

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
CAMPUS URUGUAIANA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

GABRIELA DE SOUZA DA SILVA

**EFEITOS GENOTÓXICOS E CITOTÓXICOS *EX VIVO*
DO ANTIFÚNGICO FLUCONAZOL EM LEUCÓCITOS
HUMANOS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

URUGUAIANA
2016
GABRIELA DE SOUZA DA SILVA

EFEITOS GENOTÓXICOS E CITOTÓXICOS *EX VIVO* DO ANTIFÚNGICO FLUCONAZOL EM LEUCÓCITOS HUMANOS

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA), como requisito parcial para o grau de MESTRE em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Luís Flávio Souza de Oliveira

Coorientador: Prof. Dr. Michel Mansur Machado

**URUGUAIANA
2016
GABRIELA DE SOUZA DA SILVA**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA CAMPUS URUGUAIANA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação de Mestrado

**EFEITOS GENOTÓXICOS E CITOTÓXICOS *EX VIVO*
DO ANTIFÚNGICO FLUCONAZOL EM LEUCÓCITOS
HUMANOS**

Elaborada por
Gabriela de Souza da Silva

Como requisito parcial para a obtenção do grau de

Mestre em Ciências Farmacêuticas

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada em: 27/04/2016.

Banca examinadora:

Prof. Dr. Luís Flávio Souza de Oliveira
Orientador
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas - UNIPAMPA

Prof. Dr^a. Jacqueline da Costa Escobar Piccoli
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas – UNIPAMPA

Prof. Dr. Rodrigo José Freddo
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas - UNIPAMPA

AGRADECIMENTOS

A Deus, cheio de bondade, que me deu saúde e força para vencer todos os meus obstáculos.

Ao meu noivo, Felipe Cougo, por sempre estar disposto a me ajudar e a me auxiliar em minhas decisões, me incentivar e acreditar que eu era capaz. Te amo!

A minha mãe Leri Suzana por estar sempre me guiando e me iluminando.

Um agradecimento mais que especial ao meu orientador e amigo Prof. Dr. Luís Flávio Souza de Oliveira que me proporcionou o gosto pela pesquisa e a vontade de seguir estudando. Sem ele eu não chegaria até aqui. Muito obrigada por todo o apoio, ensinamentos e amizade!

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Michel Mansur Machado, sou muito grata pela orientação, convívio e ensinamentos.

Agradeço imensamente à UNIPAMPA e aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas que de alguma forma contribuíram para a minha formação.

Ao Prof. Dr. Fávero Reisdorfer Paula pelos ensinamentos, interesse e paciência.

Aos professores Dr^a. Jacqueline da Costa Escobar Piccoli e Dr. Rodrigo José Freddo por terem aceitado o convite para fazerem parte da minha banca.

Aos colegas do grupo NUBIOTOXIM, que colaboraram no desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus colegas de trabalho do laboratório de análises clínicas BIOSUL por todo o apoio e incentivo na reta final de conclusão do meu trabalho.

A minha família e aos meus amigos.

Sem estas pessoas, o trabalho seria mais árduo e cansativo. Vocês foram meu suporte durante toda esta trajetória. É impossível concluir esta etapa sem agradecer-lhes devidamente. Suas presenças foram um marco em minha vida.

Enfim, agradeço a todos que me ajudaram de alguma forma para a realização e concretização deste trabalho.

RESUMO

O fluconazol é um fármaco antifúngico de amplo espectro muito utilizado pela população. Contudo, são poucos os registros na literatura que imputem a segurança do uso do fluconazol e tampouco a dose mínima capaz de induzir lesões no material genético do paciente. Embora a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) exija testes de genotoxicidade para admissão de novos medicamentos, os que têm seu registro expedido antes do ano de 2006 não trazem essa obrigatoriedade, incluindo-se aqui o fluconazol. Portanto, é de extrema importância estudos sobre a avaliação genotoxicológica de fármacos, principalmente os que são tão conhecidos e utilizados como o fluconazol. O presente estudo investigou os efeitos genotóxicos da cápsula e do princípio ativo do fluconazol através do teste cometa e do teste de proliferação celular e também os efeitos citotóxicos da cápsula e do princípio ativo do fluconazol através do teste de viabilidade celular. As concentrações testadas da cápsula e do princípio ativo do fluconazol foram 6, 12, 30, 60 e 120 µg/mL. Todos os ensaios foram realizados em triplicatas e o peróxido foi utilizado como controle positivo e tampão PBS 7,4 como controle negativo. Todas as concentrações testadas da cápsula do Fluconazol (6, 12, 30, 60 e 120 µg/mL) demonstraram ser capazes de interferir negativamente no processo de proliferação celular, diminuindo o número de células proliferadas em todas as concentrações testadas, quando comparadas ao controle negativo. Já no caso do princípio ativo do Fluconazol, apenas as três últimas concentrações (30, 60 e 120 µg/mL) interferiram negativamente no processo de proliferação celular. Na avaliação do índice de dano ao DNA (teste cometa), foi observado dano à estrutura de DNA nas concentrações 60 e 120 µg/mL da cápsula do Fluconazol. Já as concentrações testadas com o princípio ativo do Fluconazol não foi observado dano à estrutura de DNA. Foi verificado que a cápsula do Fluconazol possui atividade citotóxica sobre leucócitos humanos nas duas maiores concentrações testadas (60 e 120 µg/mL) de forma concentração dependente. Porém, o princípio ativo do Fluconazol não demonstrou ser citotóxico nas concentrações testadas (6 12, 30, 60 e 120 µg/mL).

Palavras chaves: Fluconazol, antifúngicos, genotoxicidade, citotoxicidade.

ABSTRACT

Fluconazole is a broad-spectrum antifungal drug widely used by the population. However, there are few reports in the literature that implicate the safety of the use of fluconazole and either the minimum dose capable of inducing lesions in the genetic material of the patient. Although the National Health Surveillance Agency (ANVISA) requires genotoxicity tests for admission of new medicines, which have their registration issued before 2006 do not bring this obligation, including here fluconazole. Therefore, it is extremely important genotoxicological studies on the evaluation of drugs, especially such that are known and used as fluconazole. This study investigated the genotoxic effects of the capsule and the active principle of fluconazole by the comet test and the cell proliferation test and also the cytotoxic effects of the capsule and the active principle of fluconazole by cell viability test. The tested concentrations of the capsule and the active principle of fluconazole were 6, 12, 30, 60, and 120 mg/mL. All assays were performed in triplicate and peroxide was used as a positive control and PBS buffer as negative control 7.4. All tested concentrations of fluconazole capsule (6, 12, 30, 60 and 120 µg/mL) were capable of induce a negative interference in the cellular proliferation process, reducing the number of proliferating cells at all concentrations tested when compared to the negative control. In the case of the active ingredient, the fluconazole, only the last three concentrations (30, 60, and 120 µg/mL) were able to decrease the cellular proliferation process. In the assessment of DNA damage index (comet assay), there was observed damage of fluconazole capsule on the DNA structure at concentrations 60 and 120 µg/mL. On the other hand, the concentrations tested with the active ingredient of Fluconazole was not observed damage to the DNA structure. Fluconazole has been found that the capsule has a cytotoxic activity on human leukocytes at the two highest concentrations tested (60 and 120 µg/mL) as a concentration-dependent manner. However, the active ingredient of Fluconazole not induced any cytotoxic effect at the concentrations tested (6, 12, 30, 60, and 120 µg/mL).

Key words: Fluconazole, antifungal, genotoxicity, cytotoxicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Rota e do fluconazol associado aos excipientes da biossíntese do Ergosterol	17
Figura 2- Estrutura do Fluconazol	17
Figura 3- Estrutura do DNA.	21
Figura 4- Diferenças morfológicas da necrose e da apoptose.	25
Figura 5- Método de contagem de leucócitos em câmara de Neubauer.	29
Figura 6 - Classificação dos nucleoides conforme comprimento da cauda: 0: classe 0; 1: classe 1; 2: classe 2; 3: classe 3; 4: classe 4.	28
Figura 7 A-B - Ensaio de proliferação celular em leucócitos humanos expostos a diferentes concentrações do princípio ativo e da cápsula do Fluconazol. Os dados estão expressos em média \pm desvio padrão, n=3; p<0.05. As letras sobre as barras representam diferenças significativas entre os grupos; CN=controle negativo; CP=controle positivo.	29
Figura 8 A-B - Índice de dano de DNA gerado pelo ensaio cometa alcalino em leucócitos humanos expostos a diferentes concentrações do princípio ativo e da cápsula do Fluconazol. Os dados estão expressos em média \pm desvio padrão, n=3; p<0.05. As letras sobre as barras representam diferenças significativas entre os grupos; * representa diferenças significativas entre os grupos; CN=controle negativo; CP=controle positivo.	33
Figura 9 A-B - Teste de viabilidade celular em leucócitos humanos expostos a diferentes concentrações da cápsula e do princípio ativo do Fluconazol. Os dados estão expressos em média \pm desvio padrão, n=3; p<0.0001. As letras sobre as barras representam diferenças significativas entre os grupos; CN=controle negativo; CP=controle positivo; * representa diferenças significativas entre os grupos.	35

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	OBJETIVOS	11
2.1	OBJETIVO GERAL	11
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	11
3.0	REFERENCIAL TEÓRICO	12
3.1	HISTÓRICO	12
3.2	EPIDEMIOLOGIA	13
3.3	ANTIFÚNGICOS	14
3.4	FLUCONAZOL	17
3.5	TOXICIDADE.....	19
3.6	TOXICIDADE DO TRATAMENTO COM FLUCONAZOL.....	19
3.7	GENOTOXICIDADE.....	20
4.	MATERIAIS E MÉTODOS	27
4.1	Substâncias químicas	27
4.2	Preparo da cultura de leucócitos humanos	27
4.3	Avaliação dos parâmetros citotóxicos e genotóxicos em cultura de leucócitos humanos.....	28
4.3.1	Viabilidade celular.....	28
4.3.2	Proliferação celular.....	28
4.3.3	Teste do cometa alcalino	29
4.4	Análise estatística	30
	RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
5.1	Genotoxicidade.....	31
5.2	Citotoxicidade.....	35
6.	CONCLUSÕES.....	39
7.	PERSPECTIVAS FUTURAS.....	40
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41

1 INTRODUÇÃO

Cresce cada vez mais o uso indiscriminado de antifúngicos, sendo que um dos fatores que contribui para este aumento é o fato de os antifúngicos causarem resistência e, mesmo assim, poderem ser comercializados sem prescrição médica nas farmácias (RAMOS et al., 2015). Contudo, são poucos os registros na literatura que imputem a segurança do uso do fluconazol e tampouco a dose mínima capaz de induzir lesões no material genético de pacientes (SANTOS JR et al., 2005; RAMOS et al., 2015).

O fluconazol é um composto bitriazólico sintético, usado em larga escala de forma isolada ou em combinação com outras drogas no tratamento de doenças causadas por fungos. Tem amplo espectro de ação, incluindo espécies de *Candida*, *Cryptococcus*, *Histoplasma* e *Paracoccidioides* (SANTOS JR et al., 2005). Os efeitos adversos presentes em alguns pacientes submetidos à terapia com fluconazol são náuseas, dor abdominal, vômitos, diarreia, cefaleia e, raramente, hepatotoxicidade, dermatite esfoliativa, anafilaxia, plaquetopenia e leucopenia (FICA, 2004).

Embora a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) exija testes de genotoxicidade para admissão de novos medicamentos, os que têm seu registro expedido antes do ano de 2006 não trazem essa obrigatoriedade, incluindo-se aqui o fluconazol. Portanto, é de extrema importância estudos sobre a avaliação genotoxicológica de fármacos, principalmente os que são amplamente utilizados, como é o caso do fluconazol.

