO, S. M. **Padrões de exposição diferencial ao tiametoxam e variação sazonal da atividade enzimática em apis mellifera: potencial como indicadora da qualidade ambiental.** Disponível em: <http://www.bv.fapesp.br/pt/bolsas/45345/padroes-exposicao-diferencial-tiametoxam-variacao>. Acesso em: 09/12/2010.

CELIK A. et al. Cytogenetic biomonitoring in petrol station attendants: micronucleus test in exfoliated buccal cells. **Mutagenesis** v.18, p. 417-421, 2003.

CHOY, W. N. **Regulatory genetic toxicology tests.** In: CHOY, W. N; DEKKER, M. (Ed.). Genetic Toxicology and Cancer Risk Assessment. New York, p.93-113, 2001.

COLLINS, A.R. Investigating oxidative DNA damage and its repair using the comet assay. **Mutrev**, p.1–9, 2008

DA SILVA, L.B., BORTOLI, M. G., AZEVEDO, M. B . Cytogenetic biomonitoring of Brazilian workers exposed to pesticides: Micronucleus analysis in buccal epithelial cells of soybean growers. **Mutation Research** v. 675, 2009.

FENECH, M. Low intake of calcium, folate, nicotinic acid, vitamin E, retinol, beta-carotene and high intake of pantothenic acid, biotin and riboflavin are significantly associated with increased genome instability—results from a dietary intake and micronucleus index survey in South Australia. **Carcinogenesis**, v.26, p. 991–999, 2007.

FRIEDMAN, G.D. et al. Epidemiologic evaluation of pharmaceuticals with limited evidence of carcinogenicity. **Int J Cancer**. v. 125, n. 9, p. 2173–2178, 2009.

FRITZ, G. e KAINA, B. Rho GTPases: promising cellular targets for novel anticancer drugs. **Curr. Cancer Drug Targets**, v.6, p.1–142, 2006.

GONSEBATT M.E. et al. Micronucleus (MN) frequency in nasal respiratory epithelium from young adults living in urban areas with different levels of air pollution, **Mut. Res**; v.379,p.198, 1997.

HARTMANN, A., PLAPPERT, U., POETTER, F. et al. Comparative study with the alkaline Comet assay and the chromosome aberration test. **Mutation Research**; v.536, p.27–38, 2003.

HOLLAND, N. et al. The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for biomonitoring DNA damage: the HUMN project perspective on current status and knowledge gaps. **Mutation Research**, v. 659, p. 93-108, 2008.

KAINA, B. DNA damage-triggered apoptosis: critical role of DNA repair, double-strand breaks, cell proliferation and signaling. **Biochem. Pharmacol.** v. 66, 1547–1554, 2003.

KRISMA, G. e HAYASHI, M. In vivo rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. **Mutation Research**. v.455, p.155-166, 2000.

KULTZ, D. Molecular and evolutionary basis of the cellular stress response. **Annu. Rev. Physiol.** v.67, p.225–257, 2005.

MAVOURNIN KH,et al .The in vivo Micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the U.S. Environmental Protection Agency. Gene-Tox Program. **Mutation Res**, v. 239, p. 29-80, 1990.

OZKUL Y, DONMEZ H, ERENMEMISOGLU A, DEMIRTAS H, IMAMOGLU N. Induction of micronuclei by smokeless tobacco on buccal mucosa cells of habitual users, **Mutagenesis** v.12, p.285–287, 1997.

OLIVEIRA, S. M. et al. Estrutura, reatividade e propriedades biológicas de hidantoínas. **Quím. Nova** v.31, n.3, p. 614-622, 2008.

REVAZOVA J, YURCHENKO V, KATOSOVA L, PLATONOVA V, SYCHEVA L, KHRIPACH L, INGEL F, TSUTSMAN T, ZHURKOV V. Cytogenetic investigation of women exposed to different levels of dioxins in Chapaevsk town, **Chemosphere** v.43; p.999–1004, 2001.

ROCHA, A.P.C.; LEMONICA, L. e BARROS, G.A.M. et al. Uso de medicações por via subaracnóidea no tratamento da dor crônica. **Rev. Bras. Anesthesiol**, v.52, n.5, p. 628-643, 2002.

SARTO F, FINOTTO S, GIACOMELLI L, MAZZOTTI D, TOMANIN R. AND LEVIS AG. The micronucleus assay in exfoliated cells of the human buccal mucosa. **Mutagenesis**, v. 2, p.11–17, 1987

SILVA, J. et al. O uso do ensaio cometa para o ensino de genética toxicológica. **SBG**. v.2, n.2, p. 30-33, 2000.

SINGH, N.P. et al. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells, **Exp. Cell Res**. v.175, p.184–191, 1988.

SCHNAIDER, T. B. et al. Efeito analgésico intra-operatório da cetamina, clonidina ou dexmedetomidina, administradas por via peridural, em cirurgia de abdômen superior. **Rev. Bras. Anesthesiol**, v.55, n.5, p. 525-531, 2005.

SUDO, T. R. et. al. Interaction of Morphine With a New α 2-Adrenoceptor Agonist in Mice. **The Journal of Pain**, v.11, n.1. p.71-78, 2010.

TERRADAS, M.M. MARTIN, L. TUSELL, A. GENESCA, DNA lesions sequestered in micronuclei induce a local defective-damage response, DNA Repair. **Amst**. v.8, p.1225–1234, 2010.

TICE, R.R. **Applications of the single cell gel assay to environmental biomonitoring for genotoxic pollutants**, IN: B.E. Butterworth, L.D. Corkum, J. Guzmán-Rincón (Eds.), *Biomonitoring and Biomarkers as Indicators of Environmental Change*, Plenum Press, New York, pp. 69–79, 1995.

TICE, R.R. et al., Single cell gel/Comet assay; guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 25, p. 206-221, 2000.

TOLBERT, P.E. et al. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development. **Mutat. Res.**, v. 271, 669–677, 1992.

TOLBERT, P.E. et al. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: a field test in snuff users. **Am. J. Epidemiol**. v.134, p. 840-850, 1991.

VASQUEZ, M. Z. Combining the in vivo comet and micronucleus assays: a practical approach to genotoxicity testing and data interpretation. **Mutagenesis**. v25, p.187-199, 2010.

WELLS, P.G. et al. Oxidative stress in developmental origins of disease: teratogenesis, neurodevelopmental deficits, and cancer. **Toxicol Sci**. v.108, p. 4-18, 2010.

Capítulo 4

6 Artigo V - Avaliação dos possíveis efeitos genotóxicos e capacidade de reparo do composto 3-(2-cloro-6-fluorobenzil)-2,4-diona em sangue periférico de camundongos com o ensaio cometa

Artigo a ser submetido à revista *Mutagenesis*

Avaliação dos possíveis efeitos genotóxicos e capacidade de reparo do composto 3-(2-cloro-6-fluorobenzil)-imidazolidina-2,4-diona em sangue periférico de camundongos com o ensaio cometa

LUCIO NETO, M. P.¹; DANTAS, A.F.; GOMES, D.C.V.²; CARVALHO, R.M.; LEITE, A.³; PAZ, M.F.⁴e MELO-CAVALCANTE, ANA AMÉLIA^{1,2}

¹ Departamento de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Piauí – UFPI – Teresina – PI - Brasil.

² Faculdade NOVAFAPI – Teresina – PI - Brasil.

³ Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Piauí, Floriano – PI – Brasil.

⁴ Universidade Luterana do Brasil – ULBRA – Canoas – RS – Brasil.

