



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

Avaliação pré-clínica dos possíveis efeitos tóxicos, citotóxicos e mutagênicos da morfina e de seu co-tratamento com o composto 3-(2-cloro-6-fluorobenzil)imidazolidina-2,4-diona (PT - 31) em *Allium cepa* e em *Mus musculus*

FERNANDA ASSUNÇÃO SAMPAIO

TERESINA-PI
2012

FERNANDA ASSUNÇÃO SAMPAIO

Avaliação pré-clínica dos possíveis efeitos tóxicos, citotóxicos e mutagênicos da morfina e de seu co-tratamento com o composto 3-(2-cloro-6-fluorobenzil)imidazolidina-2,4-diona (PT - 31) em *Allium cepa* e em *Mus musculus*

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.

Orientador: Prof. Dr. José Arimatéia Dantas Lopes
Co-orientadora: Profa. Dra. Ana Amélia Carvalho Melo Cavalcante

TERESINA-PI
2012

FERNANDA ASSUNÇÃO SAMPAIO

Avaliação pré-clínica dos possíveis efeitos tóxicos, citotóxicos e mutagênicos da morfina e de seu co-tratamento com o composto 3-(2-cloro-6-fluorobenzil)imidazolidina-2,4-diona (PT - 31) em *Allium cepa* e em *Mus musculus*

Orientadores:

Prof. Dr. José Arimatéia Dantas Lopes
Profa. Dra. Ana Amélia Carvalho Melo Cavalcante

Aprovado em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA:

Presidente e Primeiro Examinador Interno

Prof. Dr. José Arimatéia Dantas Lopes
(Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas - UFPI)

Segundo Examinador Interno

Profa. Dra. Maria das Graças Freire de Medeiros
(Universidade Federal do Piauí- UFPI)

Primeiro Examinador Externo

Prof. Dr. Joaquim Soares da Costa Júnior
(Instituto Federal de Educação Tecnológica do Piauí - IFPI)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a **Deus** por tudo que eu conquistei até hoje e por sempre me dar forças e coragem para que eu possa continuar atingindo meus objetivos.

Aos professores doutores **José Arimatéia Dantas Lopes** e **Ana Amélia Carvalho Melo Cavalcante** por serem sempre prestativos, dividir seus conhecimentos comigo e por me fazer envolver com os experimentos e gostar daquilo que fizemos durante todo o programa.

Aos meus pais por sempre terem me apoiado, compreendido minhas dificuldades e que estavam junto de mim quando eu precisei.

À parceria com o Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE, na pessoa da **Dra. Sueli Lins Galdino**, por ter disponibilizado a nova molécula utilizada neste estudo.

Aos colegas do Laboratório de Genética Toxicológica do Núcleo de Tecnologia Farmacêutica da UFPI, **Manoel, Joseana, Débora, Alisson, Rodrigo, Aracelli, Márcia** por terem colaborado na realização dos testes, padronização das técnicas e dedicação durante tantas horas de experimentos, sem os quais seria impossível a realização desse trabalho.

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

LISTA DE FIGURAS

Referencial teórico

Figura 1 - Estruturas químicas de alguns opióides: (a) morfina, (b) codeína, (c) tebaína, (d) papaverina, (e) etorfina e (f) naloxona	22
Figura 2 - Estrutura química da morfina mostrando seus anéis (A-E) e sua forma de T	23
Figura 3 - Estruturas químicas do (a) morfina; e seus derivados (b) morfina; (c) dihidromorfina; (d) 6-acetilmorfina; (e) diamorfina	26
Figura 4 - Conversão da morfina a morfina catalisada pela morfina 6-desidrogenase	26
Figura 5 - Estrutura química da hidantoína: imidazolidina-2,4-diona	38
Figura 6 - Estruturas químicas da: clonidina; medetomidina; dexmedetomidina	40
Figura 7- Fórmula estrutural do PT-31 [3-(2-cloro-6-fluorobenzil)imidazolidina-2,4-diona]	47

Artigo I

Figura 1 - Bulbos de cebolas com a área radicular em contato com a solução-este (A) em recipientes de vidro e 72 h após tratamento, mostrando as raízes crescidas (B)	87
Figura 2 - Fotomicrografias de células BN de medula óssea de camundongos encontradas após 24 horas da administração intraperitoneal da morfina (1 mg/kg) e de seu co-tratamento com PT-31 (0,25, 0,5 e 1,0 mg/kg). Aumento de 1000X	96

Artigo II

Figura 1 – Fotomicrografias de células de raízes de cebola expostas à morfina e ao co-tratamento com PT-31 nas concentrações de 0,25, 0,5 e 1 mg/mL. Aumento de 1000X	113
Figura 2 – Fotomicrografias de MN encontrados em medula óssea de camundongos após 24 h da administração intraperitoneal de morfina (1,0 mg/kg) e do co-tratamento com PT-31 (0,25; 0,5 e 1,0 mg/kg). Aumento de 1000X	115

LISTA DE TABELAS

Artigo I

Tabela 1- Tamanho das raízes (média \pm desvio padrão) em espécimes de <i>Allium cepa</i> expostos à morfina e ao co-tratamento com o composto PT-31, nas concentrações de 0,25; 0,5 e 1,0 mg/mL	90
Tabela 2- Índice Mitótico (média \pm desvio padrão) em espécimes de <i>Allium cepa</i> expostos à morfina e ao co-tratamento com o PT-31 nas concentrações de 0,25; 0,5 e 1,0 mg/mL	91
Tabela 3- Determinação de células BN e da relação EPC/ENC, por gênero (média \pm desvio padrão) em células de medula óssea de camundongos, após 24 horas da administração intraperitoneal de morfina (1,0 mg/kg)	94
Tabela 4- Determinação de células binucleadas e da relação EPC/ENC (média \pm desvio padrão), por gênero em células da medula óssea de camundongos, após 24 horas da administração intraperitoneal de morfina + PT-31 nas concentrações 0,25; 0,5 e 1,0 mg/kg	95

Artigo II

Tabela I - Frequência de MN (média \pm desvio padrão) em espécimes de <i>Allium cepa</i> expostos à morfina e ao co-tratamento com PT-31, nas concentrações de 0,25; 0,5 e 1,0 mg/mL....	113
Tabela II - Frequência de AC (média \pm desvio padrão) em espécimes de <i>Allium cepa</i> expostos à morfina e ao co-tratamento com PT-31, nas concentrações de 0,25; 0,5 e 1,0 mg/mL....	114
Tabela III - Determinação da frequência de MN (média \pm desvio padrão), por gênero, em células de medula óssea de camundongos, após 24 horas da administração de morfina (1 mg/kg)	115
Tabela IV - Determinação da frequência de MN (média \pm desvio padrão), por gênero, em células da medula óssea de camundongos, após 24 horas da administração intraperitoneal de morfina + PT-31 (0,25; 0,5 e 1,0 mg/kg)	116

LISTA DE TERMOS E SIGLAS

AC	Aberrações cromossômicas
ADME	Administração, distribuição, metabolismo e excreção
AINES	Anti-inflamatórios não esteroidais
AMPc	Adenosina Monofosfato Cíclico
BHE	Barreira hematoencefálica
BN	Células binucleadas
Ca ²⁺	Íon cálcio
CAM	Concentração Alveolar Mínima
CbMN	Micronúcleo com bloqueio de citocinese
CN	Controle negativo
CP	Controle positivo
DAG	Diacilglicerol
DMSO	Dimetilsufóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DPH	Fenitoína
ENC	Eritrócito normocromático
EPC	Eritrócito policromático
ERO	Espécie reativa de oxigênio
FDA	Food and Drug Administration
gp -P	Glicoproteína P
GSH	Glutathiona hepática
ICH	Conferência Internacional de Harmonização
IM	Índice mitótico
IP	Intraperitoneal
IP ₃	Fosfatidilinositol 1,4,5 trifosfato
IV	Intravenoso
K ⁺	Íon potássio
LC	<i>Locus coeruleus</i>
MN	Micronúcleo
NA	Noradrenalina
NMDA	N-metil D-aspartato
NO	Óxido nítrico
OMS	Organização Mundial da Saúde

PCK	Proteína cinase C
PCP	Fenciclidina
PIO	Pressão intraocular
PT-31	3- (2-cloro-6-fluorobenzil)- imidazolidina-2,4-diona
QSAR	<i>Quantitative Structure Activity Relationships</i> (Relação estrutura-atividade)
SBMCTA	Sociedade Brasileira de Mutagênese Carcinogênese e Teratogênese Ambiental
SNC	Sistema Nervoso Central
UDP	Uridino difosfato
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
UFPI	Universidade Federal do Piauí
UGP	Uridino difosfato glicuroniltransferase
UTI	Unidade de Terapia Intensiva

SAMPAIO, F.A. Avaliação pré-clínica dos possíveis efeitos tóxicos, citotóxicos e mutagênicos da morfina e de seu co-tratamento com o composto 3-(2-cloro-6-fluorobenzil)imidazolidina-2,4-diona (PT -31) em *Allium cepa* e em *Mus musculus*. Orientador: José Arimatéia Dantas Lopes. Teresina – PI: UFPI, 2012. (Dissertação - Mestrado em Ciências Farmacêuticas)

RESUMO

A morfina é um analgésico opióide amplamente utilizada na clínica tendo ação no Sistema Nervoso Central (SNC), devido a essa propriedade ela também é responsável por efeitos adversos indesejados. A busca por novas moléculas com efeitos analgésicos sobre o SNC tem se mostrado clinicamente relevante. Um novo composto, o 3-(2-cloro-6-fluorobenzil)imidazolidina-2,4-diona, ou PT-31 exibiu um perfil analgésico dose-dependente e ação sinérgica com a morfina. Este estudo pretende avaliar a toxicidade, citotoxicidade e mutagenicidade da morfina e de seu co-tratamento com o PT-31, usando-se o teste *Allium cepa* e o teste de micronúcleo (MN) em *Mus musculus*. Para o teste de *Allium* os bulbos foram expostos a diluições da morfina e desta com o PT-31, nas concentrações de 0,25; 0,5 e 1 mg/mL. Para a realização do teste de micronúcleos os animais receberam, através de administração intraperitoneal, soluções de morfina (1 mg/kg) e do co-tratamento nas concentrações de 0,25; 0,5 e 1,0 mg/kg de peso. O teste de *A. cepa* revelou toxicidade para a concentração de 1,0 mg/mL tanto no tratamento com a morfina como no seu co-tratamento. A citotoxicidade foi vista na concentração de 1,0 mg/mL, para a morfina, e nas concentrações de 0,5 e 1,0 mg/mL para o co-tratamento com PT-31. A mutagenicidade em meristemas de *A. cepa* foi observada para a concentração de 1,0 mg/mL, somente quando o parâmetro avaliado foi MN. A frequência de AC não foi estatisticamente significante em nenhum dos tratamentos. Os resultados para o teste de MN em camundongos revelou significância estatística para a frequência de MN no tratamento com a morfina apenas em animais machos, já no co-tratamento foi significativo para todas as concentrações, para os dois sexos. A citotoxicidade foi observada no tratamento com a morfina e no co-tratamento, com única exceção dos machos da menor concentração no co-tratamento. A análise de células BN mostrou indícios de citotoxicidade para a morfina apenas em animais machos, e no co-tratamento com PT-31 na concentração de 1 mg/kg nos dois sexos. Com os resultados obtidos possível se fazer uma correlação entre os testes, uma vez que apresentaram resultados semelhantes, além de um perfil dose-dependente. Entretanto, mais estudos devem ser realizados para que se possa conhecer as propriedades tóxicas e genotóxicas da nova droga e do seu co-tratamento e, assim, prosseguir com os testes clínicos.

Palavras chaves: morfina, agonista α_2 adreceptores, *Allium cepa*, micronúcleo, mutagenicidade

SAMPAIO, F.A. Preclinical evaluation of the possible toxic, mutagenic and cytotoxic morphine and its co-treatment with the compound 3-(2-chloro-6-fluorobenzyl)imidazolidin-2,4-dione (PT-31) in *Allium cepa* and in *Mus musculus*. Orientador: José Arimatéia Dantas Lopes. Teresina – PI: UFPI, 2012. (Dissertação - Mestrado em Ciências Farmacêuticas)

ABSTRACT

Morphine is an opioid analgesic widely used in the clinic taking action on the central nervous system (CNS) due to this property it is also responsible for unwanted side effects. The search for new molecules with analgesic effects on the CNS has been shown to be clinically relevant. A new compound, 3-(2-chloro-6-fluorobenzyl)imidazolidine-2,4-dione, or PT-31 exhibited a dose-dependent analgesic profile and synergistic action with morphine. This study aims to evaluate the toxicity, cytotoxicity and mutagenicity of morphine and its co-treatment with PT-31, using the *Allium cepa* and micronucleus test in *Mus musculus*. For the test the bulb of *Allium* were exposed to dilutions of morphine and thus with the PT-31 at concentrations of 0.25, 0.5 and 1 mg/mL. To achieve the micronucleus test animals received by ip administration, solutions of morphine (1 mg/kg) and the co-treatment in concentrations of 0.25, 0.5 and 1.0 mg/kg. The test *Allium* showed reactivity to a concentration of 1.0 mg/mL in both the treatment with morphine as in its co-treatment. The cytotoxicity was seen at a concentration of 1.0 mg/mL to morphine, and the concentrations of 0.5 and 1.0 mg/mL for co-treatment with PT-31. The mutagenicity of meristems *A. cepa* was observed to a concentration of 1.0 mg/mL, only when the parameter measured was MN. The frequency of CA was not statistically significant in any treatment. The test results for the MN in mice showed a statistically significant frequency of the MN in the treatment with morphine only in male animals, whereas co-treatment was significant for all concentrations for the two sexes. The cytotoxicity was observed on treatment with morphine and the co-treatment with the only exception of the male lower concentration in the co-treatment. The analysis showed evidence BN cell cytotoxicity to morphine only in male animals and co-treatment with PT-31 at a concentration of 1 mg/kg in both sexes. With the results possible to have a correlation between the tests, as showed similar results, and a dose-dependent profile. However, more studies should be undertaken so that we can learn about the toxic and genotoxic properties of new drug and its co-treatment and thus proceed with clinical trials.

Key words: morphine, α_2 agonist adreceptors, *Allium cepa*, micronucleus, mutagenicity

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. OBJETIVOS	19
2.1. Objetivo geral	19
2.2. Objetivos específicos	19
3. REFERENCIAL TEÓRICO	20
3.1. Analgésicos opióides	20
3.1.1. Origem	20
3.1.2. Química e relação estrutura atividade dos opióides	22
3.1.3. Farmacocinética	24
3.1.4. Farmacodinâmica	28
3.1.4.1. Tipos de receptor	28
3.1.4.2. Mecanismo de ação	30
3.1.5. Efeitos fisiológicos	31
3.1.6. Tolerância e dependência	33
3.1.7. Associação de analgésicos opióides com outros fármacos	35
3.2. Derivados da imidazolidina-2,4-diona	37
3.2.1. Os agonistas α_2 -adrenérgicos e seus usos em analgesia	39
3.2.2. Sinergismo dos agonistas α_2 -adrenérgicos com outras classes de fármacos	43
3.2.3. Caracterização do PT-31	46
3.2.3.1. Química	46
3.2.3.2. Síntese do PT-31	47
3.2.3.3. Ação farmacológica	48
3.3. As fases do desenvolvimento dos fármacos	48
3.3.1. A importância dos testes de genotoxicidade de um candidato a fármaco	51
3.4. Os bioensaios na detecção de mutagenicidade	52
3.4.1. Ensaio teste <i>Allium cepa</i>	58
3.4.2. Teste de micronúcleo	62
REFERÊNCIAS	68

CAPÍTULO 1

4. Artigo I - Avaliação da toxicidade e citotoxicidade da morfina e do seu co-tratamento com o composto 3-(2-cloro-6-fluorobenzil)imidazolidina-2,4-diona (PT-31) no teste *Allium cepa* e em *Mus musculus* 80

CAPÍTULO 2

5. Artigo II – Avaliação da mutagenicidade da morfina e do co-tratamento com o composto 3-(2-cloro-6-fluorobenzil)imidazolidina-2,4-diona (PT-31) em teste *Allium cepa* e em *Mus musculus* 103

CONSIDERAÇÕES FINAIS

132

1. INTRODUÇÃO

O homem vem, desde seus primórdios, utilizando os mais variados recursos, destinados a evitar e combater as doenças, principalmente por meio de drogas e medicamentos. Na Antiguidade, a base do tratamento das doenças era constituída por drogas de origem vegetal e animal, mas foi somente com a descoberta dos alcalóides, entre 1803 e 1920, que o estudo das drogas recebeu grande impulso, passando os farmacêuticos a preocupar-se mais com os constituintes químicos ao invés das plantas e drogas brutas (KOROLKOVAS, 1982). De acordo com Oliveira et al. (2008) a busca por medicamentos menos tóxicos resultou na introdução de substâncias sintéticas na terapêutica, tendo seu uso amplamente disseminado no século XX. Na última década, cerca de 85% dos fármacos disponíveis na terapêutica moderna são de origem sintética.

Os fármacos de origem sintética tiveram enorme progresso nas últimas décadas, mas nem por isso as drogas de origem natural deixaram de ter sua devida importância, pois é a partir delas que o químico medicinal faz modificações a fim de se obter um composto que possua ações terapêuticas melhores e/ou menos efeitos adversos. A Química Orgânica juntamente com a Química Medicinal foram as responsáveis pela síntese química que vem contribuindo cada vez mais com novos fármacos, principalmente depois que se começou a aplicar os conhecimentos dos mecanismos de reações químicas e bioquímicas e dispor de eficientes e rápidos métodos analíticos, principalmente cromatografia, espectrofotometria, espectroscopia e difração de raios-X (KOROLKOVAS, 1982; PATRICK, 1995).

A importância dos opióides na terapêutica da dor já está bem estabelecida há muito tempo e continuam a desempenhar esta atividade até os dias atuais. A morfina é considerada o padrão de comparação para agentes com forte ação analgésica. Os opióides são habitualmente considerados todos os alcalóides naturais e semi-sintéticos derivados do ópio, incluindo seus substitutos sintéticos farmacologicamente semelhantes e todos os outros compostos cujas ações de tipo opióide são bloqueadas pelo antagonista não-seletivo dos receptores opióides, a naloxona. Suas ações nos neurônios locais e circuitos intrínsecos envolvidos na modulação da dor causam analgesia, assim como outros efeitos terapêuticos, mas também são responsáveis pelos efeitos colaterais indesejáveis (GILMAN et al., 2003; KATZUNG, 2003; PATRICK, 1995).

A morfina e a maioria dos outros agonistas opióides utilizados na clínica exercem seus efeitos através dos receptores opióides μ . Os alcalóides opióides produzem analgesia através de suas ações em regiões no cérebro que contém peptídios com propriedades farmacológicas

semelhantes aos opióides. Esses fármacos alteram diversos sistemas fisiológicos e proporcionam analgesia, além de alterarem o humor e o comportamento recompensador e modificarem as funções respiratórias, cardiovasculares, gastrintestinais e neuroendócrinas (GILMAN et al., 2003; KATZUNG, 2003).

A morfina é o protótipo desta classe de fármacos utilizada no tratamento da dor sistêmica. Seus efeitos colaterais, como náuseas, retenção urinária, a dependência à droga e depressão respiratória podem ser significativos e limitar seu uso na terapêutica. Devido a estas propriedades faz-se necessária a busca por novos compostos, que sejam mais potentes e que possua menos efeitos colaterais. A combinação da morfina com agonistas dos α_2 -adrenoceptores seria uma alternativa para aumentar a atividade antinociceptiva, onde experimentos já foram realizados, mostrando resultados promissores (SUDO et al., 2010).

Oliveira et al. (2008) afirmam que 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. Uma das razões para o desenvolvimento de drogas é a de tentar eliminar seus efeitos colaterais, sem perder a atividade farmacológica. Portanto, o químico medicinal poderia modificar a estrutura da molécula original da droga, a fim de torná-la mais específica para o receptor-alvo (PATRICK, 1995).

Tendo em vista que as drogas disponíveis atualmente com efeitos analgésicos sobre o sistema nervoso central ainda são presentes em número reduzido, a busca por novos compostos químicos torna-se de relevante importância. Nos últimos anos pode-se notar que a terapia com agonistas dos receptores α_2 adrenérgicos vem se expandindo para outros usos além dos inicialmente propostos tais como: o controle da hipertensão e o descongestionamento nasal, sendo utilizados atualmente para o tratamento de sintomas de abstinência de drogas e álcool, como adjuvante em anestesia regional e para dor aguda e crônica (SUDO et al., 2010).

Diversas substâncias sintéticas podem ser obtidas a partir de derivações de anéis heterocíclicos, dentre as quais, destacam-se as hidantoínas devido a sua potencialidade como protótipo para o desenvolvimento de novos fármacos. As hidantoínas (também conhecidas como 2,4-dicetotetra-hidro-imidazol ou imidazolidina-2,4-dionas) e seus derivados apresentam ação biológica diversificada, como por exemplo, antimicrobiana, anticonvulsivante e antiparasitária, tendo grande importância na indústria farmacêutica, pois vários fármacos contendo este anel heterocíclico são utilizados na clínica, onde um dos mais conhecidos é a 5,5-difenil-hidantoína ou fenitoína, largamente utilizada nas crises convulsivas (OLIVEIRA et al., 2008).

Com o intuito de se encontrar novas opções terapêuticas foi sintetizado um novo composto, o 3-(2-cloro-6-fluorobenzil)imidazolidina-2,4-diona ou PT-31, derivado da imidazolidina-2,4-diona, pelo Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, verificou-se que através da administração intraperitoneal de PT-31 em camundongos houve produção de antinocicepção dose-dependente, em estudo realizado com o teste da placa quente. A associação desta droga com a morfina foi capaz de potencializar a atividade antinociceptiva. O uso de antagonistas seletivos e não-seletivos dos receptores α_2 -adrenérgicos (ioimbina e BRL 44408, respectivamente) foram capazes de reverter completamente os efeitos do PT-31. Através deste estudo foi possível estabelecer a atividade antinociceptiva de uma nova molécula agonista dos receptores α_2 -adrenérgicos, o PT-31 e seus efeitos sinérgicos com a morfina (SUDO et al., 2010).

Estudos de genotoxicidade têm sido bastante utilizados pela sua rapidez, baixo custo e confiabilidade nos resultados. A genotoxicidade ocorre quando a capacidade de replicação e de levar informação do DNA é alterada. Os danos ao DNA podem resultar em efeitos mutagênicos e carcinogênicos. Os principais tipos de genotoxicidade se dá por danos no DNA, mutações pontuais e aberrações cromossômicas. O estudo desse processo, conhecido por genética toxicológica é um componente integral das exigências regulamentares capaz de realizar a triagem de um grande número de supostos agentes mutagênicos e carcinogênicos. (COMBES, 1992). Estudos de toxicidade e mutagenicidade são necessários por contribuírem com a utilização segura e eficaz de novas drogas ou de novos tratamentos. O índice mitótico e índice de replicação são usados como indicadores de proliferação adequada das células, o que pode ser medido através do sistema teste vegetal de *Allium cepa* (GADANO et al., 2002).

O uso de raízes de *Allium cepa* em biomonitoramento permite uma resposta rápida e segura, revelando o efeito sobre o mecanismo reparador de DNA (DIANA et al, 2000). As razões para a utilização de sistemas vegetais são muitas: As plantas são fáceis de armazenar e manipular, são de baixo custo, existem na maioria das vezes cromossomos com boas condições e o mais importante, boa correlação com outros testes. O material de *Allium* é bem conhecido e tem sido utilizado para o estudo dos mecanismos básicos, bem como para marcar os efeitos dos produtos químicos. Entre as espécies de *Allium*, *Allium cepa* (cebola comum), demonstra ser a mais útil, e tem sido repetidamente sugerido como um material de teste padrão (FATIMA; AHMAD, 2006; FISKESSJO, 1985; IVANOVA; STAIKOVA; VELCHEVA, 2005; LEME; MARIN-MORALES, 2008; SETH et al. 2008).

O teste do micronúcleo consiste na investigação de células previamente expostas a agentes químicos, com a finalidade de detectar possíveis alterações do material genético. O

teste fundamenta-se no aumento da frequência de eritrócitos policromáticos com micronúcleos, utilizando-se para isso, preferencialmente, células de mamíferos (medula óssea ou sangue periférico) de animais devidamente tratados (FLORES; YAMAGUCHI, 2008).

A formação de MN durante a divisão celular é resultado da quebra de cromossomos devido às lesões não 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 aneugênicos. Essa heterogeneidade reflete a presença de múltiplas exposições externa e interna e ao grande número de alterações cromossômicas que eventualmente resultam na formação de micronúcleos (FENECH, 2005). Os MN se originam de fragmentos ou cromossomos acêntricos (quebras cromossômicas) ou de cromossomos inteiros que não conseguiram se envolver com o fuso mitótico durante a divisão nuclear (perdas cromossômicas) (MATEUCA et al., 2008).

O ensaio de MN tem sido aceito por entidades reguladoras na avaliação de risco populacional, oferecendo bons resultados em relação ao teste de AC, uma vez que pode ser analisado mais rapidamente. Foi demonstrado em muitos estudos uma correlação positiva entre o nível elevado MN e pacientes com câncer. O uso de biomarcadores como preditor de risco de doença, é apoiado na relação fatores de risco e doenças relacionadas. Assim, o uso de MN como biomarcador se baseia no fato de que diversas anomalias citogenéticas são encontradas em células cancerígenas, apoiando a hipótese de que danos cromossômicos estão diretamente envolvidos na etiologia do câncer (IARMARCOVAI et al., 2008b; MINOZZO; DEIMLING; SANTOS-MELLO, 2010; MURGIA et al., 2008). A formação de micronúcleos (MN) é largamente utilizada em epidemiologia molecular como um biomarcador de danos cromossômicos e instabilidade do genoma (IARMARCOVAI et al., 2008a).

Com o intuito de contribuir para o delineamento do perfil genotóxico do novo composto, o 3-(2-cloro-6-fluorobenzil)imidazolidina-2,4-diona (PT-31), que apresentou atividade agonista nos receptores α_{2A} adrenérgicos, além de sinergismo quando em co-tratamento com a morfina, realizou-se a avaliação da toxicidade, citotoxicidade e mutagenicidade da morfina e do seu co-tratamento com PT-31, utilizando para isto o teste de *Alium cepa* e o teste de micronúcleo em *Mus musculus*.

Esta dissertação está dividida em: Introdução, Referencial teórico, Objetivos gerais e específicos, e dois capítulos, um artigo cada um que tratam da avaliação da toxicidade, citotoxicidade e mutagenicidade da morfina e do seu co-tratamento com PT-31.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

- ❖ Avaliar os possíveis efeitos tóxicos, citotóxicos e mutagênicos da morfina e de seu co-tratamento com o PT-31 em estudos com o teste de *Allium cepa* e com o teste de micronúcleo em medula óssea de *Mus musculus*.

2.2. Objetivos Específicos

- ❖ Avaliar a toxicidade da morfina e de seu co-tratamento com o PT-31 em meristemas de raízes de *Allium cepa*, pela inibição do crescimento de raízes;
- ❖ Avaliar a citotoxicidade da morfina e de seu co-tratamento com o PT-31 em meristemas de raízes de *Allium cepa*, pela inibição da divisão mitótica;
- ❖ Detectar os possíveis efeitos mutagênicos da morfina e de seu co-tratamento com o PT-31 em meristemas de raízes de *Allium cepa*, pela frequência de micronúcleos e de aberrações cromossômicas;
- ❖ Avaliar a citotoxicidade da morfina e de seu co-tratamento com o PT-31 em medula óssea de camundongos, pela avaliação da relação EPC/ENC e de células BN com o teste de micronúcleos em de *Mus musculus*;
- ❖ Avaliar mutagenicidade da morfina e de seu co-tratamento com o PT-31 em medula óssea de camundongos, pela frequência de MN com o teste de micronúcleos em *Mus musculus*;
- ❖ Correlacionar os dados obtidos com o sistema *Allium cepa* e com os efeitos observados em *Mus musculus*.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1. Analgésicos opióides

São considerados opióides todos os alcalóides naturais e semi-sintéticos derivados do ópio, e todos os outros compostos cujas ações de tipo opióides são bloqueadas pelo antagonista não-seletivo dos receptores de opióides, a naloxona. São incluídos ainda, diversos peptídeos endógenos que são sintetizados por células nervosas e células da medula supra-renal e que interagem com receptores opióides. Foram identificadas três famílias de peptídeos com precursores específicos no sistema nervoso central: as encefalinas, as endorfinas e as dinorfinas. A morfina é considerada o protótipo dos agonistas opióides. Esse termo pode ser utilizado para agonistas, agonistas parciais, agonistas-antagonistas e antagonistas competitivos (KATZUNG, 2003; SILVA, 2006).

3.1.1. Origem

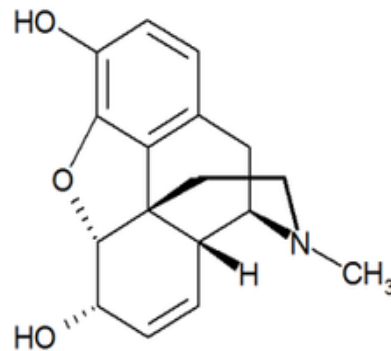
Os opiáceos são uma das classes de drogas mais antiga conhecidas pelo homem. O uso do ópio foi registrado na China há mais de dois mil anos e era conhecida na Mesopotâmia, antes disso. Ao longo dos séculos, o extrato bruto derivado das papoulas foi amplamente utilizado como sedativo. A tintura de ópio foi introduzida na Inglaterra e considerada indispensável para a medicina. O nome morfina, deve-se ao deus grego dos sonhos, Morfeu. Embora a morfina pura tenha sido isolada em 1803 pelo farmacêutico alemão Sertürner, foi somente em 1833 que os químicos da Macfarlane & Co. (agora Macfarlane-Smith), em Edimburgo foram capazes de isolá-la e purificá-la em escala comercial (KATZUNG, 2003; PATRICK, 1995).

Como a síntese laboratorial da morfina é difícil, ela é obtida do ópio ou extraída da papoula, por incisão da casca da semente, após as pétalas da flor terem caído. O látex branco que escorre torna-se marrom e endurece, quando deixado em repouso. Essa goma marrom e viscosa é o ópio. O ópio, substância bruta, contém uma mistura complexa de quase 25 alcalóides e a morfina, um de seus componentes ativos, o responsável pela atividade analgésica, são obtidos da papoula, *Papaver somniferum*. Outros alcalóides encontrados são: a codeína, a tebaína e a papaverina (Figura 1). A tebaína e a papaverina não são analgésicos,

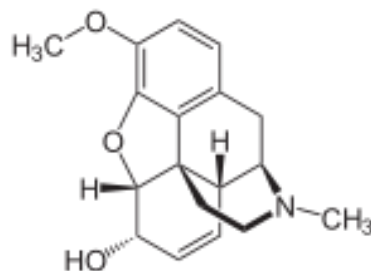
porém a tebaína é precursora de vários agonistas opióides semi-sintéticos (p. ex.: etorfina) e antagonistas (naloxona) (Figura 1). O principal alcalóide do ópio é a morfina, presente numa concentração de cerca de 10%. A codeína está presente numa concentração de menos de 0,5% e também é sintetizada a partir da morfina. Esses alcalóides podem ser divididos em: fenantrenos (morfina, codeína e tebaína) e benzilisoquinolinas (papaverina e noscapina) (GILMAN, 2003; KATZUNG, 2003; PATRICK, 1995).

Figura 1: Estruturas químicas de alguns opióides: (a) morfina, (b) codeína, (c) tebaína, (d) papaverina, (e) etorfina e (f) naloxona.

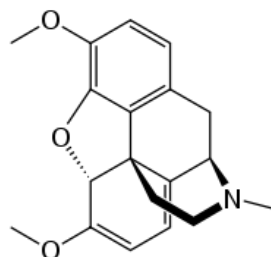
(a) Morfina: 7,8-didesidro-4,5 α -epoxi-17-metilmorfinan-3,6 α -diol.



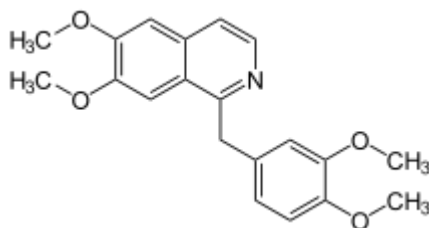
(b) Codeína: 7,8-didesidro-4,5 α -epoxi-3-metoxi-17-metilmorfinan-6 α -ol



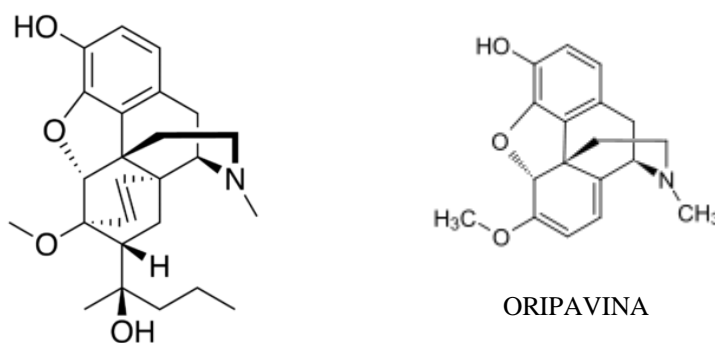
(c) Tebaína: 6,7,8,14-tetradesidro-4,5 α -epoxi-3,6-dimetoxi-17-metilmorfinano.



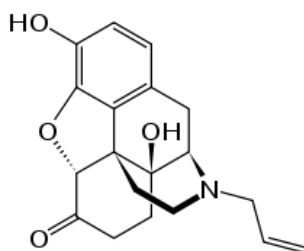
(d) Papaverina: 1-[(3,4-dimetoxifenil)metil]-6,7-dimetoxi-isoquinolina.



(e) Etorfina: 4,5 α -epoxi-6-metoxi-7 α -(1-hidroxi-1-metilbutil)-6,14-endoeteno-17-metilmorfinan-3-ol ou 6,7,8,14-tetra-hidro-7 α -(1-hidroxi-1-metilbutil)-6,14-endoeteno-oripavina.



(f) Naloxona: 4,5 α -epoxi-3,14-di-hidroxi-17-(2-propenil) morfinan-6-ona.

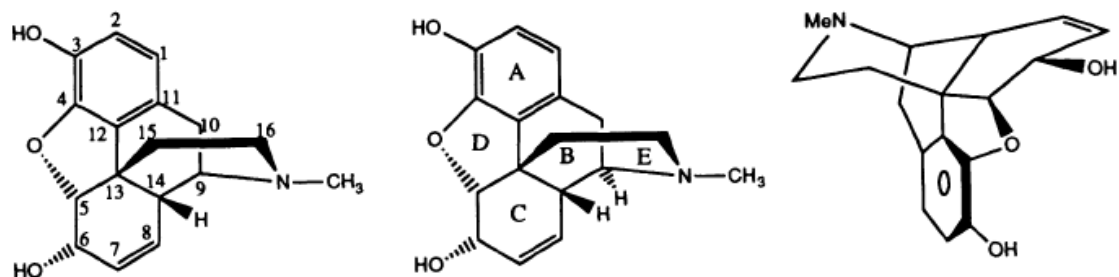


3.1.2. Química e relação estrutura-atividade dos opióides

A estrutura básica da molécula da morfina consiste na fusão de cinco anéis rígidos (A-E) e tem uma forma de um T (Figura 2). Possui um grupo amino terciário, fundamental, mas também contém um grupo fenólico, um grupo álcool, um anel aromático, uma ponte éter e uma ligação dupla. A codeína é o éter metílico da morfina e também está presente no ópio. É

usada no tratamento da dor moderada, da tosse e da diarreia. Ela sofre uma metilação na OH fenólica, com redução da atividade analgésica a apenas 0,1% da morfina *in vitro*. Essa queda na atividade é observada em análogos que contenham um grupo fenólico mascarado, com isto, pode-se inferir que o grupo fenólico livre é crucial para a atividade analgésica. Já o mascaramento ou a perda completa do grupo álcool não diminui a atividade analgésica e, pode, muitas vezes ter o efeito contrário. O grupo 6-hidroxila também não é necessário para a atividade analgésica e sua remoção pode ser benéfica para a atividade analgésica (PATRICK, 1995; SILVA, 2006).

Figura 2: Estrutura química da morfina mostrando seus anéis (A-E) e sua forma de T. Adaptada de PATRICK, 1995.



Vários análogos, como a diidromorfina, têm mostrado que a ligação dupla não é necessária para a atividade analgésica. A substituição do grupo N-metil por um próton reduz a atividade, mas não a elimina. O grupo NH secundário é mais polar do que o grupo N-metil-terciário e, portanto, mais difícil de atravessar a barreira hematoencefálica, levando a uma redução na atividade. O fato de que a atividade significativa é mantida mostra que o substituinte metil não é essencial para a atividade. No entanto, o nitrogênio é crucial, pois se ele for totalmente removido, toda a atividade analgésica é perdida. Portanto, o átomo de nitrogênio é essencial para a atividade analgésica e interage com o receptor analgésico na forma ionizada. O anel aromático também é essencial, pois compostos sem ele não possuem atividade analgésica. E por último, a ponte éter também não é necessária para a atividade analgésica. Uma variedade de drogas é derivada da substituição de grupamentos químicos ligados ao anel de nitrogênio, com adição de: 1- grupos ciclobutil (produzindo agonistas parciais), 2- derivados alil (caracterizando efeito antagonista da molécula); a eliminação de anéis da estrutura básica da morfina forma estruturas químicas para as séries de benzomorfanos (3 anéis); fenilpiperidinas (2 anéis); molécula de tiramina (1 anel).

Resumindo, então, pode-se dizer que os opióides são inativados, caso haja as seguintes alterações: modificação no anel piperidínico, eliminação no nitrogênio, ou ainda, bloqueio do radical hidroxila do anel fenólico em C₃ (PATRICK, 1995; SILVA, 2006).

3.1.3. Farmacocinética

Os opióides sofrem absorção pelas vias subcutânea, transdérmica, intramuscular, mucosa do nariz, boca e trato gastrointestinal. A biodisponibilidade dos fármacos utilizados por via oral sofre os efeitos do metabolismo de primeira passagem pelo fígado, diminuindo-a, fazendo com que a dose necessária para atingir uma concentração terapêutica eficaz seja maior por essa via que pela via parenteral (SILVA, 2006).

Os análogos da morfina são capazes de atingir o receptor analgésico de forma muito mais eficiente do que a morfina em si. Isso ocorre porque os receptores analgésicos são localizados no cérebro, então para que as drogas atinjam o cérebro, elas têm que atravessar a barreira hematoencefálica (BHE). Os capilares que alimentam o cérebro são revestidos por uma série de membranas formadas por ácidos graxos, com isto, compostos altamente polares são impedidos de cruzá-la. Assim, quanto mais grupos polares uma molécula possua, mais dificuldade ela tem em chegar ao cérebro. No caso da morfina existem três grupos polares (álcool, fenol e amina), enquanto seus análogos ou perderam o grupo álcool ou tiveram este mascarado por um grupo alquila ou acila. Eles, portanto, entram no cérebro mais facilmente e se acumulam nos locais receptores em concentrações maiores, portanto, possuem melhor atividade analgésica (PATRICK, 1995).