Neste sentido, este trabalho pretende gerar dados que corroborem com a tomada de decisão terapêutica, bem como com o uso racional do fluconazol através de avaliações que envolvem estudos sobre genotoxicidade (teste de dano oxidativo alcalino ao DNA) e de citotoxicidade (teste de viabilidade e proliferação celulares) em leucócitos humanos *ex vivo*, estabelecendo as concentrações mínimas deste antifúngico para induzir alterações nos parâmetros supracitados.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos genotóxicos e citotóxicos *ex vivo* do antifúngico fluconazol.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar os efeitos do fluconazol e do fluconazol associado aos excipientes sobre parâmetros genotóxicos em culturas de leucócitos humanos, através do teste de dano oxidativo alcalino ao DNA e proliferação celular;
- Determinar os efeitos do fluconazol e do fluconazol associado aos excipientes sobre parâmetros citotóxicos em culturas de leucócitos humanos, através do teste de viabilidade celular;
- Determinar a concentração mínima de fluconazol e do fluconazol associado aos excipientes capaz de induzir danos genotóxicos e citotóxicos nas análises *ex vivo*.

3.0 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 HISTÓRICO

A partir da década de 70 houve um aumento drástico na incidência e na prevalência de infecções micóticas superficiais ou sistêmicas, devido a vários fatores, entre os quais se destacam os avanços na Medicina, com crescente utilização de fármacos imunossupressores em pacientes transplantados ou com câncer, e o avanço da AIDS (BRAMMER *et al.*, 1990; RICHARDSON *et al.*, 1990; CHA; SOBEL, 2004).

A anfotericina B, até a década de 80, era o principal agente da terapia antifúngica, utilizada de forma isolada ou associada à flucitosina (BALDACCI, 2001). Porém, apesar da excelente atividade antifúngica, a utilização clínica deste fármaco é comprometida por uma série de fatores, incluindo alta incidência de efeitos colaterais, especialmente nefrológicos e hematológicos, baixa penetração no Sistema Nervoso Central (SNC) e restrições impostas pela administração intravascular (BRAMMER *et al.*, 1990; ALAK *et al.*, 1996; BENNETT, 1996; BALDACCI, 2001; RAMOS *et al.*, 2015).

Entre as classes de antifúngicos então conhecidas destacavam-se os azóis, inibidores da síntese *de novo* de ergosterol, um dos componentes da membrana fúngica (MILAN; MARTINEZ, 2002). Essa classe de antifúngicos apresenta, de modo geral, alta lipofilicidade, além de vulnerabilidade metabólica, resultando em baixa biodisponibilidade oral, grande volume aparente de distribuição, concentrações sanguíneas baixas e alta ligação às proteínas plasmáticas (RICHARDSON *et al.*, 1990; SANT'ANA; MILAN; MARTINEZ, 2002; RAMOS *et al.*, 2015).

O fluconazol aparece como prospecção terapêutica a partir de sua síntese em 1985, pois apresentou excelente atividade antifúngica em modelos animais, além de adequada solubilidade em água, permitindo sua administração intravascular (CHA; SOBEL, 2004). Este antifúngico é um dos representantes da segunda geração de compostos azólicos (os triazóis) e tem sido utilizado com sucesso no combate a infecções fúngicas sistêmicas e das mucosas causadas por *Candida albicans*, a qual é a espécie mais comum de fungo patogênico encontrada em pacientes hospitalizados (MARRA; CAMARGO, 2002; SANT'ANA; MILAN; MARTINEZ, 2002). Neste

sentido, é bem conhecido seu amplo uso na década de 2000 como escolha terapêutica pela classe médica para tratar infecções por *Candida spp*, incluindo orofaríngea e candidíase esofágica, candidíase vulvovaginal, candidemia e candidíase disseminada (CHA; SOBEL, 2004).

3.2 EPIDEMIOLOGIA

Os dados epidemiológicos sobre infecções fúngicas parecem estar relacionados, já há algum tempo, ao aumento da suscetibilidade da população em função de uma cronologia histórica (CHIH-CHENG *et al.*, 2008; RAMOS *et al.*, 2015), denotando uma diminuição da capacidade de resposta do sistema imune e ou aumento da resistência de fungos à terapia disponível.

De fato, o sistema imunológico pode se tornar debilitado por fatores como: a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS); procedimentos de transplantes e quimioterapia com antitumorais; uso indiscriminado de antimicrobianos de largo espectro ou crônico de corticoides; e por procedimentos médicos invasivos, como cirurgia e hemodiálise (UPTON; MARR, 2006).

As infecções hospitalares causadas por fungos tornaram-se um problema crescente de saúde pública em muitos países (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003; MALUCHE; SANTOS, 2008). A maior parte dessas infecções hospitalares é causada por fungos, onde destaca-se o gênero *Candida spp*, o qual é responsável por cerca de 80% das infecções fúngicas no ambiente hospitalar e constitui causa relevante de infecções de corrente sanguínea. Isto acontece devido ao fato das leveduras do gênero *Candida* ter alta frequência de colonização em humanos (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003; MALUCHE; SANTOS, 2008; BLANCO *et al.* 2014; RAMOS *et al.* 2015).

Já as espécies não-albicans respondem por ao menos 50% das infecções invasivas por *Candida spp*, apresentando peculiaridades de história natural e sensibilidade a antifúngicos (BLANCO *et al.* 2014; RAMOS *et al.* 2015). A mortalidade geral de fungemias por *Candida spp* é da ordem de 40 a 60%, tornando esta complicação infecciosa um grande desafio para os clínicos que trabalham em hospitais

terciários em diferentes países (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003; BLANCO *et al.* 2014; RAMOS *et al.* 2015).

Outra importante patologia causada por fungos é a criptococose, doença causada pela levedura *Cryptococcus neoformans*, que assumiu um papel relevante por ser considerada uma das micoses mais comuns em pacientes imunodeprimidos, particularmente nos portadores da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), acometendo principalmente o SNC. O comprometimento da imunidade celular é considerado o principal fator predisponente para infecção por esse microrganismo (PASSOS *et al.*, 2002; MOREIRA *et al.*, 2006).

Na prática clínica, os principais grupos de antifúngicos utilizados são: as sulfonamidas, azóis, polienos, fluorocitosina e equinocandinas. Estes antifúngicos interagem ou inibem a síntese *de novo* do ergosterol, principal esterol da membrana plasmática fúngica (GEORGOPAPADAKOU; WALSH, 1994; TRAVASSOS *et al.*, 2008).

3.3 ANTIFÚNGICOS

Os polienos (anfotericina B e nistatina) são fungicidas que atuam aumentando a permeabilidade da membrana plasmática por se ligarem a esteróis de membrana, principalmente ao ergosterol, comprometendo a integridade da membrana, e levando à morte celular (SANGLARD, 2002). Embora a anfotericina B seja o antifúngico mais utilizado no tratamento de micoses sistêmicas, seu uso clínico tem sido limitado devido ao alto nível de nefrotoxicidade (SANGLARD, 2002).

Já os azóis (fluconazol, itraconazol, cetoconazol, saperconazol e voriconazol) interagem com a enzima citocromo P-450 14- α -esterol demetilase (CYP51A1), a qual é essencial para a *síntese de novo* do ergosterol, se ligando ao grupo heme no sítio ativo da enzima (SANGLARD, 2002). Essa inibição causa a depleção da concentração de ergosterol e acúmulo de esteróis alterados na membrana. Embora a CYP51A1 também esteja envolvida na *síntese de novo* de colesterol em mamíferos, os azóis apresentam uma afinidade significativamente maior pela enzima de fungos (SANGLARD, 2002). De modo geral, foi observado que os azóis apresentam boa atividade contra

determinados fungos em culturas *in vitro* são efetivos para propósitos clínicos, apresentando menores efeitos adversos quando comparados à anfotericina B (HAHNN; HAMDAM, 2000).

As equinocandinas são uma nova classe de antifúngicos altamente seletivos de lipopeptídeos que inibem a biossíntese das β -(1,3) glicanas, constituintes da parede celular fúngica. Tendo em vista que células de mamíferos não possuem β -(1,3), esta classe de agentes se torna seletiva em sua toxicidade a fungos (KURTZ; DOUGLAS, 1997). Existem três equinocandinas no mercado: micafungina, caspofungina e anidulafungina. Dentre estas, somente a caspofungina está aprovada para o tratamento de candidíase (PERLIN, 2007).

Os principais grupos de antifúngicos sistêmicos comumente utilizados para o tratamento de patologias causadas por fungos são os imidazóis (cetoconazol), triazóis (fluconazol e itraconazol) e alilamina (terbinafina). Apesar de haver uma variabilidade maior de opções de antifúngicos, tanto tópicos quanto sistêmicos, o arsenal terapêutico ainda é bastante restrito, e é clara a necessidade de novos antifúngicos mais eficazes e menos tóxicos. Também deve-se levar em consideração o fato de que a resistência dos fungos aos fármacos antifúngicos disponíveis continua a crescer, o que dificulta o tratamento, apesar do surgimento de novos medicamentos (TAPIA, 2012).

O cetoconazol é o mais conhecido representante da primeira geração de compostos azólicos. Porém, ocasionalmente, o tratamento com este fármaco precisa ser interrompido em virtude de efeitos adversos no trato gastrointestinal. Além disso, o cetoconazol não apresenta eficácia no tratamento de candidíase sistêmica ou meningite criptocócica (BENNETT, 1996). Posteriormente a ele, fluconazol se estabelece como opção para terapia frente às limitações do cetoconazol.

Os derivados triazólico mais recentes, devem suas atividades antifúngicas, pelo mesmo em parte, a inibição da 14 α -esterol desmetilase dependente do citocromo P-250, responsável pela conversão do lanosterol em ergosterol (figura 1) (GHANNOUM; RICE, 1999). Por isso, comprometem a biossíntese do ergosterol na membrana citoplasmática levam ao acúmulo de esteróis, os quais podem desagregar o arranjo compacto das cadeias acíclicas dos fosfolipídios, comprometendo as funções de determinados sistemas enzimáticos ligados à membrana, como a ATPase e as enzimas

de transporte de elétrons (GHANNOUM; RICE, 1999), inibindo assim, o crescimento dos fungos.

O ergosterol é um componente essencial da membrana plasmática fúngica, onde regula a permeabilidade da membrana e tem um papel importante na respiração mitocondrial e fosforilação oxidativa (BOSSCHE *et al.*, 2003). A inibição da síntese de ergosterol afeta o citocromo c oxidase nas mitocôndrias; e aumenta a síntese de quitina, resultando em uma distribuição irregular da mesma (BOSSCHE *et al.*, 2003). Portanto, é esperado que mudanças nos níveis de ergosterol e nas estruturas de esteróis influenciem a atividade de várias rotas metabólicas.

As células fúngicas e as células humanas utilizam a mesma via metabólica para a síntese dos esteróis de membrana até a formação do metabólito lanosterol, a partir do qual as vias bioquímicas se divergem. Convergentemente, a síntese destes esteróis envolve uma complexa rota de reações bioquímicas que envolvem cerca de 20 enzimas, partindo do acetil CoA até a formação do esqualeno. O esqualeno é uma molécula alifática com 30 átomos de carbono que é ciclizada para a formação do lanosterol. O lanosterol, por sua vez, sofre múltiplas reações bioquímicas para originar o colesterol e o ergosterol por vias metabólicas diferentes (NELSON; COX, 2011).

A biossíntese de ergosterol em fungos envolve complexas vias metabólicas, que podem diferir um pouco a depender da espécie e linhagem. Em termos gerais, é bem descrito que o lanosterol sofre três sequenciais desmetilações nos carbonos C-14, C-14^a e C-14 B formando o zimosterol, o qual é transformado em fecosterol. O fecosterol sofre isomerização para formar episterol e, e, seguida, o ergosterol, conforme esquematizado na figura 1 (BERG *et al.*, 2010).