E-mail: manoelplucio@hotmail.com

Resumo

PT-31 é uma imidazolidina-2,4-diona, análogo da clonidina, cuja fórmula química é 3-(2-cloro-6-fluorobenzil)-imidazolidina-2,4-diona. Trata-se de uma nova entidade molecular que exibe um perfil analgésico dose-dependente e sinergismo com o opióide morfina, resultado da ativação dos receptores alfa_{2A} adrenérgicos. O estudo objetiva a avaliação genotóxica e capacidade de reparo dos possíveis danos em sangue periférico de camundongos induzidos pelo PT-31, com o Ensaio Cometa. Dez camundongos por grupo (cinco machos e cinco fêmeas) foram tratados com administração intraperitoneal de PT-31 (0,5; 1,0 e 5,0 mg/kg), além do controle negativo (DMSO a 0,5%) e controle positivo (ciclofosfamida 25 mg/kg). Após 30 minutos da administração, e decorridas 12 e 24 horas, foram feitas as coletas de sangue periférico, através de cortes na cauda dos animais. Analisou-se um total de 100 células randomicamente por tratamento. Foram considerados dois parâmetros, o índice de danos (ID) e frequência de danos (FD). Para o cálculo do ID, as células foram, visualmente, classificadas em cinco classes, de acordo com o tamanho da cauda dos cometas (0-4). A FD foi calculada para cada amostra, com base no número de células com cauda em relação às células com dano 0. A partir dos experimentos realizados, pôde-se identificar a ocorrência de danos ao DNA, 30 minutos após a injeção intraperitoneal das doses de 0,5; 1,0 e 5,0 mg/kg do composto PT-31, em camundongos machos e fêmeas. Mas, a avaliação por grupo demonstrou ausência de genotoxicidade em 0,5 mg/kg. Após 12 horas, ocorreu reparo dos danos para as

concentrações de 0,5 (em machos e por grupo) e de 1,0 mg/kg (apenas por grupo). Ao final de 24 horas, não houve significância estatística dos danos em relação ao controle negativo, o que indica possível atividade dos mecanismos de reparo. Os dados indicam que o novo composto PT-31 é capaz de gerar danos genotóxicos em células de sangue periférico de camundongos, porém tais efeitos podem ser reparados após um período de 24 horas.

Palavras-chave: Genotoxicidade; Ensaio Cometa; Reparo de DNA; Imidazolidina.

Abstract

PT-31 is an imidazolidine-2,4-dione analogue of clonidine, whose chemical formula is 3-(2-chloro-6-fluorobenzyl)-imidazolidine-2,4-dione. This is a new molecular entity that displays a dose-dependent analgesic profile and synergism with the opioid morphine, a result of activation of adrenoceptors α_{2A} . This study aims to evaluate the genotoxic PT-31, as well as the ability to repair possible damage to the peripheral blood of mice using the comet assay. To this end, ten mice per group (five males and five females) were treated by intraperitoneal administration of PT-31 (0.5, 1.0 and 5.0 mg/kg), and a negative control (DMSO, 0,5%) and a positive control (cyclophosphamide a 25 mg/kg). After 30 min of administration, and 12 and 24 hours elapsed, the collections were made from peripheral blood through cuts in the tail of animals. We analyzed a total of 100 cells randomly for treatment. We considered two parameters, the rate of damage (ID) and damage frequency (DF). For the calculation of ID, the cells were visually classified into five classes according to the size of the tails of comets (0-4). The FD was calculated for each sample, based on the number of cells with tail in relation to damage cells with 0. From the experiments it was possible to identify the occurrence of DNA damage, 30 minutes after intraperitoneal injection of doses of 0.5, 1.0 and 5.0 mg / kg of the compound PT-31 in male mice and females. However, the evaluation group demonstrated a lack of genotoxicity for dose of 0.5 mg/kg. After an interval of 12 hours repairing the damage occurred for concentrations of 0.5 (in males and group) and 1.0 mg / kg (group only). After 24 hours, there was no statistical significance of the damage in relation to the negative control, indicating possible activity of repair mechanisms in that time period. Our results indicate that the new compound PT-31 is capable of generating genotoxic damage in peripheral blood cells of mice, but such effects can be repaired after a period of 24 hours.

Keywords: Genotoxicity; Comet Assay; DNA Repair; Imidazolidine.

1 Introdução

O composto PT-31 é uma imidazolidina-2,4-diona, análogo da clonidina, cuja fórmula química é 3-(2-cloro-6-fluorobenzil)-imidazolidina-2,4-diona (Figura 1). Segundo Arduengo et. al. (1992), as imidazolidinas são um conjunto de compostos heterocíclicos formados por meio da adição de quatro átomos de hidrogênio ao anel imidazol. O intermediário resultante da adição de apenas dois átomos de hidrogênio é chamado dihidroimidazol (imidazolina). De acordo com Pitta, et. al. (2006), a modificação molecular das imidazolidinas por substituição de radicais produz respostas biológicas diferenciadas. Os derivados imidazolidínicos se destacam por apresentarem ação farmacológica diversificada, como por exemplo, antimicrobiana, anticonvulsivante e antiparasitária. Conforme Bucarechi et. al. (2003), um dos mecanismos de ação das imidazolidinas é decorrente da estimulação dos receptores α_2 -adrenérgicos. Diversos relatos apontam que esses compostos têm causado um grande impacto na indústria farmacêutica, visto que vários fármacos contendo este anel heterocíclico são utilizados na clínica. Em relação à ação anticonvulsivante, a 5,5-difenil-hidantoína, denominada genericamente de fenitoína, é amplamente utilizada no mundo como o anticonvulsivante de escolha no tratamento das crises epiléticas, especificamente de convulsões parciais e tônico-clônicas, mas não nas crises de ausência (OLIVEIRA et al., 2008).

O processo de síntese do PT-31 foi realizado pelo Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco-UFPE, Recife, PE, Brasil. Sudo et al. (2010) comprovaram que tal composto exibe um perfil analgésico e sinergismo com a morfina, resultado da ativação dos receptores alfa₂ adrenérgicos. Os receptores alfa₂ são encontrados tanto nos sistemas nervoso central e periférico quanto em tecidos não-neuronais como plaquetas, hepatócitos e células musculares lisas, podendo ser pré e pós-sinápticos (BRAZ et al., 2002; VIEIRA et al., 2004). Estudos recentes têm demonstrado que os fármacos agonistas dos receptores α_2 -adrenérgicos apresentam importante papel na modulação da dor, inibindo a condução nervosa (SCHNAIDER et al., 2005).

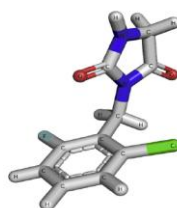


Figura 1. Fórmula Estrutural do PT-31. Adaptada de Sudo et al., 2010.

Tal molécula vem ampliar o arsenal disponível na terapêutica da dor, uma vez que, em triagem pré-clínica, mostrou-se promissora e sinérgica com a morfina, aumentando a potência e reduzindo os efeitos colaterais desse opióide. Alguns trabalhos complementares, incluindo dados toxicológicos, ainda precisam ser realizados com o intuito de traçar-se um perfil de segurança/eficácia para o PT-31, tendo em vista que o desenvolvimento de fármacos centra-se na avaliação da segurança, toxicidade e eficácia (PHRMA, 2009). Nos estágios iniciais de desenvolvimento de novos fármacos tem sido dada grande ênfase aos estudos de genotoxicidade, uma vez que, dentre as várias reações adversas que um medicamento pode causar a ocorrência de efeitos genotóxicos e carcinogênicos não pode ser excluída. A fim de se avaliar o risco de efeitos genotóxicos e cancerígenos para seres humanos, as autoridades reguladoras da Europa, Japão e EUA recomendam que estudos de genotoxicidade e de carcinogenicidade sejam realizados antes da aprovação da comercialização de produtos farmacêuticos (BRAMBILLA; MARTELLI, 2009).

A preocupação a cerca dos efeitos mutagênicos e carcinogênicos induzidos por fármacos sobre a população humana é cada vez maior. O monitoramento adequado de tais agentes vem sendo considerado como um dos mecanismos de prevenção e controle de algumas reações adversas e efeitos colaterais importantes, o que inclui diversas desordens genéticas. Alguns biomarcadores de genotoxicidade e mutagenicidade são utilizados para a avaliação de efeitos agudos e crônicos de fármacos, podendo predizer um perfil de segurança e eficácia de novas moléculas. Numerosos produtos químicos, potencialmente mutagênicos, têm sido estudados, principalmente, porque podem causar mudanças prejudiciais e herdáveis no material genético, sem ser imediatamente expressas (W.H.O., 1993; CAPELA, 2001).