Os analgésicos opióides têm tido respostas clínicas amplamente variáveis em seres humanos. Estudos revelaram que diferenças herdadas nas enzimas metabolizadoras de drogas (como o citocromo P-450), nos transportadores de drogas, glicoproteína P (gp-P), e/ou nos receptores opióides (μ , δ e κ), podem afetar a eficácia de drogas opióides em pacientes individuais. Além disso, algumas variabilidades na sensibilidade nociceptiva ou nos sistemas inibidores descendentes também podem causar variabilidade interindividual em resposta a estes medicamentos. Embora existam muitos fatores que podem influenciar a farmacocinética/farmacodinâmica de uma droga, o transporte da morfina através da BHE parece ser o passo mais importante que permite que a morfina exerça um efeito analgésico centralmente mediado (HAMABE et al., 2007).

A limitação do transporte de drogas para o cérebro é determinada pelas características da BHE, que por sua vez é afetado pelas propriedades físico-químicas das drogas tais como tamanho, carga e solubilidade lipídica. As células endoteliais cerebrais expressam numerosos transportadores de afluxo e efluxo. A gp-P é um dos transportadores de efluxo de drogas sistemicamente expressa, não só na BHE, mas também em vários tecidos como fígado, rins e intestino. Ela atua como uma bomba de efluxo dependente de energia, que transporta uma grande variedade de compostos estruturalmente diferentes, incluindo analgésicos opióides, do compartimento intracelular para o extracelular. Estudos reportam que a morfina e o fentanil ativam gp-P-ATPase nas membranas das células endoteliais capilares do cérebro, e seus efeitos analgésicos dependem da expressão de gp-P. Além disso, um grande número de relatos sugerem que os polimorfismos genéticos da gp-P têm efeito sobre a farmacocinética da droga por alterar os níveis de expressão da gp-P. Interações foram observadas entre polimorfismos genéticos e a farmacocinética/farmacodinâmica dos opióides e/ou entre polimorfismos genéticos e níveis de expressão da gp-P na placenta e intestino. No entanto, há poucos relatos no estudo da correlação entre a variabilidade interindividual da farmacocinética/farmacodinâmica dos opióides e a expressão da gp-P ou sua função como a BHE (HAMABE et al., 2007).

É interessante comparar as atividades de morfina, 6-acetilmorfina, e diamorfina (heroína) (Figura 3). O composto mais ativo e mais perigoso dos três é a 6-acetilmorfina, que é cerca de quatro vezes mais ativa que a morfina. A heroína é duas vezes mais ativa do que a morfina, mas menos ativa do que 6-acetilmorfina. Esta é menos polar que a morfina e entra no cérebro mais rapidamente e em maiores concentrações, possui um grupo fenólico livre que interage com os receptores analgésicos imediatamente. Já a heroína tem dois grupos polares mascarados, sendo por isso, o mais apolar e mais eficiente dos três para atravessar a BHE. No entanto, antes que ele possa atuar no receptor, o grupo acetil ligado ao grupo fenólico tem que ser removido por esterases cerebrais. Portanto, ela é mais potente que a morfina porque entra no cérebro mais facilmente, porém é menos potente do que 6-acetilmorfina, porque o grupo 3-acetil tem que ser removido antes que ela possa agir. A heroína e 6-acetilmorfina são ambas analgésicos mais potentes que a morfina. Infelizmente, elas também têm maiores efeitos colaterais, além de causarem tolerância grave e dependência (PATRICK, 1995).

A morfina é um potente analgésico e é utilizado mundialmente no manejo clínico da dor aguda e crônica severa. Foi demonstrado que o tratamento de ratos e camundongos com altas doses de morfina diminui a glutatona hepática (GSH) e aumenta os níveis de atividade das transaminases séricas. As reações adversas da morfina podem estar relacionadas, pelo

menos em parte, com a geração de metabólitos reativos que podem se ligar a GSH e macromoléculas teciduais. A morfina 6-desidrogenase é responsável por catalisar a conversão da morfina para morfina no fígado de cobaias (Figura 4) (TODAKA et al., 2005).

Figura 3: Estruturas químicas: (a) morfina; (b) morfina; (c) di-hidromorfina; (d) 6-acetilmorfina; (e) diamorfina.

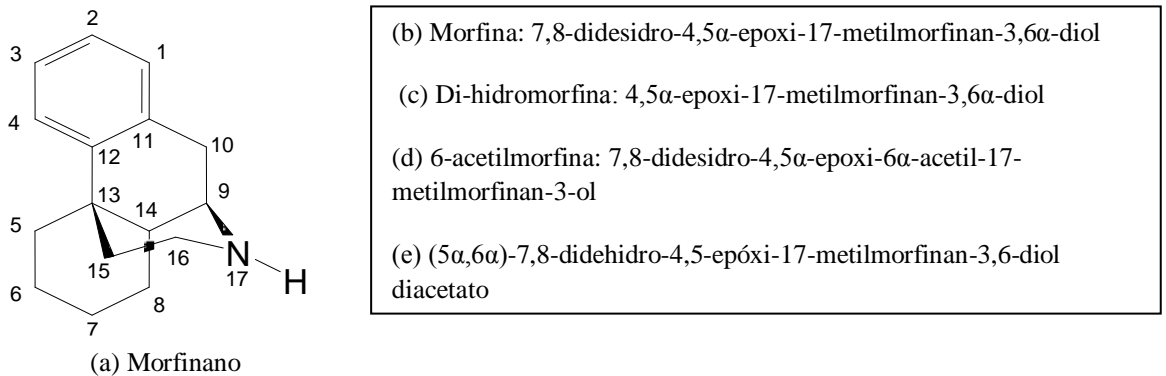
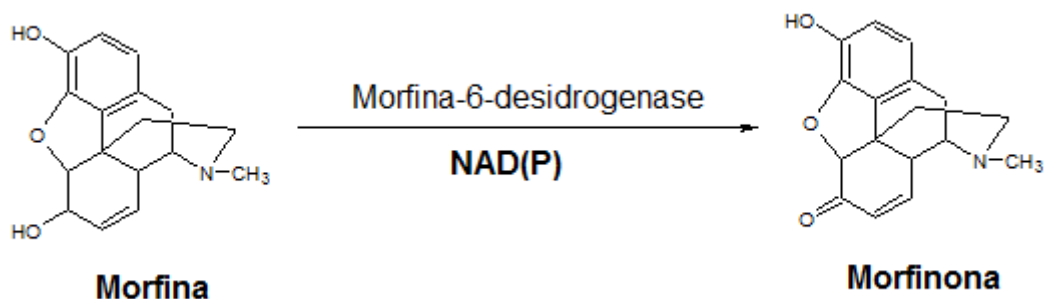


Figura 4: Conversão da morfina a morfina catalisada pela morfina 6-desidrogenase.



A morfina é nove vezes mais tóxica do que a morfina, além de ser um potente antagonista da morfina. Também foi descoberto que este metabólito bloqueou a ligação da naloxona de forma irreversível em frações de sinaptossomas mitocondriais em cérebro de ratos, e se ligou covalentemente a macromoléculas de tecidos através dos grupos sulfidril, causando hepatotoxicidade. Essas observações sugerem que a morfina formada a partir da morfina pode afetar a ação analgésica da morfina e ter um papel potencial na toxicidade induzida pela morfina, incluindo o desenvolvimento de tolerância. É, portanto, de relevante interesse toxicológico e farmacológico avaliar a via metabólica da morfina para morfina tanto em animais como em humanos (TODAKA et al., 2005).

Os opióides podem ser excretados em forma inalterada ou em compostos polares pela urina. Os conjugados com glicuronídeo são excretados na bile, mas a circulação êntero-hepática representa apenas pequena fração do processo de eliminação dessa drogas (SILVA, 2006). A via mais importante de eliminação da morfina é a glicuronização, cerca de dois terços é realizada por esta via em seres humanos. Ela é metabolizada em morfina 3- e 6-glicuronídeo por UDP-glicuronosiltransferases (UGTs) no fígado. A morfina 3-glicuronidação é a via dominante. A depuração metabólica da morfina 3-glicuronídeo é cerca de cinco vezes maior do que a eliminação metabólica de morfina 6-glicuronídeo. A morfina 3-glicuronídeo não tem nenhum efeito analgésico, enquanto a morfina 6-glicuronídeo tem efeito analgésico 20 vezes mais potente que a morfina. Pacientes que sofrem de câncer têm necessidade de terapia contínua com morfina. Frequentemente ela é co-administrada com outras classes de drogas tais como: anti-cancerígenas, imunossupressoras, outros analgésicos, anticonvulsivantes e antidepressivos. Como a depuração da morfina é dependente do metabolismo pelas UGTs, drogas que inibem as UGTs podem afetar a cinética da morfina e suas formas de glicuronídeos, resultando em eficácia analgésica alterada e risco de efeitos colaterais aumentados (HARA et al., 2007).

3.1.4. Farmacodinâmica

3.1.4.1. Tipos de receptores

Atualmente sabe-se que existem cinco tipos diferentes de receptores para opióides, mu (μ), delta (δ), kappa (κ), σ (sigma) e ϵ (epsilon), onde os três primeiros são receptores analgésicos. Foi sugerida a existência de diversos subtipos de receptores; onde, os mais bem caracterizados por critérios farmacológicos incluem μ_1 , μ_2 , κ_1 , κ_2 , κ_3 e δ_1 , δ_2 . Entretanto, foram isolados genes que codificam apenas um subtipo de cada uma das famílias de receptores μ , δ e κ . Estes receptores medeiam muitos efeitos fisiológicos do sistema de opióides endógenos, incluindo comportamento da dor e analgesia, estresse e status social, tolerância e dependência, aprendizado e memória, alimentação e bebida, álcool e abuso de drogas, atividade sexual e secreção de hormônios, doença mental e no humor, convulsões e desordens neurológicas, atividade elétrica dos neurônios, atividade geral e locomoção, gastrointestinal, funções renal e hepática, respiratória, controle da termorregulação e

respostas imunológicas (ERFANPARAST et al., 2010; KATZUNG, 2003; PATRICK, 1995; SILVA, 2006).

Há evidências de que, receptores opiáceos μ estão em grande parte envolvidos nos efeitos analgésicos de opiáceos, enquanto o receptor opiáceo δ está relacionado mais para efeitos emocionais dessas drogas, já os sítios κ podem mediar os efeitos sedativos dos opiáceos. Os receptores δ e κ também podem contribuir para a analgesia. Claramente, receptores seletivos de opiáceos podem ter menos efeitos secundários adversos. Os receptores μ medeiam os efeitos da morfina assim como os opiáceos que também produzem propriedades euforizantes, depressoras respiratórias e de dependência física da morfina (efeitos agonistas típicos). Drogas com atividade κ têm efeitos analgésico e sedativo, mas provocam menos euforia e são menos viciantes que a morfina. Outro receptor, designado σ , foi postulado para explicar os efeitos psicotomiméticos observados em alguns opiáceos, particularmente agonistas mistos (KATZUNG, 2003; SNYDER, 1984).

Os três tipos principais de receptores opióides (μ , κ e δ) são encontrados em altas concentrações no corno dorsal da medula espinhal (lâminas I e II), núcleo trigêmeo medular, tálamo, hipotálamo, substância periaquedutal cinzenta, núcleos da rafe, região ventral superior do bulbo e da ponte e *locus coeruleus*. São encontrados receptores tanto em neurônios de transmissão da dor na medula espinhal quanto nos aferentes primários que transmitem a mensagem da dor. Observa-se, também, presença de receptores nas amígdalas e córtex cerebrais, no hipocampo, no núcleo caudado e globo pálido, na medula supra-renal, nos plexos nervosos e glândulas exócrinas do estômago e intestino, sugerindo a participação dos opióides na regulação do comportamento motor, afetivo, neurovegetativo e neuroendócrino. Os agonistas opióides inibem a liberação de transmissores excitatórios desses aferentes primários e inibem diretamente o neurônio transmissor de dor do corno dorsal. Por isso, os opióides exercem um poderoso efeito analgésico diretamente na medula espinhal (KATZUNG, 2003; SILVA, 2006).

A morfina, um agonista do receptor opióide μ , tem suas ações mediadas através da ligação e ativação de receptores centrais e no sistema nervoso periférico. Mecanismos periféricos do efeito analgésico da morfina têm sido relatados, e sua importância é cada vez mais apreciada. É sabido que os bloqueadores de canais de cálcio tipo L potencializam a analgesia da morfina (SHIMIZU et al., 2004).

Ela é um agonista forte e interage fortemente com o receptor μ levando a uma mudança na conformação deste receptor. Esta mudança na conformação abre um canal iônico na membrana celular e, como resultado, os íons de potássio (K^+) podem fluir para fora da célula. Este fluxo hiperpolariza o potencial de membrana, tornando mais difícil um

potencial ser atingido. Portanto, a frequência de disparo do potencial de ação é reduzido, o que resulta em uma diminuição da excitabilidade neuronal. Este aumento da permeabilidade de K^+ tem um efeito indireto, pois também diminui o influxo de íons de cálcio (Ca^{2+}) no terminal nervoso e este por sua vez, reduz a liberação do neurotransmissor. Ambos os efeitos, então, “desligam” o nervo e bloqueiam as mensagens de dor. Infelizmente, este receptor também está associado com o risco de efeitos colaterais nos analgésicos opióides, como a depressão respiratória, euforia e vício. Esta é uma das razões de porque é tão difícil remover os efeitos colaterais da morfina e análogos, uma vez que o receptor com o qual eles se ligam mais fortemente também está intrinsecamente envolvido com estes efeitos colaterais (PATRICK, 1995).

Os receptores μ_1 e κ_3 , μ_2 e κ_1 , quando acionados, provocam, respectivamente, analgesia a nível supra-espinhal e espinhal, além de determinados efeitos adversos dos opióides (SILVA, 2006). O receptor κ está diretamente associado com o canal de cálcio, quando um agonista se liga a este receptor, ele sofre alterações de conformação e o canal de cálcio (normalmente aberto quando o nervo está disparando e passando mensagens de dor) é fechado. O cálcio é necessário para a produção dos neurotransmissores nos nervos, portanto, quando o nervo é desligado, não transmite as mensagens de dor. Os nervos afetados pelo mecanismo κ são aqueles relacionados à dor induzida por estímulos não-térmicos. Não é o que ocorre com o receptor μ , onde todas as mensagens de dor são inibidas. Isto sugere uma distribuição diferente de receptores κ em relação aos receptores μ . A morfina pode se ligar ao receptor κ ativando-o, no entanto, essa força de ligação é inferior a do receptor μ . A resposta biológica é analgesia e sedação, mas nenhum dos efeitos colaterais são perigosos. É esse receptor que oferece a melhor esperança para um analgésico seguro (PATRICK, 1995).

Estudos mostram que em animais de experimentação, a ativação de receptores δ potencializa a analgesia induzida pela ligação dos opióides aos receptores μ (SILVA, 2006). O receptor δ é onde as encefalinas interagem. A morfina também pode se ligar fortemente a este receptor. Os nervos que contêm o receptor δ , assim como os que contêm o receptor μ , não discriminam entre diferentes fontes de dor. Neste caso, não existem canais de íons envolvidos. A molécula de substrato se liga ao receptor δ e, de alguma forma, a mensagem é transmitida através da membrana celular para uma segunda proteína ligada à membrana. Esta proteína age então como uma enzima para a formação de AMP cíclico. Normalmente, o sítio ativo está aberto quando o nervo está recebendo mensagens de dor, o AMP cíclico funciona como um segundo mensageiro enviando mensagens de dor. No entanto, quando o receptor δ é ativado, provavelmente muda de forma e, como resultado leva a uma mudança

na forma da enzima ciclase para fechar o sítio ativo pelo qual ele pode fazer AMP cíclico (PATRICK, 1995).

O receptor σ não é um receptor de analgésicos, mas pode ser ativado por certas moléculas de opiáceos, como nalorfina. A estimulação destes receptores, todavia, ocasiona alterações comportamentais, como euforia, alucinações, delírios e efeitos cardíacos. O receptor pode estar associado com os efeitos alucinógenos e psicotomiméticos da fenciclidina (PCP) (PATRICK, 1995; SILVA, 2006).

3.1.4.2. Mecanismo de ação

A nível molecular, os receptores opióides estão acoplados a proteínas G e, portanto, são capazes de afetar a regulação iônica, o processamento do Ca^{2+} intracelular e a fosforilação das proteínas. Os opióides podem inibir a passagem do estímulo nervoso, hiperpolarizando as membranas celulares pré ou pós-sinápticas, através da saída de K^+ do compartimento intracelular, ou à redução da entrada de Ca^{2+} regulado por voltagem nas terminações nervosas pré-sinápticas e a uma menor liberação de neurotransmissores excitatórios (acetilcolina, noradrenalina, dopamina, serotonina e substância P) na fenda sináptica (KATZUNG, 2003; SILVA, 2006).

3.1.5. Efeitos fisiológicos

Os agonistas opióides produzem analgesia através de sua ligação a receptores específicos, que se localizam principalmente no cérebro e em regiões da medula espinhal envolvidas na transmissão e modulação da dor (KATZUNG, 2003). Apesar de os agonistas dos receptores opióides δ causarem analgesia em animais, podendo ser úteis em seres humanos, a maioria desses agentes não consegue atravessar a BHE, tendo, por isso, que ser administrados por via intratecal. Agonistas κ seletivos são capazes de induzir analgesia em animais, principalmente em locais espinhais. A depressão respiratória e a miose podem ser menos graves com estes agonistas. Em vez de euforia, os agonistas do receptor κ causam efeitos disfóricos e psicomiméticos. No circuito neural que medeia a recompensa e a

analgesia, alguns estudos demonstraram que os agonistas μ e κ exercem efeitos antagônicos (GILMAN et al., 2003; KATZUNG, 2003).

A ação analgésica da morfina está relacionada com depressão de mecanismos centrais envolvidos na nocicepção (redução de transmissão medular de impulsos periféricos e reforço dos sistemas eferentes inibitórios) e, sobretudo, com a interferência na interpretação afetiva da dor. A substância periaquedutal e os núcleos talâmicos e bulbares são áreas ricas em receptores opióides, assim como o sistema límbico que parece mediar resposta afetiva aos opióides, como euforia, sensação irreal de bem-estar responsável em grande parte pelo potencial de abuso. Também se propõe ações analgésicas periféricas para opióides, originadas da interação de agonistas parciais com receptores específicos e bloqueadas por antagonistas puros (FUCHS; WANNMACHER, 1998).

Já foi visto anteriormente que os opióides são conhecidos por exercer analgesia por ação no sistema nervoso central, como também, foi relatada a existência de receptores opióides periféricos. A ativação destes receptores tem levado à indução de analgesia em animais de laboratório, preferencialmente em estados hiperalgésicos e inflamatórios. Na ausência de inflamação, os efeitos analgésicos periféricos induzidos pelos opióides estão menos estabelecidos. Provavelmente a maior dificuldade de acesso dos opiáceos aos nervos periféricos ou a falta de efeitos adicionais nas células imunes na ausência de inflamação poderia explicar este fato. Se a morfina local pode atingir analgesia na prática clínica, seu efeito pode estar relacionado com a existência de estados inflamatórios (BAAMONDE et al., 2000).

É importante diferenciar entre a dor causada pela estimulação dos receptores nociceptivos e transmitidas pelas vias neurais intactas (dor nociceptiva) e a dor causada pela lesão das estruturas neurais, geralmente envolvendo a hipersensibilidade neural (dor neuropática). Embora a dor nociceptiva em geral responda aos analgésicos opióides, a dor neuropática não costuma responder bem a esses fármacos e pode exigir doses maiores desses analgésicos. Estudos anteriores demonstraram que os efeitos analgésicos dos opióides devem-se à sua capacidade de inibir diretamente a transmissão ascendente das informações nociceptivas provenientes do corno dorsal da medula espinhal e ativar os circuitos de controle da dor, que descem do mesencéfalo pelo bulbo ventromedial rostral e chegam ao corno dorsal da medula espinhal (GILMAN, 2003). Devido à sua ação direta sobre a medula espinhal, os opióides podem ser usados como anestésicos regionais, administrados nos espaços epidural ou subaracnóide da medula espinhal (KATZUNG, 2003).

A morfina age no cérebro elevando o limiar da dor, diminuindo a consciência do cérebro à dor. Infelizmente, ela tem um grande número de efeitos colaterais que incluem os

seguintes: depressão no centro respiratório, constipação, excitação, euforia, náuseas e vômitos, miose, sedação, boca seca, prurido, pele quente e eritematosa, hipotensão arterial, retenção urinária, tolerância e dependência. Alguns efeitos colaterais não são particularmente graves. Algumas dessas propriedades podem ser aproveitadas terapêuticamente, tais como a antitussígena, antidiarréica, sedativa, vasodilatadora; outras, como a euforia, podem ter um emprego não-médico. Os efeitos adversos perigosos da morfina são os de tolerância e dependência, aliada aos efeitos sobre a respiração. A causa mais comum de morte por overdose de morfina é a asfixia. A tolerância e a dependência da droga são particularmente perigosas, podendo levar a sintomas de abstinência grave quando a droga é suspensa (FUCHS; WANNMACHER, 1998; PATRICK, 1995).

Em geral, os fármacos relacionados com a morfina induzem analgesia, sonolência, alterações do humor e obnubilação mental em humanos. Um aspecto interessante é que essa analgesia ocorre sem perda de consciência. O alívio da dor pelos opióides semelhantes à morfina é relativamente seletivo, pois não se alteram as outras modalidades sensoriais. A dor contínua e difusa é aliviada com mais eficácia que a dor intermitente e aguda. Pacientes com dor que recebem doses terapêuticas de morfina relatam que a dor é menos intensa, menos desconfortável ou desapareceu por completo, a sonolência nesses pacientes é comum, podendo ocorrer ainda euforia. Quando se administra morfina a indivíduos sem dor, na mesma dose, pode haver reações desagradáveis, como náuseas e vômitos. Alguns indivíduos relatam a sensação de sonolência, dificuldade de raciocínio, apatia e redução da atividade física. À medida que se aumenta a dose, os efeitos vão ficando cada vez mais pronunciados, como os efeitos subjetivos, analgésicos e tóxicos (inclusive depressão respiratória) (GILMAN, 2003).

3.1.6. Tolerância e Dependência

O tratamento crônico com morfina está associado ao desenvolvimento de tolerância. O mecanismo subjacente a este fenômeno tem sido extensivamente investigado nos níveis celular e molecular. As ações farmacológicas de drogas *in vivo* são geralmente dependentes de fatores farmacocinéticos e farmacodinâmicos. Estudos anteriores relataram que a administração repetida de morfina causou um aumento de duas vezes no nível de glicoproteína P no cérebro de ratos associado a uma diminuição nos efeitos antinociceptivos. Os resultados deste estudo sugerem que administração repetida de morfina em ratos reduziu

a absorção intestinal da droga, posteriormente, diminuindo seus efeitos antinociceptivos. A diminuição da absorção pode estar relacionada, pelo menos em parte, ao efluxo mediado pela glicoproteína P. Estes achados podem ser relevantes para o desenvolvimento de tolerância à morfina após administração oral (OKURA et al., 2009).

O aparecimento de tolerância e dependência acaba, portanto, limitando o uso da morfina. A tolerância, que é a diminuição progressiva da suscetibilidade aos efeitos de uma droga, ocorre após administração repetida de doses terapêuticas da morfina, com perda gradual da sua eficácia. Para que se consiga a resposta original é necessária a administração de uma dose mais alta. Juntamente com a tolerância aparece a dependência física. Esta é definida pela ocorrência de uma síndrome de abstinência característica quando a droga é interrompida ou quando se administra um antagonista (CHIANG et al., 2010; KATZUNG, 2003).

A ação da morfina no receptor μ na medula espinhal produz inibição na atividade da adenilil ciclase e, conseqüentemente, reduz a formação de monofosfato de adenosina cíclico (AMPC). Por outro lado, a diminuição do AMPC ativa a proteína cinase C (PKC) que fosforila G_1 glutamil transpeptidase acoplada ao receptor μ , enzima que inativa a adenilil ciclase. Desse modo, o emprego de opióides também pode aumentar a atividade da adenilil ciclase e do AMPC, caso haja aumento da PKC. A PKC é responsável por outras alterações da membrana, como: 1- modulação dos canais de K^+ , facilitando a passagem do estímulo nervoso; 2- aumento da ação da fosfolipase C nos lipídios da membrana com produção de fosfatidilinositol 1,4,5 trifosfato (IP_3), que mobiliza as reservas de cálcio do meio intracelular, e o diacilglicerol (DAG) que ativa a PKC e aumenta a entrada de cálcio no meio intracelular; 3- aumento de cálcio intracelular que facilita a produção de substâncias agressivas ao neurônio, como metabólitos do ácido araquidônico, óxido nítrico e protooncogenes; e 4- redução do bloqueio dos canais de NMDA (N-metil D-aspartato) pelo magnésio e aumento da ação dos neurotransmissores excitatórios, como o glutamato. Assim, pode-se inferir que, no mecanismo intracelular da tolerância, há uma hiperexcitabilidade das células do corno dorsal da medula espinhal semelhante ao que ocorre para a transmissão dos estímulo doloroso (SILVA, 2006).

A tolerância ou dessensibilização aguda dos neurônios do *locus coeruleus* por agonistas do receptor μ ocorre através de uma redução na corrente máxima de K^+ produzida na reaplicação. Foi demonstrado que ocorre rapidamente e permanece por muitas horas após a retirada da droga. Esta tolerância pode ser mediada por uma via AMPC-dependente (JORM; STAMFORD, 1995).

O desenvolvimento de tolerância tem uma especificidade contextual. Estudos demonstraram que quando a morfina era administrada em sessões apresentava retardo no desenvolvimento de tolerância com o reaparecimento do efeito antinociceptivo. Estes resultados indicam que o processo de desenvolvimento de tolerância dos efeitos antinociceptivos envolve um fator que está associado entre os efeitos das drogas e o modo como é administrada. Assim, a tolerância é considerada como um fenômeno complexo constituído por fatores associativos e não-associativos (NAKAMA-KITAMURA; DOETHE, 2003).

Se não fosse o aparecimento dos problemas de tolerância e dependência, o uso de opióides seria mais popular e eles se tornariam as drogas mais eficazes para o alívio da dor. Extensa investigação está sendo realizada para o desenvolvimento de opióides não viciantes e/ou agentes que possam evitar ou reverter os processos de dependência. Novos agentes terapêuticos são explorados por sua capacidade de inibir uma síndrome de abstinência induzida por opióides e a auto-administração. Alguns dos medicamentos usados são baseados em mecanismos já previstos, enquanto outros tentam buscar mecanismos diversos, indicando que o processo do vício pode envolver várias vias moleculares em diferentes locais do corpo. Embora vários mecanismos tenham sido implicados para o desenvolvimento da dependência de opiáceos e manifestação da síndrome de abstinência, o manejo da síndrome de abstinência estabelecida tem se mantido praticamente restrito à substituição do agente causador por um opiáceo que cause menor dependência ou um agonista mais fraco (SETH et al., 2010).

A clonidina, um agonista alfa-2, foi utilizada para a supressão dos efeitos de abstinência, tendo sucesso limitado, porém, tem liderado pesquisas que podem vir a elucidar possíveis mecanismos distais ao receptor opióide e que são afetados durante a dependência de opiáceos. Manipulações farmacológicas desses mecanismos podem gerar estratégias terapêuticas que empregam agentes não-opióides para o controle da dependência de opiáceos e sua retirada. Para que se consiga modalidades terapêuticas alternativas, é necessária uma compreensão clara do papel dos neurotransmissores, segundos mensageiros e fluxos iônicos através das membranas durante o desenvolvimento da dependência e no controle dos sintomas de abstinência (SETH et al., 2010).

3.1.7. Associação de analgésicos opióides com outros fármacos

Conforme relatado anteriormente, os opióides possuem muitos efeitos colaterais que podem limitar a terapêutica com estes fármacos. Com isto, faz-se necessário a busca por novas drogas analgésicas com efeitos colaterais reduzidos. Alguns campos estão abertos e podem ser explorados com o intuito de obter compostos com essas características (GILMAN, 2003).

Devido à multiplicidade de receptores opióides pode-se pensar na obtenção de drogas mais seletivas. Agonistas κ podem ter efeitos colaterais muito reduzidos. No entanto, um agonista κ completo específico ainda não foi encontrado, podendo haver uma ligação estreita entre o receptor δ e o receptor σ . Outro ponto que pode ser investigado é a seletividade entre os subtipos de receptores μ . Podendo haver dois receptores μ ligeiramente diferentes, onde um deles é o responsável pela analgesia (μ_1) e o outro o responsável pelos efeitos colaterais indesejados como depressão respiratória (μ_2). Caso um agente mostrasse seletividade ele poderia se tornar um analgésico muito útil (PATRICK, 1995). Em estudos de ligação ao receptor, foi identificado um sítio de alta afinidade, sendo estes opiáceos designados μ_1 . Naloxonazina, um derivado da naloxona de longa ação, bloqueia seletivamente sítios μ_1 e, portanto, permite uma análise de seu papel funcional. Os receptores μ estão relacionados aos efeitos analgésicos, mas não depressores respiratórios dos opiáceos. Assim, opiáceos μ_1 seletivos podem ser analgésicos mais seguros (SNYDER, 1984).

Já foram identificados receptores opiáceos periféricos no íleo que são responsáveis pela atividade antidiarréica dos opiáceos. Se os nervos sensoriais periféricos também possuem receptores opiáceos, drogas podem ser projetadas contra esses sítios, não necessitando, pois, atravessar a barreira hematoencefálica. Uma outra forma de minimizar os efeitos colaterais dos opióides seria bloqueando os receptores pós-sinápticos, talvez bloqueando os mensageiros químicos de transmissão de informações da dor através do bloqueio de receptores pós-sinápticos com antagonistas seletivos seria a melhor abordagem (PATRICK, 1995).

Os opióides são largamente combinados com anestésicos em cirurgias, aumentando a qualidade da analgesia e reduzindo as doses destes anestésicos, com efeitos favoráveis sobre a estabilidade hemodinâmica. Estes estudos são de relevante importância, pois mostra que os efeitos colaterais de ambas as classes de fármacos são reduzidos quando utilizados simultaneamente (DEMIRCIOGLU et al., 2010).

Em geral, psicoestimulantes e opiáceos têm efeitos sinérgicos sobre os efeitos comportamentais somente em baixas doses de ambos os fármacos em animais. Ao contrário do que foi visto acima, quando a associação da morfina é feita com outras drogas que afetam o SNC, tais como as chamadas drogas de abuso (tais como anfetaminas, metanfetaminas, a

cocaína e a heroína), um problema tanto social quanto econômico bastante grave em todo o mundo, os efeitos já se tornam um pouco diferentes, pois neste caso, particularmente, o objetivo não o de atingir um determinado efeito terapêutico, reduzindo os efeitos adversos das drogas que estão sendo utilizadas em associação, mas, simplesmente adquirir os efeitos de abuso. Estudos demonstraram que a administração concomitante de metanfetamina e morfina aumentou os efeitos letais dos animais em teste (MORI et al., 2004; NAMIKI et al., 2005).

Quando utilizada de forma racional, algumas drogas estimulantes, como as anfetaminas, intensificam as ações analgésicas dos opióides, e, portanto, podem representar adjuvantes bastante úteis para pacientes com dor crônica. Estudos laboratoriais e clínicos demonstraram que os agonistas dos receptores α_2 adrenérgicos (por exemplo, a clonidina) produzem analgesia quando prescritos por uma variedade de vias de administração (KATZUNG, 2003).

Associações entre analgésicos opióides (codeína, propoxifeno) e não-opiídes (acetaminofeno, aspirina) são racionais já que combinam agentes com mecanismos e sítios de ação diferentes, induzindo analgesia maior do que a possível com cada agente isoladamente. Além disso, menores doses de cada um dos fármacos associados reduzem o risco de toxicidade. O perfil de efeitos adversos também é diferente por se tratarem de drogas de classes farmacológicas distintas. As associações estão indicadas em dores moderadas ou não-responsivas a agentes não-opiídes isolados. Não há vantagem no uso dessas associações quando a dor é leve (FUCHS; WANNMACHER, 1998).

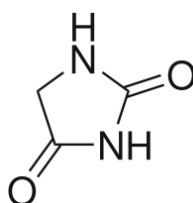
3.2. Derivados da imidazolidina-2,4-diona

Os heterociclos sintéticos vêm crescendo nos últimos anos visando a obtenção de novos compostos úteis no mercado farmacêutico para o tratamento das mais diversas enfermidades, eles apresentam importantes aplicações farmacêuticas, agroquímicas, entre outras. Dados apontam que dos 85% dos fármacos disponíveis na medicina moderna são de origem sintética, onde 62% são compostos heterociclos. Um dos representantes desta classe é a fenitoína (5,5-difenil-imidazolidina-2,4-diona) altamente utilizada no tratamento de convulsões parciais e tônico-clônicas. Sua atividade antiepilética é, principalmente, associada ao bloqueio dos canais de sódio. Devido a este crescente desenvolvimento de compostos heterocíclicos, um grande número de reações vêm sendo realizadas nessa área, e

a preparação de novos compostos tem sido objeto de estudos intensos de vários grupos de pesquisa em todo o mundo. Dentre as inúmeras classes de heterociclos que vêm sendo preparados, os compostos contendo enxofre, nitrogênio e oxigênio surgem como uma importante alternativa, que estimula testes bioquímicos ou farmacológicos. Dentre esses compostos, os derivados imidazolidínicos (hidantoínicos) despertam grande interesse em diversos grupos de pesquisa devido à grande diversidade de aplicações biológicas inerentes a estes compostos: antibacteriana, antiinflamatória, antifúngica, hipoglicêmica, inseticida, tuberculostática, esquistossomicida, entre outras (LUIZ, 2007; OLIVEIRA et al., 2008).

A hidantoína foi descoberta por Baeyer, em 1861, quando trabalhava as reações do ácido úrico chegando ao heterocíclico que corresponde ao 2,4-diceto-tetrahidroimidazol ou 2,4-dioxo-imidazolidina, ou ainda, imidazolidina-2,4-diona, esta última de acordo com as recomendações da IUPAC (Figura 5). Já a primeira fórmula estrutural para a hidantoína foi sugerida, em 1870, por Kolbe, sendo imediatamente substituída pela representação cíclica adotada atualmente, proposta, ainda no mesmo ano, por Strecker. A estrutura é um heterociclo pentagonal que apresenta dois átomos de nitrogênio e dois grupos carbonílicos nas posições 1,3 e 2,4 do anel, respectivamente. A substituição dos átomos de oxigênio carbonílicos da hidantoína por átomos de enxofre origina vários tioxo derivados. Por sua vez, os núcleos imidazolidínico e tioimidazolidínico estão presentes em várias moléculas bioativas que atualmente são usadas na clínica médica, como antiinflamatória, antifúngica, esquistossomicida, herbicida e tuberculostática, entre outras (OLIVEIRA et al., 2008; SOUZA, 2010). Este grupo de compostos heterociclos desperta grande interesse por ser de ocorrência natural e apresentar atividade biológica e por isso tem sido extensivamente estudado (LUIZ, 2007).

Figura 5: Estrutura química da hidantoína: imidazolidina-2,4-diona.



Além das importantes atividades biológicas apresentadas por moléculas derivadas da hidantoína, outros aspectos relevantes envolvendo essas substâncias têm sido abordados na literatura, cujo foco é dirigido para temas de grande interesse como a reatividade do anel imidazolidínico, a aplicação de novas metodologias de síntese, a caracterização estrutural

dos compostos, ou ainda, temas relacionados a ensaios biológicos e estudos de relação quantitativa estrutura-atividade – QSAR – *Quantitative Structure Activity Relationships* (OLIVEIRA et al., 2008).

Cientistas estudaram os receptores da imidazolidina e verificaram que eles estão farmacologicamente relacionados com os α_2 -adrenoceptores via agonista clonidina (2-[2,6-dicloro-fenil-imino]imidazolidina) e o α_2 -antagonista idazoxano. Além de produzir hipotensão como efeito principal, a clonidina causa sedação e bradicardia, enquanto o idazoxano mostra-se um bloqueador altamente eficaz da ação hipotensora (LUIZ, 2007).

Tanto as hidantoínas, como as tio-hidantoínas apresentam diversas atividades biológicas no SNC. Pesquisadores descobriram que a 2,4-ditio-5,5-dimetil-hidantoína possuía ação hipnótica, além disso, tinha atividade anticonvulsivante superior à 5,5-dimetil-hidantoína. Derivados 2-tioxo-imidazolidina-4,5-dionas também demonstraram atividade anticonvulsivante. Novas hidantoínas substituídas, como 4-hidroxi-2-imidazolidinonas, 2-imidazolonas, 2-imidazolidinonas, diaminas vicinais e derivados de aminoácidos, foram sintetizadas e avaliadas quanto à atividade anticonvulsivante. Estudos mostraram que compostos que continham a estrutura 2-tioxo-imidazolidina-4,5-diona apresentavam atividade sedativa (OLIVEIRA et al., 2008).

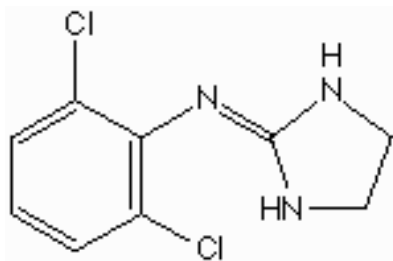
3.2.1. Os agonistas α_2 -adrenérgicos e seu uso em analgesia

Três grupos de compostos químicos são responsáveis pela divisão dos receptores agonistas α -adrenérgicos: imidazolininas, feniletilaminas e oxalozepinas. A clonidina, um composto imidazólico, é um agonista α_2 -adrenérgico seletivo, apresentando uma seletividade de 200:1 ($\alpha_2:\alpha_1$) (Figura 6). Ela 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. A metildopa, outro agonista α_2 -adrenérgico, apresenta seletividade 10 vezes maior aos receptores α_2 em relação aos receptores α_1 . Ela é metabolizada em metilnoradrenalina. Pela necessidade de biotransformação desta droga em seu componente ativo, os efeitos desenvolvidos com a utilização da metildopa são muito lentos, entre 4 e 6 horas, o que muitas vezes torna o seu uso impraticável. Guanabenz é uma droga α_2 -adrenérgica similar à clonidina em seus efeitos, porém apresenta menor potência e menor

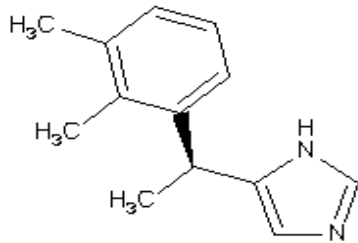
tempo de ação. Sua meia-vida de eliminação situa-se em torno de 6 horas. A medetomidina, 4-[1-(2,3-dimetilfenil)etil]imidazol, é um exemplo de agonista dos α_2 -adrenorreceptores superseletivos (Figura 6). É extremamente potente, sendo que concentrações nanomolares são suficientes para evidenciar seu efeito. Em comparação com a clonidina, apresenta uma seletividade muito maior em relação aos receptores α_2 -adrenérgicos (BAGATINI et al., 2002).