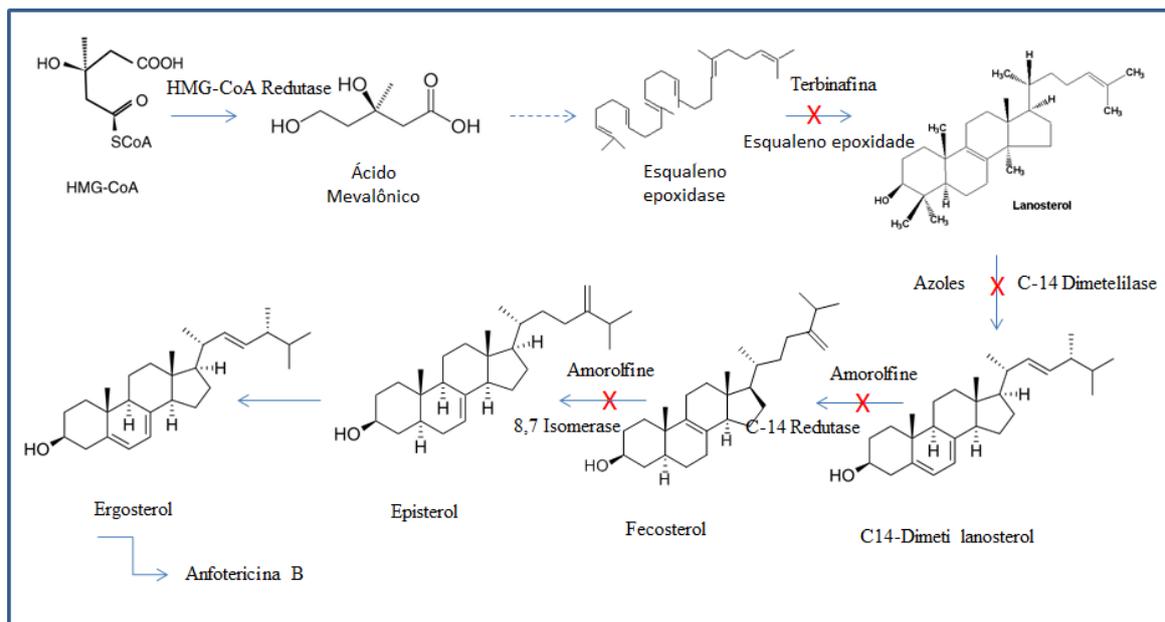


Figura 1- Rota da biossíntese do Ergosterol

3.4 FLUCONAZOL

O fluconazol, formulado na década de 80, é um fármaco antifúngico triazólico de amplo espectro (Figura 2), efetivo contra uma variedade de fungos que causam micoses sistêmicas em humanos, como a meningite criptocócica, além de exercer reconhecido efeito sobre infecções superficiais causadas por diferentes espécies do gênero *Candida* (CHA; SOBEL, 2004). Este fármaco tem absorção por via oral completa e muito rápida, além de apresentar maior hidrofiliabilidade em relação a outros derivados azólicos, o que favorece sua penetração em líquidos corporais, podendo alcançar níveis de 90% no líquido cefalorraquidiano de pacientes com meningite (RICHARDSON; WARNOCK, 1993; SANTOS *et al.*, 2005).

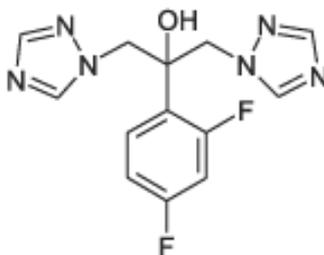


Figura 2- Estrutura do Fluconazol

Fonte: PEREIRA, 2007

Pereira *et al.*, (2004) e Porta, Chang, Storpirtis, (2005) avaliaram a biodisponibilidade e bioequivalência de formulações em cápsula comerciais de fluconazol disponíveis no mercado brasileiro e, em ambos os estudos, as cápsulas comerciais foram consideradas bioequivalentes ao produto de referência.

Segundo Sharma e Bathia (2011), o fluconazol é considerado um agente fungistático e fungicida e, em relação ao mecanismo de ação, o fluconazol age inibindo a síntese *de novo* do ergosterol fúngico em uma das etapas finais de sua biossíntese, o qual é essencial para manutenção da fluidez membranar dos fungos (WALSH *et al.*, 1997).

Mais especificamente, esse composto triazólico atua inibindo o CYP51, essa inibição não permite a geração do acetato de ergosterol por inibir a lanosterol dimetilase, que é dependente de citocromo P-450 da levedura, prejudicando a captação de nutrientes, o que se traduz por inibição do crescimento fúngico, originando alterações morfológicas que resultam em necrose celular (GHANNOUM; KUHN, 2002; RICHARDSON; WARNOCK, 1993).

Dentre as infecções fúngicas de grande notoriedade clínica estão àquelas reconhecidas como oportunistas, como a criptococose. Esta doença está comumente associada aos pacientes portadores do vírus da imunodeficiência adquirida humana (HIV). Atualmente, a criptococose associada ao HIV constitui-se em um grave problema de saúde, com taxas de prevalência que variam de 4,2% em países desenvolvidos, para 17% em países da África e Colômbia, chegando a atingir uma taxa de incidência de 3,3 para cada 1.000 doentes portadores de HIV (AGUDELO *et al.*, 2015).

Não menos preocupante, a epidemia da AIDS cresce juntamente à exposição adicional aos fármacos azólicos, o que gera uma outra problemática: a incidência de resistência aos antifúngicos (RIBEIRO *et al.*, 2005). Por outro lado, segundo trabalho de Aller *et al.* (2007), relacionado à susceptibilidade *ex vivo*, houve um decaimento da resistência fúngica ao fluconazol, considerando o período entre 1996 e 2007.

Dentro do contexto dualístico da patologia e da farmacologia, o fluconazol apresenta-se, atualmente, como uma opção valiosa, tendo em vista sua relevante atividade antifúngica, sua tolerabilidade, sua baixa incidência de efeitos colaterais, além

de poder ser administrado tanto por via intravascular quanto por via oral (JOHNSON, 2008). A união dessas características o torna um agente ideal para prevenção e tratamento de infecções fúngicas em pacientes imunossuprimidos, com sua utilização aumentada, significativa e particularmente, em pacientes com AIDS (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003; JOHNSON, 2008, AGUDELO *et al.* 2015).

3.5 TOXICIDADE

A fim de se avaliar o risco de efeitos genotóxicos e cancerígenos para seres humanos, as autoridades reguladoras da Europa, Japão e EUA recomendam que estudos pré-clínicos de genotoxicidade e de carcinogenicidade façam parte da geração de dados que compilam os documentos destinados à aprovação da comercialização de produtos farmacêuticos (BRAMBILLA; MARTELLI, 2009). Dentro dessa perspectiva, dois testes bastante utilizados na avaliação genotóxica e mutagênica de produtos químicos são, respectivamente, o ensaio cometa e o teste de micronúcleos (CARVALHO *et al.*, 2010).

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

3.6 TOXICIDADE DO TRATAMENTO COM FLUCONAZOL

O fluconazol, mesmo em doses terapêuticas de 400 mg/dia e meia vida de 30 horas, apresenta efeitos adversos relevantes em alguns pacientes, tais como: náuseas,

dor abdominal, vômitos, diarreia, cefaleia e, raramente, hepatotoxicidade, dermatite esfoliativa, anafilaxia, plaquetopenia e leucopenia (FICA, 2004).

Ainda, pelo fato de haver a indicação desse antifúngico ser administrado com uma dose de carga equivalente ao dobro da terapia a ser adotada para assegurar concentrações estacionárias desde o segundo dia, aumenta, consideravelmente, o risco de neurotoxicidade, a qual é observada com concentrações plasmáticas de 80 µg/mL e associada a doses de 800 mg/dia ou a doses menores na presença de deficiência de função renal (FICA, 2004).

O uso indiscriminado desse fármaco, principalmente em pacientes imunocomprometidos, vem apresentando resultados insatisfatórios no tratamento de infecções fúngicas em função do aparecimento da resistência fúngica, o que acaba trazendo a discussão da necessidade de novos agentes antifúngicos, com maior espectro e potência, porém, com menor toxicidade (SANTOS JR *et al.*, 2005).

O fluconazol foi formulado no ano de 1981, porém foi apenas a partir do ano de 2006 que a ANVISA passou a exigir os testes de genotoxicidade para os medicamentos lançados a partir deste ano. Sendo assim, o fluconazol não passou pelos testes de genotoxicidade.

3.7 GENOTOXICIDADE

A molécula do ácido dexossirribonucleico, o DNA, é constituída por duas cadeias helicoidais polimerizadas de nucleotídeos que se enrolam ao redor de um mesmo eixo longitudinal, formando uma dupla hélice. Os nucleotídeos são constituídos por bases nitrogenadas associadas às moléculas de ribose e fosfato através de ligações fosfodiéster. As desoxirriboses ficam no plano externo em relação às bases nitrogenadas, expostas ao meio aquoso. O espaço entre uma fita e outra forma um sulco que é ligado por pareamento de bases nitrogenadas através de pontes de hidrogênio (MARZZOCO, 1999).

Em uma extremidade da fita do DNA está livre a hidroxila do carbono-5 da primeira pentose e na outra está livre a hidroxila do carbono-3 da última pentose. Já na fita complementar este sentido é invertido. Durante a duplicação do DNA, fundamental

para a divisão celular (mitose e meiose), a DNA polimerase, a qual é a principal enzima envolvida, sintetiza as fitas de DNA no sentido 5'- 3', produzindo fitas complementares.

A direção de síntese da nova fita de DNA e o fato das duas fitas moldes correrem em sentido antiparalelo: além de necessitar de uma fita molde e de um primer, a DNA polimerase somente consegue sintetizar uma nova molécula de DNA acrescentando novos nucleotídeos ao carbono 3' do glicídeo (o carbono 5' fica localizado na parte oposta a esse glicídeo). Por isso se diz que a biossíntese dos ácidos nucleicos ocorre no sentido 5' → 3'. Como cada fita da molécula de DNA corre em sentido inverso, a sua duplicação ocorre em direções opostas (MARZZOCO, 1999; SILVA *et al.*, 2003).

As bases nitrogenadas são divididas em dois grupos de acordo com a figura 3: as purinas e as pirimidinas. As derivadas das purinas são a adenina (A) e a guanina (G), e as derivadas das pirimidinas são a citosina (C) e a timina (T). O pareamento das bases de cada fita se dá de maneira específica, de forma que uma purina sempre seja pareada com uma pirimidina, especificamente: adenina (A) com timina (T) e citosina (C) com guanina (G). A dupla hélice de DNA é, portanto, mantida basicamente por duas forças: as pontes de hidrogênio formadas entre as bases complementares e por interações hidrofóbicas (SILVA *et al.*, 2003).

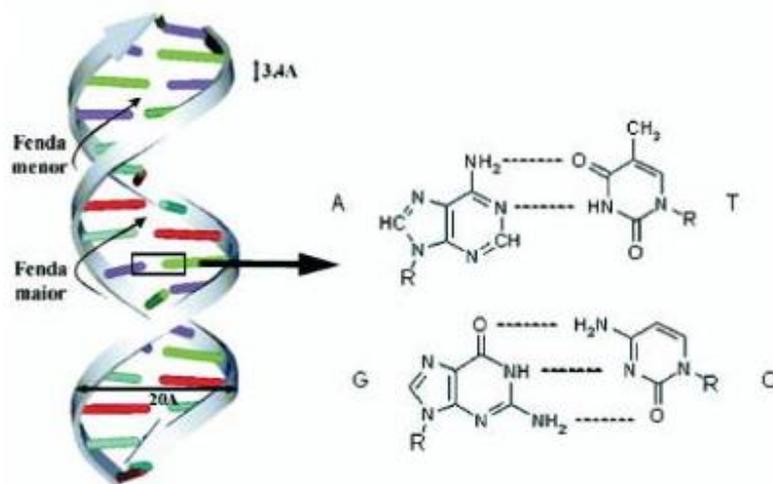


Figura 3-Estrutura do DNA.

(Imagem disponível adaptada de <http://publications.nigms.nih.gov/thenewgenetics/chapter1.html>, acesso em 03/11/2015).

A molécula de DNA pode ser alvo de xenobióticos metabólicas que reagem diretamente, ou indiretamente, com a incorporação de nucleotídeos análogos, ou bloqueando funções metabólicas do DNA como, por exemplo, as topoisomerasas e as DNA polimerases. Duas estratégias estão envolvidas nas respostas aos danos ao DNA: os danos são reparados ou tolerados, ou as células são removidas por apoptose. Aqui não levamos em consideração a possibilidade de necrose, a qual não adentra no campo da reparação, portanto, não há possibilidade de que os processos apoptóticos se estabeleçam neste caso. O não reparo no caso de a célula manter-se viável, por sua vez, leva a consequências tais como as aberrações cromossômicas, mutações em genes e transformações que concorrem malignas (KULTZ, 2005).