Agentes genotóxicos interagem quimicamente com o material genético, formando adutos, alteração oxidativa ou mesmo quebras na molécula de DNA. Funcionalmente, tais agentes possuem a habilidade de alterar a replicação do DNA e a transmissão genética. Na grande maioria dos casos, a lesão é reparada pelo próprio organismo ou a célula é eliminada. Dependendo do agente causador dos danos, diferentes caminhos de reparo estão envolvidos, tais como o reparo por excisão de nucleotídeos (NER), reparo por excisão de bases (BER), reparo por recombinação não homóloga (NHEJ), recombinação homóloga (HRR) reparo de *crosslink* (FANC) e anelamento de fitas simples (NATARAJAN; PALITTI, 2008). Caso essa lesão seja fixada, provocando alterações hereditárias (mutações), que podem se perpetuar nas células filhas durante o processo de replicação, o agente é denominado mutagênico. (CAPELA, 2001; NASCIMENTO, 2001).

Vários estudos sugerem a importância do papel de danos oxidativos ao DNA e seu reparo no desenvolvimento do câncer. A instabilidade genética pode ser originada por falhas na maquinaria de reparo. Aumento dos níveis oxidativos induzidos ao DNA tem sido reportado em vários casos de patogênese humana relacionadas à idade e a doenças crônicas associadas com instabilidade genômica e indução do câncer (KULTZ, 2005).

Medidas de genotoxicidade incluem, principalmente, danos no DNA, mutações e aberrações cromossômicas. Os ensaios de genotoxicidade *in vivo* e *in vitro* são ferramentas sensíveis para a detecção da genotoxicidade e da potencial carcinogenicidade de diversas moléculas (COMBES, 1992; CHOY, 2001). Um teste de avaliação genotóxica *in vivo* bastante aceito é o Ensaio do Cometa (eletroforese em gel de células individuais), que tem sido largamente empregado, desde meados da década de 80, com uma vasta aplicação em biomonitoramento de populações para se testar agentes genotóxicos oriundos de dejetos industriais, domésticos e agrícolas, poluentes ambientais e compostos terapêuticos, como também, na determinação da capacidade reparo de danos ao DNA em humanos, animais e populações de plantas, bem como em aplicações clínicas (WHITE; RASMUSSEN, 1998; HARTMANN et al., 2003). As vantagens do Ensaio Cometa incluem a sua simplicidade, rápida performance e sua alta sensibilidade para vários tipos de danos no DNA (DA SILVA et al., 2002; GONÇALVES et al., 2003; SPIVAK, et al., 2009).

A simplicidade e sensibilidade do Ensaio do Cometa fazem dele um sistema adequado de teste para biomonitoramento de níveis crônicos de exposição, podendo ser utilizado em inúmeras análises onde se podem avaliar células viáveis (BELPAEME et al., 1998). Além das vantagens citadas e do relativo baixo custo, o Ensaio Cometa difere de outros testes citogenéticos, que detectam danos no DNA, por requerer células viáveis, mas não em divisão, permitindo, assim, sua aplicação a qualquer tipo de tecido dos quais células vivas possam ser obtidas (RIBEIRO et al., 2003).

Este trabalho visa à investigação dos possíveis efeitos genotóxicos, assim como a capacidade de reparo dos possíveis danos induzidos pelo composto 3-(2-cloro-6-fluorobenzil)-imidazolidina-2,4-diona (PT-31) em células de sangue periférico de camundongos através do Ensaio Cometa.

2 Materiais e Métodos

2.1 Síntese química do PT-31

Todo processo de síntese e identificação do composto PT-31 foi realizado por Sudo et al. (2010) no Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, Recife, PE, Brasil.

2.2 Animais e tratamentos

Nos experimentos foram utilizados camundongos da espécie *Mus musculos*, com 20 a 30 g de peso, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Piauí – UFPI, Teresina-PI, Brasil, concedidos após aprovação pelo Comitê de Ética e Pesquisa dessa instituição (Protocolo nº0106/10). Em todos os experimentos realizados, o número de camundongos por grupo foi igual a 10 (dez), sendo 05 (cinco) machos e 05 (cinco) fêmeas, tratados através da administração intraperitoneal de PT-31, nas concentrações de 0,5; 1,0 e 5,0 mg/kg, além de um controle negativo (DMSO 0,5%, solvente utilizado na diluição do PT-31) e um controle positivo (ciclofosfamida 25 mg/kg). Experimentos prévios não demonstraram diferença estatística entre o DMSO 0,5% e a água destilada, comprovando que o solvente não interfere nos resultados obtidos para as concentrações testadas do PT-31. As concentrações finais de todas as soluções foram ajustadas para 2,5 mL/kg para a administração nos camundongos.

Todos os animais foram mantidos sem restrições alimentar (ração Labine-PURINE) e de ingestão de líquidos, durante todo o experimento, garantida sua adaptação em sala climatizada a $22 \pm 3^\circ\text{C}$ e umidade de 50 - 60 %, com ciclo claro/escuro de 12 h, e em caixas de polipropileno adequadas a sua manutenção.

2.3 Ensaio Cometa

As análises foram realizadas de acordo com o protocolo de Singh et al. (1988), com pequenas alterações (TICE, 1995). Após 30 minutos e, decorridas 12 e 24 h dos tratamentos, foi coletado, em tubos contendo 7 μL de heparina, sangue periférico dos camundongos (15 μL), através de cortes na cauda. As lâminas foram previamente cobertas com 200 μL de agarose com ponto de fusão normal – NMA - (0,75%, v/v, 90 L) - em tampão fosfato salino livre de cálcio e magnésio (PBS) e estocadas em câmara escura, úmida a 4°C até o momento do uso (dentro de 24 h). Em seguida, 5 μL da suspensão celular foram adicionados em 95 μL de agarose de baixo ponto de fusão (1,5%, v/v), LMPA, em 35°C e dispostos na lâmina pré-revestida com NMA e cobriu-se com uma lamínula. Depois da solidificação da agarose (5 min em uma bandeja de metal sob refrigeração), as lâminas foram mergulhadas em solução de lise recém-preparada e resfriada (10% DMSO, 1% Triton X-100, 2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, pH 10,0 – 10,5) por 72 h a 4°C .

Posteriormente, as lâminas foram acondicionadas em cuba de eletroforese horizontal e cobertas com tampão de eletroforese fresco (0,0075 M, 1 mM EDTA, pH 13) por 20 min. A eletroforese foi realizada por 15 min a 25 V e 300 mA. Após a eletroforese, as lâminas foram neutralizadas com solução de Tris 400 Mm (pH 7,5), fixadas (15 %, v/v, ácido tricloroacético, 5%, w/v, sulfato de zinco, glicerol 5%), lavadas com água destilada e postas para secar durante a noite. Os géis foram re-hidratados por 5 minutos em água destilada e corados por 15 min (37°C) com uma solução contendo a seguinte sequência: 34 mL de solução B (0,2%, v/v, amonionitrato, 0,2%, v/v, nitrato de prata, 0,5%, v/v, ácido tungstosalisílico, 0,15%, v/v, formaldeído, 5%, v/v, carbonato de sódio) e 66 mL de solução A (carbonato de sódio 5%). A coloração foi interrompida com uma solução de ácido acético 1% e os géis postos para secar à temperatura ambiente.

Um total de 100 células foi analisado randomicamente por tratamento. Foram considerados dois parâmetros: ID (0-400) e a FD (0-100%). Para o cálculo ID, as células foram, visualmente, classificadas em cinco classes, de acordo com o tamanho da cauda dos cometas (0 = sem cauda; 4 = máximo comprimento da cauda), o que resultou em um escore único de danos ao DNA de cada amostra e, conseqüentemente, para cada grupo estudado. A FD em % foi calculada para cada amostra, com base no número de células com cauda em relação às células com dano 0. Todas as lâminas foram codificadas para análise cega.

2.4 Análise Estatística

A análise estatística foi conduzida utilizando-se o programa Graph PRISMA versão 5.00, por meio de estatística descritiva e ANOVA não paramétrica, com o teste de Tuckey, para múltiplas comparações entre os grupos do sistema teste, com níveis de significâncias de *P<0,05, **P<0,01 e ***P< 0,001.