A clonidina é o protótipo dos α_2 -agonistas adrenérgicos (Figura 6). Tem efeito anti-hipertensivo, sedativo, inibidor de hiperatividade adrenérgica, bem como potente propriedade analgésica, antissialogoga e de diminuição da pressão intraocular (CRUZ et al., 2009). Já é conhecido há muito tempo que a clonidina possui efeitos analgésicos, que pode diminuir os sintomas de abstinência de abuso de drogas e reduzir a pressão intraocular. A capacidade dos α_2 -agonistas de alterar a atividade neuronal na medula espinhal levou ao desenvolvimento da tizanidina para o tratamento da espasticidade, síndromes de abstinência e síndromes de dor crônica. Acredita-se que esses efeitos refletem os efeitos agonistas dos receptores α_2 não-imidazolidínicos. A dexmedetomidina é outro congêneres imidazolidínico da clonidina que demonstrou ter efeitos hipnóticos e hipotensores sobre a pressão intraocular quando administrada sistemicamente (Figura 6). Além disso, possui efeitos analgésicos significativos quando administrada por via intratecal. Esses efeitos são provavelmente mediados principalmente por ação agonista α_2 . Devido aos seus efeitos simpatoplégico e hipotensor, ela pode ter seu uso limitado na cirurgia, porém, foi aprovada para uso em situações de unidade de tratamento intensivo (KATZUNG, 2003).

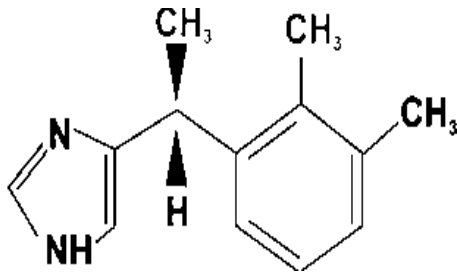
Figura 6: Estruturas químicas da: (a) clonidina; (b) medetomidina; (c) dexmedetomidina.



(a) Clonidina: 2-[2,6-dicloro-fenil-imino]imidazolidina



(b) Medetomidina: 4-[1-(2,3-dimetilfenil)etil]imidazol



(c) Dexmedetomidina: 4(S)-[1-2,3-dimetilfenil]etilimidazol

A dexmedetomidina é o enantiômero dextrógiro farmacologicamente ativo da medetomidina, (composto muito utilizado em Medicina Veterinária), separado da forma racêmica, da (-)-medetomidina, isômero pouco ativo (relação de afinidade $\alpha_2:\alpha_1$ de 23:1). Tem meia-vida de distribuição rápida, cerca de seis minutos, e tempo de eliminação de duas horas (BAGATINI et al., 2002; HERBERT, 2007).

Ela é atualmente considerada como protótipo dos agonistas α_2 -adrenérgicos superseletivos. A relação de seletividade entre os receptores α é extremamente elevada, apresentando uma relação de α_2 para α_1 na ordem de 1600:1. Comparativamente à clonidina, a dexmedetomidina é cerca de 8 vezes mais α_2 seletiva. Esta alta seletividade faz-se importante quando as ações sobre os receptores α_1 se opõem àquelas sobre os receptores α_2 , como na produção de analgesia pelo *locus coeruleus*, núcleo noradrenérgico predominante do cérebro, que funciona como o principal modulador pelo estado de vigília no sistema nervoso central (SNC). Por apresentar ação no SNC, os agonistas α_2 , em especial a dexmedetomidina, têm a propriedade de reduzir a necessidade de drogas anestésicas. Ela teve seu uso em humanos aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) em 1999. A entidade aprovou o uso para pacientes que estavam sob cuidados intensivos, entubados e sob ventilação mecânica. A FDA também sugere que o uso da droga não ultrapassasse 24 horas (BAGATINI et al., 2002; CHEUNG et al., 2011; HERBERT, 2007).

A grande vantagem da dexmedetomidina é a sua maior seletividade quando comparada à clonidina, especificamente pelo receptor α_{2A} , responsável pelos efeitos

hipnótico e analgésico desses fármacos. A clonidina e a dexmedetomidina, quando administradas por via peridural, possuem propriedades analgésicas e potencializam os efeitos dos anestésicos locais (VIEIRA et al., 2004). A dexmedetomidina possui como propriedades farmacocinéticas um rápido início de ação e uma meia-vida curta, proporcionando redução dos níveis plasmáticos de noradrenalina, estabilidade hemodinâmica, sedação e analgesia, sem depressão respiratória (MAGALHÃES et al., 2006).

Os efeitos analgésicos dos agonistas α_2 -adrenérgicos podem ser mediados através de ações supra-espinhal, espinhal e periféricas. A distribuição dos receptores α_2 é extensa no organismo, produzindo analgesia ao atuar em vários sítios, incluindo o cérebro, tronco cerebral, medula espinhal e tecidos periféricos, como plaquetas, hepatócitos, rins, pâncreas e células musculares lisas. Os encefálicos estão concentrados na ponte e na medula espinhal e envolvidos na transmissão e ativação das vias do SNC que comunicam os centros corticais superiores à periferia. A ativação dos receptores α_2 -adrenérgicos produz intensa resposta analgésica, pelo envolvimento dos receptores supra-medular e, principalmente, medular, incluindo a ativação dos receptores α_2 pós-sinápticos das vias descendentes noradrenérgicas, dos neurônios colinérgicos e da liberação de óxido nítrico (NO) e de encefalinas, levando a efeitos como contração da musculatura lisa dos vasos, elevação do fluxo sanguíneo regional encefálico, hipertensão arterial, bradicardia, sedação e analgesia (AL-METWALLI et al., 2008; BAGATINI et al., 2002; CHEUNG et al., 2011; HERBERT, 2007; VIEIRA et al., 2004).

Na medula espinhal os receptores α_2 pós-sinápticos estão localizados no corno dorsal e sua estimulação inibe a transmissão do sinal nociceptivo. Os receptores α_2 pós-sinápticos situados na musculatura lisa vascular, promovem, quando ativados, vasoconstrição, sendo também, encontrados na musculatura lisa dos vasos periféricos. Entretanto, a ação desse fármaco ocorre, sobretudo, nos receptores α_2 pré-sinápticos, modulando a liberação de noradrenalina e adenosina trifosfato por meio de mecanismo de retroalimentação inibitório. Este mecanismo inibe a adenilciclase e impede a abertura dos canais de cálcio. Deste modo, quando ativados estes receptores, ocorre inibição da liberação de transmissores. A ação analgésica deve-se, sobretudo, à interação com receptores α_2 -adrenérgicos na medula espinhal, especialmente os α_{2A} e α_{2C} . A dexmedetomidina exerce um papel importante na modulação da dor, inibindo a condução nervosa através das fibras A δ e C e pode estimular a liberação de encefalinas em sítios periféricos. O efeito analgésico da clonidina pode ser mediado através da modulação da via de analgésicos opióides. 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 (AL-METWALLI et al., 2008; BAGATINI et al., 2002; HERBERT, 2007; VIEIRA et al., 2004).

O receptor α_2 é também o sítio de ligação para o neurotransmissor adrenérgico norepinefrina. Há alguns indícios que sugerem que o efeito analgésico da clonidina são mais pronunciadas após a administração neuroaxial. No entanto, os receptores α_2 são amplamente distribuídas em todo o SNC, com três isorreceptores (α_{2A} , α_{2B} , α_{2C}) reconhecidos. Os receptores α_2 estão localizados principalmente nos terminais aferentes central e periféricamente, mas eles também são encontrados na lâmina superficial da medula espinhal e dentro de vários núcleos do tronco cerebral conhecidos por estar envolvidos na analgesia. Os estudos em animais têm demonstrado ação analgésica em todos os três sítios, porém deve-se realizar outros estudos a fim de se verificar se o principal local de ação da clonidina é a medula espinhal, pois os α_2 adrenoceptores são encontrados por todo o corpo (HANSEN et al., 2004).

O mecanismo de ação destas drogas não se relaciona com alterações da síntese, estocagem ou metabolismo de neurotransmissores e é reversível com o uso de agentes vasoativos, agonistas destes receptores ou a interrupção da administração (MAGALHÃES et al. 2006). O funcionamento destes receptores quando ativados por um agonista é o de inibir a enzima adenilato ciclase, que causa consequentemente 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 (BAGATINI et al., 2002).

3.2.2. Sinergismo dos α_2 agonistas com outras classes de fármacos

Várias drogas têm sido utilizadas com o intuito de promover sedação e analgesia, tais como: 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 apropriados. Além disso, muitas destas drogas apresentam efeitos adversos muito acentuados, limitando seu uso. Baseado na necessidade de se ter novos agentes analgésicos que possuíssem menos efeitos adversos, iniciou-se o estudo dos α_2 -agonistas, como visto anteriormente, que têm como protótipo do grupo a clonidina, para atender a esta finalidade. Além da clonidina, drogas como a xilazina e medetomidina fazem parte deste grupo. Foi relatada também, a dexmedetomidina, uma droga altamente seletiva dos receptores α_2 , que tem como característica, além da alta seletividade pelos receptores, o fato de poder ser usada em infusão contínua. Onde podemos destacar suas aplicações como medicação pré-anestésica, adjuvante da anestesia geral ou regional e analgésico (BAGATINI et al., 2002).

Estas drogas apresentam uma alternativa promissora em anesthesiologia, pois possuem excelentes propriedades sedativas e analgésicas associadas à ausência de depressão respiratória. Pelas ações no SNC, os α_2 -agonistas têm a propriedade de reduzir drasticamente a necessidade do uso de outros anestésicos. Os agonistas dos receptores α_2 -adrenérgicos possuem propriedades benéficas, quando utilizados em anestesia, uma vez que proporcionam estabilidade hemodinâmica, sedação, redução da necessidade de agentes anestésicos e analgésicos, sem efeitos depressores marcantes da ventilação (BAGATINI et al., 2002; MAGALHÃES et al., 2006).

Desde a descoberta de que a injeção da clonidina produz analgesia, a droga tem sido utilizada cada vez mais na prática da anestesia. A clonidina é uma droga altamente lipofílica, e assim é absorvida, alcançando a circulação sistêmica rapidamente, independentemente do local de administração. Foi demonstrado que a clonidina quando administrada tanto pela via oral, como pela intratecal prolonga a duração da ação de anestésicos locais administrados pela via intratecal (HANSEN et al., 2004).

Várias associações foram realizadas com α_2 -adrenérgicos e anestésicos mostrando resultados positivos. Cruz et al. (2009), relatou que 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. Em estudo feito por Vieira et al. (2004), de forma aleatória e duplamente encoberta em seres humanos, submetidos à anestesia peridural com associação da clonidina à ropivacaína, levou os pesquisadores a concluir que há sinergismo evidente entre a clonidina e a ropivacaína, neste tipo de anestesia regional. A clonidina aumenta a duração dos bloqueios analgésico e motor da anestesia peridural com a ropivacaína e prolonga a duração de analgesia pós-operatória, apresentando como vantagem adicional o aumento da sedação dos pacientes. Além de produzir analgesia sem causar depressão respiratória significativa após a administração

sistêmica, peridural ou raquidiana. Apesar da clonidina peridural também poder causar hipotensão, bradicardia e sedação em doses mais elevadas, efeitos adversos graves são raros no intervalo de dose normalmente utilizada em crianças (1-2 mg/kg) (HANSEN et al., 2004). Ela diminui os eventos hemodinâmicos e melhora o resultado em pacientes de alto risco. O pré-tratamento com clonidina reduz a exigência de propofol, um anestésico volátil (MORRIS et al., 2005).

Os α_2 agonistas proporcionam efeitos potencialmente benéficos na cirurgia oftálmica devido a suas propriedades de redução da pressão intraocular (PIO). Isto pode ser devido aos efeitos centralmente mediados simpaticolíticos de α_2 agonistas diminuindo a liberação de norepinefrina periférica via receptores α_2 pré-sinápticos (MOWAFI et al., 2008). Vários estudos têm demonstrado que a injeção intra-articular de α_2 -agonistas adrenérgicos como a clonidina ou seus derivados, apraclonidina (que tem acesso limitado ao SNC), produz analgesia eficaz após artroscopia. A fadolmidina intra-articular, um agonista α_2 adrenoceptor altamente seletivo, que tem um efeito local restrito após sua administração periférica, proporcionou uma supressão de artrite relacionada à dor em ratos (AL-METWALLI et al., 2008).

A dexmedetomidina é um α_2 -agonista com grande seletividade ao receptor específico e tem sido usada como medicação pré-anestésica, como adjuvante à anestesia geral, como sedativo e como medicação pós-operatória. A associação da dexmedetomidina como adjuvante em anestesia locorregional proporciona 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). Quando ela é administrada por via intravenosa, resulta, principalmente, em uma redução do consumo de analgésicos (CHEUNG et al., 2011). Ela possui potentes propriedades simpaticolíticas, analgésicas, sedativas que é mediada através de receptores α_2 -adrenérgicos nos sistemas nervoso central e periférico, nos gânglios autonômicos em locais pré- e pós-sinápticos e no *locus coeruleus* (HO; CHEN; KARMAKAR, 2005).

Uma das mais importantes vantagens no uso da dexmedetomidina é a ausência de depressão respiratória significativa. Como tal, tem sido utilizada para sedação em unidade de terapia intensiva e para o desmame de suporte respiratório, pois ela reduz a concentração alveolar mínima (CAM) de anestésicos inalatórios potentes e diminui a dose administrada de morfina. Mesmo em doses elevadas o suficiente para ser usado como um único agente anestésico geral, a dexmedetomidina não causou qualquer depressão respiratória significativa (HO; CHEN; KARMAKAR, 2005).

Os α_2 agonistas mostraram efeitos antiinflamatórios em estudos realizados em cirurgia do 3.º molar, diminuindo a produção de citocinas inflamatórias através de uma ação simpaticolítica central. A redução da dor, portanto, também pode ser atribuída aos efeitos antiinflamatórios da dexmedetomidina. O efeito simpaticolítico sustentado como indicado por uma redução prolongada da pressão arterial pode produzir um efeito antiinflamatório relativamente prolongado, o que resulta em menos dor pós-operatória (CHEUNG et al., 2011).

Alguns mecanismos propostos para a ação dos agonistas α_2 -adrenérgicos combinados ao uso de anestésicos locais incluem vasoconstrição, facilitação do bloqueio de fibras C por anestésicos locais, interferência no transporte axonal retrógrado no nível medular e ação em receptores de nervos periféricos. Foram relatados também, o aumento da duração dos bloqueios sensitivo e motor induzido pelo uso de agentes agonistas α_2 -adrenérgicos em bloqueios neuroaxiais (MAGALHÃES et al., 2006).

Com o uso de drogas de diferentes classes, como é o caso dos α_2 -agonistas e os opióides, notou-se claramente um efeito sinérgico entre as drogas, diminuindo, desse modo, a necessidade da utilização de cada componente, sendo de grande importância na prática clínica, visto que reduzem os efeitos adversos pertinentes a cada droga. Para demonstrar que os α_2 -agonistas e os opióides causam analgesia por mecanismos distintos, foi utilizado experimentalmente naloxona em pacientes que haviam recebido dexmedetomidina, e observou-se que o efeito analgésico não foi revertido pelo uso do antagonista opióide. (BAGATINI et al., 2002). Os receptores α_{2A} também são responsáveis por ação analgésica sinérgica com opióides quando vias noradrenérgicas descendentes são ativadas. Assim, combinando-se α_2 -agonistas com opiáceos pode-se aumentar a eficácia analgésica, sem aumentar o efeito de depressão respiratória destes últimos (HO; CHEN; KARMAKAR, 2005). O uso de dexmedetomidina determina redução de 30% a 50% do uso de opióides, principalmente nos tipos de dor em que é necessário o tratamento com doses altas desses fármacos, como a dor pós-operatória (HERBERT, 2007).

Foi estudada a co-administração da morfina com o agonista α_2 -adrenérgico, clonidina, tendo sucesso no alívio da dor intra-operatória, pós-operatória e nos cuidados intensivos. Esse co-tratamento reduz as doses de ambos os fármacos, levando à redução dos efeitos adversos. A combinação de morfina e clonidina foi associada a uma redução de náuseas e vômitos, efeitos vistos por 24 horas após a cirurgia. Isto pode estar relacionado à atividade noradrenérgica. A clonidina, atuando em adrenoceptores α_2 pré-sinápticos, reduz a atividade noradrenérgica e isso pode ser responsável por seus efeitos sobre as náuseas e vômitos (JEFFS; HALL; MORRIS, 2002; MORRIS et al., 2005).

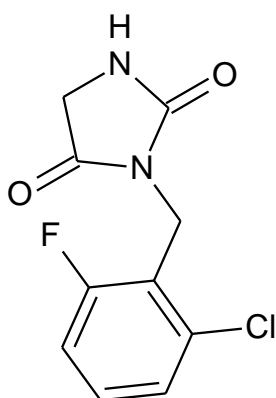
Os efeitos analgésicos da administração centralizada da morfina são atenuadas por antagonistas α_2 , enquanto a clonidina intratecal (um agonista α_2 parcial) potencializa o efeito da morfina. As interações entre receptores μ e α_2 podem ser importantes no vício e no tratamento de síndromes de abstinência. Estudos demonstraram que a morfina reduz o efluxo de noradrenalina (NA), através de ações presumivelmente no receptor μ e, possivelmente, outros receptores, além de atenuar a ação de α_2 -agonistas e induzir tolerância aparente de forma rápida. No entanto, o efeito da morfina também pode ser causado por um mecanismo pós-receptor. Já foi demonstrado, também, que a dessensibilização rápida do receptor de opióides é mediada por inibição do efluxo da NA. Sabe-se que tanto os receptores α_2 quanto μ estão acoplados à proteína G inibitória que abre canais de K^+ e podem alterar concentrações de AMPc. No entanto, no receptores de neuroblastoma da linhagem SH-SY5Y humana, α_2 e μ são co-localizados nas células e ambos estão negativamente acoplados a adenilato ciclase. Ensaio de AMPc demonstram que os efeitos combinados da morfina e da NA excedem o efeito de cada agente sozinho e que a tolerância cruzada pode ser apresentada após pré-tratamento com morfina ou clonidina (JORM; STAMFORD, 1995).

3.2.3. Caracterização do PT-31

3.2.3.1. Química

O PT-31, ou 3-(2-cloro-6-fluorobenzil)imidazolidina-2,4-diona, é uma imidazolidina-2,4-diona, relacionado estruturalmente com a clonidina (Figura 7).

Figura 7: Fórmula estrutural do PT-31 [3-(2-cloro-6-fluorobenzil)imidazolidina-2,4-diona].



3.2.3.2. Síntese do PT-31

Vários derivados substituídos de hidantoínas podem ser obtidos, quer a partir de reagentes contendo grupos que serão os substituintes ou via reações posteriores a partir de núcleos hidantoínicos não-substituídos. A 3-benzil-imidazolidina-2,4-diona foi obtida pela reação entre a imidazolidina-2,4-diona e o cloreto de benzila em meio alcalino, usando sódio metálico/metanol, ou hidróxido de potássio ou ainda hidróxido de sódio (LIMA, 2005).

Já foi relatada a síntese de compostos pela substituição com um grupo benzílico na posição 3 de algumas imidazolidina-2,4-dionas e 2-tioxo-imidazolidinonas. A 3-alkilação de imidazolidina ocorre em duas etapas: a posição 3 é ativada pela formação do sal de sódio ou de potássio seguida de condensação com cloreto de 2-cloro-6-fluorobenzil, em etanol quente (SUDO et al., 2010).

Para a realização da síntese do PT-31 adicionou-se uma solução de hidróxido de sódio (1,2 g, 0,03 mol) em etanol 70% (20 mL), gota a gota, a uma suspensão agitada de imidazolidina-2,4-diona (3 g, 0,03 mol) em etanol 70% (5 mL). Após 10 minutos, adicionou-se o cloreto de 2-cloro-6-fluorobenzil (3,83, 0,03 mol). A mistura reacional foi agitada por 5 minutos e depois deixada em repouso por 15 horas. Após o resfriamento, o precipitado obtido foi filtrado e cristalizado com etanol 95% e purificado por cromatografia em sílica com n-hexano (SUDO et al., 2010).

3.2.3.3. Ação Farmacológica

Através de estudo realizado por Sudo et al. (2010), ficou estabelecida a atividade antinociceptiva do PT-31 e o seu sinergismo com a morfina. Após a administração intraperitoneal de PT-31 em camundongos foi obtida antinocicepção dose-dependente nas doses de 1, 5, 10 e 15 mg/kg, evidenciada no teste da placa quente. Quando este foi associado com a morfina obteve-se uma potencialização da atividade antinociceptiva e a sinergia entre esses dois compostos foi demonstrada através de análise de isoblograma. Foi evidenciado, ainda, 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. Através de análise

conformacional com o *Software BioMedCache* pelo método AM1, determinou-se uma afinidade relevante do PT-31 pelos receptores α_{2A} adrenérgicos, quando comparado à clonidina. O mecanismo proposto pelo modelo molecular foi a formação de uma ligação de hidrogênio entre o PT-31 e o resíduo Ile-190 do sítio ativo do receptor α_{2A} adrenérgico.

3.3. As fases do desenvolvimento dos fármacos

O desenvolvimento de um medicamento é um processo longo, trabalhoso e de custo bastante elevado. Em geral, de cada 10.000 moléculas identificadas com potencial terapêutico, somente 1.000 chegam à fase de investigação pré-clínica. Dessas, apenas 10 serão estudadas em seres humanos e só uma delas chegará ao mercado, após aprovação e registro para uso terapêutico. Esse processo tem duração de aproximadamente 10 anos e custo em torno de dois bilhões de reais (DAIICHI SANKYO, 2011).

Os estudos pré-clínicos são realizados em animais e modelos fisiológicos em laboratório, analisando as propriedades físico-químicas e o comportamento do composto *in vivo* e *in vitro*, em que o objetivo principal é a avaliação da atividade biológica (MAROVAC, 2001). Há alguns anos, o programa de desenvolvimento de uma nova droga dependia fortemente de estudos farmacocinéticos em animais como uma ferramenta para prever o comportamento da droga no homem, atualmente se dá maior ênfase para sistemas derivados humanos sub-celulares ou celulares. Estudos em animais, no entanto, são ainda de importância crucial, porque eles constituem os estudos complementares para validar a exposição de animais nas investigações toxicológicas e a extrapolação destes resultados em seres humanos (BALANT; GEX-FABRY, 2000). Nesta fase, as moléculas são testadas em duas ou mais espécies de animais, porque uma droga pode ter comportamento diferente nas espécies. Estes estudos pré-clínicos para avaliação de uma ampla gama de parâmetros da molécula, e incluem a estabilidade, níveis plasmáticos, tissulares e propriedades farmacocinéticas (MAROVAC, 2001).

É muito importante prever as propriedades cinéticas (absorção, distribuição, metabolismo e excreção - ADME) de um candidato à droga na fase inicial do desenvolvimento de fármacos. Uma das características mais importantes é a previsão das características de liberação do princípio ativo de uma formulação farmacêutica e suas propriedades dinâmicas. Finalmente, as possibilidades de interações dinâmicas e cinéticas devem ser avaliadas. Do ponto de vista da cinética, vários métodos foram desenvolvidos,

entre os quais se incluem vários sistemas subcelulares e celulares para medir a permeabilidade, o transporte nas membranas e ADME. Estes sistemas também incluem testes *in vitro* em células modificadas pela engenharia genética. Do ponto de vista farmacodinâmico, pode-se mencionar os sistemas disponíveis para determinar tanto a afinidade quanto a eficácia intrínseca de novos fármacos *in vitro*. Ainda na fase inicial do desenvolvimento da droga, um programa de cinética clássica pode incluir: estudos de dose única ou de doses múltiplas em até três ou quatro espécies; toxicocinética e elucidação metabólica preliminar. Do mesmo modo, um programa farmacodinâmico clássico pode incluir: ensaios farmacológicos, testes de segurança farmacológica e toxicológica preliminar (BALANT; GEX-FABRY, 2000).

Para a determinação do perfil de segurança do candidato a fármaco são realizados estudos de toxicidade aguda e crônica e os efeitos sobre a reprodução e prole. Estes estudos toxicológicos deverão abordar: 1 - estudo de toxicidade aguda de dose única; 2 - estudos de toxicidade de doses repetidas por 14 dias; 3 - toxicidade subcrônica (uso por período médio de 30 dias); 4 - toxicidade crônica (uso por período médio de 90 dias). Os estudos complementares devem constar de abordagem de aspectos de: a - mutagenicidade; b - embriotoxicidade; c - alteração de fertilidade; d - carcinogenicidade e e - indução de dependência (SILVA, 2006). Com base nos resultados desta fase, podemos avaliar o desenvolvimento de formulações para os ensaios clínicos e se sugere avaliações farmacológicas mais extensas. Esses estudos levam uma média de 3,5 anos para um composto bem sucedido, mas apenas 1 de 1.000 feitos avança para a próxima fase, que inclui estudos clínicos em humanos (MAROVAC, 2001).

Após a fase de testes em laboratório, as novas drogas são testadas em seres humanos em estudos denominados de fase zero, fase 1, fase 2 e fase 3, envolvendo um número cada vez maior de pacientes. Os estudos de fase zero são aqueles que testam uma nova droga em um número muito pequeno de pacientes, utilizando microdoses, em níveis sub-terapêuticos, apenas para verificar a toxicidade e a eventual atividade bioquímica ou fisiológica (GOLDIM, 2008). Como é a primeira vez que o fármaco será testado em humanos, neste caso utiliza-se sujeitos saudáveis. Pois o principal objetivo desta fase é verificar se os efeitos colaterais são suportáveis, determinar a melhor forma de administração, verificar como o organismo reage ao fármaco (são rapidamente eliminados pela urina, fezes ou se ficam retidos no fígado) (DAIICHI SANKYO, 2011).

Os estudos de Fase 1 são normalmente conduzidos a fim de caracterizar as propriedades básicas de um novo medicamento em seres humanos no intervalo de doses terapêuticas esperadas. Isso geralmente inclui: cinética de dose única e múltiplas doses em

três níveis de dose; perfil metabólico; investigações sobre biodisponibilidade e estudos de farmacocinética para determinar a interação droga-droga. Os primeiros estudos em pacientes (fase 2A) são realizados a fim de se confirmar se os efeitos terapêuticos esperados podem ser observados em doses bem, ou pelo menos aceitavelmente, toleradas. A fase de estudos 2B é realizada para preparação de testes em grande escala (que são mais caros), os testes clínicos de Fase 3. Atualmente, são feitas tentativas para se ver a viabilidade de se substituir parte da fase 2B por meio de programa de simulações utilizando softwares específicos (BALANT; GEX-FABRY, 2000).

Os estudos de fase 3 foram subdivididos em fase 3A e 3B. A fase 3A tem como objetivo avaliar a eficácia de drogas já testadas em estudos de fase 1 e 2. Os estudos de fase 3B, realizados durante o período de tramitação do registro de uma nova droga, são executados com o objetivo de ampliar o número de pessoas ou aumentar o período de observação dos efeitos da nova substância. A extensão do uso de drogas ainda experimentais pode ou não estar associada a um estudo de fase 3B (GOLDIM, 2008).

3.3.1. A importância dos testes de genotoxicidade de um candidato a fármaco

Como visto anteriormente os testes de toxicidade são de fundamental importância no desenvolvimento de fármacos, pois a segurança é uma característica inerente ao fármaco, sem ela não há razão para um candidato a fármaco prosseguir nos processos de desenvolvimento. Muitos estudos de pesquisa e desenvolvimento de fármacos para pelo fato da substância em teste não ser segura o suficiente para que os estudos continuem. Foi visto também que esses estudos estão sendo substituídos pelos de sistemas celulares e subcelulares. Os testes de curto prazo de carcinogenicidade envolvem sistemas subcelulares, métodos *in vitro* com culturas celulares de organismos procarióticos e eucarióticos, incluindo mamíferos, e *in vivo* utilizando animais de laboratório e estudos com o homem (biomonitoramento) (BALANT; GEX-FABRY, 2000; COMBES, 1992).

Segundo a FDA (2008), compostos que têm potencial para induzir mutações genéticas, quebras cromossômicas, e/ou rearranjos cromossômicos são considerados genotóxicos e têm o potencial para causar câncer em humanos. Nos guias encontrados no sítio da FDA, alguns testes são reconhecidos e utilizados para se avaliar o potencial genotóxico de substâncias, que inclui “um *screen* mínimo” de ensaios *in vitro*: os ensaios de mutação genética e de aberração cromossômica. O risco para carcinogênese é geralmente determinado em ensaios

com roedores, em dois anos de estudos ou em estudos de curto prazo usando modelos alternativos.

Dados recentes mostraram que, em ensaios *in vitro* comumente empregados em estratégias de triagem de regulamentação são muitas vezes considerados positivos para os produtos químicos mas não apresentam um risco significativo genotóxico ou carcinogênico, *in vivo*, a taxa de respostas positivas para não-cancerígenos tornando-se excepcionalmente elevados quando as baterias de teste são empregadas. Além disso, mesmo um resultado positivo em um ensaio *in vivo* de genotoxicidade não implica necessariamente em uma atividade genotóxica. Estudos realizados indicam que existem várias evidências de que compostos relacionados com distúrbios na fisiologia de roedores podem resultar em aumento de micronúcleos na medula óssea que não estão relacionados à genotoxicidade intrínseca do composto em teste (BRAMBILLA; MARTELLI, 2009).

Estudos de genética toxicológica projetados para identificar riscos genotóxicos são aceitos pela indústria e órgãos reguladores e incluem: teste de mutação genética em bactérias; avaliação *in vitro* de lesões cromossômicas usando células de mamíferos *in vitro* ou ensaio em linfoma de ratos tk +/- e teste *in vivo* de danos cromossômicos em roedores usando células hematopoiéticas. Se os resultados dos testes de genética toxicológica indicam a falta de potencial genotóxico, então os ensaios clínicos geralmente podem ser realizados em indivíduos saudáveis ou populações de pacientes com a indicação médica proposta. Fármacos que dão resultados positivos em testes de genética toxicológica, mas não interagem diretamente com o DNA nem sempre apresentam um significativo risco *in vivo*. Nesses casos, recomenda-se que se forneçam provas do mecanismo de genotoxicidade e relevância do mecanismo previsto para a exposição *in vivo*. Se algum dos três ensaios da bateria padrão de genotoxicidade ICH (*International Conference on Harmonization*) são positivos, então é recomendável completar com um quarto teste da bateria ICH. Estudos equivalentes devem ser repetidos para determinar a reprodutibilidade dos resultados. Agentes que induzem efeitos por mecanismos indiretos podem ter limites para efeitos genotóxicos. Recomenda-se que sejam apresentadas provas da existência de um limite que não seria alcançado durante a exposição clínica proposta ou apresentar evidências de um mecanismo não deve estar operacional *in vivo*. Ensaios adicionais *in vivo* podem ser úteis para esclarecer os resultados positivos *in vitro* (FDA, 2006).

3.4.Os Bioensaios na detecção de mutagenicidade

Já está bem estabelecido que a exposição repetida a agentes citotóxicos pode causar vários efeitos adversos, como mutações, imunotoxicidade e câncer através da indução de danos genéticos e alteração dos mecanismos de divisão celular em células que se dividem rapidamente (ZALACAIN; SIERRASESÚMAGA; PATIÑO, 2005).

A Genética Toxicológica é um campo multidisciplinar de pesquisa envolvido na detecção de lesões no DNA e em seus componentes, na compreensão das consequências biológicas desses danos ao DNA e seus modos de ação moleculares que levam a alterações na reparação do material genético. Ela estuda os efeitos adversos sobre o processo de hereditariedade. Uma variedade de sistemas de ensaio de genotoxicidade têm sido desenvolvidos para a identificação de compostos que reagem com o DNA. A principal razão para o desenvolvimento destes sistemas de teste foi para proteger o homem contra os danos ao DNA e suas consequências. Algumas características importantes das espécies utilizadas incluem a disponibilidade de informações sobre sua estrutura genômica, um baixo número de cromossomos que é ideal para análises aberração e um crescimento rápido (período de geração curto) (KRISHNA; HAYASHI, 2000; UHL et al., 2003).

Toda informação sobre a função e a estrutura de uma célula encontra-se armazenada no seu DNA. Este é alvo constante de grandes mutações por uma variedade de mecanismos que incluem a mutação de ponto, devido a modificação de moléculas reativas como, por exemplo, o radical hidroxila, quebras cromossômicas, rearranjo, perda ou ganho de cromossomos, silenciamento de genes, bem como encurtamento acelerado dos telômeros. A célula pode sofrer mutação em três diferentes locais: no gene, no cromossomos e na maquinaria necessária para a segregação de cromossomos (KRISHNA; HAYASHI, 2000). Todos esses mecanismos de danos ao genoma ocorrem espontaneamente devido a efeitos de agentes mutagênicos gerados endogenamente e/ou por causa de deficiência de cofatores necessários para o metabolismo e reparo do DNA, além da exposição a genotoxinas ambientais, podendo causar grandes alterações ao material genético das células eucarióticas. Se houver alguma alteração que interrompa a sequência essencial de DNA pode haver morte celular (FENECH, 2000a, 2005; GORBUNOVA; SELUANOV, 2005).

O dano ao DNA ou cromossomo é apenas um dos vários eventos críticos que acontecem após a exposição a agentes xenobióticos. Além disso, a probabilidade de células sobreviventes a uma exposição a um agente prejudicial ao DNA (endógena ou exógena) é dependente da propensão da célula para a morte celular programada ou apoptose. Uma célula pode também sofrer necrose, em vez de apoptose, dependendo do estado oxidante/antioxidante intracelular, do nível de ATP na célula e da extensão dos danos de membrana induzida (FENECH et al., 1999).

Entretanto, as células possuem diferentes mecanismos de reparo do DNA, incluindo o reparo por excisão de bases, reparo por excisão de nucleotídeos, reparo *mismatch* e reparo da quebra da fita dupla. Numerosos genes de reparo de DNA polimórficos estão envolvidos nestas vias de reparo, muitos destes polimorfismos têm sido associados com um risco aumentado de câncer e pode estar associada a um maior nível de danos cromossômicos (KAZIMIROVA et al., 2008). A combinação de genes de reparo de DNA diferentes e sua interação com agentes genotóxicos ambientais podem modular indução de MN (MATEUCA et al., 2008). Na maioria das vezes os danos conseguem ser reparados, porém, quando o reparo é ineficiente ou incorreto, ocorre aumento da sensibilidade das células do indivíduo a tensões genotóxicas normais, culminando em mutação. Este tipo de lesão é permanente na sequência de DNA, sendo transmitida às futuras gerações de células. As mutações podem ser benéficas, quando elas conferem vantagem seletiva para a evolução da população, ou ainda, maléficas ou deletérias, com quebras de cromátides ou cromossomos, que podem causar doenças como o câncer (FENECH, 2005; GORBUNOVA; SELUANOV, 2005; KAZIMIROVA et al., 2008).

Estas lesões no DNA podem ser quantificadas, tendo por base células-controle não tratadas como parte de um ensaio de mutagenicidade bem conduzido. A frequência de fundo quantificável mutante representa uma parte crítica de qualquer caracterização dose-resposta de mutagenicidade, que pode ser medida tanto em modelos animais *in vitro* ou *in vivo*, e assim, ser extrapolada para humanos (POTTENGER; GOLLAPUDI, 2009).

Outros defeitos nos mecanismos envolvidos na segregação cromossômica, além do reparo defeituoso do DNA, podem levar a um número anormal de cromossomos ou aneuploidia, que pode estar altamente relacionado com o desenvolvimento de câncer. Eles incluem: defeitos de montagem do fuso, *checkpoints* inadequados do ciclo mitótico e replicação anormal do centrôssoma que coordena a montagem do eixo (FENECH, 2005).

Podemos perceber pelo exposto acima, que o aumento da contaminação ambiental tem impacto sobre a saúde humana podendo levar a mutações na estrutura ou no número dos cromossomas, ao aumento da instabilidade genômica e ao desenvolvimento de câncer em seres humanos (MISIK et al., 2006). Alguns destes efeitos aparecem imediatamente, enquanto outros se tornam evidentes tempos depois. Os efeitos tardios a esta exposição, além do desenvolvimento de câncer é o aparecimento de doenças genéticas que afetam as gerações futuras e deficiências no desenvolvimento. Entre estas doenças estão: anemia, diabetes, distúrbios cardiovasculares, neurocomportamentais e de desenvolvimento, podendo ter papel também no processo de envelhecimento (IARMARCOVAI et al., 2008b; MALUF, 2004).

As autoridades reguladoras da Europa, EUA e Japão recomendam que estudos de genotoxicidade e carcinogenicidade sejam realizados antes do pedido de aprovação de comercialização de produtos farmacêuticos. Este procedimento visa avaliar o risco potencial de efeitos genotóxicos e cancerígenos para os seres humanos. Uma bateria de testes padrão foi proposta como parte das diretrizes atuais para testes de genotoxicidade de produtos farmacêuticos e consiste de: (a) um teste de mutação genética em bactérias, (b) um teste de avaliação citogenética de danos cromossômicos em células de mamíferos *in vitro* ou ensaio de mutação genética em células de mamíferos *in vitro*, (c) um teste *in vivo* para lesões cromossômicas usando células hematopoiéticas de roedores. Para os testes de carcinogenicidade de produtos farmacêuticos estudos de longo prazo de carcinogenicidade em roedores devem ser realizados para todos os produtos farmacêuticos que seja para uso clínico contínuo por pelo menos 6 meses, bem como para produtos farmacêuticos usados com frequência de forma intermitente no tratamento de condições crônicas recorrentes (BRAMBILLA; MARTELLI, 2009).

Bioensaios vegetais são, em geral, altamente sensíveis na detecção de efeitos genotóxicos de poluentes ambientais e várias espécies foram usadas para estudar a poluição do ar. A maioria destes testes são de custo e tempo relativamente rápidos e não requerem equipamentos específicos e manipulação excessiva da amostra ou procedimentos de concentração. Um dos modelos mais promissores para a monitorização *in situ* é o bioensaio de micronúcleos em *Tradescantia* utilizado com sucesso em estudos de biomonitorização ambiental desde 1980. Investigações anteriores mostraram que a poluição do ar provoca um aumento de frequências MN em *Tradescantia* (MISIK et al., 2006). *Allium cepa* é outra dessas plantas bastante utilizada em diversos estudos para detectar aberrações cromossômicas induzidas por substâncias químicas (RANK; NIELSEN, 1993). Este teste é um dos melhores sistemas de ensaio estabelecidos, utilizado rotineiramente devido à sua sensibilidade e boa correlação com sistemas teste em animais (GRANT, 1994; TKALEC et al., 2009). O teste é baseado na avaliação dos efeitos citotóxicos e potencial genotóxico medido por diferentes mecanismos genéticos (aneugenicidade e clastogenicidade) através do crescimento das raízes, bem como a gravação de anormalidades mitóticas e aberrações cromossômicas em pontas de raízes (MA et al., 1995; MONARCA et al., 2003; TKALEC et al., 2009).