Nos estágios iniciais de desenvolvimento de novos fármacos, tem sido dada grande ênfase aos estudos de genotoxicidade, uma vez que, dentre as várias reações adversas que um medicamento pode causar, está à ocorrência de efeitos genotóxicos e carcinogênicos. Os testes de genotoxicidade e mutagenicidade *in vivo* são ferramentas sensíveis para detecção da ação lesiva ao material genético e do potencial carcinogênico de várias moléculas (MALUF; ERDTMANN, 2003).

Destarte ao potencial carcinogênico, os estudos genotóxicos também encontram amparo na elucidação mecanística dos fenômenos relacionados a doenças congênitas, doenças genéticas (mutagênese) degenerativas e envelhecimento celular (ERDTMANN, 2003). Tendo esses pressupostos como base, os estudos genotóxicos ganham notoriedade em sua relação com a segurança de uso de drogas, fármacos, insumos farmacêuticos, contaminantes ambientais antropogênicos em geral, entre outros, principalmente quando os mesmos são utilizados ou protagonizam uma perspectiva de uso ou exposição prolongados (LIU *et al.*, 2012).

No Brasil, diretrizes atuais reguladas pela ANVISA, exigem testes genotóxicos para comercialização de novos fármacos naturais e sintéticos, de forma a comprovar a segurança destes fármacos. Estes testes passaram a ser obrigatórios a partir do ano de 2006 (ANVISA, 2013). Porém, os medicamentos que foram lançados antes desta data no país, não possuem em seus processos de liberação para comércio e emprego terapêutico esta exigência, como é o caso do fluconazol.

Estudos que envolvem a genotoxicidade incluem, principalmente, danos no DNA, mutações e aberrações cromossômicas. Os ensaios de genotoxicidade *in vivo e in*

in vitro são ferramentas sensíveis para a detecção da genotoxicidade e da potencial carcinogenicidade de diversas moléculas (COMBES, 1992; CHOY, 2001).

A identificação de compostos genotóxicos é importante para avaliar a segurança de medicamentos, alimentos e contaminantes ambientais à saúde de humanos e de animais. Um considerável número de testes existe para detecção da genotoxicidade de compostos *in vitro*, bem como para mensuração da exposição a compostos genotóxicos *in vivo* (POWERS *et al.*, 1995; HOVHANNISYAN, 2010). Segundo Eastmond *et al.* (2009), um único teste não é suficiente para detectar todas as substâncias genotóxicas, pois uma gama de eventos genéticos pode ocorrer após o contato com o agente.

Muitos dos agentes genotóxicos interagem quimicamente com o material genético, gerando alteração oxidativa ou mesmo quebras na molécula de DNA. Funcionalmente, tais agentes possuem a habilidade de alterar a replicação do DNA e a transmissão genética. Na grande maioria dos casos, a lesão é reparada pelo próprio organismo ou a célula é eliminada. Dependendo do agente causador dos danos, diferentes caminhos de reparo estão envolvidos, tais como o reparo por excisão de nucleotídeos (NER), reparo por excisão de bases (BER), reparo por recombinação não homóloga (NHEJ), recombinação homóloga (HRR), reparo de crosslink (FANC) e anelamento de fitas simples (NATARAJAN; PALITTI, 2008).

O reparo pela via NER está relacionado à presença de *crosslinks* entre as fitas do DNA ou qualquer tipo de lesão que induza distorções na molécula de DNA. De uma maneira geral, o reparo por essa via apresenta os seguintes passos: (1) reconhecimento da lesão no DNA; (2) recrutamento do complexo de reparo; (3) preparação do DNA para o reparo pela ação de helicases; (4) incisão na fita danificada, de cada lado da lesão, com a liberação do fragmento danificado com cerca de 24-32 nucleotídeos; (5) preenchimento do *gap*; (6) ligação do novo fragmento sintetizado (ligação fosfodiéster) (DRABLOS *et al.*, 2004).

As mutações ocorridas nas bases do DNA são também reparadas pelo mecanismo BER (*base nucleotide excision*) que inclui: (1) excisão da base danificada; (2) incisão no esqueleto do DNA no sítio AP; (3) remoção da extremidade AP; (4) preenchimento do *gap* formado; e (5) ligação da nova fita biossintetizada. Em células de mamíferos, o BER é a principal via de reparo que atua contra danos de fita simples causados por agentes metilantes, oxidantes e outros agentes genotóxicos, além de um grande número (cerca de 10.000 por célula por dia) de depurinações espontâneas (WILSON *et al.*, 2003).

Caso essa lesão seja fixada, provocando alterações hereditárias (mutações), que podem se perpetuar nas células filhas durante o processo de replicação, o agente é denominado mutagênico (CAPELA, 2001; NASCIMENTO, 2001).

Existem duas vias principais de morte celular: a necrose e a apoptose, ambas desencadeadas por agressões intracelulares ou extracelulares. O processo de necrose ocorre principalmente devido às perturbações externas e não fisiológicas, enquanto que o processo de apoptose pode ocorrer através das vias extrínseca (citoplasmática) ou intrínseca (mitocondrial) (GRIVICICH *et al.*, 2007).

A necrose celular é um processo metabólico e morfológico gerado a partir de um determinado insulto à célula e que induz a mesma à morte. Estas agressões às células podem ocorrer através de agentes físicos, agentes químicos e agentes biológicos. (GUIDUGLI-NETO, 1997).

A morte celular por necrose ocorre, geralmente, em resposta a danos severos às células e é caracterizada, morfológicamente, por um aumento do volume citoplasmático e mitocondrial, ruptura da membrana plasmática e liberação do conteúdo extracelular. Conseqüentemente, gera-se uma resposta inflamatória, que pode causar danos e, por vezes até morte às células circunvizinhas, nesta condição um grande número de células são afetadas e lesadas ao mesmo tempo e, devido ao desenrolar do processo inflamatório, verificam-se alterações irreversíveis no tecido e/ou órgão afetado (GUIDUGLI-NETO, 1997).

Por outro lado, o padrão de alterações morfológicas e bioquímicas celulares associadas à morte celular programada, ou apoptose, em alguns processos patológicos *in vivo* inclui: formação de vacúolos citoplasmáticos, encolhimento e diminuição do contato entre células vizinhas, fragmentação da membrana nuclear e condensação cromatínica, despolarização de membrana mitocondrial, fragmentação internucleossomal do DNA e alterações na assimetria de fosfolípidios da membrana plasmática (ANAZETTI; MELO 2007).

A figura 4 representa o esquema da morfologia celular em processos de necrose (em cima) e apoptose (em baixo) (ANAZETTI; MELO 2007). No processo de morte celular por necrose ocorrem alterações da função mitocondrial, diminuindo drasticamente a produção de ATP (adenosina trifosfato) e interferindo na função da

bomba Na^+/K^+ , o que conduz à tumefação celular devido ao aumento de Na^+ presente no citoplasma. O aumento do Ca^{2+} no citoplasma provoca a ativação de fosfolipases e de proteases que, juntamente com o aumento de espécies reativas de oxigênio, induzem ruptura da membrana plasmática e ativam as proteases, com consequente indução do extravasamento do conteúdo celular, sinalizando, deste modo, a migração de macrófagos e ativando uma resposta inflamatória do sistema imune (ANAZETTI; MELO 2007).

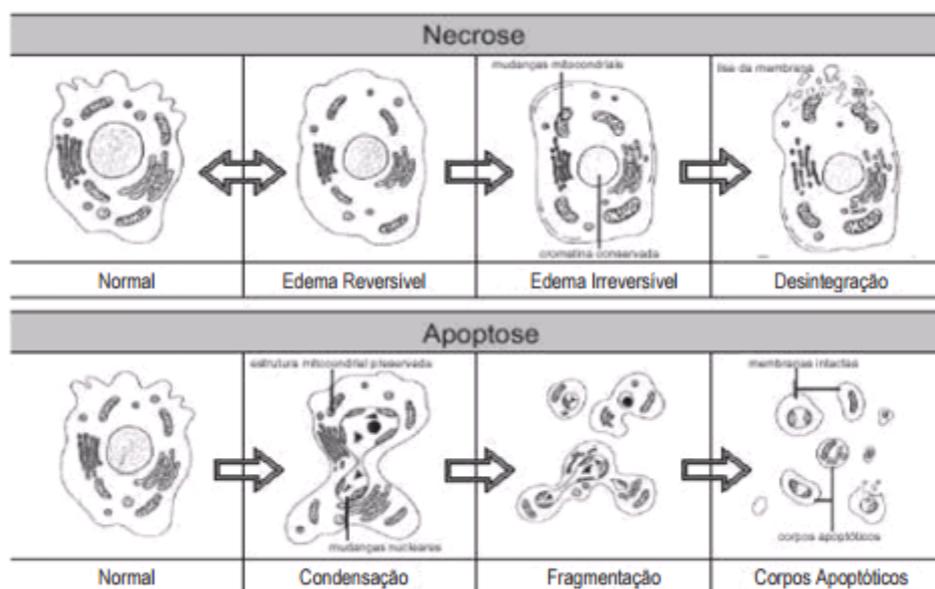


Figura 4 Diferenças morfológicas da necrose e da apoptose.

Fonte: ANAZETTI; MELO 2007.

Ao contrário da retração celular observada em células apoptóticas, na necrose observa-se um edema celular devido às lesões no citoesqueleto e inibição da bomba de Na^+/K^+ , o que origina a perda da permeabilidade seletiva da membrana. Em contraste, o processo apoptótico envolve a participação ativa das células afetadas na cascata de autodestruição que culmina em degradação do DNA pela via de ativação de endonucleases, desintegração nuclear e formação de corpos apoptóticos. Estes são rapidamente retirados do tecido por macrófagos, sendo que esta sinalização ocorre devido à translocação da fosfatidilserina do lado interno para o lado externo da membrana “assinalando” as células que deverão ser fagocitadas (ANAZETTI; MELO 2007).

Já a apoptose é caracterizada como um processo ativo fundamentado pela autodigestão controlada dos constituintes celulares, devido à ativação de proteases intracelulares e endonucleases. A ativação dessas proteases compromete a integridade do citoesqueleto, provocando verdadeiro colapso da estrutura celular. Em resposta à contração do volume citoplasmático, a membrana celular forma bolhas e acaba por comprometer a conformação de seus lipídeos e, por extensão, da fisiologia membranocelular (PAROLIN; REASON, 2001).

Um dos aspectos que distingue a apoptose da necrose é a preservação da integridade da membrana plasmática na primeira, que evita a liberação dos constituintes celulares para o meio extracelular e, conseqüentemente, a modulação da intensidade da resposta de quimiotaxia e de ativação de células fagocíticas. No entanto, algumas vezes, a apoptose e a necrose coexistem; além disso, a apoptose induzida por alguns estímulos patológicos pode progredir para a necrose (PAROLIN; REASON, 2001).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

A obtenção da matriz biológica em estudo, ou seja, leucócitos humanos para realização das culturas e, por extensão, para os protocolos utilizados neste trabalho, foi aprovada pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Santa Maria n° 0089.0.243.000-07.

4.1 Substâncias químicas

O medicamento fluconazol utilizado foi fabricado em um dos laboratórios que comercializam o fluconazol como medicamento genérico, onde cada cápsula continha 150 mg do fármaco.

Todos os outros reagentes utilizados, incluindo o princípio ativo de fluconazol - sob a forma de pó, com grau de pureza de 99%, foram adquiridos da SIGMA-Aldrich.