3 Resultados

As **Tabelas 1, 2 e 3** apresentam os resultados dos parâmetros do Ensaio Cometa (ID e FD) para células do sangue periférico de camundongos, por gênero (machos e fêmeas), após 30 min, 12 h e 24 h da administração intraperitoneal de PT-31, nas concentrações de 0,5; 1,0 e 5,0 mg/kg. Em todos os experimentos, o controle positivo mostrou diferença estatisticamente significativa (P<0,001), tanto em relação ao ID quanto à FD quando comparado ao controle negativo.

Logo após 30 min da administração intraperitoneal das soluções teste houve aumento estatisticamente significativa (P<0,001) tanto para o ID, quanto para à FD para todas as concentrações do PT-31 (**Tabela 1**). Após 12 horas, evidenciou-se que a dose de 0,5 mg/kg

em machos e fêmeas não apresentou significância estatística dos parâmetros avaliados em relação ao controle negativo (**Tabela 2**). Conforme a **Tabela 3**, decorridas 24 horas da administração, nenhuma significância estatística entre as concentrações de PT-31 testadas e os seus respectivos controles negativos foram observadas.

Tabela 1 Parâmetros do Ensaio Cometa (índice de danos e frequência de danos; média \pm desvio padrão) para linfócitos de camundongos, 30 min após da administração intraperitoneal de PT-31, nas concentrações de 0,5; 1,0 e 5,0 mg/kg. Para cada grupo, n = 10 (cinco machos e cinco fêmeas). 100 células por animal.

Grupo	Gênero	Parâmetro	
		Índice de Danos	Frequência de Danos
Controle Negativo^a	Machos	17.20 \pm 5.63	12.20 \pm 5.76
	Fêmeas	9.00 \pm 6.44	6.20 \pm 4.92
Controle Positivo^b	Machos	122.20 \pm 7.15***	76.00 \pm 5.34***
	Fêmeas	155 \pm 10.86***	82.20 \pm 4.92***
PT-31 0,5 mg/kg	Machos	31.00 \pm 8.18*	31.20 \pm 7.39 ***
	Fêmeas	44.20 \pm 5.76***	38.00 \pm 7.58***
PT-31 1,0 mg/kg	Machos	74.80 \pm 18.91***	45.20 \pm 12.70 ***
	Fêmeas	102.20 \pm 35.49***	66.00 \pm 9.62***
PT-31 5,0 mg/kg	Machos	85.40 \pm 21.70***	65.00 \pm 10.00 ***
	Fêmeas	124.60 \pm 12.78***	72.00 \pm 5.52***

^aDMSO 0,5%; ^bCiclofosfamida, 25 mg/kg; Diferença estatisticamente significante ao nível de *P<0,05; ** P<0,01 e *** P<0,001 (ANOVA).

Tabela 2 Parâmetros do Ensaio Cometa (índice de danos e frequência de danos; média±desvio padrão) para linfócitos de camundongos, após 12 horas da administração intraperitoneal de PT-31, nas concentrações de 0,5; 1,0 e 5,0 mg/kg. Para cada grupo, n = 10 (cinco machos e cinco fêmeas). 100 células por animal.

Grupo	Gênero	Parâmetro	
		Índice de Danos	Frequência de Danos
Controle Negativo^a	Machos	18.00±4.00	15.00 ± 3.94
	Fêmeas	13.00±3.54	9.80±3.90
Controle Positivo^b	Machos	107.80±5.45***	95.00± 5.38***
	Fêmeas	157.00±1.00***	60.40±5.49**
PT-31 0,5 mg/kg	Machos	17.80±6.72	17.20±5.76
	Fêmeas	33.40±10.97*	26.60±10.69***
PT-31 1,0 mg/kg	Machos	41.20±11.43*	34.40±6.84**
	Fêmeas	49.00±7.68***	39.60±0.89***
PT-31 5,0 mg/kg	Machos	146.40±22.67***	70.00±8.92 ***
	Fêmeas	80.20±15.30***	48.80±3.90***

^aDMSO 0,5%; ^bCiclofosfamida, 25 mg/kg; Diferença estatisticamente significante ao nível de *P<0,05; ** P<0,01 e *** P<0,001 (ANOVA).

Tabela 3 Parâmetros do Ensaio Cometa (índice de danos e frequência de danos; média±desvio padrão) para linfócitos de camundongos, após 24 horas da administração intraperitoneal de PT-31, nas concentrações de 0,5; 1,0 e 5,0 mg/kg. Para cada grupo, n = 10 (cinco machos e cinco fêmeas). 100 células por animal.

Grupo	Gênero	Parâmetro	
		Índice de Danos	Frequência de Danos
Controle Negativo^a	Machos	17.40±3.05	12.00±4.36
	Fêmeas	22.00±4.18	17.40±5.48
Controle Positivo^b	Machos	74.40±1.14***	86.00±1.41***
	Fêmeas	76.00±5.44***	77.80±10.64***
PT-31 0,5 mg/kg	Machos	20.40±4.83	17.40±3.71
	Fêmeas	20.60±4.72	13.00±1.41
PT-31 1,0 mg/kg	Machos	28.60±5.64	20.20±6.30
	Fêmeas	20.00±3.08	16.40±3.65
PT-31 5,0 mg/kg	Machos	36.20±19.90	27.40±16.38
	Fêmeas	23.20±3.77	14.80±3.96

^aDMSO 0,5%; ^bCiclofosfamida, 25 mg/kg; Diferença estatisticamente significativa ao nível de * P<0,05; ** P<0,01 e *** P<0,001 (ANOVA).

As **Figuras 2 e 3** mostram os resultados do ID e da FD para linfócitos de camundongos, por grupo, após 0, 12 e 24 h da administração intraperitoneal de PT-31, nas concentrações de 0,5; 1,0 e 5,0 mg/kg. Observa-se que após 30 min houve significância estatística (p<0,001) de ambos os parâmetros para as doses de 1 e 5 mg/kg. No tempo 12 h, apenas a dose de 5 mg/kg apresentou significância estatística (p<0,001). Já no tempo 24 h, nenhuma das concentrações apresentou significância estatística em relação ao controle negativo.

A **Figura 4** apresenta fotomicrografias com o perfil dos cometas encontrados para as soluções teste após os três tempos de administração.

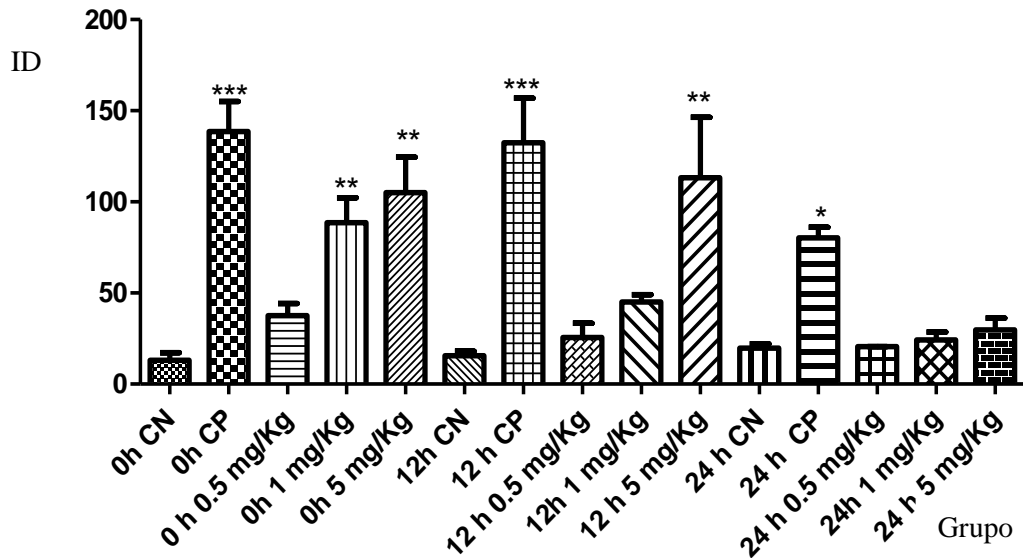


Figura 2 Índice de Danos (ID) por grupo para células de sangue periférico de camundongos após 30 min, 12 h e 24 h da administração intraperitoneal do composto PT-31. Para cada grupo $n = 10$ (5 machos e 5 fêmeas). 100 células por animal. CN: DMSO; 0,5%; CP: Ciclofosfamida 25 mg/kg. Diferença estatística em relação ao controle negativo ao nível de * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$ (ANOVA).