O uso da técnica de contagem de MN como uma medida de dano cromossômico em culturas de linfócitos humanos foi proposto em 1976, cuja única exigência foi a escolha de tipos de células com alta atividade mitótica. Mais tarde, em 1985, o ensaio de genotoxicidade foi melhorado, ficando lento o processo de divisão celular quando a célula

sofreu apenas uma divisão mitótica, desenvolvendo, então, a técnica de bloqueio da citocinese (CbMN: micronúcleo com bloqueio da citocinese), cuja base é o uso de uma substância química chamada citocalasina-B, que tem a função de impedir citocinese celular. Em 1999 o ensaio de MN foi validado em todo o mundo e considerado um biomarcador eficaz para danos ao DNA, através do programa internacional de micronúcleo humano (HUMN), onde se coletou as frequências de base de MN obtidos em diferentes laboratórios e populações em todo o mundo (ZALACAIN; SIERRASESÚMAGA; PATIÑO, 2005).

Uma associação positiva entre frequência de aberrações cromossômicas (AC) e risco aumentado de desenvolvimento de câncer foi demonstrada. Com isto, danos cromossômicos podem ser considerados como um biomarcador relevante para predisposição ao câncer (MAFFEI et al., 2002). A formação de micronúcleos (MN) é largamente utilizada em epidemiologia molecular como um biomarcador de danos cromossômicos e instabilidade do genoma (IARMARCOVAI et al., 2008a). O ensaio de MN em células bucais esfoliadas é um excelente candidato a biomarcador para o monitoramento da exposição humana a genotoxinas ocupacionais e ambientais. As células da mucosa não são apenas uma via direta da exposição aos poluentes ingeridos, mas também capazes de metabolizar agentes químicos para espécie reativa. A coleta de células bucais é um método pouco invasivo, disponível para medir o dano ao DNA em humanos, especialmente quando comparado à obtenção de amostras de sangue para testes de linfócitos e eritrócitos ou biópsias de tecidos (HOLLAND et al., 2008; KAUSAR et al., 2009).

Os biomarcadores são determinantes na biomonitorização sendo útil na avaliação de diferentes tipos de danos. Para a exposição crônica, a comparação dos níveis de dano entre uma técnica de citogenética e o ensaio cometa pode fornecer informações sobre os níveis de exposição no passado. A combinação do teste cometa com o ensaio de micronúcleo com bloqueio da citocinese (CbMN) parece ser apropriado para monitorar populações cronicamente expostas a agentes tóxicos (MALUF, 2004).

Biomarcador é toda substância ou seu produto de biotransformação, assim como qualquer alteração bioquímica precoce, que pode ser detectada nos fluidos biológicos, tecidos ou ar exalado, e é utilizado na avaliação da intensidade da exposição e do risco à saúde. A determinação quantitativa de parâmetros biológicos, que podem estar alterados como consequência da interação entre o agente químico e o organismo, usados como Indicadores Biológicos ou Biomarcadores, só é possível se existir correlação com a intensidade da exposição e/ou o efeito biológico da substância (AMORIM, 2003).

O câncer é a segunda causa de morte nos países desenvolvidos, perdendo apenas para as doenças cardiovasculares. Baseado nisto, houve a necessidade de se desenvolver e validar

biomarcadores, capazes de antecipar o diagnóstico clínico e as intervenções, e assim, prevenir o câncer em populações de risco, que ocorre devido à exposição a agentes cancerígenos ou devido a sua susceptibilidade genética. Alguns biomarcadores de danos cromossômicos já estão bem estabelecidos, como visto anteriormente, tais como aberrações cromossômicas (AC), micronúcleos (MN) e trocas de cromátides irmãs (SCE). O teste de AC já é bem aceito por estar correlacionado com o risco geral de câncer. Entretanto, o ensaio de MN têm tido ampla utilização em estratégias de saúde pública e, potencialmente, na avaliação de risco individual, por ser analisado mais rapidamente e oferecer bons resultados em relação ao teste de AC. Um aspecto interessante que deve ser observado é o fato de que um nível elevado de MN em pacientes com câncer poderia ser consequência de sua doença ou refletir a sua susceptibilidade individual para eventos de instabilidade genômica. O uso de biomarcadores como preditor de risco de doença, é portanto, apoiado pela sua relação com fatores de risco, que será semelhante entre fator de risco e doenças relacionadas. Assim, o uso de MN como biomarcador se baseia no fato de que diversas anomalias citogenéticas são encontradas em células cancerígenas, apoiando a hipótese de que danos cromossômicos estão diretamente envolvidos na etiologia do câncer (IARMARCOVAI et al., 2008b; MINOZZO; DEIMLING; SANTOS-MELLO, 2010; MURGIA et al., 2008).

A monitoração da população tem sido realizada com o intuito de se definir as condições de exposição excessiva prejudicial a fim de se evitar consequências adversas. Com o propósito de se avaliar os possíveis efeitos genotóxicos de uma exposição perigosa utiliza-se os estudos de biomonitorização humana citogenética utilizando células somáticas (MAFFEI et al., 2002).

Diversos métodos vêm sendo utilizados ao longo dos anos, para avaliar a exposição humana a agentes químicos como os agrotóxicos (PERES et al., 2005). A monitorização da exposição tem por objetivo avaliar e interpretar parâmetros biológicos e/ou ambientais, a fim de se detectar os possíveis riscos à saúde humana. A exposição pode ser avaliada pela Monitorização Ambiental através da medida da concentração do agente químico em amostras ambientais (por exemplo: o ar) ou pela Monitorização Biológica através da medida de parâmetros biológicos (indicadores biológicos ou biomarcadores). A Monitorização Ambiental tem a finalidade de reduzir as exposições ocupacionais e comprovar se as medidas preventivas adotadas no ambiente são satisfatórias, enquanto a Monitorização Biológica tem por objetivo verificar se existe segurança na presença do agente químico no ambiente de trabalho, em exposições presentes e passadas, para evitar a ocorrência de efeitos adversos à saúde (AMORIM, 2003).

A Monitorização Biológica da exposição aos agentes químicos significa a medida da substância ou seus metabólitos em várias matrizes biológicas, como sangue, urina, ar exalado e outros (por exemplo, mercúrio na urina) (AMORIM, 2003). As técnicas mais difundidas de quantificação destes indicadores são a cromatografia em fase gasosa ou em fase líquida de alta performance com o auxílio de vários detectores. Estas técnicas apresentam alta sensibilidade, produzem resultados exatos e possibilitam a avaliação da relação entre o xenobiótico em sua forma original e seus (sub) produtos, possibilitando o estudo do processo metabólico que esta substância sofre no organismo (PERES et al., 2005).

Existem 3 tipos de biomarcadores, de *exposição* (que estabelecem uma ligação entre a exposição externa e a quantificação da exposição interna sendo usados para confirmar e avaliar a exposição de indivíduos ou de um grupo, para uma substância em particular); de *efeito* (que são decorrentes da exposição e absorção da substância química usados na documentação de alterações pré-clínicas ou efeitos adversos à saúde) e os de *susceptibilidade* (permitem elucidar o grau de resposta da exposição provocada nos indivíduos). A ligação dos biomarcadores entre exposição e efeitos contribui para a definição da relação dose-resposta (AMORIM, 2003).

3.4.1. Teste *Alium cepa*

As plantas superiores já são conhecidas e bastante utilizadas há muito tempo pelo papel que estes organismos-teste desempenham na detecção, rastreamento e monitoramento de substâncias genotóxicas no meio ambiente (FISKESJO, 1985; GRANT, 1994; LEME e MARIN-MORALES, 2008; RANK; NIELSEN, 1993; YI e MENG, 2003). Numerosos estudos mostraram que os testes com plantas são altamente sensíveis e específicos para toxinas ambientais como pesticidas e outros compostos orgânicos (STEINKELLNER et al., 1998). Os sistemas de plantas superiores devem ser aceitos pelas autoridades regulatórias como uma alternativa de sistema de análise de primeira linha para a detecção de possíveis danos genéticos decorrentes da poluição ou do uso de substâncias químicas ambientais, pois como vimos, eles são reconhecidos como excelentes indicadores de efeitos citotóxicos, citogenéticos e mutagênicos de substâncias químicas ambientais, possuindo vantagens exclusivas para a monitorização *in situ* e de triagem (GRANT, 1982, 1994).

Há um grande número de bioensaios para a detecção de toxicidade genética a curto prazo. Estes ensaios utilizam uma ampla gama de organismos e tipos de células e medem

uma variedade de diferentes alterações genéticas. Os danos genéticos detectados representam dano ao DNA, mutações pontuais e mutações cromossômicas (CABRERA; RODRIGUEZ, 1999). Bioensaios vegetais são consideravelmente mais sensíveis e simples em comparação com bioensaios animais e foram validados no mercado internacional por estudos pelo Programa das Nações Unidas do Meio Ambiente (UNEP), Organização Mundial da Saúde (OMS) e Agência de Proteção Ambiental dos EUA (US-EPA), provando ser eficiente para testes de monitoramento de genotoxicidade para poluentes ambientais (YI; MENG, 2003).

Estes ensaios são valiosos para o monitoramento da água e poluição do ar e dos efeitos genotóxicos de solos e lamas. Agentes genotóxicos causam lesões ao DNA primário, seja por formação de adutos no DNA, por oxidação de bases, por dimerização de bases ou ainda, por ligações cruzadas que podem ser reparados ou levar a alterações irreversíveis do DNA. As mutações ocorrem, tanto no nível do gene (mutações genéticas) quanto no nível cromossômico (aberrações cromossômicas estruturais e numéricas) (UHL et al., 2003). Vários testes são utilizados rotineiramente para a avaliação genotóxica de água, o teste de Ames e o teste *Allium cepa*, ocupam uma posição de destaque. O teste de genotoxicidade *Allium* é um excelente teste à base de plantas para estudar aberrações em anáfase (FATIMA; AHMAD, 2006).

Várias plantas são utilizadas como sistemas de teste pois apresentam boa sensibilidade e confiabilidade como ensaios a curto prazo, são de fácil armazenamento e cultura no laboratório e em condições *in situ* (FISKESJO, 1985; RANK; NIELSEN, 1993; SETH et al., 2008), além de apresentar uma ampla gama de aplicações como indicadores de efeitos citogenéticos e mutagênicos (clastogenicidade/aneugenicidade) dos agentes ambientais (ANDRADE et al., 2008; GROVER; KAUR, 1999; MONARCA et al., 2003). Atualmente, entre as espécies de plantas mais usadas para avaliar a contaminação ambiental, as mais frequentes são *Allium cepa*, *Vicia faba*, *Zea mays*, *Tradescantia*, *Nicotiana tabacum*, *Crepis capillaris*, *Arabidopsis thaliana* e *Hordeum vulgare* (LEME; MARIN-MORALES, 2009; YI; MENG, 2003).

Entre as várias plantas superiores usadas como organismos teste, a espécie *Allium cepa* tem sido usada como um padrão genético eficiente para monitoramento ambiental (LEME; MARIN-MORALES, 2008). Ela foi introduzida primeiramente por Levan em 1938, como uma forma de sistema-teste, sofrendo adaptações posteriores na sua metodologia para possibilitar uma melhor avaliação da contaminação ambiental complexa (FISKESJO, 1985; MA et al., 1995; RANK; NIELSEN, 1993). Tais adaptações possibilitaram uma maior abrangência de utilização deste teste através da avaliação de

compostos solúveis e insolúveis em água e a avaliação dos efeitos de misturas complexas. Além de destacar a sua sensibilidade, para a detecção de danos genéticos induzidos por poluentes ambientais presentes em diversos ambientes e em especial pelo rastreamento de toxicidade de águas residuais e água de rio, ele é importante, também pela grande capacidade de avaliar diferentes mecanismos genéticos a partir de mutações pontuais de aberrações cromossômicas, tanto em células individuais quanto em órgãos e tecidos como folhas, pólen e endosperma (LEME; MARIN-MORALES, 2008, 2009; MA et al., 1995; MONARCA et al., 2003; RANK e NIELSEN, 1993).

A cebola comum (*Allium cepa*) é uma planta excelente para detectar aberrações cromossômicas após tratamento químico. Apesar de se utilizar também outras espécies de *Allium* (*A. cepa* var. *Proliferum*, *A. carinatum*, *A. fistulosum* e *A. sativum*), isto é feito em um grau bem menor (FISKESJO, 1985; GRANT, 1982; RANK; NIELSEN, 1993). O teste é baseado na avaliação de efeitos tóxicos, citotóxicos e genotóxicos potenciais, medido pelo crescimento das raízes, bem como pela gravação de anormalidades mitóticas e aberrações cromossômicas em células meristemáticas da ponta da raiz. O teste de *Allium* implica na germinação de bulbos de cebola, mas as raízes podem ser obtidas para a análise também, por germinação das sementes (TKALEC et al., 2009; VIDAKOVIC-CIFREK et al., 2002).

O método de aberração cromossômica em raízes de *Allium* é validado pelo Programa Internacional de Segurança Química (IPCS, WHO) e o Programa Ambiental das Nações Unidas (UNEP) como um eficiente teste para análise e monitoramento *in situ* da genotoxicidade de substâncias ambientais (FACHINETTO et al., 2007). O teste é fácil de manusear, mas é difícil para não-citologistas distinguir entre os diferentes tipos de células mitóticas e algumas das aberrações cromossômicas recomendadas para analisar (TKALEC et al., 2009).

A. cepa tem sido considerada favorável para avaliar danos cromossômicos e distúrbios do ciclo mitótico, incluindo eventual riscos de aneuploidia, isto porque ela possui células meristemáticas homogêneas e em grande porcentagem de divisão, a presença de cromossomos com boas condições, grandes, bem visíveis, que se coram facilmente e em número reduzido ($2n = 16$). Além disso, este sistema de teste mostrou alta sensibilidade em detecção de substâncias químicas ambientais (LEME; MARIN-MORALES, 2008, 2009; KURAS et al., 2006; FISKESJO, 1985).

A avaliação das aberrações cromossômicas (AC) detecta potencialmente agentes genotóxicos, a avaliação dos efeitos mutagênicos é feita através da observação dos micronúcleos (MN) pela indução de F1 nas células das raízes de *A. cepa* expostas aos poluentes do meio ambiente. O índice mitótico (IM), caracterizado pelo número total de

células em divisão no ciclo celular, tem sido usado como um parâmetro para avaliar a citotoxicidade de vários agentes. Os níveis de citotoxicidade de um agente podem ser determinados pelo aumento ou diminuição do IM. No entanto, tanto a redução quanto o aumento do IM são indicadores importantes no monitoramento da poluição ambiental, especialmente para a avaliação de contaminantes tóxicos que apresentam e potencial citotóxico (LEME; MARIN-MORALES, 2009).

As vantagens destes testes genéticos em vegetais superiores é que eles têm um custo relativamente baixo devido à sua simplicidade, são fáceis de manusear, necessitando de requisitos mínimos para sua realização, tornando-os viáveis nos países em desenvolvimento. Além disso, permite a investigação dos mecanismos universais para células vegetais meristemáticas, podendo ser extrapolado a sistemas de teste em mamíferos (GRANT, 1994; GROVER; KAUR, 1999; KURAS et al., 2006; RANK; NIELSEN, 1993; SETH et al., 2008; TKALEC et al., 2009). Outra vantagem do teste *A. cepa* é a possibilidade de expor o organismo-teste diretamente a misturas complexas sem tratamento prévio da amostra. Uma característica interessante deste teste é a presença de um sistema de enzima oxidase, que é essencial para avaliações de promutagenes. Assim, enquanto outros testes, como o de Ames, requerem adição da mistura S9 (fração S9 de fígado de rato), *A. cepa* apresenta capacidade metabólica para ativar promutagenes em mutagenes sem adição de sistema metabólico exógeno para avaliação de compostos. Ao se comparar o sistema de enzimas oxidases de plantas superiores com as enzimas do citocromo P-450 de mamíferos, o complexo enzimático de plantas apresenta baixa concentração e uma limitação na especificação do substrato (LEME; MARIN-MORALES, 2009; PLEWA et al., 1996).

A comparação dos resultados obtidos para os sistemas-teste com animais e humanos com aqueles obtidos utilizando um sistema-modelo com planta (*Allium*) pode trazer informações adicionais ao composto em estudo, assim como também, explicar os mecanismos da sua ação sobre as células (KURAS et al., 2006). A maioria dos testes em animais são caros sendo, portanto, pouco usados pelas agências de execução para a monitorização ambiental de rotina. Com isto, bioensaios vegetais que são consideravelmente mais baratos, têm sido indicados para este propósito (GROVER; KAUR, 1999).

Diante do exposto, pode-se perceber a importância dos resultados dos bioensaios com plantas, uma vez que, se produtos químicos são capazes de induzir danos cromossômicos nas plantas também podem oferecer risco a outros organismos, desde que o material danificado seja o DNA, comum a todos os organismos. São de extrema importância, pois, os estudos de sensibilidade e de correlação entre os sistemas de teste para que se tenha uma avaliação mais precisa dos riscos dos impactos ambientais, além da

extrapolação dos dados para outros organismos-alvo, inclusive o homem, para detectar os riscos para a saúde humana, devido à inviabilidade do uso destes testes em humanos (LEME; MARIN-MORALES, 2009).

3.4.2. Teste de micronúcleos

O índice de MN em células humanas ou em roedores tornou-se um dos *endpoints* citogenéticos padrão de biomarcadores utilizados em genética toxicológica *in vivo* ou *ex vivo*. A semelhança entre o nível de dano cromossômico em tecidos substitutos como, eritrócitos, linfócitos e células epiteliais descamadas (por exemplo, oral, urotelial, nasal) e os danos correspondentes em tecidos propensos ao câncer fornecem a justificativa para o uso destes biomarcadores como marcadores de risco de câncer. Uma das vantagens de se utilizar o ensaio de MN com células esfoliadas provenientes de tecido epitelial de divisão rápida é que não é necessária divisão nuclear *ex vivo*, e assim, não é preciso cultura de células quando os ensaios citogenéticos são feitos com base na análise de cromossomos metafásicos, como aberrações cromossômicas e trocas de cromátides irmãs (CEPPI et al., 2010; FENECH, 2005; HOLLAND et al., 2008; IARMARCOVAI et al., 2008b).

O teste de MN *in vivo* pode ser realizado tanto em medula óssea, como em outros tecidos alvo, como pele, cólon ou fígado. A importância em se utilizar o fígado em vez de medula óssea deve-se ao fato de que muitos produtos químicos são metabolizados no fígado, mas não na medula óssea; metabólitos de curta duração gerados no fígado (ou outro tecido) não pode permitir eficiente exposição na medula óssea; a medula óssea não é um órgão-alvo para algumas classes de substâncias cancerígenas. Alguns pesquisadores recomendam, pois, a utilização da medula óssea e do fígado para avaliação de toxicidade genética sistêmica de produtos químicos (SUZUKI et al., 2009).

Micronúcleos se originam a partir de fragmentos de cromossomos acêntricos (devido à quebra da fita do DNA), que são excluídos do núcleo de novas células ou de cromossomos inteiros (devido a danos no cinetocoro, no fuso ou centrômero) que sofreram atraso na anáfase e não são capazes de migrar para os pólos do fuso durante a mitose, sendo usados, portanto, como um indicador conveniente e confiável de danos cromossômicos (FENECH, 2000a, 2000b; HOLLAND et al., 2008; MALLADI et al., 2007; ZALACAIN; SIERRASESÚMAGA; PATIÑO, 2005).

Diferentes mecanismos podem estar envolvidos na formação de micronúcleos, incluindo quebras cromossômicas (clastogênese) e ruptura do eixo (aneuploidogênese), que aparecem devido a lesões no DNA não ou mal reparado, ou ainda, através da separação anômala do cromossomo devido ao mau funcionamento de mitose (DECORDIER; KIRSCH-VOLDERS, 2006; IARMARCOVAI et al., 2008a; MALUF, 2004). Os dois tipos de MN são geralmente distinguidos um do outro pela técnica de hibridização fluorescente *in situ*, utilizando sondas de DNA centroméricas, onde MN centrômero-positivos representam cromossomos inteiros e MN centrômero-negativos representam fragmentos cromossômicos (LINDBERG et al., 2008).

Estes eventos podem ser induzidos pelo estresse oxidativo, exposição a agentes clastogênicos ou aneugênicos, defeitos genéticos do ponto de verificação do ciclo celular e/ou genes de reparo do DNA, por deficiências de nutrientes necessários como co-fatores no metabolismo do DNA e segregação cromossômica (DECORDIER et al., 2005; IARMARCOVAI et al., 2008a).

Como os MN são expressos em células que tenham concluído a divisão nuclear, estes são idealmente marcados na fase de células binucleadas do ciclo celular. Ocasionalmente, pontes nucleoplásmicas entre os núcleos de uma célula binucleada são observadas. As pontes provavelmente são cromossomos dicêntricos em que os dois centrômeros foram puxados para pólos opostos da célula, resultando em uma ponte coberta por uma membrana nuclear. Assim, pontes nucleoplásmicas em células binucleadas fornecem uma medida adicional e complementar de rearranjo de cromossomos, que podem ser marcados, juntamente com a contagem de MN. A determinação da frequência de MN pode fornecer informações relativas ao tipo de efeito mutagênico envolvido (clastogênico ou aneugênico) (MALUF, 2004). Outro mecanismo de formação de MN proposto foi o brotamento nuclear. Este processo tem sido observado em culturas cultivadas sob fortes condições seletivas que induzem à amplificação do gene. Shimizu et al. (2004) mostraram que o DNA amplificado é seletivamente localizado em sítios específicos na periferia do núcleo e sua eliminação via brotamento nuclear para formar MN durante a fase S da mitose, e serem assim, excluídos da célula por completo com extrusão do MN do citoplasma, leva à formação de uma “mini-célula” (FENECH, 2000a, 2005).

A divisão celular, mitótica ou meiótica, é essencial para o aparecimento de micronúcleos tanto em aberrações cromossômicas estruturais como numéricas, entretanto indutores de aberrações numéricas foram reconhecidos por deter a divisão celular. Para isto, a avaliação da divisão celular na presença da substância testada é obrigatória (DECORDIER; KIRSCH-VOLDERS, 2006; FENECH, 2000b; IGARASHI et al., 2007).

Para que haja a divisão celular o conteúdo do material genético (DNA) no núcleo da célula-mãe é replicado e dividido igualmente para dar origem a duas células-filhas idênticas, durante esse processo podem ocorrer erros devido a falhas na replicação e divisão do DNA, por efeitos da radiação e agentes genotóxicos, resultando em quebras e perdas cromossômicas, fazendo com que a distribuição de material genético não seja realizada de forma equitativa. Quando isso ocorre, o material genético é, portanto, excluído, não se juntando adequadamente ao núcleo da célula-filha, havendo a criação de um novo núcleo menor que o principal chamado “micronúcleo” (MN), facilmente visível ao microscópio óptico (ZALACAIN; SIERRASESÚMAGA; PATIÑO, 2005). MN são encontrados em células na intérfase (DECORDIER et al., 2009), mas sua formação ocorre na telófase, onde um envelope nuclear é formado ao redor dos fragmentos e/ou cromossomos em atraso, que então se desenrolam e, gradualmente, assumem a morfologia de um núcleo interfásico com a exceção de que eles são menores do que os núcleos principais na célula (FENECH, 2000a; KAZIMIROVA et al., 2008).

Distúrbios no ciclo mitótico, que levam ao surgimento de MN e outras formas anormais nucleares, como ponte e broto, são considerados uma das principais causas da instabilidade cromossômica estrutural que são associados com a transformação de células malignas (MURGIA et al., 2008).

Em ensaios citogenéticos exigindo a divisão celular em cultura para a expressão dos *endpoints* medidos (por exemplo, MN ou AC), há a preocupação de que nem todas as células danificadas são observadas porque algumas sofreram apoptose ou necrose em vez de completar a divisão nuclear (FENECH et al., 1999). Embora, teoricamente, os linfócitos em cultura se dividam sincronicamente, na prática não ocorre de forma idêntica em todas as células em crescimento, assim pode-se encontrar no mesmo cultivo células, mono, bi e multinucleadas e células em processo de apoptose e necrose. Portanto, é essencial integrar necrose e apoptose em ensaios atuais de dano do DNA (FENECH et al., 1999; ZALACAIN; SIERRASESÚMAGA; PATIÑO, 2005). Algumas características de células em apoptose e necrose devem ser observadas, uma vez que somente as células viáveis devem ser contadas. As células em processo apoptótico são caracterizadas por cromatina condensada, que nos estágios iniciais da apoptose pode se manifestar como cromatina marginal e, mais tarde, como fragmentação culminando com material nuclear disperso no citoplasma e com coloração mais escura em relação à usual. No caso das células necróticas, no citoplasma aparecem vacúolos claros no citoplasma. Nos estágios iniciais do processo o dano é evidente na membrana citoplasmática com núcleos intactos, mas nas células em estágios avançados observa-se lesão

necrótica no citoplasma, membrana nuclear irregular e apenas parte da estrutura nuclear intacta (ZALACAIN; SIERRASESÚMAGA; PATIÑO, 2005).

O diâmetro do MN em linfócitos humanos podem variar entre 1/16 a 1/3 do diâmetro dos núcleos principais. Os critérios propostos para a identificação de MN são: possuem perímetro arredondado ou oval; não são refringentes, podendo ser facilmente distinguidos dos artefatos; não estão ligados aos núcleos principais, mas podem se sobrepor a estes; geralmente têm a mesma intensidade de coloração dos núcleos principais, no entanto, ocasionalmente, sua coloração pode ser mais intensa; textura semelhante à do núcleo; mesmo plano focal como núcleo e Feulgen positivo, ou seja, pink na iluminação de campo claro (HOLLAND et al., 2008; PATINO-GARCIA et al., 2006).

Micronúcleos, também conhecidos hematologicamente como corpúsculos de Howell-Jolly, são geralmente lisos, pois são restos da cromatina nuclear visto em eritrócitos e não devem ser confundidas com corpos de Heinz ou Ehrlich, resultantes de lesão oxidativa e precipitação de hemoglobina (KRISHNA; HAYASHI, 2000).

A avaliação do potencial genotóxico e mutagênico de um agente biológico, químico ou físico é importante em termos de avaliação do seu potencial para ser cancerígeno (KRISHNA; HAYASHI, 2000). O ensaio MN em em medula óssea de roedores tornou-se, nos últimos anos, um sistema de teste padrão para avaliação de genotoxicidade através da monitorização biológica das populações humanas expostas a uma variedade de produtos químicos mutagênicos e cancerígenos ou agentes físicos, ou ainda, por fatores ocupacionais ou estilo de vida, sendo realizados por agências reguladoras em vários países (DECORDIER et al., 2009; HOLLAND et al., 2008; LINDBERG et al., 2008; SUZUKI et al., 2009; VIJAYALAXMI et al., 2006). O teste de MN pertence à bateria de testes junto com o ensaio de mutagenicidade de Ames em *Salmonella*, o ensaio *in vitro* de aberração cromossômica e o ensaio linfoma tk em ratos. Tendo sido aceito por muitas autoridades reguladoras (KIM; CHO; KIM, 2000).

O teste de MN *in vitro* é amplamente utilizado em universidades, indústria e laboratórios como um ensaio de rastreio para avaliar os danos citogenéticos em células de mamíferos e como alternativa para o teste de aberração cromossômica *in vitro*. Nas técnicas de citogenética clássica, os cromossomos são estudados diretamente, observando e contando as AC em metáfases. Apesar dessa abordagem fornecer uma análise mais detalhada, tem uma maior complexidade e labor para a identificação das AC, além de se poder confundir com artefatos (FENECH, 2000a). Com isto, o teste de MN apresenta algumas vantagens, pois é um ensaio tecnicamente simples, o *endpoint* marcado é mais objetivo e passível de automação, é menos demorado, pode ser executado com menos experiência técnica em relação às análises

de AC, pela sua capacidade de detectar agentes aneugênicos e clastogênicos, além de poder detectar simultaneamente atraso na mitose, apoptose, quebras cromossômicas, perdas cromossômicas e não-disjunção. Diferentes *endpoints* podem ser considerados e utilizados como biomarcadores de danos no DNA, podendo ser facilmente integrados em estudos de toxicologia geral (BRYCE et al., 2007, 2008; CORVI et al., 2008; FENECH et al., 1999; KRISHNA; HAYASHI, 2000).

Apesar de o ensaio de MN ser bem validado, fácil de se realizar e possuir boa aplicabilidade para biomonitoramento em larga escala no meio ambiente, ele tem a desvantagem de a contagem visual de MN ser muito demorada precisando de um grande número de células e/ou doadores para serem analisados para a obtenção de dados estatisticamente relevantes (DECORDIER et al., 2009). A análise microscópica de MN é relativamente demorada, o que levou ao desenvolvimento de métodos automatizados de citometria de fluxo ou análise de imagem para a detecção de MN beneficiando os programas de rastreio. Uma preocupação com a análise por citometria de fluxo é o potencial para as falsas respostas positivas causadas pela detecção de fragmentos de cromatina derivadas de células apoptóticas ou necróticas que são do mesmo tamanho de MN reais (COLLINS et al., 2008; CORVI et al., 2008).

Como visto anteriormente, o ensaio de MN *in vitro* tem sido bem estabelecido na detecção de substâncias químicas potencialmente clastogênicas e aneugênicas. Sua aceitação foi especialmente favorecida pelo desenvolvimento da metodologia com bloqueio da citocinese (CbMN) que permite a identificação das células que sofreram uma divisão nuclear, e modula diferenças na cinética da divisão celular, devido à citotoxicidade, condições de crescimento ou de origem celular (CURREN et al., 2005). Assim, o teste de MN com bloqueio da citocinese (CbMN) tornou-se um dos métodos mais comumente usados para avaliar a quebra e perda cromossômica em linfócitos humanos *in vitro* e *ex vivo*. O uso de citocalasina B não só torna a técnica mais precisa, restringindo a contagem de células para aquelas que tenham concluído uma divisão nuclear, mas também permite que a frequência de células em divisão seja quantificada rapidamente (FENECH et al., 1999). Nesta variante do teste de MN, os linfócitos que estão se proliferando aparecem como células binucleadas (BN) e fornecem uma referência ideal para determinar frequências de MN (PATINO-GARCIA et al., 2006).

O teste de micronúcleo *in vitro* pode ser utilizado na detecção de danos genéticos em ecotoxicologia, nutrição, radiação, como teste de sensibilidade tanto para avaliação de risco de câncer e otimização da radioterapia, biomonitoramento de populações humanas e o mais importante no estudo de novos fármacos e agroquímicos (FENECH, 2000a). Para isto testes

de genotoxicidade adicionais *in vivo*, em órgãos-alvo para produtos farmacêuticos destinados ao uso humano são propostos para a interpretação de dados com resultados positivos *in vitro*. Para por um fim nesse conflito, entidades reguladoras propõem a combinação do ensaio cometa *in vivo* com o ensaio de MN *in vivo* (FENECH, 2000b; VASQUEZ et al., 2010).

As principais razões para o teste de micronúcleo *in vitro* ser atualmente utilizado como exame de triagem nos primeiros estágios de desenvolvimento farmacêutico são: o ensaio pode ser realizado utilizando pequenas concentrações da substância testada, que muitas vezes possuem quantidade limitada nesta fase; o *endpoint* é relativamente fácil de marcar quando comparado com AC, sendo mais rápido na avaliação da clastogenicidade de um produto químico. Alguns toxicologistas genéticos defendem o uso desta técnica de forma intercambiável com o ensaio *in vitro* de AC na avaliação de genotoxicidade antes da submissão de novos medicamentos como novas entidades farmacêuticas (GARRIOTT; PHELPS; HOFFMAN, 2002).

Eventos importantes podem estar relacionados com o envelhecimento e câncer como a frequência de MN, por exemplo, a exposição ambiental a agentes genotóxicos, os fatores de estilo de vida, deficiência de micronutrientes e fatores genéticos (IARMARCOVAI et al., 2008b). Isso pode ser devido à perda de cromossomos e separação anômala de cromossomos (não-disjunção), causados por defeitos no fuso, nos centrômeros ou como consequência de menor condensação da estrutura dos cromossomos antes da metáfase (FENECH, 2000a).

Vários fatores podem influenciar a frequência basal de MN, a idade está diretamente relacionada a ela, podendo ser um marcador muito bom do envelhecimento. Quanto ao gênero, as mulheres têm uma taxa mais elevada do que os homens, aumentando acima dos 35 anos de idade. A presença de homocisteína plasmática, deficiência de folato e vitamina B12, também levam a um aumento na frequência basal de MN (KAZIMIROVA et al., 2008; ZALACAIN; SIERRASESÚMAGA; PATIÑO, 2005).

A variação da taxa de eritrócitos policromáticos permite inferir se um agente é ou não a causa de atrasos de divisão celular, ou ainda, deduzir a extensão de seu efeito citotóxico. Estudos *in vivo* deste tipo nos permite inferir acerca dos mecanismos de ação genotóxico e citotóxico dos agentes que induzem micronúcleos, bem como a sua farmacocinética, com base na ação dos agentes e não na sua detecção (MORALES-RAMIREZ; VALLARINO-KELLY; CRUZ-VALLEJO, 2004). A identificação de eritrócitos policromáticos (EPC) e eritrócitos normocromáticos (ENC) é baseada nos critérios descritos por Wolf et al. Os EPCs são redondos, grandes com núcleos redondos e uma coloração azul, enquanto os ENCs têm forma oval e coloração rosa (MALLADI et al., 2007).

REFERÊNCIAS

- AL-METWALLI, R.R.; MOWAFI, H.A.; ISMAIL, S.A.; SIDDIQUI, A.K.; AL-GHAMDI, A.M.; SHAFI, M.A.; EL-SALEH, A.-R. Effect of intra-articular dexmedetomidine on postoperative analgesia after arthroscopic knee surgery. **British Journal of Anaesthesia**, v. 101, n. 3, p. 395–9, 2008.
- AMORIM, L.C.A. Os biomarcadores e sua aplicação na avaliação da exposição aos agentes químicos ambientais. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 6, n. 2, p. 158-170, 2003.
- ANDRADE, L.F.; CAMPOS, J.M.S.; DAVIDE, L.C. Cytogenetic alterations induced by SPL (spent potliners) in meristematic cells of plant bioassays. **Ecotoxicology Environmental Safety**, v. 71, n. 3, p. 706-710, 2008.
- BAAMONDE, A.; ÁLVAREZ-VEGA, M.; HIDALGO, A.; MENÉNDEZ, L. Effects of intraplantar morphine in the mouse formalin test. **Journal of Pharmacology**, v. 83, p. 154-156, 2000.
- BAGATINI, A.; GOMES, C.R.; MASELLA, M.Z.; REZER, G. Dexmedetomidina: farmacologia e uso clínico. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 52, n. 5, p. 606-617, 2002.
- BALANT, L.P.; GEX-FABRY, M. Modelling during drug development. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 50, p. 13-26, 2000.
- BRAMBILLA, G.; MARTELLI, A. Genotoxicity and carcinogenicity studies of analgesics, anti-inflammatory drugs and antipyretics. **Pharmacological Research**, v. 60, p. 1-17, 2009.
- BRYCE, S.M.; BEMIS, J.C.; AVLASEVICH, S.L.; DERTINGER, S.D. *In vitro* micronucleus assay scored by flow cytometry provides a comprehensive evaluation of cytogenetic damage and cytotoxicity. **Mutation Research**, v. 630, p. 78–91, 2007.
- BRYCE, S.M.; AVLASEVICH, S.L.; BEMIS, J.C.; LUKAMOWICZ, M.; ELHAJOUJI, A.; VAN GOETHEM, F.; DE BOECK, M.; BEERENS, D.; AERTS, H.; VAN GOMPEL, J.; COLLINS, J.E.; ELLIS, P.C.; WHITE, A.T.; LYNCH, A.M.; DERTINGER, S.D. Interlaboratory evaluation of a flow cytometric, high content *in vitro* micronucleus assay. **Mutation Research**, v. 650, p. 181–195, 2008.
- CABRERA G.L.; RODRIGUEZ, D.M.G. Genotoxicity of soil from farmland irrigated with wastewater using three plant bioassays. **Mutation Research**, v. 426, p. 211-214, 1999.

CEPPI, M.; BIASOTTI, B.; FENECH, M.; BONASSI, S. Human population studies with the exfoliated buccal micronucleus assay: Statistical and epidemiological issues. **Mutation Research**, v. 705, p. 11–19, 2010.

CHEUNG, C.W.; NG, K.F.J.; LIU, J.; YUEN, M.Y.V.; HO, M.H.A.; IRWIN, M.G. Analgesic and sedative effects of intranasal dexmedetomidine in third molar surgery under local anaesthesia. **British Journal of Anaesthesia**, v. 107, n. 3, p. 430–7, 2011.

CHIANG, Y.-C.; HUNG, T.-W.; LEE, C.W.-S.; YAN, J.-Y.; HO, I.-K. Enhancement of tolerance development to morphine in rats prenatally exposed to morphine, methadone, and buprenorphine. **Journal of Biomedical Science**, v. 17, n. 46, 2010.

COLLINS, J.E.; ELLIS, P.C.; WHITE, A.T.; BOOTH, A.E.G.; MOORE, C.E.; BURMAN, M.; REES, R.W.; LYNCH, A.M. Evaluation of the Litron *In Vitro* MicroFlow® Kit for the flow cytometric enumeration of micronuclei (MN) in mammalian cells. **Mutation Research**, v. 654, p. 76–81, 2008.

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

CORVI, R.; ALBERTINI, S.; HARTUNG, T.; HOFFMANN, S.; MAURICI, D.; PFUHLER, S.; VAN BENTHEM, J.; VANPARYS, P. ECVAM retrospective validation of *in vitro* micronucleus test (MNT). **Mutagenesis**, v. 23, n. 4, p. 271–283, 2008.

CRUZ, J.R.S.; CRUZ, D.F.B.M.; CASTELO BRANCO, B.; SANTIAGO, A.E.Q.; DO AMARAL, J.L.G. Clonidina como Medicação Pré-Anestésica em Facetomias: Comparação entre as Doses de 100 µg e 200 µg Clonidine as Pre-Anesthetic Medication in Cataract Extration: Comparison between 100 µg and 200 µg. *Revista Brasileira de Anestesiologia*, v. 59, n. 6, p. 694-703, 2009.

