



EDITORA
ALFREDO
NASSER



FACULDADE
ALFREDO NASSER

DR. AROLDO VIEIRA DE MORAES FILHO

A GENOTOXICIDADE DOS MEDICAMENTOS ANTIRRETROVIRAIS:

AS MONOTERAPIAS COM EFAVIRENZ (EFV)
E FUMARATO DE TENOFOVIR DESOPROXILA (TDF)



Aroldo Vieira de Moraes Filho é professor da Faculdade Alfredo Nasser, coordenador e professor Pós-Graduação e professor do MBA, assessor da Diretoria Acadêmica e membro titular como representante pesquisador da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/FAN). Graduado em Licenciatura Plena em Ciências Biológicas pela Universidade Estadual de Goiás - Unidade Universitária de Morrinhos. Especialista em Tecnologias aplicadas ao Ensino de Biologia (ETAEB), Mestre em Biologia - área de concentração Biologia Celular e Molecular pela Universidade Federal de Goiás (UFG), Doutor em Ciências Biológicas - área de concentração: Genética e Bioquímica pela UFG. Atualmente realiza estágio de Pós-Doutoramento pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da UFG. Tem experiência na área de Genética Toxicológica, Ensino de Genética e Saúde Coletiva, atuando principalmente nos seguintes temas: antirretrovirais, AIDS, genotoxicidade, mutagenicidade, sexualidade humana e sexualidade na adolescência. É avaliador de cursos do Ministério da Educação (MEC).

Nesse livro, proveniente da minha Dissertação, analiso os medicamentos antirretrovirais em *Drosophila melanogaster* para verificar a segurança destes, uma vez que os pacientes que fazem uso prolongado e os profissionais da saúde, precisam de informações sobre efeitos secundários a longo prazo. O objetivo é alertar a importância de se fazer uma análise do risco/benefício em relação aos medicamentos existentes e demonstrar a necessidade das pesquisas com os fármacos e/ou protótipos dos mesmos para garantir a qualidade de vida dos pacientes.

Moraes Filho, Aroldo Vieira de
A genotoxicidade dos medicamentos antirretrovirais: as monoterapias com efavirenz (EFV) e fumarato de tenofovir desoproxila (TDF). /Aroldo Vieira de Moraes Filho. - / Aparecida de Goiânia: Faculdade Alfredo Nasser, 2019.

ISBN: 978-85-68122-17-4.

39 Páginas. Inclui Bibliografia.

1. Genotoxicidade.
2. AIDS
3. Medicamento.
4. Síndrome da Imunodeficiência Adquirida.
5. Vírus HIV.
6. Efavirenz.
7. Fumarato de Tenofovir Desoproxila (TDF).
7. Genética Toxicológica I. TÍTULO. II. AUTOR.

CDU: 615.281.8

FACULDADE ALFREDO NASSER

Diretor Geral

Prof. Alcides Ribeiro Filho

Vice-diretor

Prof. Ms. José Carlos Barbosa Soares

Diretor Acadêmico

Prof. *PhD.* Carlos Alberto Vicchiatti

Diretor de Relações Institucionais

Prof. Msd. Luiz Antonio de Faria

Diretor de Desenvolvimento

Prof. Divino Eterno de Paula Gustavo

Diretor Financeiro

Prof. Leandro Júlio dos Santos Faria

EXPEDIENTE

Editora-chefe

Prof^a. Dr^a. Michele Giacomet

Editor-assistente

Peterson Daniel Vieira

Bibliotecárias

Ana Márcia Santana Lima

Eliana Batista Pires e Silva

Francisca Rodrigues da Silva

Layout e diagramação

Peterson Daniel Vieira

Capa

Cleyton Nascimento

Responsável técnico

Daniel Flávio Santos Rezende

AROLDO VIEIRA DE MORAES FILHO

**A GENOTOXICIDADE DOS MEDICAMENTOS ANTIRRETROVIRAIS:
as monoterapias com Efavirenz (EFV) e
Fumarato de Tenofovir Desoproxila (TDF)**

Aparecida de Goiânia

2019

ISBN: 978-85-68122-17-4

PREFÁCIO

Os medicamentos antirretrovirais surgiram para impedir a multiplicação do vírus HIV no organismo, reduzindo a sua virulência, porém sem eliminá-lo das células infectadas. Estes medicamentos aumentaram o tempo e a qualidade de vida dos pacientes com AIDS. Dentro deste contexto, o EFV é inibidor da transcriptase reversa não-análogo de nucleosídeo. O TDF, pró-fármaco oral de tenofovir, é análogo da adenosina 5`-monofosfato, pertencente à classe de inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleotídeos. Estes fármacos atuam nos mecanismos de replicação do HIV, inibindo a ação da transcriptase reversa e, conseqüentemente, impedindo a síntese de DNA viral. Diante disto, tive o intuito de avaliar o potencial tóxico e genotóxico do EFV e do TDF, por meio do Teste para Detecção de Mutação e Recombinação Somática (SMART). Para isso, trabalhei com larvas de 3º estágio oriundas do Cruzamento Padrão (ST – *standard cross*) entre machos *mwh* e fêmeas *flr³*, que distribuí em frascos contendo 0,9 g de meio sintético e 3 mL das soluções de tratamento e água destilada (controle negativo), e permaneceram por aproximadamente 48 h (tratamento crônico), isto é, até atingirem o estágio de pupa. Essas linhagens são portadoras de genes marcadores específicos, localizados no braço esquerdo do cromossomo 3, que permitem monitorar eventos relacionados com mutação gênica, aberrações cromossômicas e recombinação mitótica. Coloquei as larvas em dois frascos para cada tratamento, incluindo o controle negativo. Em um dos frascos coloquei 100 larvas e os adultos sobreviventes foram contados para a determinação da curva de sobrevivência. Posteriormente, houve a montagem das lâminas das asas dos adultos e análise dos tricomas presentes para quantificar os efeitos genotóxicos, por meio da comparação entre as frequências de manchas de pelos mutantes presentes nas asas dos indivíduos dos grupos tratados e o controle negativo. Avaliei estatisticamente pelo teste binomial condicional. Os resultados demonstraram que o EFV foi tóxico em altas concentrações e não apresentou indução de eventos genotóxicos. Inversamente, o TDF não apresentou toxicidade nas concentrações testadas, porém apresentou indução de efeitos genotóxicos em todas as concentrações, com prevalência dos eventos recombinogênicos. Diante dos resultados, ressalto a importância de analisar constantemente o custo/benefício de medicamentos isolados e identificar a atividade tóxica e genotóxica de cada fármaco com o intuito de assegurar qualidade de vida aos pacientes que fazem uso de monoterapias e oferecer suporte para as investigações com as terapias que utilizam combinações de antirretrovirais.