4.2 Preparo da cultura de leucócitos humanos

As culturas de leucócitos foram preparadas utilizando 1 mL de sangue venoso coletado por venopunção de voluntário adulto jovem, maior de 18 anos não usuário de medicação. Os linfócitos, obtidos através de gradiente de centrifugação, foram imediatamente transferidos para o meio de cultura contendo 9 mL de meio RPMI 1640, suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de estreptomicina/penicilina, conforme descrito em trabalho prévio do nosso grupo (SANTOS MONTAGNER et al., 2010). Os frascos de cultura celular foram colocados em estufa a 37°C por 72 horas. O controle negativo foi preparado utilizando tampão PBS 7,4 e o controle positivo com peróxido de hidrogênio.

As concentrações testadas foram de 6, 12, 30, 60 e 120 µg/mL correspondentes ao princípio ativo e à cápsula de fluconazol, estas concentrações foram calculadas a partir do valor do pico plasmático do Fluconazol. Todos os grupos foram ensaiados em triplicata.

4.3 Avaliação dos parâmetros citotóxicos e genotóxicos em cultura de leucócitos humanos.

A técnica escolhida para avaliar a citotoxicidade foi à viabilidade celular, enquanto que os parâmetros genotóxicos foram avaliados através das seguintes técnicas: proliferação celular e teste cometa alcalino.

4.3.1 Viabilidade celular

A viabilidade foi avaliada através da perda da integridade da membrana leucocitária utilizando 100 µL de azul de Tripam e 100 µL da amostra (BUROW et al., 1998). Nesta técnica, as amostras provenientes das culturas de linfócitos foram submetidas ao reativo de Turk e, após três minutos, uma alíquota foi colocada em uma câmara de Neubauer e visualizada em microscópio no aumento de 400X. A diferenciação entre as células vivas e mortas foi observada através da coloração azul no citoplasma das células inviáveis. Um total de 300 células foi contabilizado por lâmina.

4.3.2 Proliferação celular

Em um microtubo foi adicionado 90 µL de solução de Türk e 10 µL da amostra homogeneizada. Após, a câmara de Neubauer foi preenchida com esta suspensão e a contagem dos leucócitos foi realizada nos campos assinalados com a letra “L” conforme a figura 5.

A fórmula utilizada foi:

$$\text{Número total de leucócitos/mL} = \text{número de células contadas} \times 10^4 \times \text{diluição} / 4$$

(número de quadrados)

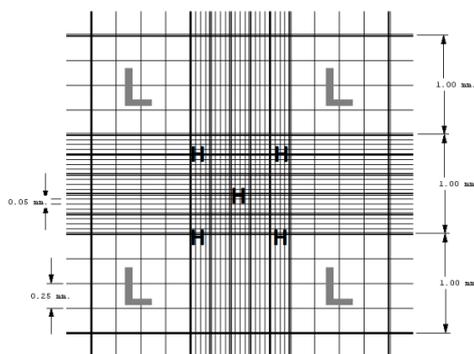


Figura 5 Método de contagem de leucócitos em câmara de Neubauer. (Imagem disponível em: <http://www.fmvz.unesp.br/takahira/PDFs/T%C3%A9cnicas%20especializa%C3%A7%C3%A3o.pdf>, acesso em 08/06/2015).

4.3.3 Teste do cometa alcalino

Este teste foi realizado seguindo os procedimentos ensaiados por Singh (1988) e em concordância com as diretrizes para uso do ensaio cometa (TICE et al., 2000; HARTMANN et al., 2003; NADIN et al., 2001). Após a incubação, as amostras (leucócitos) foram homogeneizadas com agarose de baixo ponto de fusão 0,75% e adicionadas em lâminas de microscópio pré-revestidas com agarose 1,5%. As lâminas foram imersas em uma solução de lise, para na sequência realizar corrida eletroforética (20 min a 300 mA e 25 V) em tampão NaOH 300 mM e pH > 13. Ao final da eletroforese, as lâminas foram neutralizadas e submetidas à secagem em temperatura ambiente *overnight*. As lâminas secas foram então reidratadas, fixadas, secas e coradas com nitrato de prata. Danos no DNA foram determinados utilizando o índice de dano do DNA. Cem nucleoides por lâmina (em triplicata para cada grupo) foram selecionados e analisados. Os nucleoides foram classificados de acordo com o comprimento da cauda e receberam pontuação de 0 (sem migração) a 4 (migração máxima) (Figura 6). Portanto, o índice de dano para as células pode variar de 0 (não ocorreu migração) a 4 (presença de migração máxima).

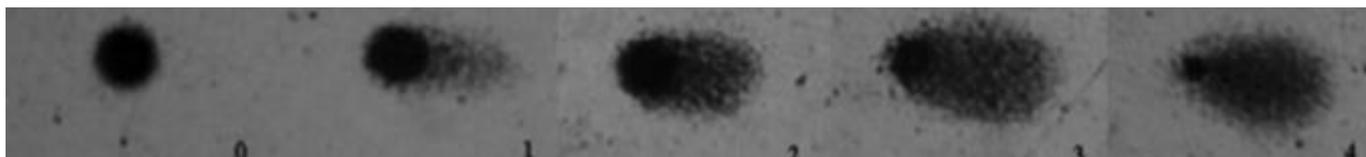


Figura 6 - Classificação dos nucleoides conforme comprimento da cauda: 0: classe 0; 1: classe 1; 2: classe 2; 3: classe 3; 4: classe 4.

Fonte: GÜEZ et al. (2012).

4.4 Análise estatística

Os dados provenientes dos testes de citotoxicidade e genotoxicidade foram expressos em média \pm desvio padrão. As comparações entre os grupos foram realizadas utilizando análise de variância (ANOVA) de uma via. Ambos tratamentos estatísticos foram complementados com o teste de Tukey para múltiplas comparações. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Genotoxicidade

A identificação de compostos genotóxicos é importante para avaliar a segurança de medicamentos, alimentos e contaminantes ambientais à saúde humana (POWERS et al., 1995). Um considerável número de testes existe para detecção da genotoxicidade de compostos *ex vivo* bem como para mensuração da exposição a compostos genotóxicos *in vivo* (HOVHANNISYAN, 2010).

Segundo Eastmond et al. (2009), um único teste não é suficiente para detectar todas as substâncias genotóxicas, pois uma gama de eventos genéticos pode ocorrer após o contato com o agente. Dessa forma, os riscos genotóxicos são mensurados por meio de uma combinação de testes que investigam os principais danos ao material genético.

Para investigar a genotoxicidade do Fluconazol foram realizados os seguintes testes: proliferação celular e teste cometa. Os resultados obtidos a partir do ensaio de proliferação celular em leucócitos humanos (Figura 7 A) expostos às diferentes concentrações do princípio ativo do Fluconazol demonstraram que apenas as três maiores concentrações testadas (30 µg/mL, 60 µg/mL e 120 µg/mL) reduziram significativamente a proliferação celular em aproximadamente 48,2%, quando comparadas ao controle negativo ($p < 0,05$), embora o efeito de redução do número de células tenha sido menor em relação ao controle positivo.

Na Figura 7 B podemos observar os resultados obtidos a partir do ensaio de proliferação celular em leucócitos humanos expostos às diferentes concentrações da cápsula do Fluconazol, os quais demonstraram que as cinco concentrações testadas (6 µg/mL, 12 µg/mL, 30 µg/mL, 60 µg/mL e 120 µg/mL) reduziram significativamente a proliferação celular, aproximadamente 44,3%, em comparação ao controle negativo ($p < 0,05$), mas com efeito semelhante ao controle positivo.

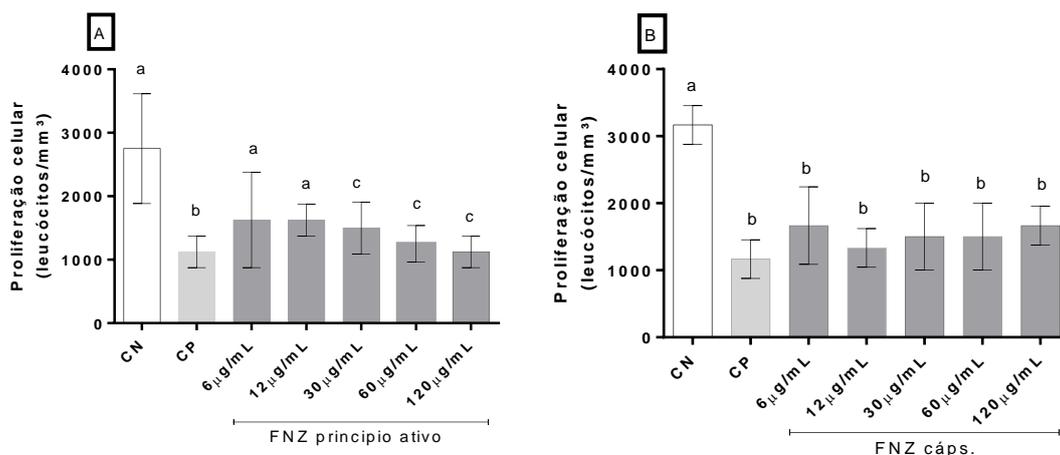


Figura 7 A-B - Ensaio de proliferação celular em leucócitos humanos expostos a diferentes concentrações do princípio ativo e da cápsula do Fluconazol. Os dados estão expressos em média \pm desvio padrão, $n=3$; $p<0,05$. As letras sobre as barras representam diferenças significativas entre os grupos; CN=controle negativo; CP=controle positivo.

A proliferação celular é um parâmetro de avaliação genotóxica que demonstra a capacidade de determinada célula ou grupo de células proliferarem-se mediante situações que podem ser adversas. No caso, as diferentes concentrações testadas do princípio ativo e da cápsula do Fluconazol demonstraram poder interferir no processo de proliferação, o qual dispõe de vários alvos moleculares passíveis de sofrer interferência, como os que envolvem a manutenção da estrutura da molécula de DNA.

Adicionalmente, a determinação das taxas de proliferação em culturas de linfócitos é um indicador considerado útil e sensível para demonstrar a ação citostática e citotóxica de vários agentes terapêuticos (CARRANO; NATARAJAN, 1998). Não obstante, podemos perceber que os excipientes do Fluconazol, que são aparentemente inertes, quando adicionados ao mesmo, induziram maior potencial genotóxico que o princípio ativo *per se*. Contudo, não podemos afirmar se esta interferência é apenas ocasionada pelos excipientes isoladamente ou se essa potencialização de efeito se dá quando em conjunto com o princípio ativo. Diante dessa problemática, estudos complementares que venham de encontro com a elucidação de interferências nas fases do ciclo celular são necessários.

A Figura 8 A-B apresenta os resultados obtidos a partir do índice de dano de DNA gerado pelo ensaio cometa alcalino para leucócitos humanos submetidos às

diferentes concentrações do princípio ativo e da cápsula do Fluconazol. Na Figura 8 A, podemos verificar que o princípio ativo do Fluconazol, nas concentrações testadas (6-120 $\mu\text{g}/\text{mL}$), não apresentou índices de dano de DNA estatisticamente diferentes do encontrado para o controle negativo ($p < 0,05$). Porém, em relação aos resultados encontrados para o teste com a cápsula do Fluconazol (Figura 8 B), as duas maiores concentrações testadas (60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e 120 $\mu\text{g}/\text{mL}$) apresentaram um índice de dano de DNA aproximadamente 1,5 vez maior em relação ao encontrado no controle negativo, porém, aproximadamente 25 vezes menores que o controle positivo ($p < 0,05$).