CURREN, R.D.; MUN, G.; GIBSON, D.P.; AARDEMA, M.J. Development of a Novel Micronucleus Assay in the Human 3-D Skin Model, EpiDerm™. Presented at the 44th Annual Meeting of the Society of Toxicology New Orleans, Louisiana March 6-10, 2005.

DAIICHI SANKYO BRASIL FARMACÊUTICA LTDA. Disponível em: <<http://www.daiichisankyo.com.br/PandD/EtapasDesenv.aspx>>. Acesso em: 26 abril 2011.

DECORDIER, I.; CUNDARI, E.; KIRSCH-VOLDERS, M. Influence of caspase activity on micronuclei detection: a possible role for caspase-3 in micronucleation. **Mutagenesis**, v. 20, n. 3, p. 173-179, 2005.

- DECORDIER, I.; KIRSCH-VOLDERS, M. The *in vitro* micronucleus test: From past to future. **Mutation Research**, v. 607, p. 2–4, 2006.
- DECORDIER, I.; PAPINE, A.; PLAS, G.; ROESEMS, S.; LOOCK, K.V.; MORENO-PALOMO, J.; CEMELI, E.; ANDERSON, D.; FUCIC, A.; MARCOS, R.; SOUSSALINE, F.; KIRSCH-VOLDERS, M. 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.
- DEMIRCIOGLU, R.I.; USTA, B.; MUSLU, B.; SERT, H.; OKANO, Y.; ONODERA, K.; GOZDEMIR, M. Combination of Small Doses of Subarachnoid Morphine with Systemic. **Journal of Hard Tissue Biology**, v. 19, n. 2, p. 117-122, 2010.
- DIANA, F.; FERNANDÉZ, V.; TORRES, E. Evaluacion de la actividad genotóxica de efluentes de curtiembres del Dpto. Central de la region oriental. **Revista de Ciencia y Tecnologia**, v. 2. p. 37-48, 2000.
- ERFANPARAST, A.; TAMADDONFARD, E.; FARSHID, A.A.; KHALILZADEH, E. Antinociceptive Effect of Morphine Microinjections into the Dorsal Hippocampus in the Formalin-Induced Orofacial Pain in Rats. **Veterinary Research Forum**, v. 1, n. 2, p. 83 – 89, 2010.
- FACHINETTO, J.M.; BAGATINI, M.D.; DURIGON, J.; DA SILVA, A.C.F.; TEDESCO, S.B. Efeito anti-proliferativo das infusões de *Achyrocline satureioides* DC (Asteraceae) sobre o ciclo celular de *Allium cepa*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 17, n. 1, p. 49-54, 2007.
- FATIMA, R.A.; AHMAD, M. Genotoxicity of industrial wastewaters obtained from two different pollution sources in northern India: a comparison of three bioassays. **Mutation Research**, v. 609, n.1, p.81-91. 2006.
- FENECH, M. CROTT, J.; TURNER, J.; BROWN, S. Necrosis, apoptosis, cytostasis and DNA damage in human lymphocytes measured simultaneously within the cytokinesis-block micronucleus assay: description of the method and results for hydrogen peroxide. **Mutagenesis**, v. 14, n. 6, p. 605-612, 1999.
- FENECH, M. The *in vitro* micronucleus technique. **Mutation Research**, v. 455, p. 81–95, 2000a.
- FENECH, M. A mathematical model of the *in vitro* micronucleus assay predicts false negative results if micronuclei are not specifically scored in binucleated cells or in cells that have completed one nuclear division. **Mutagenesis**, v. 15, n. 4, p. 329-336, 2000b.

FENECH, M. The Genome Health Clinic and Genome Health Nutrigenomics concepts: diagnosis and nutritional treatment of genome and epigenome damage on an individual basis. **Mutagenesis**, v. 20, n. 4, p. 255–269, 2005.

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

FLORES, M.; YAMAGUCHI, M.U. Teste do Micronúcleo: Uma Triagem para Avaliação Genotóxica. **Revista Saúde e Pesquisa**, v. 1, n. 3, p. 337-340, 2008.

FUCHS, F.D.; WANNMACHER, L. **Farmacologia Clínica - Fundamentos da Terapêutica Racional**, Rio de Janeiro. 2a ed. Guanabara Koogan. Unidade 4, Seção 1, cap. 19, p. 172-176, 1998.

GADANO A.; GURNI, A.; LOPÉZ, P.; FERRARO, G.; CARBALLO, M. *In vitro* genotoxic evaluation of the medicinal plant *Chenopodium ambrosioides*. L. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 81, p. 11-16, 2002.

GARRIOTT, M.L.; PHELPS, J.B.; HOFFMAN, W.P. A protocol for the *in vitro* micronucleus test I. Contributions to the development of a protocol suitable for regulatory submissions from an examination of 16 chemicals with different mechanisms of action and different levels of activity. **Mutation Research**, v. 517, p. 123–134, 2002.

GILMAN, A.G.; RALL, T.W.; NIES, A.S.; TAYLOR, P. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 10 ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2003. Seção IV, cap. 23, p. 379-402.

GOLDIM, J.R. O uso de drogas ainda experimentais em assistência: extensão de pesquisa, uso compassivo e acesso expandido. **Revista Panamericana de Salud Publica**. v. 23, n. 3, p. 198–206, 2008.

GORBUNOVA, V.; SELUANOV, A. Making ends meet in old age: DSB repair and aging. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 126, n. 6-7, p. 621-628, 2005.

GRANT, W.F. Chromosome aberration assays in *Allium*: A report of the U.S. environmental protection agency gene-tox program. **Mutation Research**, v. 99, n. 3, p. 273-291, 1982.

GRANT, W.F. The present status of higher plant bioassays for the detection of environmental Mutagens. **Mutation Research**, v. 310, n. 2, p. 175-185, 1994.

GROVER, I.S.; KAUR, S. Genotoxicity of wastewater samples from sewage and industrial

effluent detected by the *Allium* root anaphase aberration and micronucleus assays. **Mutation Research**, v. 426, p. 183–188, 1999.

HAMABE, W.; MAEDA, T.; KIGUCHI, N.; YAMAMOTO, C.; TOKUYAMA, S.; KISHIOKA, S. Negative Relationship Between Morphine Analgesia and P-Glycoprotein Expression Levels in the Brain. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 105, p. 353 – 360, 2007.

HANSEN, T.G.; HENNEBERG, S.W.; WALTHER-LARSEN, S.; LUND, J.; HANSEN, M. Caudal bupivacaine supplemented with caudal or intravenous clonidine in children undergoing hypospadias repair: a double-blind study. **British Journal of Anaesthesia**, v. 92, n. 2, p. 223 – 7, 2004.

HARA, Y.; NAKAJIMA, M.; MIYAMOTO, K.-I.; YOKOI, T. Morphine Glucuronosyltransferase Activity in Human Liver Microsomes is Inhibited by a Variety of Drugs that are Co-administered with Morphine. **Drug Metabolism and Pharmacokinetics**, v. 22, n. 2, p. 103–112, 2007.

HERBERT, B.A.G.; RAMACIOTTI, P.M.G.; FERRARI, F.; NAVARRO, L.H.C.; NAKAMURA, G.; RODRIGUES JR., G.R.; CASTIGLIA, Y.M.M.; BRAZ, J.R.C.; NASCIMENTO JR., P. Uso de Dexmedetomidina em Neurocirurgia The Use of Dexmedetomidine in Neurosurgery. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 57, n. 2, p. 223-231, 2007.

HO, A.M.; CHEN, S.; KARMAKAR, M.K. Central apnoea after balanced general anaesthesia that included dexmedetomidine. **British Journal of Anaesthesia**, v. 95 n. 6, p. 773–5, 2005.

HOLLAND, N.; BOLOGNESI, C.; KIRSCH-VOLDERS, M.; BONASSI, S.; ZEIGER, E.; KNASMUELLER, S.; FENECH, M. 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.; BONASSI, S. ; BOTTA, A; BAAN, R.A.; ORSIÈRE, T. Genetic polymorphisms and micronucleus formation: A review of the literature. **Mutation Research**, v. 658, p. 215-233, 2008a.

IARMARCOVAI, G.; CEPPI, M.; BOTTA, A.; ORSIEÈRE, T.; BONASSI, S. Micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes of cancer patients: A meta-analysis. **Mutation Research**, v. 659, p. 274–283, 2008b.

IGARASHI, M.; SETOGUCHI, M.; TAKADA, S.; ITOH, S.; FURUHAMA, K. Optimum conditions for detecting hepatic micronuclei caused by numerical chromosome aberration inducers in mice. **Mutation Research**, v. 632, n. 89–98, 2007.

IVANOVA, E.; STAIKOVA, T.A.; VELCHEVA, I. Cytogenetic testing of heavy metal and cyanide contaminated river waters in a mining region of Southwest Bulgaria. **Journal of Cell and Molecular Biology**, v. 4, p. 99-106, 2005.

JEFFS, S.A.; HALL, J.E.; MORRIS, S. Comparison of morphine alone with morphine plus clonidine for postoperative patient-controlled analgesia. **British Journal of Anaesthesia**, v. 89, n. 3, p. 424-7, 2002.

JORM, C.M.; STAMFORD, J.A. Actions of morphine on noradrenaline efflux in the rat locus coeruleus are mediated via both opioid and α_2 adrenoceptor mechanisms. **British Journal of Anaesthesia**, v. 74, p. 73-78, 1995.

KATZUNG, B.G. **Farmacologia Básica e Clínica**, 8 ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2003. Seção VI, cap 31, p. 446-460.

KAUSAR, A.; GIRI, S.; MAZUMDAR, M.; GIRI, A.; ROY, P.; DHAR, P. Micronucleus and other nuclear abnormalities among betel quid chewers with or without *sadagura*, a unique smokeless tobacco preparation, in a population from North-East India. **Mutation Research**, v. 677, p. 72-75, 2009.

KAZIMIROVA, A.; BARANCOKOVA, M.; DZUPINKOVA, Z.; WSOLOVA, L.; DUSINSKA, M. Micronuclei, chromosomal aberrations, important markers of ageing. Possible association with XPC and XPD polymorphisms. **Mutation Research**, v. 661, p. 1-2, p. 35-40, 2009.

KIM, B.S.; CHO, M-H.; KIM, H.J. Statistical analysis of *in vivo* rodent micronucleus assay. **Mutation Research**, v. 469, p. 233-241, 2000.

KOROLKOVAS, A. **Química Farmacêutica**. Rio de Janeiro: Guanabara Dois, 1982. Cap. 2, p. 40-81.

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

KURAS, M.; NOWAKOWSKA, J.; SLIWINSKA, E.; PILARSKI, R.; ILASZ, R.; TYKARSKA, T.; ZOBEL, A.; GULEWICZ, K. Changes in chromosome structure, mitotic activity and nuclear DNA content from cells of *Allium Test* induced by bark water extract of *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 107, p. 211-221, 2006.

LEME, D.M.; MARIN-MORALES, M.A. Chromosome aberration and micronucleus frequencies in *Allium cepa* cells exposed to petroleum polluted water - A case study. **Mutation Research**, v. 650, p. 80-86, 2008.

LEME, D.M.; MARIN-MORALES, M.A. *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. **Mutation Research**, v. 682, n. 1, p. 71-81, 2009.

LEVAN, A. The effect of colchicine on root mitoses in *Allium*. **Hereditas**, v. 24, p. 471-486, 1938.

LIMA, M.S. Síntese, caracterização e estudo Termoanalítico de novas imidazolidinas 2,4-diona e 2-tioxo-4-ona. 2005. (**Dissertação de Mestrado em Química na Área de Concentração Química Orgânica**) – Universidade Federal da Paraíba.

LINDBERG, H.K.; FALCK, G.C.-M.; JARVENTAUS, H.; NORPPA, H. Characterization of chromosomes and chromosomal fragments in human lymphocyte micronuclei by telomeric and centromeric FISH. **Mutagenesis**, v. 23, n. 5, p. 371–376, 2008.

LUIZ, J.A.S. Novos Derivados Imidazolidínicos-2,4-diona e -2-tioxo-4-ona: estudos químico, biológico e termoanalítico. 2007. (**Tese de Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos**) – Universidade Federal da Paraíba.

MA, T.H., XU, Z. ; XU, C. ; MCCONNELL, H. ; RABAGO, E.V. ; ARREOLA, G.A. ; ZHANG, H. The improved *Allium/Vicia* root tip micronucleus assay for clastogenicity of environmental pollutants. **Mutation Research**, v. 334, n. 2, p.185-95, 1995.

MAFFEI, F.; FORTI, G.C.; CASTELLI, E.; STEFANINI, G.F.; MATTIOLI, S.; HRELIA, P. Biomarkers to assess the genetic damage induced by alcohol abuse in human lymphocytes. **Mutation Research**, v. 514, n. 1-2, p. 49-58, 2002.

MAGALHÃES, E.; LADEIRA, L.C.A.; GOVÊIA, C.S.; ESPÍNDOLA, B.V. A Dexmedetomidina para Sedação, por Via Venosa, não Interfere com a Duração dos Bloqueios Sensitivo e Motor da Raquianestesia. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 56, n. 1, p. 1 – 7, 2006.

MALLADI, S.M.; BHILWADE, H.N.; KHANA, M.Z.; CHAUBEY, R.C. Gamma ray induced genetic changes in different organs of chick embryo using peripheral blood micronucleus test and comet assay. **Mutation Research**, v. 630, p. 20–27, 2007.

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.

MAROVAC, J. Investigación y desarrollo de nuevos medicamentos: de la molécula al fármaco. **Revista Médica do Chile**, v. 129, n. 1, 2001.

MATEUCA, R.A.; ROELANTS, M.; IARMARCOVAI, G.; AKA, P.V.; GODDERIS, L.; TREMP, A.; BONASSI, S.; FENECH, M.; BERGE-LEFRANC, J.-L.; KIRSCH-VOLDERS, M. *hOGG1*³²⁶, *XRCC1*³⁹⁹ and *XRCC3*²⁴¹ polymorphisms influence micronucleus frequencies in human lymphocytes *in vivo*. **Mutagenesis**, v. 23, n. 1, p. 35–41, 2008.

MINOZZO, R.; DEIMLING, L.I.; SANTOS-MELLO, R. Cytokinesis-blocked micronucleus cytome and comet assays in peripheral blood lymphocytes of workers exposed to lead considering folate and vitamin B12 status. **Mutation Research**, v. 697, p. 24–32, 2010.

MISIK, M.; SOLENSKÁ, M.; MICIETA, K.; MISÍKOVÁ, K.; KNASMÜLLER, S. *In situ* monitoring of clastogenicity of ambient air in Bratislava, Slovakia using the *Tradescantia* micronucleus assay and pollen abortion assays. **Mutation Research**, v. 605, n. 1-2, p. 1-6, 2006.

MONARCA, S.; RIZZONI, M.; GUSTAVINO, B.; ZANI, C.; ALBERTI, A.; FERETTI, D.; ZERBINI, I. Genotoxicity of surface water treated with different disinfectants using *in situ* plant tests. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 41, n. 5, p. 353-9, 2003.

MORALES-RAMIREZ, P.; VALLARINO-KELLY, T.; CRUZ-VALLEJO, V. Kinetics of micronucleated polychromatic erythrocyte (MN-PCE) induction *in vivo* by aneuploidogens. **Mutation Research**, v. 565, n. 1, p. 79-87, 2004.

MORI, T.; ITO, S.; NARITA, M.; SUZUKI, T.; SAWAGUCHI, T. Combined Effects of Psychostimulants and Morphine on Locomotor Activity in Mice. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 96, p. 450 – 458, 2004.

MORRIS, J.; ACHESON, M.; REEVES, M.; MYLES, P.S. Effect of clonidine pre-medication on propofol requirements during lower extremity vascular surgery: a randomized controlled trial. **British Journal of Anaesthesia**, v. 95, n. 2, p. 183–8, 2005.

MOWAFI, H.A.; ALDOSSARY, N.; ISMAIL, S.A.; ALQAHTANI, J. Effect of dexmedetomidine premedication on the intraocular pressure changes after succinylcholine and intubation. **British Journal of Anaesthesia**, v. 100, n. 4, p. 485–9, 2008.

MURGIA, E.; BALLARDIN, M.; BONASSI, S.; ROSSI, A.M.; BARALE, R. Validation of micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes as early cancer risk biomarker in a nested case–control study. **Mutation Research**, v. 639, p. 27–34, 2008.

NAKAMA-KITAMURA, M.; DOETHE, N. Influence of contextual cue on antinociceptive tolerance and facilitation of memory with morphine. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 92, p. 237 – 244, 2003.

NAMIKI, M.; MORI, T.; SAWAGUCHI, T.; ITO, S.; SUZUKI, T. Underlying mechanism of combined effect of methamphetamine and morphine on lethality in mice and therapeutic potential of cooling. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 99, p. 168 – 176, 2005.

OKURA, T.; OZAWA, T.; IBE, M.; TAKI, Y.; KIMURA, M.; KAGAWA, Y.; KATO, Y.; YAMADA, S. Effects of Repeated Morphine Treatment on the Antinociceptive Effects, Intestinal Absorption, and Efflux from Intestinal Epithelial Cells of Morphine. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 32, n. 9, p. 1571—1575, 2009.

OLIVEIRA, S.M.; SILVA, J.B.P.; HERNANDES, M.Z.; DE LIMA, M.C.A.; GALDINO, S.L.; PITTA, I.R. Estrutura, reatividade e propriedades biológicas de hidantoínas. **Química Nova**, v.31, n.3, p. 614-622, 2008.

PATINO-GARCIA, B.; HOEGEL, J.; VARGA, D.; HOEHNE, M.; MICHEL, I.; JAINTA, S.; KREIENBERG, R.; MAIER, C.; VOGEL, W. Scoring variability of micronuclei in binucleated human lymphocytes in a case–control study. **Mutagenesis**, v. 21, n. 3, p. 191–197, 2006.

PATRICK, G.L. An introduction to medicinal chemistry. Oxford University Press. 1.^a ed., 1995. cap. 12, p. 246-280.

PERES, F.; OLIVEIRA – SILVA, J.J.; DELLA – ROSA, H.V.; DE LUCCA, S.R. Desafios ao estudo da contaminação humana e ambiental por agrotóxicos. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 10, p. 27-37, 2005.

PLEWA, M.J.; WAGNER, E.D.; STAVREVA, D.A.; GICHNER, T. Plant activation and its role in environmental mutagenesis and antimutagenesis. **Mutation Research**, v. 350, p. 163–171, 1996.

POTTENGER, L.H.; GOLLAPUDI, B.B. A case for a new paradigm in genetic toxicology testing. **Mutation Research**, v. 678, p. 148–151, 2009.

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

SETH, C.S.; MISRA, V.; CHAUHAN, L.K.S.; SINGH, R.R. Genotoxicity of cadmium on root meristem cells of *Allium cepa*: cytogenetic and Comet assay approach. **Ecotoxicology Environmental Safety**, v. 71, p. 711–716, 2008.

SETH, V.; AHMAD, M.; UPADHYAYA, P.; SHARMA, M.; MOGHE, V. Effect of potassium channel modulators on morphine withdrawal in mice. **Substance Abuse: Research and Treatment**, v. 4, p. 61–66, 2010.

SHIMIZU, N.; KISHIOKA, S.; MAEDA, T.; FUKAZAWA, Y.; DAKE, Y.; YAMAMOTO, C.; OZAKI, M.; YAMAMOTO, H. Involvement of Peripheral Mechanism in the Verapamil-Induced Potentiation of Morphine Analgesia in Mice. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 95, p. 452 – 457, 2004.

SILVA, P. **Farmacologia**. Rio de Janeiro, 7^a ed, Guanabara Koogan, 2006. cap. 47, p.469-482.

SNYDER, S.H. Drug and neurotransmitter receptors in the brain. **Science**, v. 224, n. 4644, p. 22-31, 1984.

SOUZA, S.A. Síntese e Caracterização de Novas Imidazolidinas- 2,4-diona e 2-tioxo-4-ona com potencialidade para atividade biológica. 2010 (**Dissertação de Mestrado em Química na área de concentração em Química Orgânica.**) – Universidade Federal da Paraíba.

STEINKELLNER, H.; MUN-SIK, K.; HELMA, C.; ECKER, S.; MA, T.-H.; HORAK, O.; KUNDI, M.; KNASMUÈLLER, S. Genotoxic effects of heavy metals: comparative investigation with plant bioassays. **Environmental Molecular Mutagen**, v. 31, n. 2, p. 183-91, 1998.

SUDO, R.T. ; CALASANS-MAIA, J.A.; GALDINO, S.L.; LIMA, M.C.A.; ZAPATA-SUDO, G.; HERNANDES, M.Z.; PITTA, I.R. Interaction of morphine with a new $\alpha 2$ -adrenoceptor agonist in mice. **The Journal of Pain**, v. 11, n. 1, p. 71-78, 2010.

SUZUKI, H.; TAKASAWA, H.; KOBAYASHI, K.; TERASHIMA, Y.; SHIMADA, Y.; OGAWA, I.; TANAKA, J.; IMAMURA, T.; MIYAZAKI, A.; HAYASHI, M. Evaluation of a liver micronucleus assay with 12 chemicals using young rats (II): a study by the Collaborative Study Group for the Micronucleus Test/Japanese Environmental Mutagen Society–Mammalian Mutagenicity Study Group. **Mutagenesis**, v. 24, n. 1, p. 9–16, 2009.

TKALEC, M.; MALARIC, K.; PAVLICA, M.; PEVALEK-KOZLINA, B.; VIDAKOVIC-CIFREK, Z. Effects of radiofrequency electromagnetic fields on seed germination, root meristematic cells of *Allium cepa* L. **Mutation Research**, v. 672, n. 2, p. 76–81, 2009.

TODAKA, T.; ISHIDA, T.; KITA, H.; NARIMATSU, S.; YAMANO, S. Bioactivation of Morphine in Human Liver: Isolation and Identification. **Biological Pharmaceutical Bull**, v. 28, n 7, p. 1275-1280, 2005.

UHL, M.; PLEWA, M.J.; MAJER, B.J.; KNASMÜLLER, S. Basic principles of genetic toxicology with an emphasis on plant bioassays, 11-30. In: **J. Maluszynska, M. Plewa (Eds): Bioassays in plant cells for improvement of ecosystem and human health. Wydawnictwo Uniwersytetu Śląskiego**. Katowice, p. 150. Electronic copy only for education purpose. 2003.

U.S. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Guidance for Industry and Review Staff. Recommended Approaches to Integration of Genetic Toxicology Study Results. January 2006.

U.S. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Guidance for Industry. Genotoxic and Carcinogenic Impurities in Drug Substances and Products: Recommended Approaches. December 2008.

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.

VIDAKOVIC-CIFREK, Z.; PAVLICA, M.; REGULA, I.; PAPES, D. Cytogenetic damage in shallot (*Allium cepa*) root meristems induced by oil industry "high-density brines". **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 43, n. 3, p. 284-91, 2002.

VIEIRA, A.M.; SCHNAIDER, T.B.; BRANDÃO, A.C.A.; PEREIRA, F.A.; COSTA, E.D.; FONSECA, C.E.P. Clonidina e Dexmedetomidina por Via Peridural para Analgesia e Sedação Pós-Operatória de Colecistectomia. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 54, n. 4, p. 473 – 478, 2004.

VIJAYALAXMI; KLIGERMAN, A.D.; PRIHODA, T.J.; ULLRICH, S.E. Micronucleus studies in the peripheral blood and bone marrow of mice treated with jet fuels, JP-8 and Jet-A. **Mutation Research**, v. 608, p. 82–87, 2006.

YI, H.; MENG, Z. Genotoxicity of hydrated sulfur dioxide on root tips of *Allium sativum* and *Vicia faba*. **Mutation Research**, v. 537, p.109–114, 2003.

ZALACAIN, M.; SIERRASESÚMAGA, L.;PATIÑO, A. El ensayo de micronúcleos como medida de inestabilidad genética inducida por agentes genotóxicos. **Anales del Sistema Sanitario de Navarra**, v. 28, n. 2, p. 227-236, 2005.

Capítulo 1

- 4. Artigo I** – Avaliação da toxicidade e citotoxicidade da morfina e do seu co-tratamento com o composto 3-(2-cloro-6-fluorobenzil)imidazolidina-2,4-diona (PT-31) no teste *Allium cepa* e em *Mus musculus*

Artigo submetido à revista *Mutation Research*

Avaliação da toxicidade e citotoxicidade da morfina e do seu co-tratamento com o composto 3-(2-cloro-6-fluorobenzil)imidazolidina-2,4-diona (PT-31) no teste *Allium cepa* e em *Mus musculus*

**SAMPAIO, F.A.^{1,2}; LUCIO NETO, M.P.^{1,2}; LEITÃO, J.M.S.R.^{1,2}; DANTAS, A.F.^{1,2};
VIEIRA, D.C.G.^{1,2}; CARVALHO, R.M.¹; CAVALCANTE, A.A.C.M.^{1,2}; LOPES,
J.A.D.²**

¹Laboratório de Genética Toxicológica da Universidade Federal do Piauí, Brasil.

²Departamento de Farmácia – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas – Universidade Federal do Piauí, Brasil.

Resumo

A morfina é o composto padrão utilizado no manejo clínico da dor severa e crônica. Ela atua no Sistema Nervoso Central (SNC) e por isso é também responsável por uma vasta gama de efeitos adversos indesejados. Visando minimizar esses efeitos, tem-se buscado novos compostos com efeitos analgésicos sobre o SNC, devido ao número limitado de drogas disponíveis. Os agonistas α_2 -adrenérgicos têm sido utilizados na modulação da dor, um novo composto sintetizado, o 3-(2-cloro-6-fluorobenzil)imidazolidina-2,4-diona, ou PT-31, mostrou atividade analgésica dose-dependente e ação sinérgica com a morfina. Este estudo busca avaliar a toxicidade e a citotoxicidade da morfina e do seu co-tratamento com o PT-31, por meio dos testes *Allium cepa* e do teste de micronúcleo em *Mus musculus*. Bulbos da espécie *A. cepa* foram colocados em contato com soluções-teste de morfina e desta com o PT-31 nas concentrações de 0,25; 0,5 e 1 mg/mL, além dos controle negativo (solvente) e controle positivo (sulfato de cobre 0,0006 mg/mL). Após 72 horas de exposição, as raízes foram removidas e mensuradas. 5000 mil células por concentração foram examinadas ao microscópio (objetiva de 100X). No teste de micronúcleos os animais receberam intraperitonealmente, soluções de morfina (1 mg/kg) e do co-tratamento com PT-31 nas concentrações de 0,25; 0,5 e 1,0 mg/kg de peso, além do controle negativo (solvente) e controle positivo (ciclofosfamida 50 mg/kg). O teste de *A. cepa* revelou toxicidade na maior concentração nos dois tratamentos, citotoxicidade na concentração de 1,0 mg/mL, para a morfina, e nas de 0,5 e 1,0 mg/mL para o co-tratamento. Houve citotoxicidade (células BN) apenas em animais machos tratados com morfina e no co-tratamento somente na maior concentração, para machos e fêmeas. Entretanto, as concentrações testadas foram citotóxicas para a relação EPC/ENC, em ambos tratamentos, exceto em machos na menor concentração.

Palavras-chave: morfina, agonista α_2 -adrenoceptor, *Allium cepa*, toxicidade, citotoxicidade.

Abstract

Morphine is the standard compound used in the clinical management of severe and chronic pain. It acts on the Central Nervous System (CNS) and is therefore also responsible for a wide range of unwanted side effects. In order to minimize these effects, researchers have tried to find novel compounds with analgesic effects on the CNS, due to the limited number of drugs available. The agonists α_2 -adrenergic have been used in pain modulation based on that, a new compound, 3-(2-chloro-6-fluorobenzyl)imidazolidine-2,4-dione, or PT-31, showed analgesic activity dose-dependent and synergistic action with morphine. This study search evaluate the toxicity and cytotoxicity of morphine and of its co-treatment with the PT-31, by means of tests *Allium cepa* and micronucleus test in *Mus musculus*. Bulbs of the species *A. cepa* were placed in contact with solutions-test of morphine and this with the PT-31 in concentrations of 0.25, 0.5 and 1 mg/mL, beyond the negative control (water dechlorinated and DMSO) and positive control (sulfate copper 0.0006 mg/mL). After 72 hours of exposure, the roots were removed and measured. 5000 cells per bulb were examined under the microscope (objective at 100X). In micronucleus test the animals received intraperitoneally solutions morphine (1 mg/kg) and of co-treatment with PT-31 in concentrations of 0.25, 0.5 and 1.0 mg/kg of weight, beyond the control negative (solvent) and positive control (cyclophosphamide 50 mg/kg). The test of *A. cepa* showed toxicity at the highest concentration in both treatments, cytotoxicity at the concentration 1.0 mg/mL, for morphine, and in of 0.5 and 1.0 mg/mL for co-treatment. There cytotoxicity (BN cells) only in male animals treated with morphine and co-treatment only at the higher concentration, for males and females. However, the tested concentrations were cytotoxic to the ratio PCE/NCE in both treatments, except in males at lower concentration.

Key words: morphine, α_2 -adrenoceptor agonist, *Allium cepa*, toxicity, cytotoxicity.

1. Introdução

Os opióides têm sido utilizados no tratamento da dor há anos e ainda hoje são fundamentais. Entre eles, a heroína e a morfina já têm seus efeitos bem esclarecidos simulando as ações de substâncias naturais conhecidas como peptídios opióides endógenos ou endorfinas no cérebro e em regiões da medula. Eles agem nos neurônios locais e circuitos intrínsecos envolvidos na modulação da dor provocando analgesia e outros efeitos terapêuticos, como também, efeitos colaterais indesejáveis (GILMAN et al., 2003; KATZUNG, 2003).

A morfina, 7,8-didesidro-4,5 α -epoxi-17-metilmorfinan-3,6 α -diol, é um potente analgésico e considerada o composto padrão-ouro para o tratamento da dor sistêmica aguda e crônica. No entanto, seus efeitos colaterais, como náuseas, retenção urinária, a dependência à droga e depressão respiratória podem ser significativos. Novos compostos são necessários, com maior potência e menos efeitos colaterais do que a morfina, ou drogas que podem aumentar sua atividade antinociceptiva. Experimentos realizados anteriormente onde se combinou a morfina com agonistas dos α_2 -adrenoceptores mostraram resultados promissores (SUDO et al., 2010; TODAKA et al., 2005).

Várias classes de drogas, tais como: barbitúricos, opióides, benzodiazepínicos, entre outras, têm sido utilizadas isoladas ou em associação a fim de se obter sedação e analgesia em pacientes nas unidades de terapia intensiva (UTI). Entretanto, observou-se que apesar de ótimos analgésicos ou sedativos, estes fármacos não alcançam um ponto de equilíbrio entre sedação e analgesia apropriados. Muitas destas drogas apresentam efeitos adversos muito acentuados, limitando seu uso, o que faz necessário o desenvolvimento de novos agentes analgésicos que possuam menos efeitos adversos. Os α_2 -agonistas têm sido extensivamente estudados para atender a esta finalidade, tendo como protótipo a clonidina, além da xilazina e medetomidina. Mais recentemente foi desenvolvida uma droga altamente seletiva dos receptores α_2 -adrenérgicos, a dexmedetomidina, que tem como característica, além da alta seletividade pelos receptores, o fato de poder ser usada em infusão contínua. Podemos destacar suas aplicações como medicação pré-anestésica, adjuvante da anestesia geral ou regional e analgésico (BAGATINI et al., 2002).

Sudo et al. (2010) detectaram a atividade antinociceptiva de uma nova molécula agonista dos receptores α_2 -adrenérgicos, o 3-(2-cloro-6-fluorobenzil)imidazolidina-2,4-diona ou PT-31, derivado da imidazolidina-2,4-diona, onde se verificou que através da administração intraperitoneal desta droga em camundongos houve produção de antinocicepção dose-dependente, no teste da placa quente. A associação do PT-31 com a

morfina foi capaz de potencializar a atividade antinociceptiva e o sinergismo desses dois compostos foi demonstrado através da análise de isoblograma. Porém, ainda é necessário estabelecer um potencial clínico para o PT-31, através de trabalhos complementares, incluindo estudos de toxicidade.

As autoridades reguladoras da Europa, EUA e Japão recomendam que estudos de genotoxicidade e carcinogenicidade sejam realizados antes do pedido de aprovação de comercialização de produtos farmacêuticos, este procedimento visa avaliar o risco potencial de efeitos genotóxicos e cancerígenos para os seres humanos. Uma bateria de testes padrão foi proposta como parte das diretrizes atuais para testes de genotoxicidade de produtos farmacêuticos e consiste de: (a) um teste de mutação genética em bactérias, (b) um teste de avaliação citogenética de danos cromossômicos em células de mamíferos *in vitro* ou ensaio de mutação genética em células de mamíferos *in vitro* e (c) um teste *in vivo* para lesões cromossômicas usando células hematopoiéticas de roedores (BRAMBILLA; MARTELLI, 2009).

As plantas superiores têm sido propostas como organismos de bioensaio para a detecção de substâncias mutagênicas e genotóxicas no meio ambiente. Vários sistemas de teste de plantas já em uso são considerados como sensíveis e confiáveis como testes de curto prazo. *Allium cepa* é uma dessas plantas, que tem sido utilizada em diversos estudos para detectar aberrações cromossômicas induzidas por substâncias químicas (RANK; NIELSEN, 1993). Este teste é um dos melhores sistemas de ensaio estabelecidos, utilizado rotineiramente devido à sua sensibilidade e boa correlação com sistemas teste em animais (GRANT, 1994; TKALEC et al., 2009). O teste é fundamentado na avaliação dos efeitos citotóxicos e potencial genotóxico medido por diferentes mecanismos genéticos (aneugenicidade e clastogenicidade) através do crescimento das raízes, bem como a gravação de anormalidades mitóticas e aberrações cromossômicas em pontas de raízes (MA et al., 1995; MONARCA et al., 2003; TKALEC et al., 2009).

Estes testes provaram ser de grande valia, uma vez que combinam uma alta sensibilidade para detectar agentes mutagênicos em diferentes ambientes e uma grande capacidade de avaliar diferentes mecanismos genéticos, como mutações pontuais, aberrações cromossômicas em células individuais em órgãos como folhas, pólen e endosperma (BOLLE et al., 2004; LEME; MARIN-MORALES, 2008). O teste de *Allium* implica a germinação de bulbos de cebola, as raízes, mas pode ser obtido para análise, também, por germinação das sementes (TKALEC et al., 2009).

O teste de *Allium* introduzido por Levan em 1938, foi posteriormente proposto como um método padrão para o ensaio de substâncias químicas e também no monitoramento

ambiental e análise de toxicidade de águas residuais e água do rio, pois as células mitóticas meristemáticas das raízes dessa planta são indicadores para a detecção de clastogenicidade de poluentes ambientais, especialmente para o monitoramento de contaminantes da água e do solo (MIGID; AZAB; IBRAHIM, 2007; RANK; NIELSEN, 1993; TKALEC et al., 2009; VIDA KOVIC-CIFREK et al., 2002). Desde a introdução por Levan desta espécie no sistema de teste, o protocolo do teste *Allium* foi melhorado, a fim de realizar uma melhor avaliação do complexo por contaminações ambientais. Após ajustes, este teste se tornou mais popular e sua sensibilidade na detecção de danos genéticos induzidos por poluentes ambientais foi aumentada (LEME; MARIN-MORALES, 2008).

Devido à necessidade de se conhecer os produtos químicos que são ativos *in vitro* são também biodisponíveis e ativos nos organismos vivos através de técnicas de exposição convencional, foram desenvolvidos testes de MN *in vivo*, padronizados para vários órgãos/sistemas de tecido, sendo o mais utilizado o sistema hematopoiético (CURREN et al., 2005). A medida de instabilidade genética induzida por compostos genotóxicos, além da presença de mutações em genes-alvo associados com fatores de risco, como por exemplo, o tabagismo que é detectado pelo aumento na formação de micronúcleos, sendo facilmente visível em cultura de células eucarióticas (ZALACAIN; SIERRASESÚMAGA; PATIÑO, 2005).

No ensaio de micronúcleos em mamíferos, além da avaliação destes, pode ser observada a relação Eritrócitos Policromáticos/Eritrócitos Normocromáticos (EPC/ENC) em animais tratados com o agente teste e comparados ao controle do veículo, obtendo-se desta forma um estudo da citotoxicidade de compostos (KRISHNA; HAYASHI, 2000). Outro parâmetro que pode ser avaliado na determinação do perfil citotóxico de um composto é a análise de células binucleadas (BN) (HOLLAND et al., 2008). A medição da frequência destas células é um método simples de se medir a toxicidade de um tratamento, podendo ser correlacionado com outros biomarcadores (DRAFT GUIDELINE, 2004).

O objetivo deste trabalho é determinar a toxicidade (através do crescimento das raízes) e a citotoxicidade (pela determinação do índice mitótico – IM) da morfina e do co-tratamento com o PT-31 pela influência destas substâncias sobre as células meristemáticas de pontas de raiz de *Allium cepa*, nas concentrações de 0,25; 0,5 e 1,0 mg/mL. Além do estudo da citotoxicidade, medida através da presença de células BN e pelo estudo da relação EPC/ENC, realizados na medula óssea de camundongos submetidos aos tratamentos com a morfina e ao co-tratamento com o PT-31, nas concentrações de 0,25; 0,5 e 1,0 mg/kg, com a aplicação do teste de micronúcleos em *Mus musculus*.

2. Materiais e métodos

2.1. Drogas utilizadas

A morfina foi adquirida de Cristália – Produtos Químicos Farmacêuticos LTDA (São Paulo-SP) – na concentração 1 mg/mL, em frascos de 2 mL. O composto PT-31 foi gentilmente cedido pelo Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil, para realização dos testes pré-clínicos.

2.2. Teste de *Allium cepa*

Para a realização do teste *A. cepa* seguiu-se o protocolo definido primeiramente por Fiskesjö (1985), com algumas modificações, conforme descrito por Carvalho et al. (2011).

2.2.1. Condições do ensaio e tratamentos

Foram utilizadas cebolas (*Allium cepa*) de tamanho médio e uniforme (diâmetro: 20 a 30 mm e peso: 5 a 10 g), com catáfilos externos brancos, mesmas origens, não germinados e saudáveis, adquiridas comercialmente do Mercado Central de Teresina-PI, Brasil, sendo mantidas em local livre de umidade e ao abrigo da luz. Os grupos experimentais utilizados eram compostos de diluições da morfina e da morfina com o composto PT-31 nas doses de 0,25; 0,5 e 1,0 mg/mL, além de uma solução de DMSO 0,5% (solvente do PT-31). Como controle negativo utilizou-se água desclorificada e para o controle positivo, sulfato de cobre (0,0006 mg/mL). Foram distribuídos 5 bulbos para cada concentração a ser testada, tendo-se o cuidado de retirar com auxílio de bisturi as raízes secas e camadas externas secas ou com mofo, atentando-se para que a área radicular não fosse danificada. Em seguida, retirou-se o parênquima central da coroa de brotamento (fazendo-se uma pequena incisão circular) para aumentar a absorção das soluções, a uniformidade de brotamento e o crescimento das raízes.