Tais resultados são oriundos da Dissertação de Mestrado em Biologia – área de concentração: biologia celular e molecular na Universidade Federal de Goiás, sob a orientação e parceria da Prof^a. Dr^a. Kênya Silva Cunha que fez parte da construção dessa pesquisa.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO À GENOTOXICIDADE DOS MEDICAMENTOS ANTIRRETROVIRAIS ISOLADOS	9
1.1	Medicamentos antirretrovirais	9
1.2	Efavirenz (EFV)	10
1.3	Fumarato de tenofovir desoproxila (TDF)	14
1.4	Genética Toxicológica	17
1.5	Teste para Detecção de Mutação e Recombinação Somática (SMART)	18
2	OBJETIVOS	20
3	MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1	Agentes antirretrovirais	21
3.2	Teste para Detecção de Mutação e Recombinação Somática (SMART)	21
3.3	Linhagens teste de <i>Drosophila melanogaster</i>	22
3.4	Procedimento experimental e tipos de larvas	22
3.5	Montagem e análise microscópica das lâminas	23
3.6	Bases genéticas e classificação dos clones	24
3.7	Análise estatística	24
4	RESULTADOS	25
4.1	Efeito tóxico	25
4.2	Toxicidade genética	26
5	DISCUSSÃO	30
6	CONCLUSÃO	32
	REFERÊNCIAS	33

1 INTRODUÇÃO À GENOTOXICIDADE DOS MEDICAMENTOS ANTIRRETROVIRAIS ISOLADOS

1.1 Medicamentos antirretrovirais

A Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) é uma doença, causada pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), que acomete o sistema imunológico. Esse vírus ataca os linfócitos T CD4⁺ e, conseqüentemente, o organismo fica mais suscetível a “doenças oportunistas”, que variam desde resfriados até infecções mais graves (BRASIL, 2012a).

A detecção da doença iniciou-se em 1980 e até junho de 2011 o Brasil registrou 608.230 casos de AIDS, de acordo com o último boletim epidemiológico do Ministério da Saúde. Em 2010, foram notificados 34.218 casos e a taxa de incidência de AIDS no Brasil foi de 17,9 casos por 100 mil habitantes (BRASIL, 2012a; BRASIL, 2012b).

O RNA genômico do HIV é constituído por duas monofitas que existem na forma de ribonucleoproteína, contendo as enzimas transcriptase reversa (TR), integrase, protease e a proteína p7 de ligação ao RNA. O vírus tem afinidade com as células do sistema imune, causando supressão de células que expressam as proteínas CD4 e CD8, pois a infecção inicia-se com a ligação das subunidades da proteína do vírus com as moléculas de CD4 (PETER; GAMBERTOGLIO, 1998; PECANHA *et al.*, 2002; ABBAS *et al.*, 2003).

Em 1981 a AIDS foi identificada como uma doença e dois anos após iniciou-se uma busca intensa por compostos que inibissem a infectividade e replicação do vírus. O primeiro composto que demonstrou ser capaz de inibir a replicação do HIV tanto *in vitro* quanto *in vivo* foi a suramina, mas o primeiro agente anti-HIV a ser licenciado para uso clínico, em 1987, foi a zidovudina (AZT) (DE CLERCQ, 2009).

Os medicamentos antirretrovirais surgiram para impedir a multiplicação do vírus no organismo, reduzindo assim, a virulência do HIV sem eliminá-lo das células infectadas. Então, o uso desses medicamentos tornou-se fundamental para aumentar o tempo e a qualidade de vida dos portadores de AIDS, por evitarem o enfraquecimento do sistema imunológico e, conseqüentemente, reduzirem os riscos de serem acometidos por “doenças oportunistas” (BRASIL, 2012c). Desde 1996, o Brasil distribui gratuitamente o coquetel anti-AIDS para todos que necessitam do tratamento. Segundo dados do Ministério da Saúde, cerca de 200 mil pessoas recebem regularmente os remédios para tratar a doença (BRASIL, 2012c).

As drogas antirretrovirais são divididas em diferentes categorias, de acordo com o alvo de sua interação no ciclo replicativo do HIV. Essas categorias são: (i) os inibidores de

proteases (IPs) que atuam nessa enzima, bloqueando sua ação e impedindo a produção de novas cópias de células infectadas com HIV; (ii) inibidores de fusão (FIs) que impedem a entrada e, conseqüentemente, a reprodução do vírus na célula; (iii) inibidores de correceptores (CRIs) que interagem com os receptores CCR5 ou CXCR4, impedindo a entrada do vírus nas células; (iv) inibidores de integrase, que bloqueiam a atividade desta enzima, responsável pela inserção do DNA do HIV no genoma humano; (v) inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleosídeos (NRTIs); (vi) inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleotídeo (NtRTIs); (vii) inibidores da transcriptase reversa não-análogos de nucleosídeos (NNRTIs). As drogas pertencentes às categorias NRTIs e NtRTIs interagem com o sítio catalítico da enzima transcriptase reversa (RT), enquanto as NNRTIs interagem com sítios alostéricos da enzima. A TR é a enzima responsável pela conversão do RNA viral em DNA, antes que o material genético do vírus se integre ao genoma da célula infectada (DE CLERCQ, 2009; FERREIRA *et al.*, 2010).

Nos últimos anos houve pouco progresso em relação ao desenvolvimento da vacina contra o HIV, obtendo-se eficácia máxima de 31,2% (RERKS-NGARM *et al.*, 2009). Contrariamente, a terapia de combinação de drogas para combater a infecção por HIV, surge como um avanço promissor no tratamento da AIDS. Entretanto, essa terapia é limitada pelo seu custo, pela exigência de adesão ao longo da vida e pelos efeitos desconhecidos ao longo do tratamento (RERKS-NGARM *et al.*, 2009; RICHMAN *et al.*, 2009).

1.2 Efavirenz (EFV)

A classe dos NNRTIs consiste de moléculas estruturalmente diversas, inibidoras alostéricas que se ligam a um local na RT distante do sítio ativo, com a finalidade de alterar a configuração da enzima e anular a sua capacidade catalítica. São moléculas não competitivas em relação a desoxirribonucleotídeos fosfatados (dNTP's) e, portanto, não tem qualquer efeito direto sobre o ácido nucleico de ligação à RT (IYIDOGAN; ANDERSON, 2012).