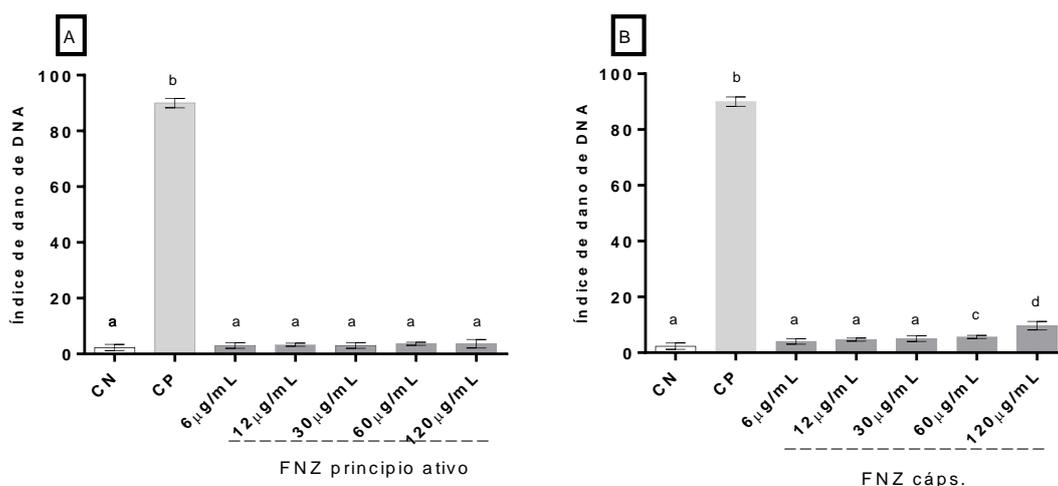


Figura 8 A-B - Índice de dano de DNA gerado pelo ensaio cometa alcalino em leucócitos humanos expostos a diferentes concentrações do princípio ativo e da cápsula do Fluconazol. Os dados estão expressos em média \pm desvio padrão, $n=3$; $p < 0,05$. As letras sobre as barras representam diferenças significativas entre os grupos; CN=controle negativo; CP=controle positivo.

Comparando-se as concentrações de 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e 120 $\mu\text{g}/\text{mL}$ da cápsula de Fluconazol, podemos perceber um aumento no índice de dano de DNA na concentração de 120 $\mu\text{g}/\text{mL}$, o que expressa uma relação concentração-dependente. Adicionalmente, fica evidente a interferência dos excipientes da formulação sobre o processo de geração de dano oxidativo, o qual denota quebra nas pontes de DNA.

Curioso notar que há evidências de que a capacidade de indução de dano está relacionada ao tipo celular exposto a formulações à base de fluconazol. De fato, Silva et al. (2013) demonstraram haver diferenciação nos resultados obtidos a partir do teste de dano oxidativo de DNA (cometa) entre células leveduriformes (*C. tropicalis*) e linfócitos humanos, onde não observaram lesão nas primeiras, mas evidenciaram lesões de DNA nos linfócitos em concentrações aproximadas de 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$, o que corrobora com nossos dados para este teste.

Em se tratando de formulações, não se podem desconsiderar as possíveis interferências dos excipientes nos testes toxicológicos. Dentre os excipientes presentes na formulação do Fluconazol destacam-se os que possuem metal, como dióxido de silício, estearato de magnésio e silicato de magnésio como os possíveis indutores de dano oxidativo de DNA. O silicato de magnésio, por exemplo, é considerado tóxico na porcentagem de 20,75%, de acordo com o Sistema Globalmente Harmonizado para a Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos (2009).

Infelizmente não há acesso à informação da concentração de silicato de magnésio incorporado à formulação comercial utilizada neste estudo, contudo, sabe-se que metais são potencialmente indutores de processos oxidativos. Todavia, a toxicidade deste metal parece estar relacionada à dose administrada e o estado de saúde ou condição fisiológica que se encontra. De fato, existem trabalhos na literatura que atribuem toxicidade ao Mg sob a forma de sulfato de magnésio, como a nefrotoxicidade em gestantes no tratamento de pré-eclâmpsia e eclâmpsia em doses de 2.000 µg/mL (YU AS, 2001; TOPF, 2003).

Dentro dessa mesma perspectiva, Das et al. (2015) atribuíram ao sulfato de magnésio efeitos sobre a mineralização óssea desfavorável em neonatais de mães tratadas com dose 493 µg/mL, sob condição de eclâmpsia. De forma semelhante, porém mais drástica, Wedgi et al. (2016) encontraram processos de desmineralização e fraturas ósseas em neonatos de mães tratadas com doses entre 2.000 e 2.500 µg/mL/h.

Por outro lado, alguns estudos que utilizaram magnésio em implantes biodegradáveis não demonstraram haver toxicidade do metal (STAIGER et al., 2006; BERGLUND et al., 2016). Adicionalmente, Heydary et al. (2015) estudando a formulação de nanopartículas de clorpirifos, onde o óxido de magnésio foi usado como excipiente nas concentrações de 0,1 µg/mL, 1 µg/mL, 10 µg/mL, 100 µg/mL, e 200 µg/mL, não encontraram evidência de toxicidade em linfócitos humanos para o teste de viabilidade celular, além de ter apresentado propriedades antioxidante, antiapoptótica e anti-inflamatória.

Não menos importante, a toxicidade do dióxido de silício presente na formulação estudada também deve ser considerada. Infelizmente, assim como o magnésio, não se tem acesso à concentração ou percentual utilizado desse composto no produto final (cápsula). Todavia, parece haver, assim como no caso do magnésio, uma

relação direta entre a concentração utilizada e a presença ou ausência de toxicidade. De fato, Krokowic et al. (2015), testando atividade antibacteriana e antifúngica do dióxido de silício, observaram alta efetividade deste composto na concentração de 5.000 µg/mL; ao passo que Wang et al. (2014) não observaram toxicidade do dióxido de silício sobre revestimento ocular de coelhos nas concentrações entre 0,00224 µg/mL e 0,024 µg/mL.

Dessa forma, se considerado os resultados dos diferentes estudos supracitados, parece haver uma relação entre a capacidade de induzir toxicidade com as doses ou concentrações utilizadas de magnésio e dióxido de silício, bem como dos sais que veiculam esses metais. Esses pressupostos são determinantes para considerar a concentração ou percentual de incorporação à determinada formulação de excipientes à base de sais de magnésio, sob pena de induzir toxicidade aos seus consumidores.

Há uma carência de estudos na literatura especializada em relação a estudos genotóxicos para fármacos, ainda mais considerando o binômio fármacos e excipientes, como é o caso do presente estudo, que possam vir a dar maior segurança para o uso de medicamentos, ou pelo menos que amplie a análise de risco benefício para escolha de modelo terapêutico a ser empregado.

5.2 Citotoxicidade

Os resultados obtidos a partir do ensaio de viabilidade celular em leucócitos humanos (Figura 9 A-B) expostos às diferentes concentrações do princípio ativo e da cápsula do Fluconazol demonstraram que as maiores concentrações testadas da cápsula do Fluconazol (60-120 µg/mL), figura 10 B, reduziram significativamente a viabilidade das células quando comparados ao controle negativo ($p < 0,0001$).

O controle negativo apresentou um percentual de células viáveis de 97,33%, enquanto o controle positivo demonstrou uma redução aproximada de 11,66% em relação ao controle negativo, com um percentual de 85,67% de células viáveis. As diferentes concentrações testadas do princípio ativo do Fluconazol (6-120 µg/mL) apresentaram, respectivamente, uma viabilidade de 98,33%, 98,67%, 98%, 98% e 96,67%, com percentuais de viabilidade celular de 11% a 13% superiores em relação ao

controle positivo, contudo, não diferiram estatisticamente do controle negativo (Figura 9 A).

Ao se analisar a viabilidade celular dos leucócitos humanos submetidos às diferentes concentrações (6-120 $\mu\text{g/mL}$) da cápsula do Fluconazol observou-se um percentual de viabilidade de 97,33%, 97,67%, 96,33%, 95,67% e 89,67% (Figura 9 B), com um aumento aproximado da viabilidade celular de 4% a 11,66% ao comparar-se com o controle positivo, sendo que apenas as duas maiores concentrações da cápsula do Fluconazol (60 $\mu\text{g/mL}$ e 120 $\mu\text{g/mL}$) apresentaram níveis de viabilidade celular significativamente menores que as outras três concentrações testadas (6 $\mu\text{g/mL}$, 12 $\mu\text{g/mL}$ e 30 $\mu\text{g/mL}$), se comparadas ao controle negativo ($p < 0.001$), o que evidencia uma relação dose dependente.

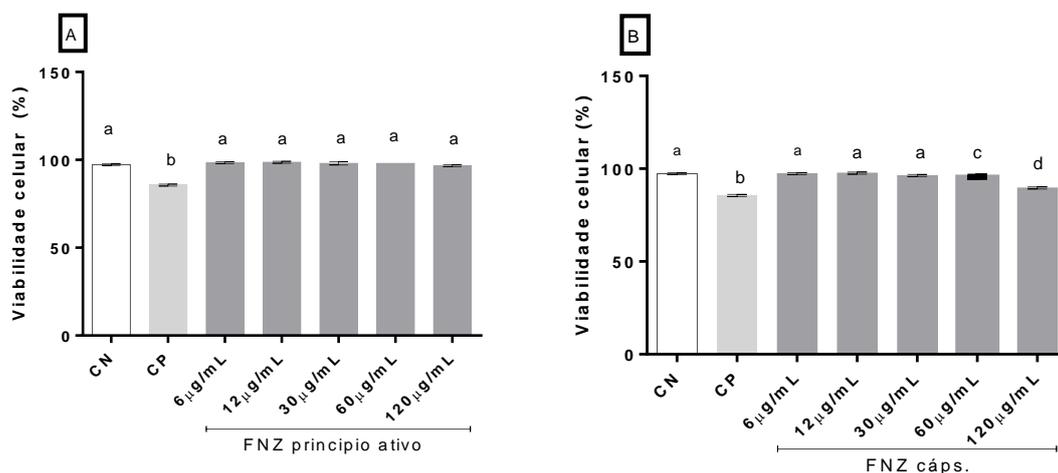


Figura 9 A-B Teste de viabilidade celular em leucócitos humanos expostos a diferentes concentrações da cápsula e do princípio ativo do Fluconazol. Os dados estão expressos em média \pm desvio padrão, $n=3$; $p < 0.0001$. As letras sobre as barras representam diferenças significativas entre os grupos; CN=controle negativo; CP=controle positivo.

Os resultados encontrados para o teste de viabilidade demonstram que as duas maiores concentrações testadas da cápsula do Fluconazol apresentam citotoxicidade. Em relação ao mecanismo de indução de citotoxicidade, se devem levar em consideração as vias intracelulares, após captação, e a indução de lesão na membrana celular, ou ainda, o aumento do influxo celular do princípio ativo e ou de seus excipientes. De qualquer forma, uma ou outra, de forma direta ou indireta, isolada ou conjuntamente, pode ocasionar dano a membranas celulares.

Pelo teste de viabilidade celular realizado, não podemos afirmar se houve o curso dos dois processos. Entretanto, a observação do fenômeno é importante, pois trata de um estudo com células humanas, onde a literatura apresenta poucos dados, quanto mais da segurança de uso de fármacos nos aspectos genotoxicológico e citotoxicológico, como é o caso do Fluconazol.

Dentro de uma perspectiva de possíveis interferências relacionadas à formulação, Yang et al. (2009) corroboram com a possibilidade de o dióxido de silício ser o responsável pela citotoxicidade observada em nosso estudo, uma vez que demonstraram que este excipiente foi capaz de reduzir a viabilidade celular de forma crescente (10% a 25%,) e dose-dependente (5, 10, 20, 50 e 100 ng/mL). Resultados semelhantes foram obtidos por Farcas (2015), onde observou diminuição da viabilidade celular entre 5% e 50%, nas concentrações entre 10 µg/mL, 25 µg/mL, 50 µg/mL, 75 µg/mL e 100 µg/mL, sendo as duas últimas responsáveis pelo maior percentual de redução em diferentes linhagens celulares humanas, a saber: HUMDUM, RAW264.7 e MH-S, para o sistema imunológico; Calu-3, 16HBE e RLE-6TN, para o sistema respiratório; TM3 e TM4, para o sistema reprodutor masculino; Caco-2, para o sistema gastrointestinal; NRK- 52E, para rins; e NIH-3T3 e MES/D3, para células embrionárias.

Existem pouquíssimos estudos na literatura sobre os efeitos citotóxicos e genotóxicos causados pelos antifúngicos. Todavia, Kolachana e Smith (1994) ao investigarem os efeitos citotóxicos da griseofulvina através do teste de viabilidade celular em culturas de linfócitos humanos, nas concentrações de 1, 5, 10, 15 e 20 µg/mL e condições experimentais às utilizadas por nosso grupo neste trabalho, obtiveram os seguintes percentuais de viabilidade linfocitária: 91,1%; 90,6%; 89,2%; 79,4% e 74,9%. Em nosso trabalho, o maior percentual de redução de viabilidade celular (89,67 %) foi encontrado para a concentração de 120 µg/mL da cápsula de Fluconazol.