Os bulbos foram lavados em água corrente, por cerca de 20 minutos. Como muitas cebolas foram iniciadas ao mesmo tempo, os bulbos descascados foram colocados em água fresca durante o continuado procedimento de limpeza a fim de que se reduzissem os efeitos de possíveis inibidores do brotamento. Os bulbos destes grupos foram colocados em recipientes de vidro, previamente esterilizados, com capacidade de 5 mL, deixando a área radicular diretamente em contato com os líquidos-teste (Figura 1). Os experimentos foram realizados em temperatura relativamente constante de cerca de 20 ± 2 °C e protegido contra a luz direta do sol. Os líquidos-teste foram preparados no momento do uso na mesma temperatura. A

morfina foi diluída em água destilada, enquanto o PT-31 foi dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO). Por fim as substâncias foram diluídas em água de torneira desclorificada. Foi utilizada a versão modificada do teste de *Allium*, previamente descrito por Fiskesjö (1985), onde as cebolas foram colocadas diretamente nos líquidos de teste. As raízes foram cultivadas por 72 h e em seguida foram medidas com o auxílio de régua, desprezando-se as que cresceram acima de 2,0 cm. As pontas de raízes foram então utilizadas para análise citogenética. As raízes foram fixadas em solução de Carnoy (etanol 99%:ácido acético glacial - 3:1) por 24 h. A seguir foram colocadas em álcool 70% e refrigeradas até o momento da preparação das lâminas. O teste foi conduzido em temperatura controlada de 20 ± 2 °C, sobre bancada sem vibrações e sem iluminação direta.



Figura 1: Bulbos de cebolas com a área radicular em contato com a solução-teste (A) em recipientes de vidro e 72 h após tratamento, mostrando as raízes crescidas (B).

Para o preparo das lâminas, as raízes fixadas foram lavadas com água destilada 3 vezes por 5 minutos, cada processo, para a retirada dos resíduos de fixador. Em seguida foram submetidas à hidrólise ácida (HCl a 1 mol/L por 11 minutos), seguido de um novo banho em água destilada a temperatura ambiente. Com o auxílio de uma pinça de ponta fina, secou-se as raízes em papel de filtro; depois transferiu-se as raízes para frascos escuros (âmbar), contendo o reativo de Schiff, por aproximadamente 2 horas. Passado este tempo, as raízes foram lavadas com água destilada, até a total retirada do corante. Para a confecção das lâminas colocou-se as raízes sobre elas e separou-se a região meristemática, adicionou-se uma gota de carmim acético 2%, cobrindo-se depois com uma lamínula. Em seguida, pressionou-se com auxílio do polegar, os locais onde estavam dispostos os materiais seccionados. Por fim, levou-se para análise em microscópio, usando aumento de 1000X, seguindo-se a recomendação de se usar lente de imersão. Foram avaliadas 5000 células por tratamento (1000 células/lâmina).

A toxicidade das substâncias testadas foi analisada através do crescimento das raízes. O índice mitótico (IM) e as frequências de fases da mitose (prófase, metáfase, anáfase e

telófase) foram utilizadas como parâmetros para a determinação de efeitos citotóxicos (TKALEC et al., 2009). O IM foi calculado para cada tratamento utilizando o número de células em divisão/100 células (TÜRKOGLU, 2007). E para a taxa de divisão celular utilizou-se o índice mitótico (IM) por 1000 (IVANOVA; STAIKOVA; VELCHEVA, 2005; SETH et al., 2008).

2.3. Análise da relação EPC/ENC e de células binucleadas com a aplicação do teste de micronúcleos em camundongos

O teste de micronúcleos (MN) foi realizado conforme recomendações de Flores e Yamaguchi (2008), com algumas modificações.

2.3.1. Animais e tratamentos

Para a realização dos experimentos foram utilizados camundongos da espécie *Mus musculus*, 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 desta instituição (Protocolo nº 0107/10). Os animais foram mantidos sem restrição alimentar e de ingestão de líquidos, durante todo o experimento, com adaptação em sala climatizada a 22 ± 2 °C e umidade de 50-60%, com ciclo claro/escuro de 12 h e em caixas de polipropileno adequadas a sua manutenção, cinco dias antes da realização dos testes. Em todos os experimentos realizados, utilizou-se 10 (dez) camundongos por grupo, sendo 05 (cinco) machos e 05 (cinco) fêmeas, que foram tratados através da administração intraperitoneal de morfina (1 mg/kg) e morfina + PT-31, nas concentrações de 0,25; 0,5 e 1,0 mg/kg, além de um controle com DMSO 0,5% (solvente utilizado na diluição do PT-31), um controle negativo (água desclorificada) e um controle positivo (ciclofosfamida, 25 mg/kg). As concentrações finais de todas as soluções foram ajustadas para 2,5 mL/kg para a administração nos camundongos.

As substâncias-teste foram administradas nos animais de forma aguda pela via intraperitoneal e a frequência de EPC, ENC e células BN determinadas em lâminas preparadas a partir de medula óssea colhidas 24 h após o tratamento (KRISHNA; HAYASHI, 2000). Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, os fêmures foram dissecados, a medula óssea extraída, misturada com 2 mL de soro fetal bovino e preparado um esfregaço de medula óssea (duas lâminas por animal). Os esfregaços foram fixados com metanol:ácido acético (3:1) e coradas com uma mistura de azul de metileno (Giemsa:May-Grünwald) e 0,2 mol/L de tampão fosfato (pH 5,8), na proporção de 60:30:10,

respectivamente. As lâminas foram codificadas e examinadas em microscópio óptico comum com aumento de 1000X.

2.3.2. Critério de identificação

Para cada animal, a relação EPC/ENC foi calculada, como um índice de citotoxicidade à medula, essa proporção foi determinada pela contagem de um total de 1000 células/lâmina, perfazendo-se um total de 2000 células por animal (duas lâminas/animal) de conforme recomendado por Guzmán et al. (2008). Foram contadas apenas células apresentando citoplasma íntegro. Na avaliação da citotoxicidade considerou-se, ainda, a presença de células binucleadas (BN), como um tipo de anormalidade nuclear, de acordo com Holland et al. (2008).

2.4. Análise estatística

A análise estatística foi realizada com o software estatístico GraphPad Prism 5.0, através de estatística descritiva e ANOVA não paramétrica, com o teste de Tukey, que faz a comparação do tratamento entre os grupos do sistema teste, no sistema teste *Allium cepa*, enquanto que no teste em *Mus musculus*, utilizou-se o teste de Dunnet, com níveis de significâncias de * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

3. Resultados e discussão

Na análise da toxicidade pelo crescimento das raízes de *Allium cepa*, somente a maior concentração (1 mg/mL) no tratamento com a morfina, apresentou resultado significativo ($p < 0,001$), com inibição do crescimento das raízes de cerca de 69% em relação ao controle negativo, enquanto o controle positivo inibiu em torno de 55%. De forma similar, o co-tratamento (morfina + PT-31) também mostrou resultado significativo ($p < 0,001$) apenas na maior concentração (1 mg/mL), com cerca de 46% de inibição de crescimento em relação ao controle negativo, sugerindo toxicidade para as substâncias testadas (Tabela 1).

Conforme estudo realizado em *A. cepa*, por Lucio Neto et al. (2011) utilizando o composto PT-31, quando se avaliou o crescimento das raízes os resultados encontrados foram de toxicidade na maior dose testada (5 mg/mL). A partir destes dados, podemos notar uma semelhança com os achados em nossos experimentos, onde a maior dose testada apresenta sinais de toxicidade (Tabela 1).

O sistema *A. cepa* foi utilizado para avaliação citogenética de exposição à morfina e ao co-tratamento da morfina com o PT-31, uma vez que este sistema de teste tem uma longa história de uso e que compara favoravelmente com outros organismos de ensaio convencional em termos de sensibilidade (ausência de falsos negativos), especificidade (falsos positivos) e valor preditivo. Um dos parâmetros citogenéticos comumente utilizados, o crescimento das raízes foi analisado a fim de estimar os possíveis efeitos das drogas em nível macroscópico, uma vez que este parâmetro tem sido muitas vezes utilizado como indicador conveniente e sensível da poluição ambiental como indicativo de toxicidade (RANK; NIELSEN, 1993; STEINKELLNER et al., 1998; TKALEC et al., 2009; VIDAKOVIC-CIFREK et al., 2002).

Tabela 1: Tamanho das raízes (média \pm desvio padrão) em espécimes de *Allium cepa* expostos à morfina e ao co-tratamento com o composto PT-31, nas concentrações de 0,25; 0,5 e 1,0 mg/mL

Grupos	Tamanho das raízes (cm)	% de inibição do crescimento
Controle negativo ^a	0,56 \pm 0,13	0,00
Controle positivo ^b	0,25 \pm 0,06 ***	55,36 ***
DMSO 0,5% ^c	0,63 \pm 0,13	12,5
Morfina 0,25 mg/mL	0,42 \pm 0,01	25,00
Morfina 0,5 mg/mL	0,44 \pm 0,14	21,43
Morfina 1,0 mg/mL	0,17 \pm 0,04***	69,64 ***
Morfina + PT-31 0,25 mg/mL	0,51 \pm 0,13	8,93
Morfina + PT-31 0,5 mg/mL	0,40 \pm 0,16	28,57
Morfina + PT-31 1,0 mg/mL	0,30 \pm 0,11***	46,43 ***

^a Água desclorificada.

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

^c Solvente do PT-31.

***p < 0,001, ANOVA teste de Tukey.

A morfina apresentou indícios de citotoxicidade, pela avaliação do IM, somente na maior concentração testada (1 mg/mL), apresentando resultado significativo (p < 0,001) em relação ao controle negativo, com cerca de 63% de inibição da divisão celular. No co-tratamento (morfina + PT-31), as concentrações de 0,5 e 1,0 mg/mL, mostraram resultados significativos, com valores em torno de 32 e 68% de inibição de divisão celular, respectivamente (Tabela 2).

Tabela 2: Índice Mitótico (média \pm desvio padrão) em espécimes de *Allium cepa* expostos à morfina e ao co-tratamento com o PT-31 nas concentrações de 0,25, 0,5 e 1,0 mg/mL

Grupos	Índice Mitótico (%)	% de inibição do Índice Mitótico
Controle negativo ^a	76,70 \pm 5,52	-
Controle positivo ^b	37,00 \pm 8,07***	52,00***
DMSO 0,5% ^c	78,40 \pm 4,41	2,22
Morfina 0,25 mg/mL	76,08 \pm 4,12	0,08
Morfina 0,5 mg/mL	68,45 \pm 3,79	10,75
Morfina 1,0 mg/mL	28,34 \pm 1,87***	63,05***
Morfina + PT-31 0,25 mg/mL	65,78 \pm 5,36	14,23
Morfina + PT-31 0,5 mg/mL	52,40 \pm 7,19***	31,68***
Morfina + PT-31 1,0 mg/mL	24,40 \pm 1,14***	68,18***

^a Água desclorificada.

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

^c Solvente do PT-31.

***p < 0,001, ANOVA Teste de Tukey.

A citotoxicidade é observada através do índice mitótico (IM) (SMAKA-KINCL et al., 1996). Onde alterações do IM em células meristemáticas de *A. cepa* mostra exposição a agentes citotóxicos, sendo um teste sensível para estimar os níveis de poluição (LEME; MARIN-MORALES, 2009).

É possível que a alta concentração de alguns compostos químicos tenha um efeito (inibitório ou estimulatório) no ciclo celular, como tem sido mostrado para extratos de *Alpinia mutans* e *Pogostemon heyneanus* nas células de raízes de *Allium cepa* (FACHINETTO et al., 2007). Os estudos realizados por diversos autores apontam o teste *Allium* como uma ferramenta útil para a detecção de substâncias potencialmente genotóxicas utilizadas em programas de rastreio de água, na área ambiental e também para substâncias químicas (IVANOVA; STAIKOVA; VELCHEVA, 2005).

A citotoxicidade definida como uma diminuição do índice mitótico, (SMAKA-KINCL, 1996) em sistema teste vegetal *in vivo*, como o *Allium cepa*, estão validados por vários pesquisadores que realizam de forma conjunta o teste animal *in vitro* e os resultados obtidos são similares. Segundo Fiskesjö (1985) mesmo que o metabolismo vegetal seja diferente, o sistema teste de *Allium cepa* é um excelente parâmetro de análise citotóxica (FACHINETTO et al., 2007). As células vegetais normalmente possuem as enzimas

importantes e necessárias para a ativação de certos promutagenes, isso tem sido demonstrado ser o caso para as células da ponta da raiz de *Allium* (FISKESJÖ, 1985; PLEWA, 1996). A inibição do IM pode se dar pelo bloqueio do ciclo mitótico, que pode resultar em um prolongamento do período G₂ ou pela inibição da síntese do DNA. A diminuição do IM ainda está relacionada com anormalidades cromossômicas (RASGELE; KAYMAK, 2006).

Um aumento do número anáfases prematuras, não os grupos anáfase completamente separados, pode indicar uma menor velocidade de divisão celular. O aumento do índice mitótico não parece estar relacionado ao aumento da atividade celular proliferativa, mas pode ser uma consequência de mitose atrasada (TKALEC et al, 2009; UHL et al., 2003).

Este modelo de sistema radicular das células de *A. cepa* é comumente usado como um teste para investigar os fatores de poluição ambiental, a toxicidade de compostos químicos e a avaliação de propriedades anticancerígenas potenciais. Possui muitas vantagens já que as raízes de cebola são fáceis de preparar, possui células meristemáticas bastante homogêneas, com poucos cromossomos (2n=16), que são muito longos, bem visíveis e facilmente ficam corados, facilitando a avaliação do dano cromossômico e/ou distúrbios no ciclo de divisão celular, incluindo um eventual risco de aneuploidias. O teste permite a investigação dos mecanismos universais de células vegetais e extrapolação meristemática em células animais (IVANOVA; STAIKOVA; VELCHEVA, 2005; KURAS et al., 2006).

Os dados obtidos em experimentos realizados em *A. cepa* utilizando o PT-31, por Lucio Neto et al. (2011) apresentaram citotoxicidade para este composto, com resultados estatisticamente significantes em relação ao controle positivo na maior dose testada (5 mg/mL).

A morfina é conhecida por gerar estresse oxidativo assim como os peptídeos opióides. Tanto a morfina como outros opióides podem gerar espécies reativas de oxigênio (EROs), que podem causar danos ao DNA. Portanto, a genotoxicidade da morfina pode ser mediada através EROs. Também existem relatos de que a morfina é capaz de inibir a GSH (glutathiona hepática) e este efeito também pode contribuir para a sua atividade genotóxica, uma vez que enzimas como GSH, SODs (superóxido desmutase) entre outras, têm a capacidade de proteger contra danos no DNA. Esse efeito inibitório da morfina em GSH periférica foi descrita como mediada por receptores centrais μ . No caso da pentazocina que é incapaz de suprimir a GSH, mostrada em estudo anterior, poderia explicar a ausência de genotoxicidade observada. (PULI; PATIL, 2007).

Kao et al. (2001) afirmam que exposições crônicas à morfina induzem citotoxicidade no SNC, além de formação de óxido nítrico (NO), e que ela pode atuar de forma sinérgica

potencializando esta ação mediada por receptores NMDA. Gerando como consequência sérios efeitos adversos nos neurônios, sobretudo em células corticais.

A noscapina, um antitussígeno opióide, foi capaz de induzir aneuploidia *in vitro*, porém não há relatos de genotoxicidade em estudos *in vivo*. A pentazocina, um agonista parcial κ , apresentou atividade citotóxica e antitumoral fraca. Uma característica ininteressante é que as drogas citotóxicas são geralmente genotóxicas (PULI; PATIL, 2007). A noscapina se liga a tubulina e afeta a montagem dos microtúbulos, assim, pode atrasar a mitose, isso pode mediar a sua genotoxicidade. Independentemente do mecanismo de ação, estudos mostraram que a morfina e noscapina são genotóxicos, devendo ser utilizados com cautela na prática clínica (PULI; PATIL, 2007).

Ocasionalmente, propriedades genotóxicas da substância ativa, de uma determinada classe farmacológica pode ser extrapolada para outras substâncias da mesma classe. Nestes casos não há necessidade de estudos de genotoxicidade, principalmente se outros ensaios de toxicidade já tiverem sido realizados (AARDEMA et al., 2008).

A clonidina e o guanabenz não foram carcinogênicos em testes que utilizaram ratos e camundongos; a clonidina também apresentou resultados negativos em ensaios de genotoxicidade. Guanfacina não mostrou provas de atividade carcinogênica. Metildopa, o mais extensivamente testado, mostrou resultados contrastantes nos ensaios, com genotoxicidade positiva, porém não foi carcinogênica em camundongos e ratos (BRAMBILLA; MARTELLI, 2006).

A mutagenicidade e clastogenicidade da dexmedetomidina foi avaliada usando a bateria padrão de testes *in vitro* e *in vivo*: teste de Ames, teste de reparo do DNA, ensaio de mutação genética em células de linfoma de rato, teste de micronúcleo em ratos. Todos estes estudos tiveram resultados negativos (EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 2011).

Quando se analisou a frequência de células BN, foram observadas diferenças significativas ($p < 0,001$) do controle positivo em relação ao controle negativo no tratamento com a morfina, conforme mostrado no teste de Dunnet, para incidência de células BN, assim como, em animais machos que também apresentaram resultados significativos em relação ao controle negativo (Tabela 3).

Quando se analisou as células BN para o co-tratamento (morfina + PT-31), obteve-se sinais de citotoxicidade para o controle positivo e para a concentração de 1 mg/kg, que se mostraram estatisticamente significantes ($p < 0,001$) em relação ao controle negativo, estes dados foram observados tanto em animais fêmeas como em machos (Tabela 4).

Tabela 3: Determinação de células BN e da relação EPC/ENC (média±desvio padrão), por gênero, em células de medula óssea de camundongos, após 24 horas da administração intraperitoneal de morfina (1,0 mg/kg).

Grupo	Binucleadas	Binucleadas %	Relação (EPC/ENC ^a) Por grupo
Controle negativo ^b	18,60 ± 4,16	0,93 ± 0,21	2,20 ± 0,84
Controle positivo ^c	158,0 ± 25,88***	7,9 ± 1,29***	0,78 ± 0,23**
Morfina 1,0 mg/kg macho	84,60 ± 44,10**	4,23 ± 2,20**	0,87 ± 0,47**
Morfina 1,0 mg/kg fêmea	18,20 ± 6,76	0,87 ± 0,34	0,78 ± 0,17**

^aEPC: eritrócitos policromáticos, ENC: eritrócitos normocromáticos.

^bÁgua desclorificada.

^cCiclofosfamida 25 mg/kg.

Resultados para 2000 células por animal (para cada grupo n=10 - cinco machos e cinco fêmeas).

**p < 0,01, ANOVA- Teste de Dunnet.

***p < 0,001 ANOVA- Teste de Dunnet.

Tabela 4: Determinação de células BN e da relação EPC/ENC (média ± desvio padrão), por gênero em células da medula óssea de camundongos, após 24 horas da administração intraperitoneal de morfina + PT-31 nas concentrações de 0,25; 0,5 e 1,0 mg/kg

Grupo	Gênero	Binucleadas	Binucleadas %	Relação (EPC/ENC) ^a Por grupo
Controle negativo ^b	Machos	18,60 ± 4,16	0,93 ± 0,21	1,44 ± 0,41
	Fêmeas	13,20 ± 4,81	0,66 ± 0,24	2,20 ± 0,84
DMSO 0,5% ^c	Machos	12,00 ± 2,83	0,60 ± 0,14	1,60 ± 0,33
	Fêmeas	6,60 ± 2,88	0,33 ± 0,14	1,60 ± 0,20
Controle positivo ^d	Machos	158,00 ± 25,88***	7,9 ± 1,29***	0,28 ± 0,14***
	Fêmeas	121,00 ± 19,49***	6,05 ± 0,97***	0,78 ± 0,23
Morfina+PT 0,25 mg/kg	Machos	12,20 ± 2,28	0,61 ± 0,11	0,96 ± 0,56
	Fêmeas	7,60 ± 3,65	0,38 ± 0,18	0,19 ± 0,06***
Morfina+PT 0,5 mg/kg	Machos	4,40 ± 2,07	0,22 ± 0,10	0,35 ± 0,32***
	Fêmeas	7,20 ± 2,59	0,36 ± 0,13	0,17 ± 0,10***
Morfina+PT 1,0 mg/kg	Machos	69,60 ± 27,39***	3,48 ± 1,37***	0,23 ± 0,08**
	Fêmeas	115,40 ± 17,69***	5,77 ± 0,88***	1,13 ± 0,43**

^aEPC: eritrócitos policromáticos, ENC: eritrócitos normocromáticos.

^bÁgua desclorificada.

^cSolvente do PT-31.

^dCiclofosfamida 25 mg/kg.

Resultados para 2000 células por animal (para cada grupo n = 10 - cinco machos e cinco fêmeas).

***p < 0,001, ANOVA- Teste de Dunnet.

A medição da frequência de células binucleadas em relação às células mononucleadas dentro de uma cultura também fornece um método simples de medir a citotoxicidade de um tratamento (DRAFT GUIDELINE, 2004).

Foi descrito que vários tipos celulares têm sido associados à citotoxicidade ou eventos genotóxicos secundários, os tipos de células mais comuns relacionados com o processo de diferenciação incluem: células com cromatina picnótica condensada, cariorrexe, cariólise, bud nuclear e células binucleadas (HOLLAND et al., 2008). A Figura 2 mostra as fotomicrografias de células binucleadas encontradas neste experimento.

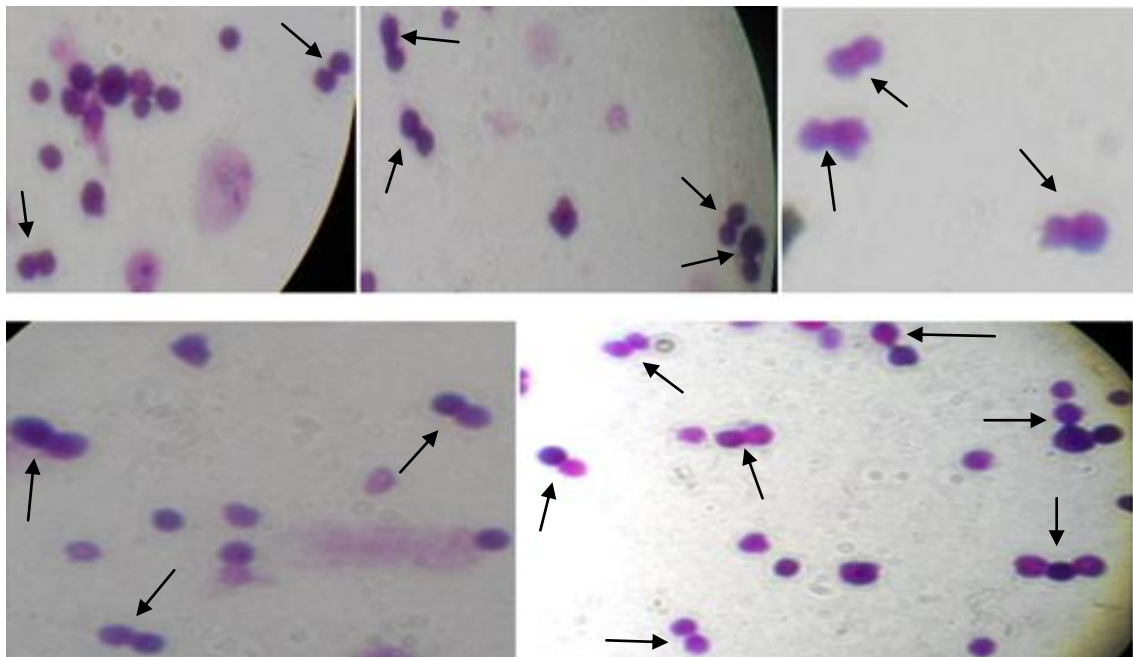


Figura 2: Fotomicrografias de células BN encontradas em medula óssea de camundongos encontradas após 24 h da administração intraperitoneal de morfina (1,0 mg/kg) e de seu co-tratamento com PT-31 (0,25, 0,5 e 1,0 mg/kg). Aumento de 1000X.

A análise da relação EPC/ENC nos permite apontar uma provável citotoxicidade tanto para o tratamento com a morfina (1 mg/kg), para ambos os sexos (Tabela 3) quanto para o co-tratamento com PT-31, em todas as concentrações e para ambos os sexos, que apresentaram resultados estatisticamente significativos em relação ao controle negativo, com a única exceção dos machos da menor concentração (Tabela 4).

No ensaio de micronúcleos, a proporção EPC/ENC é o *endpoint* utilizado na avaliação citotoxicidade, que ajuda a demonstrar uma exposição da célula-alvo pela substância em estudo. Assim, o índice de EPC/ENC entre animais tratados com agente teste e o controle do veículo tem sido utilizado na avaliação de citotoxicidade de compostos (KRISHNA; HAYASHI, 2000). Uma característica ao se observar a variação da taxa de eritrócitos policromáticos (EPC) é que esta análise também permite inferir se um agente é ou não uma

das causas do atraso da divisão celular, além de se deduzir a extensão de seu efeito citotóxico (MORALES-RAMIREZ; VALLARINO-KELL; CRUZ-VALLEJO, 2004).

Durante à análise em medula óssea de camundongos é possível observar eritrócitos em diferentes estágios de maturação, já que os EPC amadurecem em ENC durante o curso do desenvolvimento. Para isto é necessário saber identificar corretamente estes tipos de células (MALLADI et al., 2007). No estágio de maturação, o eritroblasto se desenvolve em um eritrócito policromático (EPC), pela expulsão do núcleo principal. Os EPC são eritrócitos jovens que ainda contém RNA, são basofílicos se corando em azul claro ou cinza azulado com Giemsa. Este tipo de célula é bastante utilizada na análise de MN, pois a visualização destes é facilitada nestas células pela falta de um núcleo principal. Um aumento na frequência de micronúcleos em EPC em animais tratados com um agente teste é uma indicação de danos cromossômicos induzidos. Os EPC, com o tempo, perdem RNA e adquirem hemoglobina, tornando-se eritrócitos normocromáticos (ENC), que são eritrócitos maduros, conhecidos como glóbulos vermelhos, são um pouco menores do EPC, são acidófilos, corando-se em laranja ou rosa alaranjado com Giemsa (KRISHNA; HAYASHI, 2000).

É importante, pois, a correlação feita entre os sistemas de teste na avaliação do perfil genotóxico de compostos, para que se possa extrapolar os dados para outros organismos-alvo, como o homem. O teste de *A. cepa* utilizado neste estudo tem mostrado alta sensibilidade e boa correlação quando comparados com outros testes, inclusive, em mamíferos. Em estudos realizados por Fiskesjö (1985), o teste *A. cepa* os resultados obtidos foram praticamente os mesmos que os observados em outros organismos, como as algas e em linfócitos humanos. Rank e Nielsen (1993), obtiveram dados que correlacionavam o teste *A. cepa* com teste de carcinogenicidade em roedores em cerca de 82%. Devido a estes resultados encontrados, pode-se pensar no teste de *A. cepa* como uma alternativa para os sistemas de ensaio em mamíferos para monitorar a genotoxicidade potencial de substâncias químicas (LEME; MARIN-MORALES, 2009).

4. Conclusão

Os testes de toxicidade são de importância fundamental no desenvolvimento de novos fármacos, eles ajudam a traçar um perfil de segurança e eficácia destes compostos. Por meio do ensaio realizado com *A. cepa*, encontramos indícios de toxicidade no tratamento com a morfina somente na maior concentração, 1 mg/mL, no co-tratamento (morfina + PT-31) também a maior concentração (1 mg/mL) apresentou resultado significativo em relação ao controle negativo. A citotoxicidade foi observada apenas na maior concentração testada (1

mg/mL) em espécimes tratados com morfina, enquanto no co-tratamento com o PT-31 além da dose de 1,0 mg/mL a de 0,5 mg/mL também foi significativa ($p < 0,001$) em relação ao controle negativo.

A citotoxicidade, avaliada pela análise de células binucleadas em medula óssea de *Mus musculus*, foi observada em animais machos tratados com morfina (1 mg/kg) e no co-tratamento (morfina + PT-31), tanto para machos como para fêmeas, na concentração de 1 mg/kg em relação ao controle negativo. A análise da relação EPC/ENC, mostrou citotoxicidade para o tratamento com morfina (1 mg/kg) e para o co-tratamento com PT-31, exceto para os machos na concentração de 0,25 mg/kg.

Com base nos dados obtidos neste estudo, podemos perceber que os os testes realizados em *Allium cepa* e em *Mus musculus* apresentam um perfil de toxicidade similar, confirmando a correlação existente, já descrita anteriormente, entre testes em plantas e em mamíferos. Também foi possível observar uma resposta dose-dependente, onde as menores doses testadas não apresentaram indícios de toxicidade e citotoxicidade.

Apesar de nossos estudos apontarem para toxicidade e citotoxicidade das substâncias testadas em células eucarióticas vegetais e animais, nos levando a predizer que elas possam apresentar risco ao material genético, ainda se faz necessária a realização de outros testes pré-clínicos e clínicos para atestar a segurança do uso do fármaco em humanos, sem riscos para a estabilidade do material genético.

Referências

- AARDEMA, M.J.; ROBISON, S.H.; GATEHOUSE, D.; JOHNSTON, G. An evaluation of the genotoxicity of the antitussive drug Dextromethorphan. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 50, p. 285–293, 2008.
- BAGATINI, A.; GOMES, C.R.; MASELLA, M.Z.; REZER, G. Dexmedetomidina: farmacologia e uso clínico. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 52, n. 5, p. 606-617, 2002.
- BOLLE, P.; MASTRANGELO, S.; TUCCI, P.; EVANDRI, M.G. Clastogenicity of atrazine assessed with the *Allium cepa* test. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 43, n. 2, p.137-41. 2004.
- BRAMBILLA, G.; MARTELLI, A. Genotoxicity and carcinogenicity studies of antihypertensive agents. **Mutation Research**, v. 612, p. 115–149, 2006.

BRAMBILLA, G.; MARTELLI, A. Genotoxicity and carcinogenicity studies of analgesics, anti-inflammatory drugs and antipyretics. **Pharmacological Research**, v. 60, p. 1-17, 2009.

CARVALHO, I.M.C.M.M.; CAVALCANTE, A.A.M.; DANTAS, A.F.; PEREIRA, D.L.A.; ROCHA, F.C.C.; OLIVEIRA, F.M.; DA SILVA, J. Environmental mutagenicity and toxicity caused by sodium metabisulfite in sea shrimp harvesting in Piauí, Brazil. **Chemosphere**, v. 82, p. 1056-1061, 2011.

CURREN, R.D.; MUN, G.; GIBSON, D.P.; AARDEMA, M.J. Development of a Novel Micronucleus Assay in the Human 3-D Skin Model, EpiDerm™. Presented at the 44th Annual Meeting of the Society of Toxicology New Orleans, Louisiana March 6-10, 2005.

DRAFT GUIDELINE. OECD guideline for the testing of chemicals. draft proposal for a new guideline 487: *In Vitro* Micronucleus Test. 1.^a version, p. 1-13, June 14, 2004.

EUROPEAN MEDICINES AGENCY. Science Medicines Health. Assessment report. Dexdor. Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP). EMA/789509/2011. 22 September 2011.

FACHINETTO, J.M.; BAGATINI, M.D.; DURIGON, J.; DA SILVA, A.C.F.; TEDESCO, S.B. Efeito anti-proliferativo das infusões de *Achyrocline satureioides* DC (Asteraceae) sobre o ciclo celular de *Allium cepa*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 17, n. 1, p. 49-54, 2007.

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

FLORES, M.; YAMAGUCHI, M.U. Teste do Micronúcleo: Uma Triagem para Avaliação Genotóxica. **Revista Saúde e Pesquisa**, v. 1, n. 3, p. 337-340, 2008.

GILMAN, A.G.; RALL, T.W.; NIES, A.S.; TAYLOR, P. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 10 ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2003. Seção IV, cap. 23, p. 379-402.

GRANT, W.F. The present status of higher plant bioassays for the detection of environmental mutagens. **Mutation Research**, v. 310, n. 2, p. 175-85, 1994.

GUZMÁN, A.; GARCÍA, C.; MARÍN, A.-P.; TORTAJADA, A.; RUIZ, M.T.; DE HENESTROSA, A.R.F.; MARCOS, R. Formation of micronucleated erythrocytes in mouse bone-marrow under conditions of hypothermia is not associated with stimulation of erythropoiesis. **Mutation Research**, v. 656, p. 8-13, 2008.

HOLLAND, N.; BOLOGNESI, C.; KIRSCH-VOLDERS, M.; BONASSI, S.; ZEIGER, E.; KNASMUELLER, S.; FENECH, M. 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.

IVANOVA, E.; STAIKOVA, T.A.; VELCHEVA, I. Cytogenetic testing of heavy metal and cyanide contaminated river waters in a mining region of Southwest Bulgaria. **Journal of Cell and Molecular Biology**, v. 4, p. 99-106, 2005.

KAO, Y.H.; JIAN, W.; TSE, C.; BAO, T.; MOU, Y.Z.; SHENG-NAN, Y. Chronic morphine exposure enhanced NMDA receptor-mediated cytotoxicity in primary cortical cells. **Journal of Medical Sciences**, v. 21, n. 3, p. 159-168, 2001.

KATZUNG, B.G. **Farmacologia Básica e Clínica**, 8 ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2003. Seção VI, cap 31, p. 446-460.

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

KURAS, M.; NOWAKOWSKA, J.; SLIWINSKA, E.; PILARSKI, R.; ILASZ, R.; TYKARSKA, T.; ZOBEL, A.; GULEWICZ, K. Changes in chromosome structure, mitotic activity and nuclear DNA content from cells of *Allium* Test induced by bark water extract of *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 107, p. 211–221, 2006.

LEME, D.M.; MARIN-MORALES, M.A. Chromosome aberration and micronucleus frequencies in *Allium cepa* cells exposed to petroleum polluted water - A case study. **Mutation Research**, Rio Claro-SP, v. 650, p. 80–86, 2008.

LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M.A. *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. **Mutation Research**, Rio Claro, SP, v. 682, n. 1, p. 71-81, 2009.

LEVAN, A. The effect of colchicine on root mitoses in *Allium*. **Hereditas**, v. 24, p. 471-486, 1938.

LUCIO NETO, M.P. Avaliação tóxica, citotóxica, genotóxica e mutagênica do composto 3-(2-cloro-6-fluorobenzil)-imidazolidina-2,4-diona em células eucarióticas. 2011. **(Dissertação de Mestrado em Ciências farmacêuticas)** – Universidade Federal do Piauí.

MA, T.H., XU, Z. ; XU, C. ; MCCONNELL, H. ; RABAGO, E.V. ; ARREOLA, G.A. ; ZHANG, H. The improved *Allium/Vicia* root tip micronucleus assay for clastogenicity of environmental pollutants. **Mutation Research**, v. 334, n. 2, Apr, p.185-95, 1995.

MALLADI, S.M.; BHILWADE, H.N.; KHANA, M.Z.; CHAUBEY, R.C. Gamma ray induced genetic changes in different organs of chick embryo using peripheral blood micronucleus test and comet assay. **Mutation Research**, v. 630, p. 20–27, 2007.

MIGID, H.M.A.; AZAB, Y.A.; IBRAHIM, W.M. Use of plant genotoxicity bioassay for the evaluation of efficiency of algal biofilters in bioremediation of toxic industrial effluent. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Egito, v. 66, p. 57–64, 2007.

MONARCA, S.; RIZZONI, M.; GUSTAVINO, B.; ZANI, C.; ALBERTI, A.; FERETTI, D.; ZERBINI, I. Genotoxicity of surface water treated with different disinfectants using *in situ* plant tests. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, Italy, v. 41, n. 5, p. 353-9, 2003.

MORALES-RAMIREZ, P. VALLARINO-KELLY, T. CRUZ-VALLEJO, V. Kinetics of micronucleated polychromatic erythrocyte (MN-PCE) induction *in vivo* by aneuploidogens. **Mutation Research**, 2004.

PLEWA, M.J.; WAGNER, E.D.; STAVREVA, D.A.; GICHNER, T. Plant activation and its role in environmental mutagenesis and antimutagenesis. **Mutation Research**, v. 350, p. 163-171, 1996.

PULI, L.K.; PATIL, P. Genotoxic evaluation of morphine, buprenorphine, pentazocine, and noscapine by micronucleus and comet assay in albino mice. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 39, n. 6, p. 265-268, 2007.

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

RASGELE P.G.; KAYMAK, F. The Cytogenetic Effects of Logran on Bone Marrow Cells of *Mus musculus*. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 9, p. 2781-2786, 2006.

SETH, C.S.; MISRA, V.; CHAUHAN, L.K.S.; SINGH, R.R. Genotoxicity of cadmium on root meristem cells of *Allium cepa*: cytogenetic and Comet assay approach. **Ecotoxicology Environmental Safety**, v. 71, p. 711–716, 2008.

SMAKA-KINCL, V.; STEGNAR, P.; LOVKA, M.; TOMAN, M.J. The evaluation of waste, surface and ground water quality using the *Allium* test procedure. **Mutation Research**, v. 368, p. 171-179, 1996.

STEINKELLNER, H.; MUN-SIK, K.; HELMA, C.; ECKER, S.; MA, T.-H.; HORAK, O.; KUNDI, M.; KNASMUËLLER, S. Genotoxic effects of heavy metals: comparative investigation with plant bioassays. **Environmental Molecular Mutagen**, v. 31, n. 2, p. 183-91, 1998.

SUDO, R.T.; CALASANS-MAIA, J.A.; GALDINO, S.L.; LIMA, M.C.A.; ZAPATA-SUDO, G.; HERNANDES, M.Z.; PITTA, I.R. Interaction of morphine with a new α_2 -adrenoceptor agonist in mice. **The Journal of Pain**, v. 11, n. 1, p. 71-78, 2010.

TKALEC, M.; MALARIC, K.; PAVLICA, M.; PEVALEK-KOZLINA, B.; VIDAKOVIC-CIFREK, Z. Effects of radiofrequency electromagnetic fields on seed germination, root meristematic cells of *Allium cepa* L. **Mutation Research**, v. 672, n. 2, p. 76-81, 2009.

TODAKA, T.; ISHIDA, T.; KITA, H.; NARIMATSU, S.; YAMANO, S. Bioactivation of Morphine in Human Liver: Isolation and Identification. **Biological Pharmaceutical Bull**, v. 28, n 7, p. 1275-1280, 2005.

TÜRKOGLU, S. Genotoxicity of five food preservatives tested on root tips of *Allium cepa* L., **Mutation Research**, Turquia, v. 626, n. 1-2, p. 4-14, 2007.