Dentro desta classe há um fármaco muito utilizado na terapia antirretroviral, o efavirenz (CAS 154598-52-4; EFV), (4S)-6-cloro-4-(ciclopropiletinil)-1, 4-dihidro-4-(trifluorometil) 2-H-3, 1-benzoxazina 2-1 (RAJU; BEGON, 2008) (Figura1), aprovado pela *Food and Drugs Administration* (FDA) em 1998 (WU *et al.*, 2012), que consiste em um pó cristalino branco a ligeiramente rosa, com massa molecular de 315,68 e é praticamente insolúvel em água (SUSTIVA, 2009).

O EFV foi o primeiro agente antirretroviral aprovado pela FDA para ser tomado apenas uma vez ao dia. Esse fármaco apresenta alta eficiência e tolerabilidade a longo prazo, por isso que os esquemas antirretrovirais que possuem EFV apresentam as respostas mais satisfatórias. Porém o fármaco não deve ser administrado como monoterapia, apenas associado a esquemas antirretrovirais (GOODMAN; GILMAN, 2006).

O EFV é um dos componentes preferidos do regime de primeira linha no tratamento de infecção pelo HIV em todo o mundo, além de ser a primeira geração de NNRTIs. Levando em consideração o aumento do acesso a terapia antirretroviral, a potencial exposição da população mundial ao EFV é muito grande (RAKHMANINA; ANKER, 2010).

O governo brasileiro publicou no dia 07 de maio de 2012, o decreto 7.723/2012 para renovar por cinco anos o licenciamento compulsório do EFV, visto que atualmente cerca de 104 mil pessoas no país utilizam o fármaco nos seus esquemas terapêuticos, ou seja, quase 50% das pessoas em tratamento no Brasil fazem uso do EFV. Em 2007, o governo decretou o licenciamento compulsório para que o Ministério da Saúde possa importar da Índia medicamentos genéricos pré-qualificados pela Organização Mundial da Saúde (OMS), possibilitando uma economia de US\$ 31,5 milhões para o país. Visando uma economia maior, foi iniciado o desenvolvimento do EFV no Brasil, para isso, o governo federal investiu no desenvolvimento da formulação do medicamento e na produção do princípio ativo que passaram a ser produzidos no Brasil desde 2009, na forma de genérico, mas laboratórios indianos forneceram o medicamento até 2010 e o estoque durou até 2011. Atualmente a produção é inteiramente nacional e em 2012 a Farmaguinhos fabricará 57 milhões de comprimidos de EFV que custarão ao Ministério da Saúde R\$ 76,9 milhões, assegurando a viabilidade do tratamento fornecido pelo Sistema Único de Saúde (SUS) (BRASIL, 2012d).

O EFV é metabolizado principalmente por via hepática pelo citocromo P450, isoenzima CYP2B6. O gene CYP2B6 foi mapeado no cromossomo 19 e apresenta polimorfismos que codificam para a enzima, podendo, portanto, influenciar no metabolismo do fármaco, como no caso da variante alélica 516G>T que está associada com uma menor atividade da isoenzima CYP2B6 e conseqüente aumento da concentração plasmática do EFV, causando maior incidência de toxicidade neuropsicológica associada ao fármaco. Ainda na metabolização do EFV, há o envolvimento parcial de CYP3A4 e CYP2A6 para metabólitos hidroxilados inativos que incluem 8-hidroxi-efavirenz e 7-hidroxi-efavirenz. O 8-hidroxi-efavirenz é o principal metabólito do EFV *in vitro* e *in vivo*, e a contribuição de 7-hidroxi-efavirenz à depuração total de EFV é considerada pequena. Estudos recentes sugerem que o CYP2A6 é o principal responsável pela 7-hidroxi-efavirenz e catalisa a segunda etapa de

hidroxilação do 8-hidroxi metabólito para 8,14-dihidroxi efavirenz. Estima-se que aproximadamente 17% de 8-hidroxi efavirenz é ainda oxidado a 8,14-dihidroxi efavirenz *in vitro*. Os metabólitos hidroxilados de EFV sofrem excreção biliar e urinária subsequente após conjugação (OGBURN *et al.*, 2010; GOUNDEN *et al.*, 2010).

Células de câncer de próstata (LNCaP) foram tratadas com o EFV para estudar seus efeitos sobre a expressão de CYP2J2 e CYP2R1. EFV suprimiu significativamente os níveis de CYP2J2. Em fibroblastos tratados com EFV para estudar o seu efeito sobre a expressão de CYP2R1 e CYP27A1, foi demonstrado que esse antirretroviral suprimiu significativamente CYP2R1, mas CYP27A1 não respondeu a este tratamento, concluindo assim, que o EFV suprime a expressão de CYP2R1 em fibroblastos, mas não em células LNCaP. Esta diferença de regulação por EFV em CYP2R1 está correlacionada com a expressão do receptor nuclear PXR em fibroblastos, mas não em células LNCaP (ELFOLK *et al.*, 2009).

Jamaluddin *et al.* (2010) confirmaram que o EFV aumenta a permeabilidade endotelial, causando a disfunção das células endoteliais da artéria coronária humana (HCAECs) de uma maneira concentração-dependente, que pode ser devido à diminuição de proteínas de junção (claudina e ocludina, por exemplo) e o aumento do ânion superóxido. Além disso, a ação do EFV nas HCAEDs causa a ativação da JNK e NF-B que podem estar diretamente envolvidas na transdução de sinal.

A mutação de resistência mais comum relacionada a diminuição de sensibilidade ao EFV ocorre no códon 103 da transcriptase reversa (K103N), porém foram relatadas mutações de resistência nos códons 100, 106, 108, 181, 188, 190 e 225. Contudo, o EFV é bem absorvido pelo trato gastrointestinal e atinge concentrações plasmáticas máximas dentro de cinco horas (GOODMAN; GILMAN, 2006). Entretanto, nos dados coletados por Lisón *et al.* (2011) sobre mutações genótípicas resistentes aos antirretrovirais, as mais frequentes para o EFV e para a nevirapina (fármaco da mesma classe do EFV) foram: K103N/R (23,98%), V179D/E/I/M/T (10,82%), A98E/G/S (10,53%) e K101E/P/Q/R (9,06%).

A atividade antirretroviral do EFV tem comprovado ser equivalente ou superior a todos os agentes antirretrovirais comparados até a presente data (RAKHMANNINA; ANKER, 2010). Este fármaco é administrado uma vez ao dia devido a uma meia vida longa e por demonstrar ser um seguro e conveniente esquema antirretroviral potente no combate ao HIV-1. O EFV é atualmente o único agente antirretroviral disponível em uma combinação de dose fixa com mais dois antirretrovirais em um único comprimido administrado uma vez ao dia como uma Terapia Antirretroviral Altamente Ativa (HAART, do inglês, *Highly Active*

Antiretroviral Therapy), que tem o potencial de preservar as taxas de alta aderência necessária para atingir a supressão viral (RAKHMANINA; ANKER, 2010).