O estudo supracitado, apesar da griseofulvina agir em alvo molecular diferente do qual age o fluconazol, vem ilustrar o potencial toxicológico ainda muito pouco explorado nessa classe farmacológica, principalmente se considerado que os resultados obtidos advêm da investigação sob baixas concentrações. Este fenômeno evidencia a importância dos testes genotóxicos e citotoxicológicos para comprovar a segurança dos medicamentos. Neste sentido, o Fluconazol ganha notoriedade, uma vez que é um dos

fármacos mais utilizados para combater infecções fúngicas desde os anos oitenta (QUINTERO, 2010).

Como pode se observar, é premente uma discussão ampliada sobre a segurança do uso do Fluconazol, considerando as alterações observadas neste estudo. De forma particular, quando o esquema terapêutico estabelecer um período longo de uso.

Adicionalmente, não se dispõe de estudos na literatura para estabelecer segurança de uso para excipientes, considerando a forma isolada ou conjunta a fármacos nas concentrações preconizadas para serem utilizados como insumos farmacêuticos. Entretanto, este trabalho abre um caminho sem precedentes sobre estudos genotóxicológicos de agentes antifúngicos relacionados à segurança de seu uso, além de evidenciar a diferença de efeitos entre o princípio ativo e princípio ativo associado a excipientes.

6. CONCLUSÕES

Considerando a exposição de células leucocitárias ao princípio ativo e a cápsula do Fluconazol em uma faixa de concentração de 6, 12, 30, 60 e 120 $\mu\text{g/mL}$, e período de incubação de 72 horas, foi possível concluir que:

Todas as concentrações testadas da cápsula do Fluconazol (6, 12, 30, 60 e 120 $\mu\text{g/mL}$) demonstraram ser capazes de interferir negativamente no processo de proliferação celular, diminuindo o número de células proliferadas em todas as concentrações testadas, quando comparadas ao controle negativo. Já no caso do princípio ativo do Fluconazol, apenas as três últimas concentrações (30, 60 e 120 $\mu\text{g/mL}$) interferiram negativamente no processo de proliferação celular.

Na avaliação do índice de dano ao DNA (teste cometa), foi observado dano à estrutura de DNA nas concentrações 60 e 120 $\mu\text{g/mL}$ da cápsula do Fluconazol. O comportamento foi concentração dependente, com maior indução de dano para a concentração de 120 $\mu\text{g/mL}$. As concentrações testadas com o princípio ativo do Fluconazol não foi observado dano à estrutura de DNA.

A cápsula do Fluconazol possui atividade citotóxica sobre leucócitos humanos nas duas maiores concentrações testadas (60-120 $\mu\text{g/mL}$) de forma concentração dependente. Porém, o princípio ativo do Fluconazol não demonstrou ser citotóxico nas concentrações testadas (6, 12, 30, 60 e 120 $\mu\text{g/mL}$).

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

Através dos resultados encontrados, surge a necessidade de estudos complementares relacionados à genotoxicidade e mutagenicidade.

Há o interesse do grupo de continuar os estudos dentro do contexto mecânicos do princípio ativo e da cápsula do Fluconazol, para uma possível elucidação dos fenômenos citotóxicos e genotóxicos observados neste estudo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K. ; LICHTMAN, A. H. **Imunologia Celular e Molecular**. São Paulo, Saunders Elsevier, 2005.

AGUDELO, C. A.; MUNOZ, C., RAMÍREZ, A.; TOBÓN, A. M.; BACT, C. B.; CANO, L. E.; RESTREPO, A; Response to therapy in patients with cryptococcosis and AIDS: Association with in vitro susceptibility to fluconazole; **Rev Iberoam Micol**, 2015.

ALBERTINI, B.; CAVALLARI, C.; PASSERINI, N.; GONZALES-RODRÍGUEZ, M. L.; RODRIGUEZ, L. Evaluation of B-lactose, PVP K12 and PVP K90 as excipients to prepare piroxicam granules using two granulation techniques. *Eur. J. Pharm. Biopharm*, 2003.

ALAK, A., MOY, S. BEKERSKY, I. A high-performance liquid chromatographic assay for the determination of amphotericin B serum concentrations after the administration of AmBisome, a liposomal amphotericin formulation. **Ther. Drug Monit.**, New York, 1996.

ANAZZETI, M.; MELO, P.. "Morte Celular por Apoptose: uma visão bioquímica e molecular." **Metrocamp Pesquisa**, 2007.

ANVISA. Gerência de Avaliação de Segurança e Eficácia – GESEF. Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/e0f1d9004e6248049d5fddd762e8a5ec/Guia+de+Estudos+N%C3%A3o+Cl%C3%ADnicos+-+vers%C3%A3o+2.pdf?MOD=AJPERES>>. Acesso em 13/10/2015.

BACKONJA, M. M.; COE, C. L.; MULLER, D. A. et al. - Altered cytokine levels in the blood and cerebrospinal fluid of chronic pain patients. **J Neuroimmunol**, 2008.

BALDACCI, E.R. Qual a conduta terapêutica antifúngica mais segura na criança gravemente enferma. **Rev Assoc Med Bras**, 2001.

BERG, J.M.; TYMOCZKO, J. L.; STRAYER, L.; Bioquímica. 6 ed., Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 2010.

BLANCO, M. T. B.; GARCIA, A.C.G; HURTADO, C.; LADERO, M.A G.; LOZANO, M. C.; TAPIA, A. G.; BLANCO, M. T.; Candida orthopsilosis fungemias in a Spanish tertiary care hospital: Incidence, epidemiology and antifungal susceptibility, **Rev Iberoam Micol**, 2014.

BRAMBILLA, G.; MARTELLI, A. Genotoxicity and carcinogenicity studies of antihypertensive agents. **Mut. Res.**, 2009.

BENNETT, J.E. Fluconazole: a novel advance in therapy for systemic fungal infections. Overview of the symposium. **Rev. Infect. Dis.**, Chicago, 1990.

BERGLUN, I. S.; JACOBS, B. Y.; ALLEN, K. D.; KIMC, S. E.; POZZI, A., ALLEN, J. B.; MANEUL, M. V.; Peri-implant tissue response and biodegradation performance of a Mg.1.0Ca.0.5Sr alloy in rat tibia, **Materials Science and Engineering C** 62, 2016.

BIRKBAK, N. J.; EKLUND, A. C.; LI, Q.; MCCLELLAND, S. E.; ENDESFELDER, D.; TAN, P.; TAN, I. B.; RICHARDSON, A. L.; SZALLASI, Z.; SWANTON, C. Paradoxical relationship between chromosomal instability and survival outcome in cancer. **Cancer Research**, 2011.

BOSSCHE, H.V.; ENGELEN, M.; ROCHETTE, F. Antifungal agents of use in animal health- chemical, biochemical and pharmacological aspects. **J. Vet. Pharmacol. Therap.** 2003.

BRAMMER, K.W., FARROW, P.R., FAULKNER, J.K. Pharmacokinetics and tissue penetration of fluconazole in humans. **Rev. Infect. Dis.**, 1990.

Boveris A, Cadenas E. Cellular source and steady-state levels of reactive oxygen species. In: Clerch L, Massaro D. Oxygen, gene expression and cellular function. Marcel Decker: New York , 1997.

BUROW ME, WELDON CB, TANG Y, NAVAR GL, KRAJEWSKI S, REED JC, HAMMOND TG, CLEJAN S, BACKMAN BS. Differences in susceptibility to tumour necrosis factor alpha-induced apoptosis among MCF-7 breast cancer cell variants. **Cancer Res.** 1998.

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

CARRANO, A.V., NATARAJAN, A.T. Commission for protection against environmental mutagens and carcinogens, 1998.

CARILLO-MUNOZ A. J. et al. Antifungal agents: mode of action in yeast cells. *Rev Esp Quimioter*, Cash, P. Proteomics: the protein revolution. *Biologist* (London), 2006.

CARVALHO, S. M. Padrões de exposição diferencial ao tiametoxam e variação sazonal da atividade enzimática em *apis mellifera*: potencial como indicadora da qualidade ambiental. Disponível em: <http://www.bv.fapesp.br/pt/bolsas/45345/padroes-exposicaodiferencial-tiametoxam-variacao>. Acesso em: 30/06/2015.

CHA, R.; SOBEL, J.D. Fluconazole for the treatment of candidiasis: 15 years experience. **Expert Review Anti-infect Therapy**, 2004.

CHIH-CHENG, L.; CHE-KIM, T.; YU-TSUNG, H.; PEI-LAN, S.; PO-REN, H. Current challenges in the management of invasive fungal infections. **Journal of Infection and Chemotherapy**, 2008.

COLOMBO, A. L., GUIMARÃES, T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida spp.* **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 2003.

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

COMBES, R.D. Genotoxicity testing: recent advances and future trends. **Chemistry & Industry**, 1992.

CROTT, J.W.; MASHIYAMA, S.T.; AMES, B.N.; FENECH, M. The effect of folic acid deficiency and MTHFR C677T polymorphism on chromosome damage in human lymphocytes *in vitro*. **Cancer Epidemiology Biomarkers Prevention**, 2001.

DAS, M.; RAY, P.; PRAMANIK, S.; Assessment of serum magnesium levels and its outcome in neonates of eclamptic mothers treated with low-dose magnesium sulfate regimen, **Indian Journal of Pharmacology, Indian Journal of Pharmacology**, 2015.

DAVIS, A.M.; RILEY, R.J. Predictive ADMET studies, the challenges and the opportunities. **Curr. Op. in Chem. Biol.**, 2004.

DENAMUR, E., MATIC, I. Evolution of mutation rates in bacteria. **Molecular Microbiology**, 2006.

DESAGHER, S, MARTINO, J.C. Mitochondrial as the central control point of apoptosis. **Trends Cell Biol.** 2000.

DURVAL, C. K; RIOKO, K. S; ISSY, A. M; BARCELLAR, O.; JESUS, R. S; CARVALHO, E. M. Citocinas pró-inflamatórias em pacientes com dor neuropática submetidos a tratamento com Tramadol, **Rev. Bras. Anestesiologia**, 2009.

DRABLOS, F.; FEYSI, E.; AAS, P. A.; VAAGDO, C. B.; KAVLI, B.; BRATLIE, M. S.; PENA, J.; OTTERLEI, M.; SLUPPHAUG, G.; KROKAN, H. E. Alkylation damage in DNA and RNA--repair mechanisms and medical significance. **DNA Repair (Amst)**, 2004.

EASTMOND, D.A.; TUCKER, J.D. Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochores antibody, **Environmental and Molecular Mutagenesis**, , 1989.

- ERDTMANN, B. A genotoxicidade nossa de todos os dias. *In*: Silva, J.; Erdtmann, B.; Henriques, J. A. P. **Genética Toxicológica**. Porto Alegre: Alcance. 2003.
- FARCALL, L.; ANDÓN, F. T., CRISTO, A. L., ROTOLI, B. M.; Comprehensive In Vitro Toxicity Testing of a Panel of Representative Oxide Nanomaterials: First Steps towards an Intelligent Testing Strategy, 2015.
- FENECH, M. , The in vitro micronucleus technique, 2000.
- FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. **Nature Protocols**, 2007.
- FICA, A.C. Tratamiento de infecciones fúngicas sistêmicas primeira parte: fluconazol, itraconazol y voriconazol. **Rev Chil Infectol** , 2004.
- GEORGOPAPADAKOU, N.H.; WALSH, T.J. Human mycoses: drugs and targets for emerging pathogens. **Science**, 1994.
- GHANNOUM, M.A.; KUHN, D.M. Voriconazole - Better chances for patients with invasive mycoses. **European Journal of Medical Research**, 2002.
- GHANNOUM, M.A.; RICE, L. B. Antifungal Agents: Mode of Action, Mechanisms of Resistance, and Correlation of These Mechanisms with Bacterial Resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 1999.
- GRIVICICH, I; REGNER, A; ROCHA, A. Morte Celular por Apoptose. **Rev Bras Cancerol**, 2007.
- GUERRERO, P. C.; LORENZO, J. M. F.; BURGOS, A. M. C.; Interlukin levels in umbilical cord blood:relationship with a family history of allergic disease, 2005.
- GUIDUGLI-NETO, J. **Elementos de Patologia Geral**. São Paulo : Santos, 1997.
- HAHN, R.C; HAMDAN, J.S. In vitro susceptibilities of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast form to antifungal drugs, *Mycoses*, 2000.
- HEYDARY, V.; NIGJEH, M. N.; RAHIMIFAR, M.; MOHAMMADIRAD, A.; BAEERI, A.; Biochemical and molecular evidences on the protection by magnesium oxide nanoparticles of chlorpyrifos-induced apoptosis in human lymphocytes, **Journal of Research in Medical Sciences**, 2015.
- HONG, Y. L.; HOSSLER, P.A.; CALHOUN, D.H., MESHICK, S. R.. Inibition of recombinant *Pneumocytis carinii* dihydropteroate synthetase by sulfa drugs. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1995
- HOVHANNISYAN, G.G. Fluorescence in situ hybridization in combination with the comet assay and micronucleus test in genetic toxicology. **Molecular Cytogenetics**, 2010.