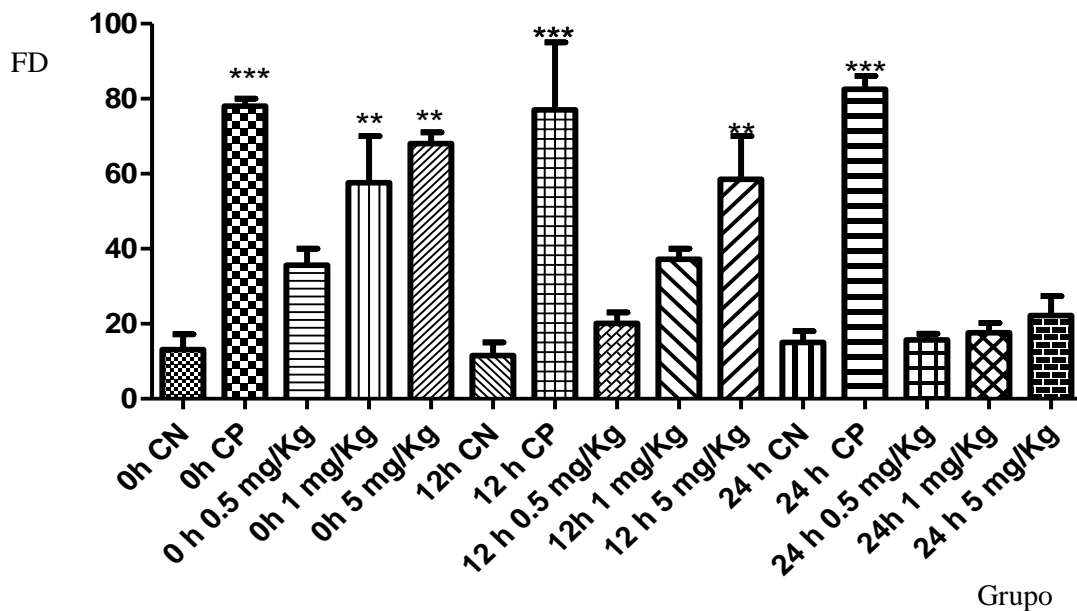


Figura 3 Frequência de Danos (FD) por grupo para células de sangue periférico de camundongos após 30 min, 12 h e 24 h da administração intraperitoneal do composto PT-31. Para cada grupo $n = 10$ (5 machos e 5 fêmeas). 100 células por animal. CN: DMSO; 0,5% CP: Ciclofosfamida 25 mg/kg. Diferença estatística em relação ao controle negativo ao nível de * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$ (ANOVA).

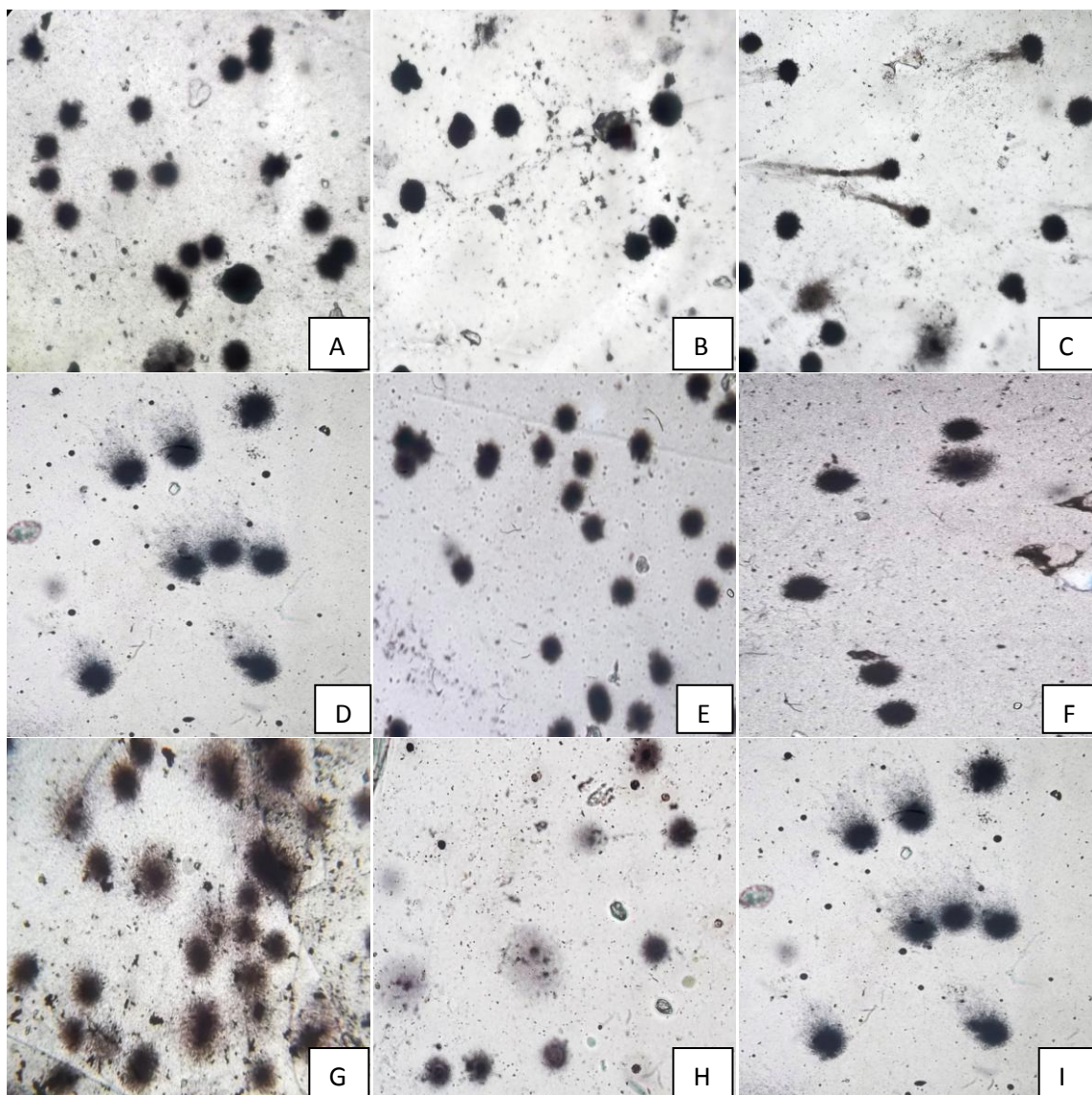


Figura 4 Fotomicrografia das classes de danos em linfócitos de camundongos após a administração intraperitoneal de PT-31 nas doses de 0,5 (A, B e C); 1,0 (D, E e F) e 5,0 (G, H e I) mg/kg, após 30 min (A, D e G); 12 h (B, E e H) e 24 h (C, F e I).

4 Discussão

O Ensaio Cometa *in vivo* é bastante usado na avaliação genotóxica com várias aplicabilidades em vários tecidos e com muita sensibilidade para detectar baixos níveis de danos ao DNA com pequenos números de células nas amostras biológicas (BRENDLER-SCHWAAB et al., 2005). A versão alcalina pode detectar diferentes tipos de danos ao DNA em células eucarióticas tratadas *in vivo* ou *in vitro* com agentes genotóxicos com aplicações para o monitoramento humano e seus resultados podem ser correlacionados com os de outros biomarcadores de danos ao DNA (ALBERTINI et al., 2000). Os resultados deste estudo demonstram que a administração intraperitoneal de PT-31 em camundongos nas doses de 0,5;

1,0 e 5,0 mg/kg é capaz de induzir um aumento do nível de danos ao DNA, como pode ser observado na **Tabela 1**, a qual demonstra elevação significativa do ID e do FD em machos e fêmeas, em um curto período (30 min) após administração das soluções teste. Quando se avalia tais parâmetros por grupo, observa-se que a dose de 0,5 mg/kg (menor concentração do PT-31) não apresentou danos (**Figuras 2 e 3**). A **Figura 4** apresenta os cometas após a injeção do PT-31 nas doses de 0,5 (A, B e C); 1,0 (D, E e F) e 5,0 (G, H e I) mg/kg, após 30 min (A, D e G); 12 h (B, E e H) e 24 h (C, F e I). Experimentos preliminares em camundongos demonstraram que o composto PT-31 tem ação rápida, apresentando atividade farmacológica poucos minutos após a injeção (SUDO et al., 2010).