No entanto, os efeitos adversos do EFV incluem: erupções cutâneas, raros relatos de ocorrência da síndrome de Stevens-Johnson (erupções cutâneas fatais); efeitos tóxicos que envolvem o sistema nervoso central (SNC), como tontura, comprometimento da concentração, disforia, insônia, sonhos vívidos ou anormais, psicose franca (depressão, alucinação e/ou manias), cefaléia, aumento das transaminases hepáticas e níveis séricos elevados de colesterol. Além disso, o EFV é o único antirretroviral teratogênico em primatas, pois quando o EFV foi administrado a fêmeas grávidas de macacos, 25% dos fetos apresentaram malformações e em seis casos de mulheres grávidas que fizeram uso do fármaco, o feto ou lactente apresentaram malformações do cérebro e da medula espinhal (GOODMAN; GILMAN, 2006).

Nos dados coletados por Adjene e Igbigbi (2010), o EFV pode ter atuado como uma toxina para as células do colículo inferior de ratos adultos Wistar. O EFV afetou a integridade celular, causou defeitos na permeabilidade da membrana e interferiu na homeostase da célula, tendo como consequências, alterações celulares degenerativas tais como uma população celular esparsa, hipertrofia, alterações microcísticas e vacuolização no estroma do colículo inferior dos ratos.

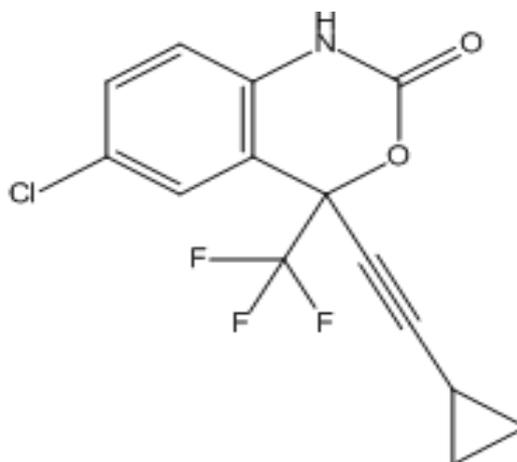
Estudos realizados em ratos Wistar sobre o efeito da administração de EFV para os rins demonstraram que o fármaco causou distorção e ruptura da citoarquitetura renal, glomerulonefrite, congestão celular (aumento do volume sanguíneo devido à diminuição da drenagem venosa) e decréscimo significativo do peso do rim (indicando provável morte celular programada), comprovando que a administração de EFV causa citotoxicidade renal, comprometendo a função dos rins (ADJENE *et al.*, 2011).

Ao analisar os efeitos do EFV na diferenciação, expressão gênica e liberação de proteínas reguladoras da adipogênese humana, determinou-se que o EFV causou uma repressão dose-dependente na diferenciação dos adipócitos que foi associado com a baixa regulação dos genes reguladores da formação de adipócitos SREBP-1, PPARC e C/EBPa, e seus genes-alvo na codificação das lipoproteínas (lipase, leptina e adiponectina) que são proteínas chave na função dos adipócitos. O EFV causou um aumento significativo da liberação de citocinas pró-inflamatórias (interleucina [IL] -8, IL-6, proteína quimiotática de monócitos-1), inibidor do ativador do plasminogênio tipo-1 e fator de crescimento de hepatócitos (HGF); reprimiu a liberação de adiponectina. Portanto, o EFV apresentou resposta anti-adipogênica e pró-inflamatória, sugerindo que pode contribuir para alteração de tecido

adiposo, de acordo com a sua capacidade de prejudicar a diferenciação de culturas de células de adipócitos (DÍAZ-DELFÍN, 2011).

Nos estudos de Gomez-Sucerquia *et al.* (2012) demonstrou-se que EFV alterou a função mitocondrial e causou estresse oxidativo e, conseqüentemente, danos em células hepáticas tratadas com o fármaco, sugerindo que o EFV pode ser associado com toxicidade hepática. Porém, segundo Pineda *et al.* (2012) a tolerabilidade hepática de EFV foi boa em pacientes HIV / HCV co-infectados que apresentavam fibrose hepática avançada, pois a taxa de interrupção do tratamento atribuível à insuficiência hepática causada por toxicidade do fármaco foi baixa.

Figura 1 – Estrutura química do efavirenz



Fonte: (Chemfinder, 2012 – a)

1.3 Fumarato de tenofovir desoproxila (TDF)

A classe dos NtRTIs é constituída por pró-fármacos que necessitam de ativação metabólica por meio de vias de fosforilação que produzem os seus derivados difosfato e trifosfato, respectivamente. Estes derivados servem como substratos alternativos para a síntese do DNA viral catalisada pela RT do HIV-1 enquanto competem com os substratos naturais, os desoxiribonucleosídeos trifosfatos (dNTP), para interromper a formação da cadeia de DNA viral após a sua incorporação (IYIDOGAN; ANDERSON, 2012).

Dentro deste contexto, o tenofovir é um NtRTIs que não apresenta uma hidroxila no carbono 3 da desoxirribose. Portanto, uma incorporação de tenofovir no alongamento do

DNA viral interrompe a sequência da transcrição, impedindo a ligação do próximo nucleotídeo (JOHNSON *et al.*, 2010).

O fumarato de tenofovir desoproxila (CAS 202138-50-9; TDF); 9-((R)-2-((Bis(((isopropoxicarbonil)oxi) metoxi) fosfonil) metoxi) propil) adenina fumarato (Figura 2), é o pró-fármaco oral de tenofovir, com atividade antiviral contra o vírus da hepatite B (HBV) e o HIV (RAJU; BEGON, 2008). O tenofovir é um análogo da 5'-monofosfato de adenosina, e tem o potencial de inibir a ação da DNA polimerase de HBV e HIV por competir com o substrato natural da enzima, induzindo a terminação do alongamento da cadeia de DNA e, conseqüentemente, cessando a replicação do genoma viral. O TDF possui um perfil de citotoxicidade favorável, por ser um inibidor muito fraco das DNA polimerases α e β em mamíferos e DNA polimerase mitocondrial γ (DELANEY *et al.*, 2006; DECLERCQ; HOLLY, 2005; LEE *et al.*, 2003).