UHL, M.; PLEWA, M.J.; MAJER, B.J.; KNASMÜLLER, S. Basic principles of genetic toxicology with an emphasis on plant bioassays, 11-30. In: **J. Maluszynska, M. Plewa (Eds): Bioassays in plant cells for improvement of ecosystem and human health. Wydawnictwo Uniwersytetu Śląskiego**. Katowice, p. 150. Electronic copy only for education purpose. 2003.

VIDAKOVIC-CIFREK, Z.; PAVLICA, M.; REGULA, I.; PAPES, D. Cytogenetic damage in shallot (*Allium cepa*) root meristems induced by oil industry "high-density brines". **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 43, n. 3, Oct, p. 284-91, 2002.

ZALACAIN, M.; SIERRASESÚMAGA, L.; PATIÑO, A. El ensayo de micronúcleos como medida de inestabilidad genética inducida por agentes genotóxicos. **Anales del Sistema Sanitario de Navarra**, v. 28, n. 2, p. 227-236, 2005.

Capítulo 2

5. **Artigo II** – Avaliação da mutagenicidade da morfina e do seu co-tratamento com o composto 3-(2-cloro-6-fluorobenzil)imidazolidina-2,4-diona (PT-31) em teste *Allium cepa* e em *Mus musculus*

Artigo a ser submetido à revista *Environmental and Molecular Mutagenesis*

Avaliação da mutagenicidade da morfina e do seu co-tratamento com o composto 3-(2-cloro-6-fluorobenzil)imidazolidina-2,4-diona (PT-31) em teste em *Allium cepa* e em *Mus musculus*

**SAMPAIO, F.A.^{1,2}; LUCIO NETO, M.P.^{1,2}; LEITÃO, J.M.S.R.^{1,2}; DANTAS, A.F.^{1,2};
VIEIRA, D.C.G.^{1,2}; CARVALHO, R.M.¹; CAVALCANTE, A.A.C.M.^{1,2}; LOPES,
J.A.D.²**

¹ Laboratório de Genética Toxicológica – UFPI – Teresina – Piauí – Brasil

² Departamento de Farmácia – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas – Universidade Federal do Piauí, Brasil.

Resumo

A morfina é um potente analgésico e o protótipo dos agonistas opióides largamente utilizada no manejo clínico da dor aguda e crônica. Uma das suas desvantagens é o fato de causar sérios efeitos adversos. Um agonista α_2 recentemente sintetizado, o 3-(2-cloro-6-fluorobenzil)imidazolidina-2,4-diona ou PT-31, apresentou atividade antinociceptiva e ação sinérgica com a morfina em camundongos. O objetivo deste estudo foi avaliar a mutagenicidade da morfina e do seu co-tratamento com o PT-31 através da análise de micronúcleos e aberrações cromossômicas em *Allium cepa*, e de micronúcleos pelo teste de em medula óssea de *Mus musculus*. Bulbos de *A. cepa* foram expostos a soluções de morfina e desta com o PT-31 nas concentrações de 0,25; 0,5 e 1 mg/mL. Após 72 horas de exposição, as raízes foram removidas. Um total de 1000 células por bulbo foram examinadas ao microscópio (objetiva de 100X). Para o teste de micronúcleos, os animais receberam, através de administração intraperitoneal, soluções de morfina (1 mg/kg) e do seu co-tratamento (PT-31 + morfina), nas concentrações de 0,25; 0,5 e 1,0 mg/kg de peso. Após 24 h da administração das drogas foi coletada a medula óssea dos animais, onde foi observada mutagenicidade em *A. cepa*, pela frequência de micronúcleos, apenas na concentração de 1,0 mg/mL. Camundongos machos tratados com morfina (1 mg/kg) apresentaram resultado significativamente estatístico para MN, indicando mutagenicidade. Esta foi vista também no co-tratamento, onde apenas a menor concentração, não mostrou diferença estatística em relação ao controle negativo. Entretanto, mais estudos devem ser realizados a fim de tornar nossos resultados mais próximos à realidade.

Palavras-chave: *Allium cepa*, micronúcleo, morfina, agonista α_2 -adrenérgico, mutagenicidade

Abstract

Morphine is a potent analgesic and the prototype of opioid agonists widely used in the clinical management of acute and chronic pain. One of its drawbacks is the fact of causing serious adverse effects. A newly synthesized agonist α_2 , 3-(2-chloro-6-fluorobenzyl)imidazolidin-2,4-dione or PT-31, showed synergistic antinociceptive and with morphine in mice. The aim of this study was to evaluate the mutagenicity of morphine and its co-treatment with PT-31 by analysis of micronuclei and chromosomal aberrations in *Allium cepa* and micronucleus test in the bone marrow of *Mus musculus*. Bulbs of *A. cepa* was exposed to solutions of morphine and thus with the PT-31 at concentrations of 0.25, 0.5 and 1 mg/mL. After 72 hours exposure, the roots were removed. A total of 1000 cells per bulb were examined under a microscope (100X objective). For micronucleus test, the animals received by ip administration, solutions of morphine (1 mg/kg) and its co-treatment (PT-31 + morphine) in concentrations of 0.25, 0.5 and 1,0 mg/kg. After 24 h of drug administration was collected bone marrow of animals, where mutagenicity was observed in *A. cepa*, by the MN frequency, at the concentration of 1.0 mg/mL. Male mice treated with morphine (1 mg/kg) tested for statistical MN significantly, indicating mutagenicity. This was also seen in co-treatment, where only the lowest concentration, showed no statistical difference compared to negative control. However, more studies are needed to make our results closer to reality.

Key-word: *Allium cepa*, micronucleus, morphine, α_2 -adrenergic agonist, mutagenicity

INTRODUÇÃO

Os opiáceos são compostos bastante utilizados no alívio da dor, porém existem várias outras classes de compostos que podem ser utilizados com esta finalidade (p. ex.: aspirina). Estes compostos, no entanto, operam por diferentes mecanismos daqueles empregados pelos opiáceos, e, portanto, aliviam um tipo de dor diferente. Os opiáceos têm se revelado ideal para o tratamento de dor crônica “profunda” e atua no sistema nervoso central (SNC). Estes compostos produzem analgesia não somente por exercerem ações no SNC, como também, em receptores periféricos, conforme já descrito para ratos e camundongos (BAAMOND et al., 2000; PATRICK, 1995). A morfina utilizada para o alívio da dor há anos continua sendo o padrão de comparação com drogas de forte ação analgésica até hoje. Ela é considerada como protótipo dos agonistas opióides e é um potente analgésico utilizado em todo o mundo no manejo clínico da dor aguda e crônica severa. A sua administração repetida já é bem relatada como causa de tolerância e dependência física (KATZUNG, 2003; TODAKA et al., 2005). Seus efeitos colaterais, como náuseas, retenção urinária, a dependência à droga e depressão respiratória podem muitas vezes limitar o uso dessa droga na clínica (DEMIRCIOGLU, 2010; GILMAN et al., 2003; KATZUNG, 2003; SUDO et al., 2010).

Estudos têm sido realizados na tentativa de minimizar os efeitos adversos da morfina ao se combinar esta droga com outras classes de fármacos, tais como anestésicos e analgésicos, podendo não só diminuir as doses das drogas usadas como potencializar seus efeitos quando comparado a sua utilização de forma individual (DEMIRCIOGLU, 2010; TODAKA et al., 2005). O problema da dependência e tolerância é outro fator limitante importante no uso de opióides na terapêutica. Extensas investigações estão sendo realizadas para o desenvolvimento de agentes opióides não-viciantes ou que podem prevenir ou reverter os processos de dependência. Novos agentes terapêuticos são também explorados por sua capacidade de inibir a síndrome de abstinência e o comportamento auto-administrativo induzidos por opióides. Faz-se necessária, portanto, a busca por novos compostos que possuam menos efeitos colaterais e sejam mais potentes que a morfina, ou ainda, que aumente suas ações analgésicas (TODAKA et al., 2005).

O uso terapêutico dos agonistas α_2 -adrenoceptores (por exemplo, clonidina), inicialmente sintetizados para controle da hipertensão e descongestionamento nasal, tem se expandido para outras condições, incluindo o tratamento de sintomas de abstinência de drogas e álcool, como adjuvante em anestesia regional e para dor aguda e crônica. Através de estudos realizados, determinou-se a atividade antinociceptiva de um novo composto, o 3-(2-cloro-6-

fluorobenzil)imidazolidina-2,4-diona ou PT-31, que quando administrado intraperitonealmente em camundongos apresentou um aumento dose-dependente na atividade antinociceptiva. Além disso, foi demonstrada também a interação do PT-31 com a morfina, onde se observou através de análise de isoblograma, uma interação sinérgica destes compostos (SUDO et al., 2010).

Já é sabido que agentes químicos podem causar danos a organismos expostos a eles, como efeitos genotóxicos e mutagênicos, bastante preocupantes, devido à sua capacidade de induzir danos genéticos, podendo levar a vários problemas de saúde e também afetar as futuras gerações, uma vez que estas alterações podem ser herdadas. Por isso, faz-se necessária a identificação dos compostos que reagem com DNA, a fim de assegurar a qualidade ambiental. Isto tem levado ao desenvolvimento de vários testes de genotoxicidade e mutagenicidade em uma ampla gama de organismos. Bioensaios com procariontes permitem a detecção de agentes que induzem mutação nos genes e danos no DNA primário. Por outro lado, as análises com eucariontes permitem a detecção de uma extensão maior do dano, variando de mutações genéticas a danos cromossômicos e aneuploidias (LEME; MARIN-MORALES, 2009). Além de testes de toxicidade geral, é obrigatório uma nova molécula ter sua genotoxicidade potencial rastreada do ponto de vista regulamentar. As drogas que têm sido utilizadas antes da aplicação desta regulamentação precisa ser reavaliada para sua genotoxicidade (MITTAL; PATIL; TORRAL, 2009).

Vários bioensaios com plantas têm sido utilizados para o rastreamento e monitoramento de agentes mutagênicos no meio ambiente (GRANT, 1982). Possuem a vantagem de ser altamente sensíveis, relativamente fáceis de executar, de baixo custo e permitem mostrar diversos tipos de mecanismos genéticos (aneugenicidade e clastogenicidade), além de mostrar boa correlação com sistemas de teste animal e serem realizados em um prazo de tempo relativamente curto. Sabe-se que tais fatores são fundamentais para avaliação mais precisa de riscos ambientais, bem como para a extrapolação de dados para outros organismos alvos, como, por exemplo, o homem (FISKESJO, 1985; LEME; MARIN-MORALES, 2008; MA et al., 1995; RANK; NIELSEN, 1993).

O teste de *Allium*, um dos melhores sistemas de teste estabelecidos, é baseado na avaliação de potencial citotóxico e genotóxico através da medição do crescimento das raízes e na capacidade de avaliar diferentes mecanismos genéticos a partir de mutações pontuais de aberrações cromossômicas em pontas de raízes induzidos por substâncias químicas. Este modelo de sistema radicular das células vegetais é comumente usado como um teste para a investigação de fatores ambientais de poluição, toxicidade de produtos químicos e avaliação de compostos com potenciais propriedades cancerígenas (MONARCA et al., 2003; TKALEC

et al., 2009). O teste pode ser feito através da germinação de bulbos de cebola, como também pela germinação de sementes. Entre os vários parâmetros citológicos nestas células de divisão rápida, como aberrações cromatídicas, permuta de cromátides-irmãs e micronúcleos, o mais eficaz e mais simples indicador de danos citológicos é a formação de micronúcleos. A espécie mais utilizada é a *Allium cepa*, outras espécies de *Allium* (*A. cepa* var. *Proliferum*, *A. carinatum*, *A. fistulosum* e *A. sativum*) também têm sido utilizadas, mas em um grau muito menor. Ensaio para a detecção de micronúcleos em meristemas de *Allium cepa* e *Vicia faba* têm sido muito utilizados em estudos clastogenicidade (BOLLE et al., 2004; GRANT, 1982; LEME; MARIN-MORALES, 2008).

Danos ao DNA podem ser detectados pelo teste de micronúcleo (MN), através da análise das alterações cromossômicas. O índice de MN em células humanas tornou-se um dos testes de citogenética padrão para monitoramento das populações de risco. O ensaio de MN com bloqueio da citocinese (CbMN) é o método preferido para a medição de MN em células humanas cultivadas, porque aparece nas células que estão se dividindo. Estas células são reconhecidas por sua aparência binucleada após inibição da citocinese pela citocalasina-B (MALUF, 2004). O ensaio de MN foi concebido principalmente para avaliar a capacidade que os agentes de teste têm para induzir danos cromossômicos estruturais e/ou numéricos. Ambos os tipos de danos estão associados com o aparecimento e/ou progressão de tumores e com efeitos adversos reprodutivos e de desenvolvimento (KRISHNA; HAYASHI, 2000).

Diversos estudos demonstraram uma associação positiva entre frequência de aberrações cromossômicas (AC) e risco aumentado de desenvolvimento de câncer. Com isto, danos cromossômicos podem ser considerados como um biomarcador relevante para predisposição ao câncer (MAFFEI et al., 2002). Os MN são geralmente utilizados como um biomarcador de instabilidade cromossômica, integrando mutações adquiridas e susceptibilidade genética, sendo ainda muito estudado com o propósito de se verificar se estes ou outros polimorfismos genéticos são capazes de explicar o risco de câncer associado a altas frequências de MN (IARMARCOVAI et al., 2008).

O teste de MN pertence à bateria de testes junto com o ensaio de mutagenicidade de Ames em *Salmonella*, o ensaio *in vitro* de AC e o ensaio linfoma tk em ratos, sendo aceito por muitas autoridades reguladoras (KIM; CHO; KIM, 2000). Estudos de biomonitorização utilizando o teste de MN têm sido realizados nos últimos anos, como o Projeto Micronúcleo Humano (HUMN), contribuindo para melhorar a confiabilidade deste ensaio, fornecendo orientações técnicas e analisando as principais fontes de variabilidade (IARMARCOVAI et al., 2008).

No presente estudo realizou-se o teste de *Allium cepa* com a finalidade de se determinar a mutagenicidade da morfina e do co-tratamento da morfina com o PT-31, através da análise das aberrações cromossômicas e micronúcleos encontrados em meristemas de raízes desta espécie, nas concentrações de 0,25; 0,5 e 1,0 mg/mL, como também, através do estudo da presença de micronúcleos na medula óssea de camundongos tratados com a morfina (1 mg/mL) e do seu co-tratamento com o PT-31, nas concentrações de 0,25; 0,5 e 1,0 mg/kg.

MATERIAIS E MÉTODOS

Drogas utilizadas

A morfina foi adquirida de Cristália – Produtos Químicos Farmacêuticos LTDA (São Paulo-SP) – na concentração 1 mg/mL, em frascos de 2 mL. O composto PT-31 foi gentilmente cedido pelo Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil, para realização dos testes pré-clínicos.

Ensaio com *Allium cepa*

Para a realização do teste *A. cepa* seguiu-se o protocolo definido primeiramente por Fiskesjö (1985), com algumas modificações, conforme descrito por Carvalho et al. (2011).

Condições de ensaio e tratamentos

Para a execução do teste utilizou-se cebolas (*Allium cepa*) de tamanho médio e uniforme (diâmetro: 20 a 30 mm e peso: 5 a 10 g), com catáfilos externos brancos, mesmas origens, não germinados e saudáveis, adquiridas comercialmente do Mercado Central de Teresina-PI, Brasil, sendo mantidas em local livre de umidade e ao abrigo da luz. Os grupos experimentais utilizados eram compostos de diluições da morfina e do co-tratamento com o composto PT-31 nas doses de 0,25; 0,5 e 1,0 mg/mL, além de uma solução de DMSO 0,5% (solvente do PT-31). Como controle negativo utilizou-se água desclorificada e para o controle positivo, sulfato de cobre (0,0006 mg/mL). Foram distribuídos 5 bulbos para cada concentração a ser testada, tendo-se o cuidado de retirar com auxílio de bisturi as raízes secas e camadas externas secas ou com mofo, atentando-se para que a área radicular não fosse danificada. Em seguida, retirou-se o parênquima central da coroa de brotamento (fazendo-se

uma pequena incisão circular) para aumentar a absorção das soluções, a uniformidade de brotamento e o crescimento das raízes. Os bulbos foram lavados em água corrente, por cerca de 20 minutos. Como muitas cebolas foram iniciadas ao mesmo tempo, os bulbos descascados foram colocados em água fresca durante o continuado procedimento de limpeza a fim de que se reduzissem os efeitos de possíveis inibidores do brotamento. Os bulbos destes grupos foram colocados em recipientes de vidro, previamente esterilizados, com capacidade de 5 mL, deixando a área radicular diretamente em contato com os líquidos-teste.

Os experimentos foram realizados em temperatura relativamente constante de cerca de 20 ± 2 °C e protegido contra a luz direta do sol. Os líquidos-teste foram preparados no momento do uso na mesma temperatura. A morfina foi diluída em água destilada, enquanto o PT-31 foi dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO). Por fim as substâncias foram diluídas em água de torneira desclorificada. Foi utilizada a versão modificada do teste de *Allium*, previamente descrito por Fiskesjö (1985), onde as cebolas foram colocadas diretamente nos líquidos de teste. As raízes foram cultivadas por 72 h e em seguida foram medidas com o auxílio de régua, desprezando-se aquelas que cresceram acima de 2,0 cm. As pontas de raízes foram então utilizadas para análise citogenética. As raízes foram fixadas em solução de Carnoy (etanol 99%:ácido acético glacial - 3:1) por 24 h. A seguir foram colocadas em álcool 70% e refrigeradas até o momento da preparação das lâminas. O teste foi conduzido em temperatura controlada de 20 ± 2 °C, sobre bancada sem vibrações e sem iluminação direta.

Para o preparo das lâminas, utilizou-se 2 a 3 raízes, colocando-as em uma placa de Petri, que foram lavadas com água destilada (3 banhos de 5 minutos cada), para a retirada do fixador do material. A seguir realizou-se a hidrólise com HCl a 1 mol/L por 11 minutos, seguido de um novo banho em água destilada a temperatura ambiente. Com o auxílio de uma pinça de ponta fina, secou-se as raízes em papel de filtro; depois transferiu-se as raízes para frascos escuros (âmbar), contendo o reativo de Schiff, por aproximadamente 2 horas. Passado este tempo, as raízes foram lavadas com água destilada, até a total retirada do corante. Para a confecção das lâminas colocou-se as raízes sobre elas e separou-se a região meristemática, adicionou-se uma gota de carmim acético 2%, cobrindo-se depois com uma lamínula. Em seguida, pressionou-se com auxílio do polegar, os locais onde estavam dispostos os materiais seccionados. Por fim, levou-se para análise em microscópio, usando aumento de 1000X, seguindo-se a recomendação de se usar lente de imersão. Foram contadas 5000 células por tratamento (1000 células/lâmina).

Para as análises das AC, vários tipos de aberrações em diferentes fases de divisão celular (metáfase, anáfase e telófase) foram considerados: perdas e fragmentos cromossômicos, pontes, cromossomos em atraso ou soltos e outras aberrações indicando

efeitos clastogênicos. No entanto, eles foram classificados em apenas uma categoria, a fim de avaliar a AC como um único resultado. A indução de MN em células meristemáticas de *A. cepa* foi considerada como outro resultado, além da AC (IVANOVA; STAIKOVA; VELCHEVA, 2005).

Teste de micronúcleos em *Mus musculus*

O teste de micronúcleos (MN) foi realizado conforme recomendações de Flores e Yamaguchi, (2008), com algumas modificações.

Animais e tratamentos

Para a realização dos experimentos foram utilizados camundongos da espécie *Mus musculus*, 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 nº 0107/10). Os animais foram mantidos sem restrição alimentar e de ingestão de líquidos, durante todo o experimento, com adaptação em sala climatizada a 22 ± 2 °C e umidade de 50-60%, com ciclo claro/escuro de 12 h e em caixas de polipropileno adequadas a sua manutenção, cinco dias antes da realização dos testes. Em todos os experimentos realizados, utilizou-se 10 (dez) camundongos por grupo, sendo 05 (cinco) machos e 05 (cinco) fêmeas, que foram tratados através da administração intraperitoneal de morfina (1 mg/kg) e morfina + PT-31, nas concentrações de 0,25; 0,5 e 1,0 mg/kg, além de um controle com DMSO 0,5% (solvente utilizado na diluição do PT-31), um controle negativo (água desclorificada) e um controle positivo (ciclofosfamida, 25 mg/kg). As concentrações finais de todas as soluções foram ajustadas para 2,5 mL/kg para a administração nos camundongos.

Para a realização dos experimentos, as substâncias-teste foram administradas nos animais de forma aguda pela via intraperitoneal e a frequência de micronúcleos determinada em lâminas preparadas a partir de medula óssea colhidas 24 h após o tratamento (KRISHNA; HAYASHI, 2000). Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, os fêmures foram dissecados, a medula óssea extraída, misturada com 2 mL de soro fetal bovino e preparado um esfregaço de medula óssea (duas lâminas por animal). Os esfregaços foram fixados com metanol:ácido acético (3:1) e coradas com uma mistura de azul de metileno (Giemsa:May-Grünwald) e 0,2 mol/L de tampão fosfato (pH 5,8), na proporção de 60:30:10,

respectivamente. As lâminas foram codificadas e examinadas em microscópio óptico comum com aumento de 1000X.

Critério de identificação

Os critérios de identificação dos micronúcleos estão de acordo com Sarto et al. (1987) e Tolbert et al. (1991,1992), como sendo 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 contadas apenas células apresentando citoplasma íntegro. A incidência de MN foi observada em 2000 EPC (1000 em cada lâmina preparada por animal).

Análise estatística

A análise estatística foi realizada com o software estatístico GraphPad Prism 5.0, no sistema teste *Allium cepa*, por meio de estatística descritiva e ANOVA não paramétrica, com o teste de Tukey, que faz a comparação do tratamento entre os grupos do sistema teste, enquanto que no teste em *Mus musculus*, utilizou-se o teste de Dunnet, com níveis de significâncias de * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

RESULTADOS

Na Figura 1 a seguir podemos ver células em diferentes fases da mitose e algumas das aberrações encontradas após o tratamento de meristemas de *A. cepa* com morfina e o co-tratamento com o PT-31, onde as AC mais comuns foram: atraso em anáfase, ponte, fragmentos, micronúcleos, cromossomos soltos, porém, dentre estes tipos somente o micronúcleo na maior concentração, 1,0 mg/mL, tanto para o tratamento com a morfina quanto para o co-tratamento, apresentou resultado significativo em relação ao controle negativo, como visto anteriormente (Tabelas I e II).

A mutagenicidade em *Allium cepa* foi avaliada por dois parâmetros, tanto pela frequência de micronúcleos (MN), quanto pela de aberrações cromossômicas (AC).

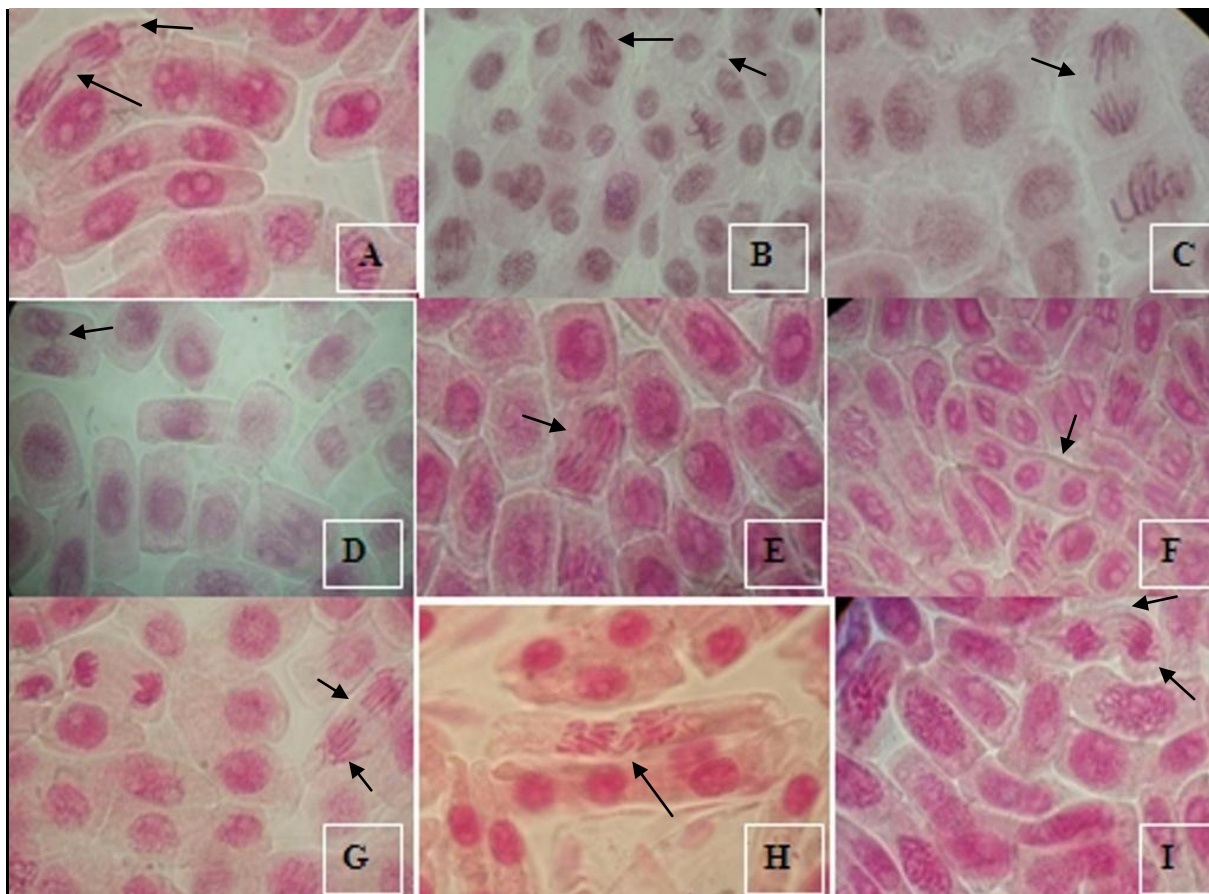


Fig. 1: Fotomicrografias de células de raízes de cebola expostas à morfina e ao co-tratamento com PT-31 nas concentrações de 0,25, 0,5 e 1 mg/mL. Aumento de 1000X. A) Ponte e fragmento. B) Atraso em anáfase e micronúcleo. C) Atraso em anáfase. D) Ponte. E) Atraso em anáfase. F) Micronúcleo. G) Atraso em anáfase e cromossomo solto. H) Fragmentos. I) Ponte e fragmentos.

Na análise da frequência de MN em meristemas de *A. cepa* tratados com a morfina, apenas a maior concentração, 1 mg/mL, apresentou resultado estatisticamente significativo ($p < 0,05$) em relação ao controle negativo. No co-tratamento, morfina + PT-31, também somente a maior concentração (1 mg/mL) apresentou resultados significantes ($p < 0,001$) em relação ao controle negativo (Tabela I).

Quando se analisou a frequência de AC em meristemas de raízes de *Allium cepa*, observou-se que não houve diferença estatística significativa em relação ao controle negativo ($p < 0,05$) no tratamento com morfina para todas as concentrações analisadas. De forma similar, também não houve diferença significativa em relação ao controle negativo para a frequência de AC para o co-tratamento, morfina + PT-31 (Tabela II).

TABELA I: Frequência de micronúcleos (média \pm desvio padrão) em espécimes de *Allium cepa* expostos à morfina e ao co-tratamento com PT-31 (0,25; 0,5 e 1,0 mg/mL)

Grupos	Total de células micronucleadas (MN/1000)
Controle negativo ^a	0,04 \pm 0,09
Controle positivo ^b	0,50 \pm 0,27
DMSO 0,5% ^c	0,10 \pm 0,10
Morfina 0,25 mg/mL	0,28 \pm 0,16
Morfina 0,5 mg/mL	0,14 \pm 0,11
Morfina 1,0 mg/mL	0,78 \pm 0,31*
Morfina + PT-31 0,25 mg/mL	0,18 \pm 0,18
Morfina + PT-31 0,5 mg/mL	0,20 \pm 0,20
Morfina + PT-31 1,0 mg/mL	0,78 \pm 0,34***

^a Água sem cloro; ^b Sulfato de cobre a 0,0006 mg/mL; ^c DMSO 0,5%. Diferença significativa em relação ao controle negativo ao nível de *p < 0,05; (ANOVA- Teste de Tukey).

TABELA II: Frequência de aberrações cromossômicas (média \pm desvio padrão) em espécimes de *Allium cepa* expostos à morfina e ao co-tratamento com PT-31 nas concentrações de 0,25; 0,5 e 1,0 mg/mL

Grupos	Total de aberrações cromossômicas
Controle negativo ^a	0,12 \pm 0,08
Controle positivo ^b	0,96 \pm 0,53
DMSO 0,5% ^c	0,20 \pm 0,14
Morfina 0,25 mg/mL	0,58 \pm 0,31
Morfina 0,5 mg/mL	0,72 \pm 0,30
Morfina 1,0 mg/mL	0,54 \pm 0,45
Morfina + PT-31 0,25 mg/mL	0,64 \pm 0,67
Morfina + PT-31 0,5 mg/mL	0,14 \pm 0,15
Morfina + PT-31 1,0 mg/mL	0,16 \pm 0,15

^a Água desclorificada; ^b Sulfato de cobre 0,0006 mg/mL ^c Solvente do PT-31; Diferença significativa em relação ao controle negativo ao nível de *p < 0,05; (ANOVA- Teste de Tukey).

Com a finalidade de complementar os estudos de mutagenicidade em *A. cepa*, procedeu-se à análise de MN em medula óssea de camundongos (Figura 2). Os resultados obtidos em animais que receberam a morfina (1 mg/kg) foram significantes ($p < 0,001$) apenas em animais machos (Tabela III).

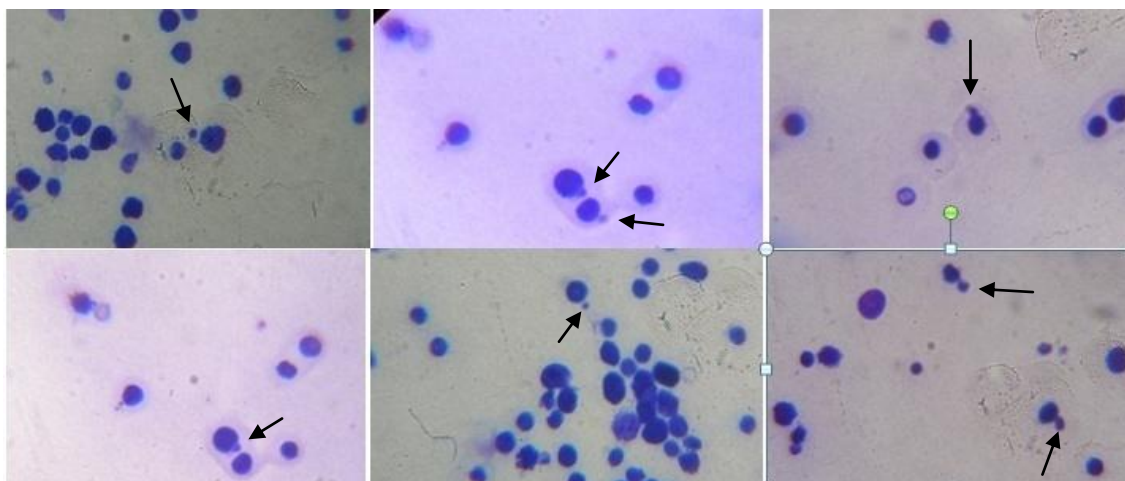


Fig. 2: Fotomicrografias de MN encontrados em medula óssea de camundongos após 24 h da administração intraperitoneal de morfina (1,0 mg/kg) e do co-tratamento com PT-31 (0,25; 0,5 e 1,0 mg/kg). Aumento de 1000X.

TABELA III: Determinação da frequência de micronúcleos (média \pm desvio padrão), por gênero, em células de medula óssea de camundongos, após 24 horas da administração de morfina (1 mg/kg)

Grupo	Micronúcleos	Micronúcleos %
Controle negativo	2,80 \pm 0,45	0,20 \pm 0,04
Controle positivo	11,20 \pm 1,48	0,75 \pm 0,13
Morfina 1,0 mg/kg macho	52,20 \pm 23,83***	2,61 \pm 1,19***
Morfina 1,0 mg/kg fêmea	19,20 \pm 13,08	0,96 \pm 0,65

^a Água desclorificada; ^b Ciclofosfamida 25 mg/kg. Para cada grupo n = 10 (cinco machos e cinco fêmeas) em 2000 células por animal. Diferença significativa em relação ao controle negativo ao nível de * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ (ANOVA- Teste de Dunnet).

Ao se analisar a frequência de MN em animais tratados com morfina + PT-31 nas concentrações de 0,25; 0,5 e 1,0 mg/kg, observou-se um resultado significativo ($p < 0,001$) para todas as concentrações com única exceção dos machos de menor concentração, indicando provável mutagenicidade do co-tratamento (Tabela IV).

TABELA IV: Determinação da frequência de micronúcleos (média \pm desvio padrão), por gênero, em células da medula óssea de camundongos, após 24 horas da administração intraperitoneal de morfina + PT-31 nas concentrações de 0,25, 0,5 e 1,0 mg/kg

Grupo	Gênero	Micronúcleos	Micronúcleos %
Controle negativo ^b	Machos	2,80 \pm 0,45	0,14 \pm 0,02
	Fêmeas	4,00 \pm 0,71	0,20 \pm 0,03
DMSO 0,5% ^c	Machos	2,80 \pm 0,45	0,14 \pm 0,02
	Fêmeas	4,80 \pm 0,84	0,24 \pm 0,42
Controle positivo ^d	Machos	11,20 \pm 1,48	0,56 \pm 0,07
	Fêmeas	15,00 \pm 2,55	0,75 \pm 0,13
Morfina+PT 0,25 mg/kg	Machos	21,00 \pm 8,28	1,05 \pm 0,41
	Fêmeas	22,20 \pm 8,96*	0,91 \pm 0,55*
Morfina+PT 0,5 mg/kg	Machos	34,60 \pm 12,78***	1,73 \pm 0,64***
	Fêmeas	30,80 \pm 10,57***	1,54 \pm 0,53***
Morfina+PT 1,0 mg/kg	Machos	35,60 \pm 14,26***	1,78 \pm 0,71***
	Fêmeas	30,40 \pm 10,16***	1,52 \pm 0,51***

^aÁgua desclorificada; ^b Solvente do PT-31; ^cCiclofosfamida 25 mg/kg. Para cada grupo n = 10 (cinco machos e cinco fêmeas) em 2000 células por animal. Diferença significativa em relação ao controle negativo ao nível de *p < 0,05, ***p < 0,001 (ANOVA- Teste de Dunnet).

DISCUSSÃO

O teste de *Allium* tem sido utilizado para avaliar danos no DNA, como AC e MN, que são usados na avaliação da mutagenicidade. A avaliação dos efeitos mutagênicos é feita através da observação dos MN em células das raízes de *A. cepa* expostas, por exemplo, aos poluentes do meio ambiente. As plantas superiores, mesmo apresentando baixas concentrações de enzimas oxidase e uma limitação na especificação do substrato em relação a outros grupos de organismos, apresentam resultados consistentes que podem servir como um aviso para outros sistemas biológicos, uma vez que o alvo é o DNA, comum a todos os organismos (LEME; MARIN-MORALES, 2009; UHL, et al., 2003).

Este teste combina dois testes-alvo: toxicidade e mutagenicidade. A toxicidade é facilmente medida pela observação da inibição do crescimento, e a mutagenicidade está correlacionada com a taxa de quebras cromossômicas e pode ser avaliada pela frequência de quebras cromossômicas induzidas por vários tratamentos. As células da ponta da raiz de *Allium cepa* constituem um excelente sistema para tais análises citológicas (TÜRKÖGLÜ, 2006).

Nos experimentos observou-se mutagenicidade apenas para a frequência de MN em meristemas de *A. cepa* tratados com a morfina na maior concentração, 1 mg/mL, com resultado estatisticamente significativo ($p < 0,05$) em relação ao controle negativo. No co-tratamento, morfina + PT-31, também somente a maior concentração (1mg/mL) apresentou resultados significantes ($p < 0,001$) em relação ao controle negativo (Tabela I).

As fases da mitose foram analisadas em meristemas de *A. cepa* e as AC contadas, o que indicaria possíveis efeitos danosos do tratamento (Figura 1). Ao se analisar a frequência de AC em meristemas de raízes de *Allium cepa*, observou-se que não houve diferença estatística significativa em relação ao controle negativo ($p < 0,05$) no tratamento com morfina para todas as concentrações analisadas. De forma similar, também não houve diferença significativa em relação ao controle negativo para a frequência de AC para o co-tratamento, morfina + PT-31 (Tabela II). A mitose inicia a partir da condensação da cromatina dentro do núcleo e da formação de regiões cromossômicas. No meio da fase prófase, a cromatina aparece fina, na forma de fios emaranhados, que ficam ligeiramente encurtados e espessados no final desta fase. Cromossomos metafásicos espessados começam a formar a placa metafásica, as cromátides, geralmente são visíveis neste estágio. Durante a próxima fase, a anáfase, as cromátides se mudam para os pólos da célula de uma forma ordenada até chegar aos pólos na telófase. Os núcleos das células recém-formadas são ovais, com a parede celular formada entre eles (KURAS et al., 2006).

Para que haja a divisão celular o conteúdo do material genético (DNA) no núcleo da célula-mãe é replicado e dividido igualmente para dar origem a duas células-filhas idênticas, durante esse processo podem ocorrer erros devido a falhas na replicação e divisão do DNA, por efeitos da radiação e agentes genotóxicos, resultando em quebras e perdas cromossômicas, fazendo com que a distribuição de material genético não seja realizada de forma equitativa. Quando isso ocorre, o material genético é, portanto, excluído, não se juntando adequadamente ao núcleo da célula-filha, havendo a criação de um novo núcleo menor que o principal chamado “micronúcleo”, facilmente visíveis ao microscópio óptico (ZALACAIN; SIERRASESÚMAGA; PATIÑO, 2005).

Diferentes mecanismos podem estar envolvidos na formação de micronúcleos, que aparecem devido a lesões no DNA não ou mal reparado, ou ainda, através da separação anômala do cromossomo devido ao mau funcionamento da mitose (DECORDIER; KIRSCH-VOLDERS, 2006; IARMARCOVAI et al., 2008). Eles se originam a partir de algumas AC, como fragmentos de cromossomos acêntricos, como os encontrados na Figura 1, devido à quebra da fita de DNA (clastogênese), ou a partir de cromossomos inteiros, devido a danos no cinetocoro, no fuso ou centrômero (aneugênese) que sofreram atraso na anáfase e não se anexaram ao fuso mitótico não sendo capazes de migrar para os pólos do fuso durante a mitose, sendo excluídos do núcleo principal, e por isso são muito utilizados, portanto, como um indicador conveniente e confiável de danos cromossômicos (FENECH, 2000a, 2000b; HOLLAND et al., 2008; MALLADI et al., 2007; MALUF, 2004; ZALACAIN; SIERRASESÚMAGA; PATIÑO, 2005).