Vale ressaltar que a clonidina, uma imidazolidina, análoga estrutural do composto PT-31 não se mostrou carcinogênica, apresentando resultados negativos em alguns ensaios de genotoxicidade e mutagênica (*S. typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537, mutação reversa; *E. coli* uvrA de WP2, mutação reversa; UDS, hepatócitos de rato *in vivo*) (BRAMBILLA e MARTELLI, 2009). Entretanto, existem relatos que a fenitoína, pertencente ao mesmo grupo das imidazolininas 2,4-dionas, durante estudos de sua bioativação *in vitro*, produz compostos reativos intermediários indutores de radicais livres e pode ter efeitos teratogênicos em camundongos pela ação de um dos seus metabólitos epóxidos (WELLS, 2010). De acordo com o “*Center for Drug Evaluation and Research*”, a fenitoína pertence ao grupo 2B, portanto considerada como um possível carcinógeno para humanos pela avaliação em testes citogenéticos *in vitro*, como também em testes com bactérias, em teste citogenéticos *in vivo* em roedores, incluindo também os testes de carcinogenicidade. Estudos recentes corroboram com as informações anteriores confirmando que a fenitoína pode induzir câncer de esôfago, fígado, pulmão e leucemia linfocítica (FRIEDMAN et al., 2009).

Em relação aos danos ao DNA induzidos por fármacos, o DNA pode ser o alvo de drogas que reagem diretamente com o DNA ou indiretamente com a incorporação de nucleotídeos análogos, ou bloqueando funções metabólicas do DNA, tais como as DNA polimerases e topoisomerasas relacionados às quebras simples e duplas, formação de adutos ao DNA e pontes intra e inter cadeias, possíveis de serem detectados na versão alcalina do Ensaio Cometa (FAIRBAIRN et al., 1995). Apesar de alguns danos ao DNA serem reparados, é necessário o permanente biomonitoramento de genotoxicidade a vários agentes químicos, com o uso de biomarcadores de genotoxicidade, para a prevenção de futuras lesões na molécula da vida, as quais podem induzir crescimentos neoplásicos em células somáticas danificadas. O monitoramento dos efeitos genotóxicos de químicos em humanos com o objetivo de avaliar os riscos tem aumentado e como resultado tem sido identificado marcadores da exposição humana a mutágenos e carcinógenos (VALVERDE; ROJAS, 2009).

As lesões do DNA em sítios específicos do genoma podem levar a mudanças na sequência de nucleotídeos, através de processos tais como síntese translesão ou de recombinação, causando mutagênese e respostas celulares inesperadas. Agentes mutagênicos são capazes de invadir as células e dirigirem-se ao núcleo causando alterações no material genético, podendo desregular o ciclo celular. Isso faz com que a célula se reproduza descontroladamente, invadindo tecidos adjacentes. Alguns tipos de lesões ao DNA podem ser revertidas diretamente, retornando-se para a sequência original. Entretanto, na maioria dos casos, o DNA danificado é processado por um ou mais dos vários mecanismos de reparo celular. A localização do dano e a eficiência do reparo em certas sequências de DNA podem ter diferentes efeitos críticos sobre parâmetros biológicos, tais como mutações, transformação ou morte celular, distribuição dos danos por todo o genoma ou o seu reparo. Conhecer os componentes físicos, químicos e biológicos que causam alterações gênicas é necessário para melhor preservar a saúde humana (ALBERTS et al., 2002; SPIVAK, et al., 2009).

Após 12 h da administração das soluções teste em camundongos, quando analisados os resultados por sexo (**Tabela 2**), observa-se que não houve danos apenas para a dose de 0,5 mg/kg em machos. Entretanto, a avaliação por grupo demonstra que a concentração de 1,0 mg/kg também não apresentou aumento nos danos, o que não aconteceu com a dose de 5,0 mg/kg, onde o ID e o FD foram estatisticamente significantes ($p < 0,001$) em relação aos controles negativos (**Figuras 4 e 5**). Esses resultados sugerem um possível reparo dos danos induzidos pelo PT-31, após um intervalo de tempo de 12 horas, para as doses de 0,5 e 1,0 mg/kg. Decorridas 24 horas da administração intraperitoneal das soluções de PT-31, não se verificou significância estatística do ID e do FD, tanto por sexo (**Tabela 3**), quanto por grupo (**Figuras 4 e 5**) em relação aos seus respectivos controles negativos, indicando atividades de reparo nos danos ocasionados por todas as concentrações do PT-31 aos linfócitos após 24 horas da injeção do composto. Cabe enfatizar que o Ensaio Cometa é um biomarcador sensível e rápido de genotoxicidade que indica danos recentes ao DNA, com ações da maquinaria de reparo de DNA (DUSINSKA; COLLINS, 2008), o que, possivelmente, pode indicar que os danos encontrados após 30 min podem estar sujeitos às ações de reparo celular. Níveis altos de danos ao DNA podem resultar em vários caminhos, tais como a apoptose, que resulta em depleção celular, contribuindo para acelerar o envelhecimento (VASQUEZ, 2008).

Duas estratégias estão envolvidas na respostas aos danos ao DNA: os danos são reparados ou tolerados, ou as células são removidas por apoptose. O não reparo leva a consequências tais como as aberrações cromossômicas, mutações em genes e transformações malignas (KULTZ, 2005). A citotoxicidade ainda não é bem conhecida como resposta aos agentes genotóxicos, isto porque as respostas aos danos genotóxicos é complexa, podendo

levar desde reparos, fixação de danos, mutações, eliminações de danos e morte celular (KAINA, 2003; FRITZ; KAINA, 2006).

Dependendo do agente causador dos danos, diferentes caminhos de reparo estão envolvidos, tais como o reparo por excisão de nucleotídeos (NER), reparo por excisão de bases (BER), reparo por recombinação não homóloga (NHEJ), recombinação homóloga (HRR) reparo de *crosslink* (FANC) e anelamento de fitas simples (KULTZ, 2005). Durante a última década, o Ensaio do Cometa foi extensivamente utilizado como uma ferramenta básica em muitas áreas de pesquisa, incluindo biomonitoramento ambiental, genética toxicológica, radiação biológica, processos de reparo de DNA e ecotoxicologia genética (GONTIJO; TICE, 2003).

Manipulações genéticas em camundongos dos caminhos de reparo de DNA indicam que a interrupção de caminhos específicos, tais como reparo por excisão de nucleotídeos e recombinação não homóloga, são associados a fenótipos de envelhecimento precoce, sugerindo que o reparo do DNA tem papel chave na modulação da longevidade, possivelmente por disfunção e perdas celulares. O gradual envelhecimento da população se constitui como um aspecto de interesse médico, social e econômico. A maior motivação das pesquisas sobre envelhecimento está relacionada com os riscos de várias doenças, incluindo o câncer (VILELA et al., 2003).

O biomonitoramento de populações humanas expostas aos agentes potencialmente mutagênicos e carcinogênicos pode providenciar informações iniciais de desregulações celulares e iniciação do desenvolvimento de câncer (VALVERDE; ROJAS, 2009). Como complemento à bateria de testes padrão de genotoxicidade, o Ensaio Cometa *in vivo* vem sendo utilizado para selecionar candidatos potenciais a fármacos no início do desenvolvimento farmacêutico. Devido à sua flexibilidade, ele pode ser combinado ou incorporado à maioria das baterias de testes padrão para fornecer dados sem despesas adicionais de tempo e recursos exigidos por um estudo independente (VASQUEZ, 2010).