O TDF foi aprovado pela FDA em 2001 para o tratamento da AIDS e dois anos após sua descoberta como um agente antirretroviral, estudos demonstraram que esse fármaco poderia inibir completamente a infecção pelo SIV (vírus da imunodeficiência símia), equivalente ao HIV em macacos, quando administrado por via subcutânea, começando 48 horas antes ou 4 ou 24 horas após a inoculação intravenosa do SIV. A sua eficácia contra o SIV também foi testada por inoculação intravaginal e em macacos recém-nascidos e o fármaco demonstrou ser eficiente contra infecções retrovirais independentemente da via de transmissão (parenteral, sexual ou perinatal) (DECLERCQ, 2012).

O TDF possui potente atividade contra o HIV, sendo um dos medicamentos recomendados no uso inicial da terapia anti-HIV, pois geralmente apresenta poucos efeitos colaterais ou toxicidade. Os eventos adversos mais comuns incluem: erupções cutâneas, náuseas, flatulência, diarreia e dor de cabeça (Duarte-Rojo e Heathcote, 2010).

Este fármaco apresenta vantagens sobre os NRTIs utilizados para tratar a infecção pelo HIV, visto que o TDF é monofosforilado, reduzindo a via de ativação intracelular para uma conversão mais rápida e completa do pró-fármaco à droga ativa. Além disso, o TDF apresenta toxicidade celular e mitocondrial menor em relação aos NRTIs. Devido a essas características, a ativação intracelular do TDF é rápida, pois ele sofre hidrólise do diéster, sendo convertido em tenofovir, que por sua vez, é fosforilado pela monofosfato de adenosina cinase (AMP cinase) em tenofovir monofosfato (TFV-MP) e, este é fosforilado pela nucleosídeo difosfato cinase (NDP cinase), sendo convertido em difosfato de tenofovir (metabólito ativo). Portanto, como o fármaco é monofosforilado, após essas duas fosforilações, o componente ativo torna-se um composto trifosfatado (GRIGSBY *et al.*, 2010b; GOODMAN; GILMAN, 2006).

Além disso, o TDF tem um grupo lábil lipofílico para facilitar a penetração através das membranas da célula alvo. Este fármaco, não é um indutor ou inibidor de enzimas citocromo P450 humano *in vitro* ou *in vivo* e tem alta potência e uma resposta excepcionalmente durável quando usado em ensaios como o único agente terapêutico. Também, o metabólito ativo, difosfato de tenofovir, exibe uma meia-vida intracelular longa em células do sangue periférico mononuclear, que permite a dosagem única diária (GRIGSBY *et al.*, 2010a).

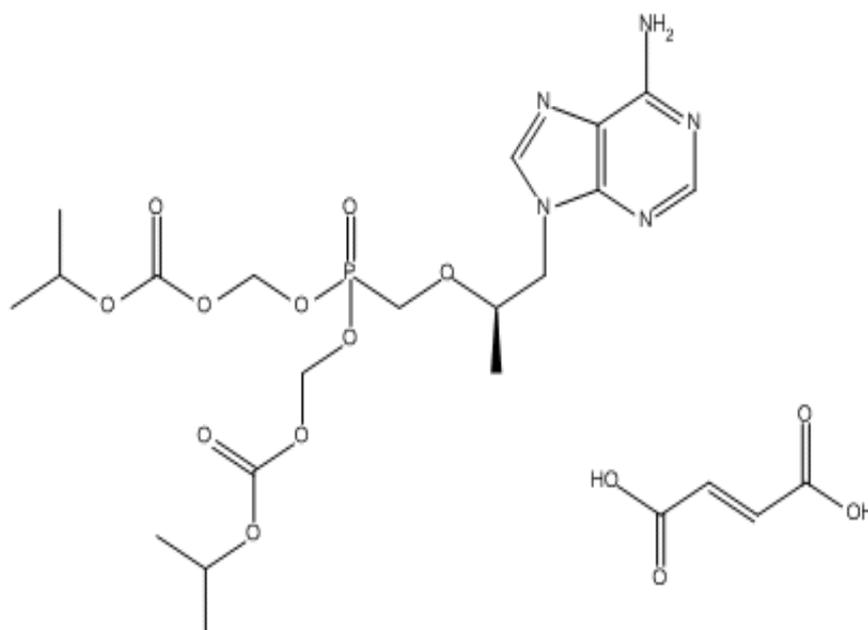
Na fase III de ensaios utilizando pacientes infectados somente pelo HBV nenhuma evidência de resistência ao TDF foi demonstrada até 72 semanas de tratamento, pois apenas dois pacientes HIV-HBV co-infectados, apresentando a mutação A194T relacionada com resistência a lamivudina (3TC), demonstraram ser resistentes ao TDF, mas a associação entre esta mutação e a resistência ao TDF ainda não foi confirmada em outro estudo (VRIES-SLUIJS *et al.*, 2010). Quatro indivíduos tiveram avanço virológico, porém apenas um paciente apresentou a combinação de mutações rt194T no gene da polimerase do HBV resistentes ao 3TC e ao adefovir. Um fenômeno interessante foi que dois avanços virológicos ocorreram em associação com o desenvolvimento de carcinoma hepatocelular, porém a satisfatória explicação para essa relação não pôde ser encontrada. Há relatos que demonstram uma associação entre o desenvolvimento de resistência e o risco de carcinoma hepatocelular, explicado em grande parte pela recorrência de replicação viral, mas houve apenas um relato de carcinomas hepatocelulares aumentarem significativamente após o desenvolvimento da resistência ao 3TC (VRIES-SLUIJS *et al.*, 2010; ANDREONE *et al.*, 2004).

Este NtRTI de segunda geração melhorou a atividade antiviral contra infecções que contém mutações nos análogos da timidina (TAMs) [D67N, K70R e T215Y] e mutações nos análogos de nucleosídeos (NAMs) [Q151M]. Além disso, o TDF exerce atividade antiviral em células CD4⁺ ativas e em repouso, visto que, por exigir menos vias de fosforilação, o fármaco resulta em elevadas concentrações intracelulares. Porém, a resistência ao TDF é causada pela mutação pontual K65R (AAA → AGA) na RT que tem uma barreira genética muito baixa, exigindo uma única transição, visto que, essas transições (substituições A-G) são 2,5 vezes mais frequentes do que transversões (substituição A-C). Por outro lado, a mutação K65R é mais rara (1,7-4%) em comparação com a alta incidência (>40%) de TAMs associadas com AZT e d4T (BRENNER; COUTSINOS, 2009).

Um outro efeito secundário demonstrado pelo tratamento com TDF relaciona-se com a perda de densidade mineral óssea (DMO), particularmente em crianças, jovens e adolescentes, mas pouco se sabe sobre o mecanismo associado à perda óssea em indivíduos infectados pelo HIV (GRIGSBY *et al.*, 2010b).