Outro mecanismo proposto de formação de MN é o brotamento nuclear. Este processo tem sido observado em células cultivadas sob fortes condições seletivas que induzem a amplificação do gene. Shimizu et al. (2004) mostrou que o DNA amplificado é seletivamente localizado em sítios específicos na periferia do núcleo e sua eliminação via brotamento nuclear para formar MN durante a fase S da mitose, e serem assim, excluídos da célula por completo com extrusão do MN do citoplasma levando à formação de uma “mini-célula” (FENECH, 2000, 2005). Distúrbios no ciclo mitótico, que levam ao surgimento de MN e outras formas anormais nucleares, como ponte e broto, são considerados uma das principais causas da instabilidade cromossômica estrutural que são associados com a transformação de células malignas (MURGIA et al., 2008).

Os dois tipos de MN são geralmente distinguidos um do outro pela técnica de hibridização fluorescente *in situ*, utilizando sondas de DNA centroméricas, onde MN centrômero-positivos representam cromossomos inteiros e MN centrômero-negativos representam fragmentos cromossômicos (LINDBERG et al., 2008). Geralmente, os micronúcleos que surgem de danos clastogênicos falta um cinetocoro, e aqueles associados a danos cromossômicos numéricos contêm um cinetocoro. A presença de um cinetocoro pode ser identificada através de anticorpos disponíveis comercialmente (KRISHNA; HAYASHI, 2000). Foi demonstrado que o tamanho do MN pode ser um parâmetro eficaz para avaliar os efeitos clastogênicos e aneugênicos em *A. cepa*, uma vez que esta espécie apresenta um cariótipo simétrico, que é homogêneo em relação ao tamanho dos cromossomos, sendo estes grandes e em número reduzido ($2n = 16$). Portanto, MN grandes poderiam indicar um efeito aneugênico resultante da perda de cromossomos, enquanto que MN pequenos podem indicar ação clastogênica resultante de quebras cromossômicas (LEME; MARIN-MORALES, 2009).

MN são encontrados em células na intérfase (DECORDIER et al., 2009), mas sua formação ocorre na telófase, onde um envelope nuclear é formado ao redor dos fragmentos e/ou cromossomos em atraso, que então se desenrolam e, gradualmente, assumem a morfologia de um núcleo interfásico com a exceção de que eles são menores do que os núcleos principais na célula (FENECH, 2000; GROVER; KAUR, 1999; KAZIMIROVA et al., 2008; YI; MENG, 2003). Além disso, MN ainda podem derivar de outros processos como poliploidização, que se originam da eliminação de DNA superior do núcleo principal em uma tentativa de restabelecer as condições normais de ploidia (LEME; MARIN-MORALES, 2009).

MN têm sido considerados por muitos autores como o endpoint mais eficaz e simples para analisar o efeito mutagênico causado por produtos químicos. Isto se deve ao fato de que eles resultam de danos mal ou não reparados nas células parentais, sendo facilmente observados em células-filhas como uma estrutura semelhante ao núcleo principal, mas em um tamanho reduzido (LEME; MARIN-MORALES, 2009). A vantagem do teste de MN em relação a outros ensaios citogenéticos é que ele é tecnicamente simples, quantitativo, além de sua rapidez e facilidade de análise, não sendo necessário que as células estejam em metáfase. Consequentemente, a frequência de MN fornece uma medida tanto de quebras como de perdas cromossômicas e pode ser usado como um indicador de danos genéticos estruturais e numéricos em seres humanos (MAFFEI et al., 2002; MALUF, 2004). Pelo fato de poder ser marcado como endpoint único, é mais objetivo e passível de automação, sendo menos demorado, podendo ser executado com menos experiência técnica em relação às análises de AC, com capacidade de detectar agentes aneugênicos e clastogênicos, além de poder detectar simultaneamente atraso na mitose, apoptose, quebras cromossômicas, perdas cromossômicas e não-disjunção. Diferentes endpoints podem ser considerados e utilizados como biomarcadores de danos no DNA, podendo ser facilmente integrados em estudos de toxicologia geral (BRYCE et al., 2007, 2008; CORVI et al., 2008; FENECH et al., 1999; IVANOVA; STAIKOVA; VELCHEVA, 2005; KRISHNA; HAYASHI, 2000).

Todavia, tanto a análise de MN quanto a de AC tem mostrado ser sensíveis para detectar agentes mutagênicos ambientais. Além de avaliar os efeitos mutagênicos, a análise de MN também permite uma investigação dos mecanismos de ação de agentes químicos. Alguns toxicologistas genéticos defendem o uso desta técnica de forma intercambiável com o ensaio *in vitro* de AC na avaliação de genotoxicidade antes da submissão de novos medicamentos como novas entidades farmacêuticas (LEME; MARIN-MORALES, 2009; GARRIOTT; PHELPS; HOFFMAN, 2002).

As AC são caracterizadas por alterações cromossômicas em qualquer estrutura ou no número total de cromossomos, que podem ocorrer tanto de forma espontânea, como resultado da exposição a agentes físicos ou químicos. Alterações cromossômicas estruturais podem ser induzidas por vários fatores, como quebras de DNA, a inibição da síntese de DNA e replicação de DNA alterada. As AC numéricas (aneuploidia e poliploidia) são consequência da segregação anormal de cromossomos, que podem ocorrer espontaneamente ou pela ação de agentes aneugênicos. De uma forma simples, AC, como pontes e quebras cromossômicas, são indicadores de ação clastogênica, enquanto as perdas de cromossomos, atrasos, a adesão aos polos e C-metáfases são resultado de efeitos aneugênicos (LEME; MARIN-MORALES, 2009).

Então, podemos observar que as AC, tais como fragmentos e perdas cromossômicas, podem resultar em micronúcleos, uma vez que ambos os fragmentos de cromossomos não podem ser incorporados no núcleo principal durante o ciclo celular. Tanto as análises de AC e de MN em células meristemáticas quanto MN nas células F1 de *A. cepa*, têm sido relatadas como indicadores de eficiência da ação direta sobre DNA. A análise da AC, juntamente com MN em células meristemáticas de *A. cepa*, é tão precisa quanto a análise de MN em células F1 nesta espécie (LEME; MARIN-MORALES, 2009).

Qualquer perturbação na formação do eixo pode causar uma distribuição desigual dos cromossomos. Rupturas e distribuições desiguais foram relatados em diversos materiais, como resultado de tratamento com vários produtos químicos. Quebras cromossômicas são normalmente encontradas nas extremidades das raízes *A. cepa* tratadas com produtos químicos. Estes produtos que induzem quebras cromossômicas e sua ação nos cromossomos é geralmente devida a sua ação sobre o DNA (BOLLE et al., 2004; TÜRKÖGLÜ, 2006). A clastogenicidade na anáfase foi medida pela análise das aberrações cromossômicas (pontes, cromossomos em atraso e fragmentos) nas células das raízes (MONARCA et al., 2003).

A atividade celular também pode corrigir erros nos danos da divisão celular, impedindo a perda do genoma da célula em forma de MN. De acordo com a estrutura ontogenética da cebola, a maioria dos MN ocorre em células F1, exceto em raros casos em que há um atraso na mitose. Estudos mostram maior eficiência, quando estes fragmentos são acêntricos analisados na região de F1 em relação à região meristemática, facilitando a pontuação (MACÊDO et al, 2008).

Os fragmentos cromossômicos podem resultar de quebras cromossômicas devido a efeitos clastogênicos causados por substâncias químicas, ou por efeitos aneugênicos onde o cromossomo é perdido dos fusos mitóticos, conforme já relatado (MACÊDO et al., 2008), ou ainda, podem derivar de AC, como pontes cromossômicas, que se dividem e originam

fragmentos acêntricos. Por outro lado, as perdas cromossômicas são uma consequência de fusos mitóticos inativos durante o ciclo de divisão celular (efeitos aneugênicos). Assim, os MN observados nas células F1, provavelmente terão sido originados do não-reparo ou reparo incompleto dos danos às células parentais (LEME; MARIN-MORALES, 2008). Sabe-se que pontes e fragmentos cromossômicos resultam de diferentes tipos de AC da anáfase e telófase, tais como deficiência, exclusões e translocações, normalmente associados a uma perda de material genético. Um atraso cromossômico pode indicar risco de aneuploidia (IVANOVA; STAIKOVA; VELCHEVA, 2005).

As pontes observadas nas células provavelmente são formadas por quebra e fusão de cromossomos e cromátides (Figura 1). Pesquisadores relataram que conservantes de comida como o benzoato de sódio e o sulfito de sódio causam pontes na anáfase em *Vicia faba*. As pontes cromossômicas podem ser devidas à aderência cromossômica e subsequente falha da livre separação na anáfase ou então pode ser atribuída à translocação desigual ou inversão de segmentos de cromossomos (TÜRKOGLU, 2006). Como os MN são expressos em células que tenham concluído a divisão nuclear estes são idealmente marcados na fase de células binucleadas do ciclo celular. Ocasionalmente pontes nucleoplásmicas entre os núcleos de uma célula binucleada são observadas. Estas provavelmente são cromossomos dicêntricos em que os dois centrômeros foram puxados para pólos opostos da célula, resultando em uma ponte coberta por uma membrana nuclear. Assim, pontes nucleoplásmicas em células binucleadas fornecem uma medida adicional e complementar de rearranjo de cromossomos, que podem ser marcados, juntamente com a contagem de MN. Quando se determina a frequência de MN pode fornecer informações relativas ao tipo de efeito mutagênico envolvido (clastogênico ou aneugênico) (MALUF, 2004).

O teste do micronúcleo *in vivo* em roedores é o ensaio mais amplamente utilizado para a detecção de agentes clastogênicos (que causam quebras em cromossomos) e aneugênicos (que induzem aneuploidia ou segregação cromossômica anormal) em eritroblastos que estão proliferando, sendo internacionalmente aceito como parte da bateria de testes recomendada para a avaliação do potencial mutagênico e para o registro de novos produtos químicos que entram anualmente no mercado mundial. Este teste foi inicialmente desenvolvido em eritrócitos de medula óssea de camundongos, mas é também realizado em ratos. A presença de MN é analisada em eritrócitos policromáticos (PCE, eritrócitos jovens) de medula óssea de camundongos, mas pode, também, ser analisada em eritrócitos normocromáticos (NCE, eritrócitos maduros). Ele apresenta uma especificidade relativamente alta (falsos positivos são raros) e os resultados positivos têm um grande peso regulamentar (FLORES; YAMAGUCHI, 2008; GUZMÁN et al., 2008).

A análise de MN em medula óssea de camundongos apresentou resultados significantes ($p < 0,001$) para os animais machos que receberam a morfina (1 mg/kg) (Tabela III). Os animais tratados com morfina + PT-31 nas concentrações de 0,25; 0,5 e 1,0 mg/kg, mostraram um resultado significativo ($p < 0,001$) para todas as concentrações, com a única exceção dos machos da menor concentração, indicando provável mutagenicidade do co-tratamento (Tabela IV). A maior frequência de micronúcleos em fêmeas, em comparação com os machos, é devida a fatores hormonais que aumenta a frequência de micronucleação nos cromossomos sexuais (LINDBERG et al., 2008).

O diâmetro do MN em linfócitos humanos podem variar entre 1/16 a 1/3 do diâmetro dos núcleos principais. Os critérios propostos para a identificação de MN são que eles possuem perímetro arredondado ou oval; não são refringentes, podendo ser facilmente distinguidos dos artefatos; não estão ligados aos núcleos principais, mas podem se sobrepor a estes; geralmente têm a mesma intensidade de coloração dos núcleos principais, no entanto, ocasionalmente, sua coloração pode ser mais intensa; textura semelhante à do núcleo; mesmo plano focal como núcleo e Feulgen positivo, ou seja, pink na iluminação de campo claro (HOLLAND et al., 2008; PATINO-GARCIA et al., 2006).

O ensaio MN em medula óssea de roedores tornou-se, nos últimos anos, um sistema de teste padrão para avaliação de genotoxicidade através da monitorização biológica das populações humanas expostas a uma variedade de produtos químicos mutagênicos e cancerígenos ou agentes físicos, ou ainda, por fatores ocupacionais ou estilo de vida, sendo realizados por agências reguladoras em vários países (DECORDIER et al., 2009; HOLLAND et al., 2008; LINDBERG et al., 2008; SUZUKI et al., 2009; VIJAYALAXMI et al., 2006).

O ensaio de MN tem tido ampla utilização em estratégias de saúde pública e, potencialmente, na avaliação de risco individual. Um aspecto interessante que deve ser observado é o fato de que um nível elevado de MN em pacientes com câncer poderia ser consequência de sua doença ou refletir a sua susceptibilidade individual para eventos de instabilidade genômica. O uso de biomarcadores como preditor de risco de doença, é portanto, apoiado pela sua relação com fatores de risco, que será semelhante entre fator de risco e doenças relacionadas. Assim, o uso de MN como biomarcador se baseia no fato de que diversas anomalias citogenéticas são encontradas em células cancerígenas, apoiando a hipótese de que danos cromossômicos estão diretamente envolvidos na etiologia do câncer (IARMARCOVAI et al., 2008b; MINOZZO; DEIMLING; SANTOS-MELLO, 2010; MURGIA et al., 2008).

Resultados positivos neste ensaio são considerados indicativos de efeitos cromossômicos que podem ocorrer de forma potencialmente semelhante em seres humanos, o

que poderia levar a uma variedade de efeitos adversos à saúde a longo prazo, incluindo defeitos hereditários e carcinogênese. Como consequência, os resultados positivos obtidos no teste de MN em roedores pode ter um impacto dramático sobre a viabilidade do programa de desenvolvimento de um candidato a fármaco. Apesar de atuarem através de mecanismos indiretos, aumentando a formação de MN em roedores, consequências como distúrbios nas condições fisiológicas ainda são consideradas como possível causa de preocupação no caso de serem capazes de induzir as mesmas alterações fisiológicas em humanos (GUZMÁN et al., 2008).

Foi demonstrado que a morfina teve ação clastogênica em linfócitos murinos (MITTAL; PATIL; TORRALBA, 2009; PULI; PATIL, 2007). Além disso, morfina mostrou aumento significativo no número de MN, bem como de danos ao DNA, tanto em estudos de toxicidade aguda como subaguda. Este achado está em concordância com um relatório anterior, realizado por Das e Swain, 1982, em que a morfina foi capaz de induzir micronúcleos em uma forma dose-dependente (PULI; PATIL, 2007). Nos nossos experimentos a morfina apresentou um aumento na frequência de MN na maior concentração testada (1 mg/mL) em meristemas de raízes de *A. cepa* (Tabela I). No teste de MN em medula óssea de camundongos a morfina (1 mg/kg) apresentou atividade mutagênica apenas em animais machos (Tabela III).

Vários estudos de genotoxicidade têm sido publicados sobre o opióide natural morfina. Resultados negativos têm sido relatados em testes de mutação bacteriana, em ensaios *in vitro* utilizando clastogenicidade em células de hamster chinês e aberrações cromossômicas em linfócitos humanos. Além disso, não houve aumento na formação de MN após tratamento *in vitro* com linfócitos esplênicos de ratos tratados com morfina. (AARDEMA et al., 2008). Entretanto, apresentou resultados positivos em testes *in vivo* de MN em ratos e de mutação letal em *Drosophila melanogaster* (PURDUE PHARMA L.P., 2009).

Estudos mostram que a morfina e a noscapina possuem genotoxicidade significativa, enquanto que a buprenorfina e a pentazocina são desprovidas de potencial genotóxico. A heroína, embora não utilizada clinicamente, apresenta relatos de genotoxicidade. Da mesma forma, há indícios de que a buprenorfina cause indução da fragmentação do DNA e apoptose em células nervosas NG108-15 (PULI; PATIL, 2007). A codeína apresentou resultados negativos no teste de indução de AC em células de ovário de hamster chinês (AARDEMA et al., 2008). Codeína, dextrometorfano e dextropropoxifeno também não foram genotóxicos em ensaios cometa e micronúcleo realizados em camundongos. Porém, existem relatos de teratogenicidade em modelos de embriões aviários para o antitussígeno de ação central dextrometorfano. Em estudo caso-controle realizado em mulheres que usaram

dextrometorfano seus bebês estavam livres de teratogenicidade, não mostrando aumento significativo de malformações congênitas em comparação com o controle durante o primeiro trimestre da gravidez (MITTAL; PATIL; TORRAL, 2009).

Como visto anteriormente, a morfina apresentou atividade genotóxica *in vivo*, devido a este fato esperava-se que a codeína também apresentasse efeito genotóxico, uma vez que ela é convertida em morfina no organismo. Além disso, ela produz troca de cromátides irmãs em células de ovário de hamster chinês. Entretanto, observou-se que a fração da codeína convertida em morfina, cerca de 10%, não é suficiente para produzir genotoxicidade (MITTAL; PATIL; TORRAL, 2009). A codeína mostrou resultado negativo em teste *in vivo* de MN em camundongos quando administrado por via intraperitoneal. Na verdade, os efeitos clastogênicos *in vivo* da morfina em camundongos pode estar diretamente relacionado ao aumento dos níveis de glicocorticóides produzidos pela morfina nesta espécie (AARDEMA et al., 2008).

Uma associação entre dextropropoxifeno com anti-inflamatórios não esteroidais (AINES) já foi relatada, ele possui atividade analgésica mediada através dos receptores opióides μ similares à morfina, embora ainda sejam escassas as informações sobre a sua genotoxicidade, sabe-se que efeitos adversos como a liberação de histamina, broncoespasmo, tolerância, dependência, vômitos e constipação são diminuídos quando essa associação é realizada (MITTAL; PATIL; TORRAL, 2009).

Estudos realizados por Lucio Neto et al. (2011), indicaram que apenas a concentração de 1 mg/mL do composto PT-31 mostrou indícios de mutagenicidade tanto pela frequência de micronúcleos quanto pelo aumento do número global de aberrações em teste de *A. cepa*.

No presente trabalho, a associação do PT-31 com a morfina apresentou resultado significativo ($p < 0,001$) para MN na concentração de 1 mg/mL, quando analisado em meristemas de raízes de *A. cepa*. A análise de AC não mostrou indícios de mutagenicidade em nenhuma concentração testada (Tabela I). No teste de MN realizado em camundongos, com a exceção dos machos da concentração de 0,25 mg/kg, mostraram resultados significativos ($p < 0,001$) (Tabela IV).

A clonidina e o guanabenz não foram carcinogênicos em testes que utilizaram ratos e camundongos; a clonidina também apresentou resultados negativos em ensaios de genotoxicidade. Guanfacina não mostrou provas de atividade carcinogênica. Metildopa, o mais extensivamente testado, mostrou resultados contrastantes nos ensaios, com genotoxicidade positiva, porém não foi carcinogênica em camundongos e ratos (BRAMBILLA; MARTELLI, 2006).

A dexmedetomidina foi clastogênica em ensaios *in vitro* com o teste de aberrações cromossômicas em linfócitos humanos, mas não sem ativação metabólica. Ela também se mostrou clastogênica no teste de micronúcleo *in vivo* em ratos (HOSPIRA, 2005).

A prática atual de regulamentação do uso de uma bateria de ensaios de genotoxicidade para avaliar o potencial genotóxico de candidatos a fármaco visa reduzir o risco de os compostos genotóxicos não serem adequadamente detectados. Enquanto ensaios *in vitro* são geralmente considerados mais sensíveis para a detecção de substâncias cancerígenas genotóxicas, ensaios *in vivo* são considerados mais próximo à situação humana, já que eles levam em conta os processos biológicos de absorção, distribuição, metabolismo e excreção, os quais não são contabilizados em ensaios *in vitro* (GUZMÁN et al., 2008). A principal razão para o teste de MN *in vitro* ser atualmente utilizado como exame de triagem nos primeiros estágios de desenvolvimento farmacêutico se deve ao fato de o ensaio poder ser realizado utilizando pequenas concentrações da substância testada, que muitas vezes possuem quantidade limitada nesta fase (GARRIOTT; PHELPS; HOFFMAN, 2002). Com isto, o uso de diferentes sistemas de teste é importante para uma mais avaliação abrangente dos diferentes aspectos de ação de um agente, obtendo assim uma visão mais completa de seu risco potencial (LEME; MARIN-MORALES, 2009).

A partir dos resultados alcançados nos dois sistemas de teste em ambos tratamentos, tanto para a morfina quanto para o co-tratamento (morfina + PT-31), pode-se perceber um resultado dose-dependente. Onde somente na concentração de 1 mg/mL mostrou resposta significativa em *A. cepa*. Ou seja, tanto para a morfina quanto para o co-tratamento, a concentração de 1 mg/mL foi mutagênica, neste último caso somente para MN. Apesar do aparecimento de algumas AC, estas não foram significativas.

No teste de MN realizado em camundongos, o tratamento com a morfina (1 mg/kg) apresentou significância estatística apenas para animais machos, enquanto no co-tratamento (morfina+ PT-31) todas as concentrações apresentaram indícios de mutagenicidade, com a única exceção dos animais machos da menor concentração (0,25 mg/kg).

Apesar dos testes aqui realizados mostrarem uma boa correlação condizente com a literatura, mais estudos de toxicidade devem ser realizados com a finalidade de se comparar os resultados entre vários tipos de teste, e assim, poder se utilizar em humanos de forma segura e eficaz.

REFERÊNCIAS

AARDEMA, M.J.; ROBISON, S.H.; GATEHOUSE, D.; JOHNSTON, G. An evaluation of the genotoxicity of the antitussive drug Dextromethorphan. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 50, p. 285–293, 2008.

BAAMONDE, A.; ÁLVAREZ-VEGA, M.; HIDALGO, A.; MENÉNDEZ, L. Effects of intraplantar morphine in the mouse formalin test. **Journal of Pharmacology**, v. 83, p. 154–156, 2000.

BOLLE, P.; MASTRANGELO, S.; TUCCI, P.; EVANDRI, M.G. Clastogenicity of atrazine assessed with the *Allium cepa* test. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 43, n. 2, p. 137–41. 2004.

BRAMBILLA, G.; MARTELLI, A. Genotoxicity and carcinogenicity studies of antihypertensive agents. **Mutation Research**, v. 612, p. 115–149, 2006.

CARVALHO, I.M.C.M.M.; CAVALCANTE, A.A.M.; DANTAS, A.F.; PEREIRA, D.L.A.; ROCHA, F.C.C.; OLIVEIRA, F.M.; DA SILVA, J. Environmental mutagenicity and toxicity caused by sodium metabisulfite in sea shrimp harvesting in PiauÍ, Brazil. **Chemosphere**, v. 82, p. 1056–1061, 2011.

DECORDIER, I.; KIRSCH-VOLDERS, M. The *in vitro* micronucleus test: From past to future. **Mutation Research**, v. 607, p. 2–4, 2006.

DECORDIER, I.; PAPINE, A.; PLAS, G.; ROESEMS, S.; LOOCK, K.V.; MORENO-PALOMO, J.; CEMELI, E.; ANDERSON, D.; FUCIC, A.; MARCOS, R.; SOUSSALINE, F.; KIRSCH-VOLDERS, M. 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.

DEMIRCIOGLU, R.I.; USTA, B.; MUSLU, B.; SERT, H.; OKANO, Y.; ONODERA, K.; GOZDEMIR, M. Combination of Small Doses of Subarachnoid Morphine with Systemic. **Journal of Hard Tissue Biology**, v. 19, n. 2, p. 117–122, 2010.

FENECH, M. CROTT, J.; TURNER, J.; BROWN, S. Necrosis, apoptosis, cytostasis and DNA damage in human lymphocytes measured simultaneously within the cytokinesis-block micronucleus assay: description of the method and results for hydrogen peroxide. **Mutagenesis**, v. 14, n. 6, p. 605–612, 1999.

FENECH, M. The *in vitro* micronucleus technique. **Mutation Research**, v. 455, p. 81–95, 2000a.

FENECH, M. A mathematical model of the *in vitro* micronucleus assay predicts false negative results if micronuclei are not specifically scored in binucleated cells or in cells that have completed one nuclear division. **Mutagenesis**, v. 15, n. 4, p. 329-336, 2000b.

FENECH, M. The Genome Health Clinic and Genome Health Nutrigenomics concepts: diagnosis and nutritional treatment of genome and epigenome damage on an individual basis. **Mutagenesis**, v. 20, n. 4, p. 255–269, 2005.

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

FLORES, M.; YAMAGUCHI, M.U. Teste do Micronúcleo: Uma Triagem para Avaliação Genotóxica. **Revista Saúde e Pesquisa**, v. 1, n. 3, p. 337-340, 2008.

GARRIOTT, M.L.; PHELPS, J.B.; HOFFMAN, W.P. A protocol for the *in vitro* micronucleus test I. Contributions to the development of a protocol suitable for regulatory submissions from an examination of 16 chemicals with different mechanisms of action and different levels of activity. **Mutation Research**, v. 517, p. 123–134, 2002.

GILMAN, A.G.; RALL, T.W.; NIES, A.S.; TAYLOR, P. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 10 ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2003. Seção IV, cap. 23, p. 379-402.

GRANT, W.F. Chromosome aberration assays in *Allium*. A report of the U. S. Environmental Protection Agency Gen-Tox Program. **Mutation Research**, v. 99, p. n. 3, 273-291, 1982.

GROVER, I.S.; KAUR, S. Genotoxicity of wastewater samples from sewage and industrial effluent detected by the *Allium* root anaphase aberration and micronucleus assays. **Mutation Research**, v. 426, p. 183–188, 1999.

GUZMÁN, A.; GARCÍA, C.; MARÍN, A.-P.; TORTAJADA, A.; RUIZ, M.T.; DE HENESTROSA, A.R.F.; MARCOS, R. Formation of micronucleated erythrocytes in mouse bone-marrow under conditions of hypothermia is not associated with stimulation of erythropoiesis. **Mutation Research**, v. 656, p. 8–13, 2008.

HOLLAND, N.; BOLOGNESI, C.; KIRSCH-VOLDERS, M.; BONASSI, S.; ZEIGER, E.; KNASMUELLER, S.; FENECH, M. 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.

HOSPIRA. Material Safety Data Sheet. Precedex. September 15, 2005.

IARMARCOVAI, G.; BONASSI, S.; BOTTA, A.; BAAN, R.A.; ORSIÈRE, T. Genetic polymorphisms and micronucleus formation: A review of the literature. **Mutation Research**, v. 658, p. 215-233, 2008a.

IARMARCOVAI, G.; CEPPI, M.; BOTTA, A.; ORSIEÈRE, T.; BONASSI, S. Micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes of cancer patients: A meta-analysis. **Mutation Research**, v. 659, p. 274-283, 2008b.

IVANOVA, E.; STAIKOVA, T.A.; VELCHEVA, I. Cytogenetic testing of heavy metal and cyanide contaminated river waters in a mining region of Southwest Bulgaria. **Journal of Cell and Molecular Biology**, v. 4, p. 99-106, 2005.

KATZUNG, B.G. **Farmacologia Básica e Clínica**, 8 ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2003. Seção VI, cap 31, p. 446-460.

KAZIMIROVA, A.; BARANCOKOVA, M.; DZUPINKOVA, Z.; WSOLOVA, L.; DUSINSKA, M. Micronuclei, chromosomal aberrations, important markers of ageing. Possible association with XPC and XPD polymorphisms. **Mutation Research**, v. 661, p. 1-2, p. 35-40, 2009.

KIM, B.S.; CHO, M.; KIM, H.J. Statistical analysis of *in vivo* rodent micronucleus assay. **Mutation Research**, v. 469, p. 233-241, 2000.

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

KURAS, M.; NOWAKOWSKA, J.; SLIWINSKA, E.; PILARSKI, R.; ILASZ, R.; TYKARSKA, T.; ZOBEL, A.; GULEWICZ, K. Changes in chromosome structure, mitotic activity and nuclear DNA content from cells of *Allium Test* induced by bark water extract of *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 107, p. 211-221, 2006.

LEME, D.M.; MARIN-MORALES, M.A. Chromosome aberration and micronucleus frequencies in *Allium cepa* cells exposed to petroleum polluted water—A case study. **Mutation Research**, v. 650, p. 80-86, 2008.

LEME, D.M.; MARIN-MORALES, M.A. *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. **Mutation Research**, v. 682, n. 1, p. 71-81, 2009.

LINDBERG, H.K.; FALCK, G.C.-M.; JARVENTAUS, H.; NORPPA, H. Characterization of chromosomes and chromosomal fragments in human lymphocyte micronuclei by telomeric and centromeric FISH. **Mutagenesis**, v. 23, n. 5, p. 371–376, 2008.

LUCIO NETO, M.P. Avaliação tóxica, citotóxica, genotóxica e mutagênica do composto 3-(2-cloro-6-fluorobenzil)-imidazolidina-2,4-diona em células eucarióticas. 2011. (**Dissertação de Mestrado em Ciências farmacêuticas**) – Universidade Federal do Piauí.

MA, T.H., XU, Z. ; XU, C. ; MCCONNELL, H. ; RABAGO, E.V. ; ARREOLA, G.A. ; ZHANG, H. The improved *Allium/Vicia* root tip micronucleus assay for clastogenicity of environmental pollutants. **Mutation Research**, v. 334, n. 2, Apr, p.185-95, 1995.

MAFFEI, F.; FORTI, G.C.; CASTELLI, E.; STEFANINI, G.F.; MATTIOLI, S.; HRELIA, P. Biomarkers to assess the genetic damage induced by alcohol abuse in human lymphocytes. **Mutation Research**, v. 514, n. 1-2, p. 49-58, 2002.

MALLADI, S.M.; BHILWADE, H.N.; KHANA, M.Z.; CHAUBEY, R.C. Gamma ray induced genetic changes in different organs of chick embryo using peripheral blood micronucleus test and comet assay. **Mutation Research**, v. 630, p. 20–27, 2007.

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.

MINOZZO, R.; DEIMLING, L.I.; SANTOS-MELLO, R. Cytokinesis-blocked micronucleus cytome and comet assays in peripheral blood lymphocytes of workers exposed to lead considering folate and vitamin B12 status. **Mutation Research**, v. 697, p. 24–32, 2010.

MITTAL, R.; PATIL, P.A.; TORGAL, S.S. Screening of codeine, dextromethorphan & dextropropoxyphene for their genotoxicity in swiss albino mice. **Indian Journal Medical Research**, v. 129, p. 676-680, 2009.

MONARCA, S.; RIZZONI, M.; GUSTAVINO, B.; ZANI, C.; ALBERTI, A.; FERETTI, D.; ZERBINI, I. Genotoxicity of surface water treated with different disinfectants using *in situ* plant tests. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 41, n. 5, p. 353-9, 2003.

MURGIA, E.; BALLARDIN, M.; BONASSI, S.; ROSSI, A.M.; BARALE, R. Validation of micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes as early cancer risk biomarker in a nested case–control study. **Mutation Research**, v. 639, p. 27–34, 2008.

PATINO-GARCIA, B.; HOEGEL, J.; VARGA, D.; HOEHNE, M.; MICHEL, I.; JAINTA, S.; KREIENBERG, R.; MAIER, C.; VOGEL, W. Scoring variability of micronuclei in

binucleated human lymphocytes in a case–control study. **Mutagenesis**, v. 21, n. 3, p. 191–197, 2006.

PATRICK, G.L. **An introduction to medicinal chemistry**. Oxford University Press. 1.^a ed., 1995.

PULI, L. K.; PATIL, P. Genotoxic evaluation of morphine, buprenorphine, pentazocine, and noscapine by micronucleus and comet assay in albino mice. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 39, n. 6, p. 265-268, 2007.

PURDUE PHARMA L.P. Material Safety Data Sheet. MS Contin® (morphine sulfate controlled-release) 15, 30, 60, 100 200 mg Tablets, 2009.

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

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

SHIMIZU, N.; KISHIOKA, S.; MAEDA, T.; FUKAZAWA, Y.; DAKE, Y.; YAMAMOTO, C.; OZAKI, M.; YAMAMOTO, H. Involvement of Peripheral Mechanism in the Verapamil-Induced Potentiation of Morphine Analgesia in Mice. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 95, p. 452 – 457, 2004.

SUDO, R.T. ; CALASANS-MAIA, J.A.; GALDINO, S.L.; LIMA, M.C.A.; ZAPATA-SUDO, G.; HERNANDES, M.Z.; PITTA, I.R. Interaction of morphine with a new α_2 -adrenoceptor agonist in mice. **The Journal of Pain**, v. 11, n. 1, p. 71-78, 2010.

SUZUKI, H.; TAKASAWA, H.; KOBAYASHI, K.; TERASHIMA, Y.; SHIMADA, Y.; OGAWA, I.; TANAKA, J.; IMAMURA, T.; MIYAZAKI, A.; HAYASHI, M. Evaluation of a liver micronucleus assay with 12 chemicals using young rats (II): a study by the Collaborative Study Group for the Micronucleus Test/Japanese Environmental Mutagen Society–Mammalian Mutagenicity Study Group. **Mutagenesis**, v. 24, n. 1, p. 9–16, 2009.

TKALEC, M.; MALARIC, K.; PAVLICA, M.; PEVALEK-KOZLINA, B.; VIDAKOVIC-CIFREK, Z. Effects of radiofrequency electromagnetic fields on seed germination, root meristematic cells of *Allium cepa* L. **Mutation Research**, v. 672, n. 2, p. 76–81, 2009.

TODAKA, T.; ISHIDA, T.; KITA, H.; NARIMATSU, S.; YAMANO, S. Bioactivation of Morphine in Human Liver: Isolation and Identification. **Biological Pharmaceutical Bull**, v. 28, n 7, p. 1275-1280, 2005.

TOLBERT, P.E.; SHY, C.M.; ALLEN, J.W. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: a field test in snuff users. **American Journal of Epidemiology**, v. 134, p. 840-850, 1991.

TOLBERT, P.E.; SHY, C.M.; ALLEN, J.W. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development. **Mutation Research**, v. 271, 669–677, 1992.

TÜRKOGLU, S. Genotoxicity of five food preservatives tested on root tips of *Allium cepa* L., **Mutation Research**, Turquia, v. 626, n. 1–2, p. 4–14, 2007.

UHL, M.; PLEWA, M.J.; MAJER, B.J.; KNASMÜLLER, S. Basic principles of genetic toxicology with an emphasis on plant bioassays, 11-30. In: **J. Maluszynska, M. Plewa (Eds): Bioassays in plant cells for improvement of ecosystem and human health. Wydawnictwo Uniwersytetu Śląskiego**. Katowice, p. 150. Electronic copy only for education purpose. 2003.

VIJAYALAXMI; KLIGERMAN, A.D.; PRIHODA, T.J.; ULLRICH, S.E. Micronucleus studies in the peripheral blood and bone marrow of mice treated with jet fuels, JP-8 and Jet-A. **Mutation Research**, v. 608, p. 82–87, 2006.

YI, H.; MENG, Z. Genotoxicity of hydrated sulfur dioxide on root tips of *Allium sativum* and *Vicia faba*. **Mutation Research**, v. 537, p.109–114, 2003.

ZALACAIN, M.; SIERRASESÚMAGA, L.; PATIÑO, A. El ensayo de micronúcleos como medida de inestabilidad genética inducida por agentes genotóxicos. **Anales del Sistema Sanitario de Navarra**, v. 28, n. 2, p. 227-236, 2005.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Ensaio de genotoxicidade e carcinogenicidade fazem parte de uma bateria de testes exigidos por entidades regulamentadoras antes que um fármaco entre no mercado farmacêutico. Essa medida visa prevenir possíveis efeitos genotóxicos e carcinogênicos que as substâncias testadas possam vir a apresentar futuramente em seres humanos.

O teste de *Allium* é um teste barato, de fácil execução e os resultados são obtidos de forma rápida, além de possuir boa correlação com testes em animais. Ele é capaz de determinar os mecanismos da genotoxicidade, seja ela por ação clastogênica ou aneugênica dos agentes testados. Apesar de o metabolismo vegetal ser diferente do animal, os resultados dos testes nesta espécie servem de indicativo para uma potencial ação tóxica, citotóxica e mutagênica no homem.

Após tratamento de meristemas de *A. cepa* com soluções de morfina e de seu co-tratamento com o PT-31, nas concentrações de 0,25, 0,5 e 1 mg/mL, somente esta última apresentou indícios de toxicidade tanto no tratamento com a morfina como no co-tratamento. A citotoxicidade também foi verificada apenas na maior concentração em espécimes tratados com morfina, enquanto no co-tratamento as doses de 0,5 e 1,0 mg/mL foram significativas em relação ao controle negativo. Na análise de mutagenicidade nesta espécie, quando o parâmetro avaliado foi a frequência de MN, somente a concentração de 1 mg/mL apresentou mutagenicidade, no entanto, para frequência de AC nenhuma concentração foi estatisticamente significativa.

O estudo de micronúcleos *in vivo* em camundongos é importante pois reflete as condições dos seres humanos, como os processos de absorção, distribuição, metabolismo e excreção, podendo apresentar resultados mais parecidos entre essas espécies. Resultados positivos neste ensaio indicam risco potencial em seres humanos, pois já é sabido que a frequência de MN está associada muitas vezes ao aparecimento de câncer. Por isso, a importância deste biomarcador na detecção do potencial mutagênico de novas substâncias. Juntamente com a análise de MN pode se fazer o estudo da relação EPC/ENC e de células BN, que em conjunto fornecem informações a respeito da citotoxicidade de agentes testados, ajudando a traçar seu perfil de segurança.

No teste de MN realizado em *Mus musculus*, a citotoxicidade medida através da análise de células BN, mostrou resultado significativo somente em animais machos tratados com morfina (1 mg/kg), animais que receberam o co-tratamento (morfina + PT-31) nas concentrações de 0,25; 0,5 e 1 mg/kg, apenas os da maior concentração, apresentaram

resultados significativos, tanto em animais machos como fêmeas. A citotoxicidade avaliada pela análise da relação EPC/ENC foi observada nos dois tratamentos, com a única exceção dos animais machos da concentração de 0,25 mg/kg, que não apresentaram resultados significantes estatisticamente. A frequência de MN no tratamento com a morfina apresentou mutagenicidade apenas em animais machos, enquanto no co-tratamento, foi significativa para todas as concentrações, com a exceção dos machos da concentração de 0,25 mg/kg.

Baseado nos dados encontrados podemos perceber que há uma relação dose-dependente nos dois tratamentos, onde a menor dose testada (0,25 mg/mL em *A. cepa* e 0,25 mg/kg em *Mus musculus*) não apresentou sinais de toxicidade, citotoxicidade e mutagenicidade. Como os resultados encontrados nas duas espécies foram semelhantes, é possível verificar uma correlação entre os bioensaios utilizados.

Para que a droga testada em co-tratamento com morfina possa ser utilizada futuramente na prática clínica são necessários mais estudos de toxicidade para complementar nossos achados, a fim de se evidenciar os mecanismos relacionados às atividades tóxicas, citotóxicas e mutagênicas e, assim, assegurar que o novo fármaco seja seguro em seres humanos.