Os resultados do presente estudo sugerem que o composto PT-31 é capaz de gerar danos genotóxicos em células de sangue periférico de camundongos, todavia tais efeitos podem ser reparados em 24 horas da injeção da droga. Nessas condições, verifica-se que alguns estudos complementares tornam-se viáveis, no sentido de confirmação dos resultados e elucidação dos possíveis mecanismos geradores dos danos e do reparo. No que diz respeito ao Ensaio Cometa, observa-se que esse pode ser utilizado como um método regular para a triagem e análise de parâmetros relacionados à genotoxicidade, podendo predizer um perfil inicial de segurança e eficácia de novas moléculas. Nossos dados são importantes para a

realização de estudos clínicos visando à manutenção da integridade genômica de pacientes em possíveis terapias com PT-31.

Agradecimentos

Nós agradecemos ao Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, Recife, Brasil, que sintetizou e cedeu a molécula PT-31, permitindo, assim, a realização deste trabalho.

Referências

ALBERTINI, R.J. et al. A. IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans, **Mutat. Res.** v.463, p.111–172, .2000.

ALBERTS, B. et al. **Fundamentos da Biologia Celular.** Porto Alegre Artmed. 2 ed., 2002.

ARDUENGO, A. J.; Dias, H. V. R.; HARLOW, R.L. e KLINE, M. Electronic stabilization of nucleophilic carbenes . **J. Am. Chem. Soc.** v.114, p.5530, 1992.

BELPAEME, K.; COOREMAN, K.; KIRSCH-VOLDERS, M. et al. Development and validation of the in vivo alkaline comet assay for detecting genomic damage in marine flatfish. **Mut. Res.** v. 415. p. 167-184, 1998.

BRAMBILLA, G.; MARTELLI, A. Genotoxicity and carcinogenicity studies of antihypertensive agents. **Mut. Res.** v.612, p. 115–149, 2009.

BRAZ L.G. et al. Níveis de sedação determinados pela clonidina e midazolam na medicação pré-anestésica. Avaliação clínica e eletroencefalográfica bispectral. **Rev. Bras. Anestesiol.** v. 52, p. 9-18, 2002.

BRENDLER-SCHWAAB SUSANNE, ANDREAS HARTMANN, STEFAN PFUHLER e GU UNTER SPEIT. The in vivo comet assay: use and status in genotoxicity testing. **Mutagenesis** vol. 20 no. 4 pp. 245--254, 2005.

BUCARETCHI, F. et al. Exposição aguda a derivados imidazolínicos em crianças. **J. Pediatria** v.79, n.6, pp. 519-524, 2003.

CAPELA, F.S. **Avaliação de Biomarcadores.** Dept. de Biologia, Universidade de Évora, 2001.

CHOY, W. N. **Regulatory genetic toxicology tests.** In: CHOY, W. N; DEKKER, M. (Ed.). Genetic Toxicology and Cancer Risk Assessment. New York, p.93-113, 2001.

COMBES, R.D. Genotoxicity testing: recent advances and future trends. **Chemistry & Industry**, v. 24. 1992, p. 950-954.

DA SILVA, J. et al. Evaluation of the genotoxic effect of rutin and quercetin by comet assay and micronucleus test. **Food and Chemical Toxicology**. v.40. p. 941-947, 2002.

DUSINSKA, M.; COLLINS, A.R. The comet assay in human biomonitoring: gene-environment interactions. **Mutagenesis** vol. 23 no. 3 pp. 191-205, 2008.

FARBAIRN DW, OLIVE PL, O'NEILL K.L et al. The Comet assay: a comprehensive review. **Mut. Res.** v.339, p.37-59, 1995.

FRIEDMAN, G.D. et al. Epidemiologic evaluation of pharmaceuticals with limited evidence of carcinogenicity. **Int J Cancer**. v. 125, n. 9, p. 2173-2178, 2009.

FRITZ, G.; KAINA, B. Rho GTPases: promising cellular targets for novel anticancer drugs. **Curr. Cancer Drug Targets**, v.6, p.1-142, 2006.

GONÇALVES, L.M. et al. **Avaliação do potencial genotóxico das águas do Rio Itajaí-Açú e zona costeira sobre os hemócitos do mexilhão Perna perna através do Ensaio do Cometa**. In: II SIMPÓSIO BRASILEIRO DE ENGENHARIA AMBIENTAL, 2003. Itajaí, SC. Livro de Resumos. Vol.1. Itajaí: UNIVALI, p 384, 2003.

GONTIJO, A. M. M. C.; TICE, R. **Teste do cometa para a detecção de dano no DNA e reparo em células individualizadas**. In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. (Org.). *Mutagênese Ambiental*. Canoas: Ulbra, p. 173-200, 2003.

HARTMANN, A. et al. Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. **Mutagenesis**. v.18 p. 45-51, 2003.

KAINA, B. DNA damage-triggered apoptosis: critical role of DNA repair, double-strand breaks, cell proliferation and signaling. **Biochem. Pharmacol.** v.66, p.1547-1554, 2003.

KULTZ, D. Molecular and evolutionary basis of the cellular stress response. **Annu. Rev. Physiol.** v.67, p.225-257, 2005.

NASCIMENTO, P. A. et al. Evaluation of radioinduced damage and repair capacity in blood lymphocytes of breast cancer patients. **Brazilian Journal and Biological Research**, v.34, p.165-176, 2001.

NATARAJAN, T. e PALLITI, F. DNA Repair, Chromosomal Alterations. **Mutation Research**, v. 65, p. 86-98, 2008.

OLIVEIRA, S. M. et al. Estrutura, reatividade e propriedades biológicas de hidantoínas. **Quím. Nova** v.31, n.3, p. 614-622, 2008.

PHARMA. Research and Development continue to grow, 2009. Acessado em: 10/09/2011, às 14:35 horário de Brasília. Disponível em: <http://www.phrma.org/about/key-industry-facts-about-phrma>.

PITTA, M. G. R. et al. New imidazolidinic bioisosters: potential candidates for antischistosomal drugs. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. v.101, suppl.1, p. 313-316, 2006.

RIBEIRO L.R. et al. **A importância da mutagênese ambiental na carcinogênese humana**, IN: Mutagênese ambiental, Ribeiro, L.R., Salvadori, D.M.F., Marques, E.K. Ulbra Ed., Canoas, p. 21-27, 2003.

VALVERDE, M. e ROJAS, E. Environmental and occupational biomonitoring using the Comet assay **Mut. Res.** v.681, p. 93–109. 2009.

RICHES, L. C. et al. Gooderham events in the mammalian response to DNA double-strand breaks **Mutagenesis** v.23, n.5 pp. 331–339, 2008

SCHNAIDER, T. B. et al. Efeito analgésico intra-operatório da cetamina, clonidina ou dexmedetomidina, administradas por via peridural, em cirurgia de abdômen superior. **Rev. Bras. Anesthesiol**, v.55, n.5, p. 525-531, 2005.

SPIVAK, G. et al. New applications of the Comet assay: Comet-FISH and transcription-coupled DNA repair. **Mutation Research**. v.681. p. 44-50, 2009.

SUDO, T. R. et. al. Interaction of Morphine With a New α_2 -Adrenoceptor Agonist in Mice. **The Journal of Pain**, v.. 11, n.1. p 71-78, 2010.

TICE, R.R. **Applications of the single cell gel assay to environmental biomonitoring for genotoxic pollutants**, IN: B.E. Butterworth, L.D. Corkum, J. Guzmán-Rincón (Eds.), Biomonitoring and Biomarkers as Indicators of Environmental Change, Plenum Press, New York, pp. 69–79, 1995.

VALVERDE, M. e ROJAS, E. Environmental and occupational biomonitoring using the Comet assay **Mutation Research** v.681, p.93–109, 2009.

VASQUEZ, M. Z. Combining the in vivo comet and micronucleus assays: a practical approach to genotoxicity testing and data interpretation. **Mutagenesis**. v25, p.187-199, 2010.

VIEIRA, A. M. et al. Clonidina e dexmedetomidina por via peridural para analgesia e sedação pós-operatória de colecistectomia. **Rev. Bras. Anesthesiol**. v..54, n.4, p. 473-478, 2004.

VILLELA, I.V. et al. **Bioensaios para o Monitoramento de Genotoxicidade Ambiental**. In: Silva J., ERDTMANN B & HENRIQUES J. A.P. (organizadores) Genética Toxicológica. Ed. Alcance. Porto Alegre pp 147-163, 2003.