O TDF é principalmente eliminado por via renal, portanto há relatos de toxicidade renal grave, incluindo insuficiência renal aguda e síndrome de Fanconi. Nos estudos de Vries-Sluijs et al. (2010), as investigações sobre o risco de toxicidade renal em pacientes que fazem uso do TDF foram realizadas e um aumento pequeno no soro, mas significativo, dos níveis de creatinina foi observado após cinco anos de tratamento. No entanto, apenas 3% dos pacientes apresentaram aumento de creatinina sérica que exigiu a interrupção do TDF. Portanto, recomenda-se que a depuração da creatinina deve ser calculada antes de iniciar o uso desta droga, bem como o monitoramento de rotina de creatinina sérica e fósforo devem ser realizados (DUARTE-ROJO; HEATHCOTE, 2010; WINSTON *et al.*, 2010). Porém, os aumentos na creatinina sérica ocorrem, geralmente, no início do tratamento, sugerindo que o monitoramento frequente da insuficiência renal é necessário pouco depois do início do tratamento com TDF, mas que, em seguida provavelmente pode ser diminuído. Em geral, há segurança renal do TDF como parte da terapia antirretroviral através de cinco anos de tratamento (VRIES-SLUIJS *et al.*, 2010).

Figura 2 – Estrutura química do fumarato de tenofovir desoproxila



Fonte: (CHEMFINDER, 2012b).

1.4 Genética Toxicológica

O câncer é o resultado de alterações genéticas que trabalham em conjunto para substituir os mecanismos de controle que impedem a proliferação celular, portanto se

desenvolve quando as células não seguem seu padrão normal de crescimento controlado, em consequência de alterações em sua composição genética. Na falta dessa regulação, essas células crescem demasiadamente, expandindo-se em clones pré-cancerígenos. Enquanto os tecidos normais controlam a produção e liberação de sinais de promoção do crescimento que instruem a entrada e a progressão através da célula, as células cancerosas sustentam a proliferação crônica (HANAHAN; WEINBERG, 2000; HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Alguns processos estão comprovadamente relacionados com a carcinogênese, destacando-se (i) as mutações, seja por danos na replicação, fatores ambientais ou deficiência no mecanismo de reparo; (ii) a recombinação homóloga (RH), devido a perda de heterozigose (LOH) de genes envolvidos na regulação do ciclo celular (BISHOP; SCHIESTL, 2003).

Outras evidências que relacionam a RH com a carcinogênese são (i) o fato dos pacientes portadores de síndromes indutoras de câncer apresentarem um aumento na frequência de recombinação e (ii) a atuação da RH na manutenção dos telômeros, processo relacionado com a conservação de células tumorais. Adicionalmente, a RH é induzida por uma ampla variedade de agentes cancerígenos (BISHOP; SCHIESTL, 2003).

A genética toxicológica avalia os efeitos genotóxicos que são considerados como precursores para o desenvolvimento de neoplasias, como o câncer. Para isso, vários testes estão disponíveis para avaliar mutação gênica, dano cromossômico ou lesão no DNA (Ribeiro e Marques, 2003). Porém, nem todos os sistemas testes analisam a recombinação mitótica, que é um dos principais processos que está envolvido com a carcinogênese, mediada por agentes genotóxicos (ANDRADE; LEHMANN, 2003).

1.5 Teste para Detecção de Mutação e Recombinação Somática (SMART)

A *Drosophila melanogaster* é o organismo modelo do bioensaio SMART. Devido às similaridades com mamíferos, a *Drosophila* tornou-se um excelente modelo para os estudos que envolvam a detecção de agentes genotóxicos, antígenotóxicos e os mecanismos moleculares envolvidos nos processos de mutagênese e carcinogênese, podendo fornecer respostas relevantes, que podem ser extrapoladas para mamíferos superiores (ANDRADE; LEHMANN, 2003; ANDRADE *et al.*, 2004).

Apesar da *Drosophila* possuir aproximadamente 17.000 genes a menos que os humanos, ambas espécies apresentam similaridades genéticas e bioquímicas, então as rotas bioquímicas e funções regulatórias entre as duas espécies são muito conservadas e, vários

genes estudados na *D. melanogaster* provaram ser homólogos dos genes supressores de tumor e oncogenes humanos (MIKLOS; RUBIN, 1996; ST. JOHN; XU, 1997).

As linhagens mutantes de *Drosophila* são bem caracterizadas e possuem uma variedade de marcadores que permitiram a criação de vários sistemas-teste capazes de detectar os mais variados tipos de eventos genéticos, como mutações gênicas, aberrações cromossômicas e recombinação mitótica. Como, a recombinação tem sido considerada um evento que contribui para carcinogênese torna-se importante a aplicação do bioensaio SMART, que realiza a detecção simultânea dos eventos mutacionais e recombinação mitótica, por possibilitar a quantificação desses eventos com o intuito de avaliar a contribuição de cada um deles para a genotoxicidade total dos compostos em estudos (GRAF *et al.*, 1984; ANDRADE; LEHMANN, 2003; ANDRADE *et al.*, 2004).

O SMART se baseia no conceito de que durante o desenvolvimento embrionário de *D. melanogaster*, um grupo de células - disco imaginal – se prolifera mitoticamente para formar o corpo da mosca adulto. A perda de heterozigose de dois genes marcadores recessivos (*mwh* e *flr³*) pode levar à formação de clones de células mutantes que são expressas fenotipicamente como manchas contendo pelos mutantes, presentes nas asas de células de moscas adultas (GRAF *et al.*, 1984; ANDRADE; LEHMANN, 2003; ANDRADE *et al.*, 2004).

Entretanto, não há estudos que comprovem a indução de recombinações mitóticas no DNA causadas pelo EFV e TDF. Enfatizando a importância da aplicação de testes que avaliam este parâmetro, o SMART destaca-se como um teste capaz de fornecer informações seguras acerca do potencial recombinogênico destes medicamentos, contribuindo para ampliar as análises de possíveis efeitos colaterais induzidos por eles.

O nosso grupo tem analisado vários antirretrovirais que demonstram ou não a indução de recombinação mitótica, utilizando o SMART. Em estudo realizado em nosso laboratório foi demonstrado que, no total de eventos tóxicos genéticos induzidos, a zidovudina (AZT) apresentou 85% de eventos recombinacionais, enquanto a didanosina (ddI) foi 100% recombinogênica (GUIMARÃES *et al.* 2008). Em outro estudo do nosso grupo, desenvolvido por Franchi *et al.* (2009), aproximadamente 86% dos clones induzidos pelo lamivudina (3TC) e 76% dos clones induzidos pela estavudina (d4T) foram relacionados com a recombinação mitótica. Estes resultados sugerem que, devido ao alto índice de recombinação mitótica a exposição aos fármacos pode provocar instabilidade genômica e perda de heterozigose, processo relacionado com a carcinogênese. Considerando que a AIDS é uma doença de alta incidência, estudos sobre os efeitos tóxicos genéticos causados pelos antirretrovirais, tornam-se

fundamentais para garantir a segurança dos pacientes que utilizam esses medicamentos (GUIMARÃES *et al.*, 2010).