JOHNSON, E. M. Issues in antifungal susceptibility testing. **J Antimicrob Chemother**, 2008.

KADAN, R.U., ROY, N. Recent Trends in Drug Likeness Prediction: A Comprehensive Review of *In Silico* Methods. **Indian Journal of Pharmaceutical Science**, 2007.

KLUG, W. S. et al. **Conceitos de Genética**. 9 ed. São Paulo: Artmed, 2010.

KOLACHANA, P.; SMITH, M.T. Induction of kinetochore-positive micronuclei in human lymphocytes by the anti-fungal drug griseofulvin. **Mutation Research**, 1994.

KROKOWIC, L. S.; TOMCZAK, H.; BOBKIEWICZ, A.; MACKIEWICZ, J.; MARCINIAK, R.; DREWS, M.; BANASIEWICZ, T.; *In Vitro* Studies of Antibacterial and Antifungal Wound Dressings Comprising H₂TiO₃ and SiO₂ Nanoparticles; **Polish Journal of Microbiology** 2015.

KURTZ, M. B.; DOUGLAS, C. M. Lipopeptide inhibitors of fungal glucan synthase. **J. Med. Vet. Mycol**, 1997.

LIU, X. et al. Potential and mechanisms of genotoxicity of six pharmaceuticals frequently detected in freshwater environment. **Toxicology Letters**, 2012.

NIGRO, M.M.L; CARBALLO, M.A.; Genotoxicity and cell death induced by tinidazole (TNZ); **Toxicology Letters** **180**, 2008.

LOURENÇO, J.A.; PITANGUI, C.P.; JORDÃO, A.A.; Vannucchi, H.; Cecchi, A.O. Ausência de mutagenicidade e antimutagenicidade do extrato obtido das flores do ipê roxo [*Tabebuia impetiginosa* (Mart. ex DC.)] **Rev. bras. plantas**, 2010.

MALUCHE, M. E., SANTOS, J. I., Candida sp. e infecções hospitalares: aspectos epidemiológicos e laboratoriais Candida sp. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, 2008.

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

MARRA A, CAMARGO LFA. Fluconazol ou anfotericina B no tratamento de candidemias em pacientes internados na UTI. **Rev Assoc Med Bras**.;48:107. 2002

MARZZOCO, A ; TORRES, Sayardo Baptista. **Bioquímica básica**. 2.ed. Rio de janeiro: Guanabara Koogan, 1999.

MOREIRA, T.A., FERREIRA, M. S., RIBAS, S. M., e BORGES, A. S., Criptococose: estudo clínico-epidemiológico, laboratorial e das variedades do fungo em 96 pacientes.

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

NATARAJAN, T. e PALLITI, F. DNA Repair, Chromosomal Alterations. **Mutation Research**, 2008.

NELSON, D. L.; COX, M. M.; Princípios de Bioquímica de Lehninger. 5 ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.

OHKAWA, H.; OHISHI, H.; YAGI, K. Assay for lipid peroxide in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Annals of Biochemistry**, 1979.

OLIVEIRA, C. M. B.; SAKATA, R. K.; SLULITE, A.; SALOMÃO, R.; LANCHOTE, R.; ISSY, A. M.; Effect of intraoperative intravenous lidocaine on pain and plasma interleukin-6 in patients undergoing hysterectomy, **Brazilian Journal of Anesthesiology**, 2015.

PAROLIN, M. B.; REASON, I. J. M. APOPTOSE COMO MECANISMO DE LESÃO NAS DOENÇAS HEPATOBILIARES. **Arq Gastroenterol**, 2001.

PASSOS, X. S., SANTOS, S. C., FERRI, P. H., FERNANDES, O. F. L., PAULA, T. F., GARCIA, A. C. F., SILVA, M. R. R., **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 2002.

PEREIRA, R.; FIDELIS, S.; VANUNCI, M. L.; OLIVEIRA, C. H.; MENDES, G. D.; ABIB, E.; MORENO, R. A. Bioequivalence study of two fluconazole capsule formulations in healthy volunteers. **Int. J. Clin. Pharmacol.**, 2004.

PEREIRA, D.G; Importância do metabolismo no planejamento de fármacos, **Quím. Nova**, 2007.

PERLIN, D. S. Resistance to echinocandin-class antifungal drugs. **Drug Resist. Updat.**, 2007.

PORTA, V.; CHANG, K. H.; STORPIRTIS, S. Evaluation of the bioequivalence of capsules containing 150 mg of fluconazole. **Int. J. Pharm.**, 2005.

POWERS, R.E.; LAWTON, G.P.; MODLIN, I.M. Genotoxicity, carcinogenicity and acid-suppressing medications. **Pharmacology & Therapeutics**, 1995.

QUINTERO, C. H. G. Resistencia de levaduras de género Candida al Fluconazol. **Revista de Infectologia**, 2010.

RAMON, S. S.; LONGO, F.J.L.; CARRÑO, L.; Interleukins network in rheumatoid arthritis pathophysiology: beyond proinflammatory cytokines; **Reumatología Clínica**, 2010.

RAMOS, A.; VILILLAB, C. P.; ASENSIO, A.; ANTORÁND, B. R.; FOLGUERA, C.; CANTERO, M.; ORDENF, B.; MUNEZ, E.; Antifungal stewardship in a tertiary hospital, **Rev Iberoam Micol.** 2015.

RIBEIRO, M.; PAULA, C.R.; PERFECT J.R.; COX, G.M. Phenotypic and genotypic evaluation of fluconazole resistance in vaginal Candida strains isolated from HIVinfected women from Brazil. **Med. Micol.**, 2005.

RICHARDSON, K., COOPER, K., MARRIOTT, MS, TARBIT, M.H, TROKE, P.F., WHITTLE, P.J. Discovery of fluconazole, a novel antifungal agent. **Rev. Infect. Dis.**, Chicago, 1990.

RICHARDSON, M.D.; WARNOCK, D.W. Fungal infection – Diagnosis and management. London : Blackwell, 1993.

SANGLARD, D. Resistance of human fungal pathogens to antifungal drugs. *Current Opinion Microbiology*, 2002.

SANT'ANA, P.L, MILAN, E. P, MARTINEZ, R, et al. Multicenter brazilian of oral Candida species isolated from AIDS patients. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 2002.

SANTOS JR, I.D.; SOUZA, I.A.M.; BORGES, R.G.; SOUZA, L.B.S; SANTANA, W.J.; COUTINHO, H.D.M. Características gerais da ação, do tratamento e da resistência fúngica ao fluconazol. **Scientia Medica**, 2005.

SANTOS, G.F.F.; SAGRILLO, M.; MACHADO, M.M.; ALMEIDA, R. C.; MASTARDEIRO, C. P.; DUARTE, M.M.M.F.; CRUZ, I.B.M.. Toxicological effects of ultraviolet radiation on lymphocyte cells with different manganese superoxide dismutase Ala16Val polymorphism genotype. *Toxicol in Vitro*, 2010.

SANTOS JR, I.D.;SOUZA,I.A.M; BORGES, R.G; DE SOUZA, L.B.S; SANTANA, W.J; COUTINHO, H.D.M. Características gerais da ação, do tratamento e da resistência fúngica ao fluconazol. **Scientia Medica**, 2005.

SCHILTER, B.; BENIGNI, R.; BOOBIS, A.; CHIODINI, A.; COCKBURN,A.; CRONIN, M. T. D.; PIPARO,E L.; MODI, S.; THIEL, A.; WORTH,A.;Establishing the level of safety concern for chemicals in food without the need for toxicity testing, **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, 2014.

SCHIMID, W. The Micronucleus Test. Mut. Res, 1975.

SCHOFIELD, M.J., HIEH, P. DNA mismatch repair: molecular mechanisms and biological function. Annu Rev Microbiol, 2003.

SHARMA, V.; BHATIA, R. Triazoles in Antifungal Therapy: A Review. **International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical**, 2:417-427, 2011.

SILVA, J; ERDTMANN, B; HENRIQUES, J.A. P. **Genética toxicológica**. Porto Alegre: Alcance. 2003.

SINGH, N., MCCOY, M., TICE, R., SCHNEIDER, E., 1995. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individuals cells. Exp. Cell Res, 1995.

Sistema de classificação de perigo de acordo com o Sistema Globalmente Harmonizado para a Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos. Norma ABNT-NBR 14725 – Parte 2:2009.

STAIGER, M.P. PIETAK, A.M.; HUADMAI,J.; DIAS, G.; , Biomaterials, 2006.

TAPIA, C., Antifúngicos y resistencia.Revista chilena de infectología, 2012.

TRAVASSOS, L. R; TABORDA, C. P; COLOMBO, A.L.; . Treatment options for paracoccidioidomycosis and new strategies investigated. Expert review of anti-infective therapy, 2008.

TOPF, J. M. , Murray PT. Hypomagnesemia and hypermagnesemia. Rev Endocr Metab Dis, 2003.

TUCKER, J.D., PRESTON, R.J.. Chromosome aberrations, micronuclei, aneuploidy, sister chromatid exchanges and cancer risk assessment. Mutat. Res, 1996.

UPTON, A.; MARR, A.K. Emergence of opportunistic mould infections in the hematopoietic stem cell transplant patient. **Current Infectious Disease Report**, 2006.

YANG, H.; LIU, C.;YANG, D.; ZHANGA, H.; XIA, Z.; Comparative study of cytotoxicity, oxidative stress and genotoxicity induced by four typical nanomaterials: the role of particle size, shape and composition; **J. Appl. Toxicol.**; 2009.

Yu AS. Evolving concepts in epithelial magnesium transport. Curr Opin Nephrol Hypertens; 2001.

YUNIS, J.J. High resolution of human chromosomes. **Science**, 1996.

YÜZBAŞIOĞLU, D.; ÜNAL, F.; YILMAZ, S.; AKSOY, H.; ÇELİK, M. Genotoxicity testing of fluconazole *in vivo* and *in vitro*. **Mutation Research**, 2008.

WALSH, T.J.; KASAI, M.; FRANCESCONI, A.; LANDSMAN, D.; CHANOCK, S.J. New evidence that *Candida albicans* possesses additional ATP-binding cassette MDR-like genes: implications for antifungal azole resistance. **J. Med. Vet. Mycol.**, 1997.

WANG, C.; HOU, H.; NAN, K.; MICHAEL, J.; CHENG, L.; Intravitreal controlled release of dexamethasone from engineered microparticles of porous silicon dioxide; *Experimental Eye Research*, 2014.

WEDIG, K. E.; KOGAN, L.; SCHORRY, E. K.; WHITSETT, J. A.; Skeletal demineralization and fractures caused by fetal magnesium toxicity; *Journal of Perinatology*, 2006.

WILSON, D. M.; SOFINOWSKI, T. M.; MCNEILL, D. R. Repair mechanisms for oxidative DNA damage. *Front Biosci*, 2003.

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