WELLS, P.G. et al. Oxidative stress in developmental origins of disease: teratogenesis, neurodevelopmental deficits, and cancer. **Toxicol Sci.** v.108, p. 4-18, 2010.

WHITE, P.A.; RASMUSSEN, J.B. The genotoxic hazards of domestic wastes in surface waters. **Mut. Res.** v.410. p. 223-236, 1998.

W.H.O. World Health Organization. International Program on Chemical Safety (IPCS). Environmental Health Criteria 155. Biomarkers and Risk Assessment: Concepts and Principles. Geneva, 1993.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O teste *A. cepa* é aceito pela comunidade científica para análises ambientais e de produtos sintéticos e/ou naturais, com respostas correlacionadas com outros testes de genotoxicidade em mamíferos. Em relação ao Teste de Ames, feito em procariotos, o teste *A. cepa* apresenta vantagens devido a não necessidade de incluir sistema de metabolização para produtos que devem ser detoxificados para apresentarem seus possíveis efeitos ao material genético. Apesar das diferenças existentes entre o sistema enzimático oxidase das plantas superiores e o citocromo P450 de mamíferos, os resultados do teste *Allium cepa* demonstram boa correlação com os ensaios em camundongos, no que diz respeito, sobretudo, às atividades citotóxicas e mutagênicas.

A exposição de meristemas de raízes de *A. cepa* ao composto PT31 permitiu identificar sua ação tóxica e citotóxica em células eucarióticas, pela inibição do crescimento e do índice mitótico na maior dose testada (5,0 mg/mL). Mas, em relação aos parâmetros para análise de mutagenicidade, o composto aumentou a frequência de micronúcleos e de aberrações cromossômicas apenas na concentração de 1,0 mg/mL, provavelmente devido a atividades observadas na maior dose testada. Os dados mostram que em meristemas de raízes de *A. cepa*, a dose testada de 0,5 mg/mL não apresenta riscos ao DNA de células eucarióticas vegetais. Existem relatos de que os dados obtidos para os parâmetros do referido teste podem ser associados com outros sistemas testes em mamíferos. No presente estudo, com a aplicação da correlação de *Spearman's*, foi possível estabelecer correlação com células de medula e células sanguíneas de camundongos.

Em relação à citotoxicidade, observada no sistema *A. cepa*, os dados corroboram a ação citotóxica também identificada em medula óssea de camundongos para a dose de 5,0 mg/kg, pelo aumento na frequência de células binucleadas, como também na redução da relação EPC/ENC por grupo. Tais efeitos citotóxicos sugerem que o composto PT-31 pode interferir divisão celular.

Quanto à genotoxicidade, avaliada pelo Ensaio Cometa, houve aumento de danos ao DNA em células de medula óssea de camundongos identificados após 24 horas de exposição, em machos e fêmeas, para a dose de 5,0 mg/kg em células de medula óssea, o que indica ação genotóxica. Os danos evidenciados no Ensaio Cometa, como bem entendidos no artigo referente à genotoxicidade, podem ser reparados, ou em caso de não reparo ou de reparo incorreto, podem ocasionar a programação da morte celular. Como foi observado com o

PT31, em células de medula óssea de roedores, para as dose de 5,0 mg/kg que aumentou a frequência de micronúcleos, indicando danos fixos ao material genético das células avaliadas, sugerindo, provavelmente, que os mecanismos de reparo não foram suficientes para evitar a instabilidade genética em medula óssea. O aumento na frequência de micronúcleos indica possíveis efeitos aneugênicos ou clastogênicos ao composto PT-31. Entretanto, não foi possível identificar qual desses efeitos se deve a ação mutagênica do composto em foco.

Houve diferenças entre os resultados encontrados em medula óssea e sangue periférico de roedores, uma vez que as células da medula demonstraram-se mais sensíveis aos efeitos do PT-31. Nos estudos foram observados excelentes capacidade de reparo em células sanguíneas, após 24 horas da administração do PT-31, em todas as concentrações testadas. Cabe mencionar que, a partir de 0 hora, foi possível apontar os efeitos genotóxicos do P-T31. Não foi possível a identificação dos mecanismos indutores dos danos, todavia aventa-se a possibilidade de efeitos oxidativos, devido a atividade para carcinogenicidade, relacionada a danos oxidativos; e teratogenicidade relatada na literatura para a fenitoína, análogo do PT-31, como referenciada no capítulo sobre as ações farmacológicas do PT-31.

Buscando atender ao objetivo de correlacionar os biomarcadores usados na pré-avaliação do PT-31, quanto aos riscos ao material genético, foi possível estabelecer correlações entre os danos observados no Ensaio Cometa e os micronúcleos em células de medula óssea, com os danos identificados e reparados em células sanguíneas. Correlações positivas também foram observadas entre o Teste de Micronúcleos e Ensaio Cometa. Os micronúcleos evidenciados em medula foram correlacionados com ID e FD em sangue periférico cerca 30 minutos após administração do PT-31, com correlação significativa ($r=0,14^*$ e $r=0,005^{**}$). O índice de danos observado em medula óssea foi correlacionado com o índice de danos em sangue periférico, em 24 h depois da administração do PT 31 na dose de 5 mg/kg em fêmeas, com coeficientes de correlação $r=0,032^*$ e $r=0,041^*$, respectivamente.

Com a aplicação do teste de correlação estatística de Spearman's foi possível evidenciar que para o controle negativo dos testes em camundongos que o índice de danos foi correlacionado significativamente ($r=0,026$) para a dose de 5 mg/kg com o crescimento de raízes de *A. cepa* ($r=0,041^*$). Em machos, na dose de 1 mg/kg, observou-se correlação do índice de danos com as aberrações cromossômicas identificadas no teste *A. cepa* com coeficiente de *Spearman's rho* de forma negativa ($r=0,052$). Na dose de 5 mg/kg correlações positivas foram observadas entre índice e frequências de danos de 12 horas com a inibição de crescimento de meristemas de raízes de *A. cepa*, com $r=0,041^*$ e $r=0,037^*$, respectivamente. Em fêmeas, também foram observadas correlações do índice e frequência de danos em células sanguíneas com a inibição do índice mitótico em *A. cepa* com $r=0,037^*$ e r

= 0,041* 12 horas após a administração das drogas. Em 24 h, foram observadas para fêmeas, correlações do índice de danos com as aberrações cromossômicas ($r=0,037$). Na dose de 5,0 mg/kg, após 12 horas, foi possível observar correlações com frequência de danos e aberrações cromossômicas ($r = 0,028$).

É crescente a preocupação a cerca dos efeitos genotóxicos de agentes químicos, incluindo fármacos, no que diz respeito à indução de diversas desordens genéticas, como envelhecimento precoce e câncer. A Organização Mundial de Saúde (OMS), assim como os órgãos de regulamentação sanitária da maioria dos países, preconizam a realização de testes de genotoxicidade *in vivo* e *in vitro* para novos ativos anteriormente aos estudos de fase clínica em seres humanos. Várias drogas, apesar de comprovada ação farmacológica, são descartadas, logo de início, por conta do alto potencial genotóxico e mutagênico. As evidências fornecidas por esse trabalho são extremamente relevantes. Nossos resultados são importantes para a realização de estudos posteriores, visando à manutenção da integridade genômica de pacientes em possíveis terapias com PT-31. O composto PT-31 se revelou bastante promissor, existindo um alto interesse no seu desenvolvimento farmacêutico. Para as atividades testadas, verifica-se um perfil de dose-dependência, onde a menor dose avaliada se demonstrou segura, desprovida de atividades tóxicas, citotóxicas e mutagênicas aos meristemas de *A. cepa* e em mamíferos.

Sugerimos estudos complementares, no sentido da elucidação dos possíveis mecanismos geradores das atividades testadas em outros testes pré-clínicos e, posteriormente, em estudos clínicos, para que o fármaco em foco possa ser aplicado de forma segura e eficaz em relação aos seus efeitos farmacológicos, com o mínimo de riscos relacionados aos danos ao DNA dos seres humanos, como uma estratégia para a prevenção de mutações e, conseqüentemente, do câncer.