As conclusões geradas a partir dos resultados dos experimentos realizados em *D. melanogaster* contribuem para um melhor conhecimento sobre possíveis atividades mutagênica e/ou recombinogênica das drogas investigadas, por meio da comparação dos resultados obtidos em dois diferentes genótipos que permitem acompanhar alterações genéticas específicas, como descrito por Graf *et al.*, (1984); Andrade e Lehmann, (2003); e, Andrade *et al.*, (2004): (i) genótipo trans heterozigoto - que evidencia a ocorrência de eventos mutagênicos e/ou recombinogênicos e (ii) genótipo heterozigoto para o cromossomo balanceador TM3 - que expressa, exclusivamente, lesões do tipo mutação gênica e mutação cromossômica.

O presente estudo visa contribuir para que se faça uma projeção do risco-benefício da sua utilização nas terapias antirretrovirais, com o intuito de fornecer novas possibilidades de terapias que ofereçam menos efeitos colaterais e, conseqüentemente, melhore a qualidade de vida dos pacientes a elas submetidos.

2 OBJETIVOS

Com base nesses pressupostos teóricos e no intuito de oferecer informação a respeito da segurança para a saúde humana, o presente trabalho apresenta os seguintes objetivos:

- I) Avaliar o potencial tóxico, mutagênico e recombinogênico dos antirretrovirais, EFV e TDF quando administrados isoladamente em diferentes concentrações;
- II) Quantificar a frequência de recombinação induzida pelo EFV e TDF quando administrados isoladamente;
- III) Avaliar comparativamente os possíveis efeitos tóxico-genéticos dos agentes antirretrovirais em estudo.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Agentes antirretrovirais

Foram utilizados neste trabalho os medicamentos ESTIVA-600[®] e VIREAD[®], ambos cedidos pelo Hospital de Doenças Tropicais Dr. Anuar Auad. Cada comprimido de ESTIVA-600 contém 600 mg de EFV e cada comprimido de VIREAD[®] contém 300 mg de TDF.

À hora do tratamento, diluiu-se três comprimidos de ESTIVA-600 (totalizando 1800 mg de EFV) em 18 mL de água destilada. Para obter a diluição total do comprimido, a solução foi sonicada por 6 minutos, utilizando-se o sonicador Thornton – INPEC (40 watts; 60 Hz) Eletrônica S/A. Com a solução-mãe na concentração de 100 mg/mL, foram diluídas as demais concentrações (0,78125; 1,5625; 3,125; 6,25; 12,5; 25 e 50 mg/mL). Também à hora do tratamento, diluiu-se um comprimido de VIREAD (300 mg) em 30 mL de água destilada, fazendo uso do mesmo sonicador do experimento anterior por 2 minutos. A partir da solução-mãe (10 mg/mL) foram obtidas as demais concentrações: 0,15625; 0,3125; 0,625; 1,25; 2,5 e 5,0 mg/mL.

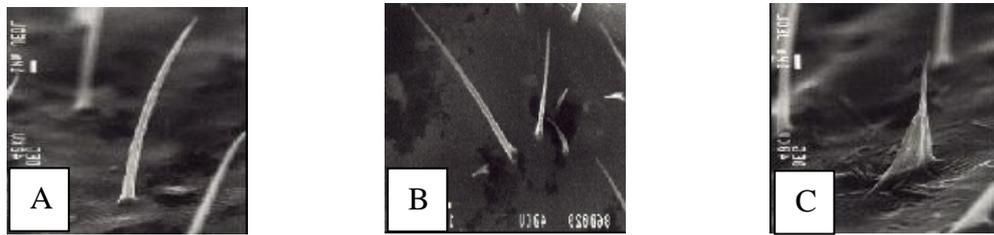
Em todos os experimentos, o solvente (água destilada) foi utilizado como controle negativo.

3.2 Teste para Detecção de Mutação e Recombinação Somática (SMART)

O SMART investiga a ocorrência de lesões em nível de DNA, por meio da análise e quantificação de pelos mutantes presentes nas asas de *D. melanogaster*. Essas alterações ocorrem nas células dos discos imaginais que, por sucessivas divisões mitóticas, darão origem às asas dos adultos de *D. melanogaster*, ocasionando a perda de heterozigose de dois genes marcadores para forma dos pelos presentes nas asas: os genes *mwh* e *flr*³ (GRAF *et al.*, 1984; ANDRADE; LEHMANN, 2003; ANDRADE *et al.*, 2004).

O gene selvagem origina um pelo por célula (Figura 3a). O gene *mwh* origina pelos múltiplos (Figura 3b) e o gene *flr*³, pelos geralmente com formato de chama de vela (Figura 3c), indicando a ocorrência de lesões mutacionais e/ou recombinacionais.

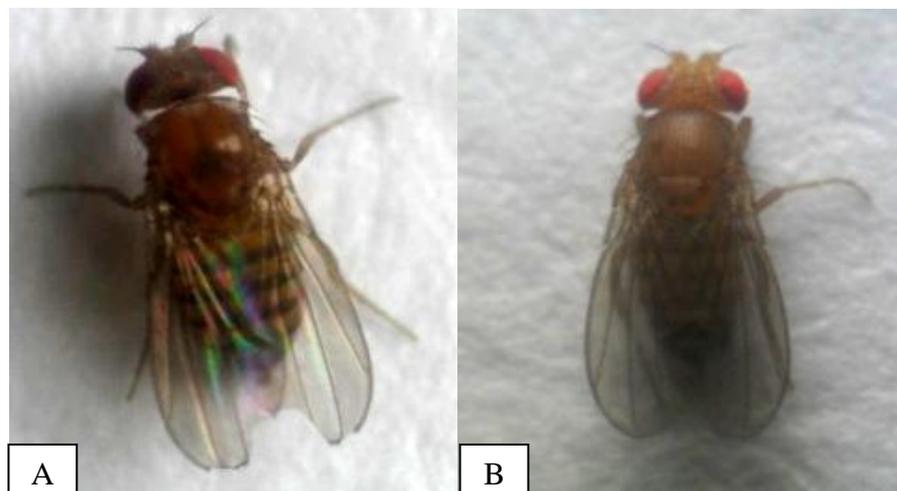
Figura 3 – Visualização em microscopia eletrônica dos fenótipos de: (A) pelo normal, (B) pelos múltiplos e (C) pelo *flare*



3.3 Linhagens teste de *Drosophila melanogaster*

No presente trabalho foram utilizadas as linhagens com as seguintes características genotípicas: (i) $flr^3 - flr^3/In(3LR)TM3,rip^p sep l(3)89Aa bx^{34e}$ (Figura 4a) e Bd^S e (ii) $mwh - mwh/mwh$ (Figura 4b). Essas linhagens são portadoras de genes marcadores específicos, localizados no braço esquerdo do cromossomo 3, que permitem monitorar eventos relacionados com mutação gênica, aberrações cromossômicas e recombinação mitótica (GRAF *et al.*, 1984).

Figura 4 – Linhagens teste de *D. melanogaster*: (A) flr^3 , (B) mwh



3.4 Procedimento experimental e tipos de larvas

Para a realização do SMART, larvas de 3º estágio oriundas do cruzamento padrão (ST – *standard cross*) entre 40 machos *mwh* e 80 fêmeas flr^3 , foram distribuídas em frascos contendo 0,9 g de meio sintético e 3 mL das soluções de tratamento e permaneceram até

atingirem o estágio de pupa (tratamento crônico). As larvas foram distribuídas em dois frascos de cada concentração, inclusive em frascos somente com água destilada (controle negativo). Em um dos frascos foram colocadas exatamente 100 larvas e os adultos sobreviventes foram contados para a determinação da curva de sobrevivência. Enquanto que, no outro frasco, foram colocadas aproximadamente 100 larvas e, todos os adultos que nasceram dos dois frascos de cada concentração, em 10-12 dias após a postura dos ovos, foram conservados em etanol 70% para posterior montagem das lâminas das asas e análise dos tricomas presentes. Por meio deste procedimento experimental, as células dos discos imaginais ficaram expostas às diferentes soluções de tratamento por 5 a 6 ciclos de divisão mitótica - o que corresponde a 95% de todas as divisões celulares que ocorrem desde o desenvolvimento do embrião até o início da pupação (FREI; WÜRGLER, 1988).

As larvas provenientes desse cruzamento deram origem a indivíduos adultos de duas constituições genótípicas: (i) MH – trans-heterozigotos ($mwh +/+ flr^3$) para os marcadores recessivos mwh e flr^3 , e (ii) BH - heterozigotos para o cromossomo balanceador TM3 ($mwh +/TM3, Bd^S$). O cromossomo TM3 é indispensável para manter a heterozigose do gene marcador $flare$ (flr^3) na linhagem parental e contém múltiplas inversões, tornando inviáveis os produtos de recombinação. Dessa forma, os indivíduos expressam somente mutações gênicas e aberrações cromossômicas. A relação entre o total de manchas da progênie trans-heterozigota e o total de manchas da progênie TM3 possibilita avaliar o potencial recombinôgenico dos compostos. O gene marcador Bd^S determina uma forma recortada das asas das moscas adultas, permitindo facilmente a sua diferenciação em relação ao genótipo trans-heterozigoto que determina forma normal, arredondada (GRAF *et al.*, 1984; ANDRADE; LEHMANN, 2003; ANDRADE *et al.*, 2004).

3.5 Montagem e análise microscópica das lâminas

Os adultos conservados em etanol 70% tiveram suas asas retiradas do corpo com o auxílio de duas pinças de relojoeiro (n. 5), e em seguida, embebidas em solução de Faure (30 g de goma arábica, 20 mL de glicerol, 50 mL de água e 50 mL de hidrato de cloral) para a montagem das lâminas com 5 pares de asas de fêmeas e 5 pares de asas de machos. Após ficarem na temperatura ambiente por 24 horas, foram colocados lamínulas (24x32 mm) e cubos de metal de aproximadamente 400 g para auxiliar na fixação das asas sobre a lâmina. Após 24 horas, o peso é retirado e a lamínula é fixada por uma base de esmalte para evitar o deslocamento da mesma durante a análise microscópica (ANDRADE *et al.*, 2004).

A superfície dorsal e ventral das asas dos adultos, contendo aproximadamente 24.400 pelos, foram analisadas em microscópio óptico de luz com aumento de 400x para a classificação e quantificação das manchas (ANDRADE; LEHMANN, 2003).

3.6 Bases genéticas e classificação dos clones

Os pelos mutantes ocorrem em manchas ou clones com fenótipos característicos. Nas manchas *mwh*, as células expressam pelos múltiplos, ou seja, três ou mais pelos em cada célula. Nas manchas *flr³*, os pelos mutantes *flr³* se expressam como pelos com a base alargada e com formato de chama de vela.

Essas manchas foram classificadas em: mancha simples (ocorrem somente fenótipos *mwh* ou *flr³*), originadas por mutação pontual, alteração cromossômica ou recombinação mitótica e manchas gêmeas (ocorrem os fenótipos *mwh* e *flr³* simultaneamente), indicando, exclusivamente, a ocorrência de recombinação mitótica. As manchas simples foram divididas em pequena (uma ou duas células mutantes) e grande (três ou mais células mutantes). São consideradas como manchas distintas, aquelas que são separadas por três ou mais pelos normais. O número total de clones induzidos em um grupo tratado fornece dados quantitativos sobre a atividade genotóxica do composto (ANDRADE *et al.*, 2004).

3.7 Análise estatística

A avaliação dos efeitos tóxico-genéticos foi realizada por meio da comparação entre a frequência de manchas mutantes dos grupos tratados e o controle negativo. O diagnóstico estatístico foi obtido através do teste binomial condicional de Kastenbaum e Bowman (1970), seguindo um procedimento de múltiplas escolhas proposto por Frei e Würzler (1988), testando as hipóteses: H_0 : não há diferença entre a frequência de mutação do grupo controle (frequência espontânea) e do grupo tratado; H_A : a frequência de mutações do grupo tratado é m vezes maior que a do grupo controle, visto que m é um fator de correção utilizado para minimizar a possibilidade de ocorrência de falso positivo, sendo $m=2$ para manchas simples pequena e total de manchas e $m=5$ para manchas simples grande e manchas gêmeas (devido a menor frequência) (FREI; WÜRGLER, 1988; GRAF *et al.*, 1984).

Dependendo da avaliação das hipóteses (aceita ou rejeitada), há quatro possíveis diagnósticos: positivo – aceita-se H_A e rejeita-se H_0 ; negativo – aceita-se H_0 e rejeita-se H_A ;

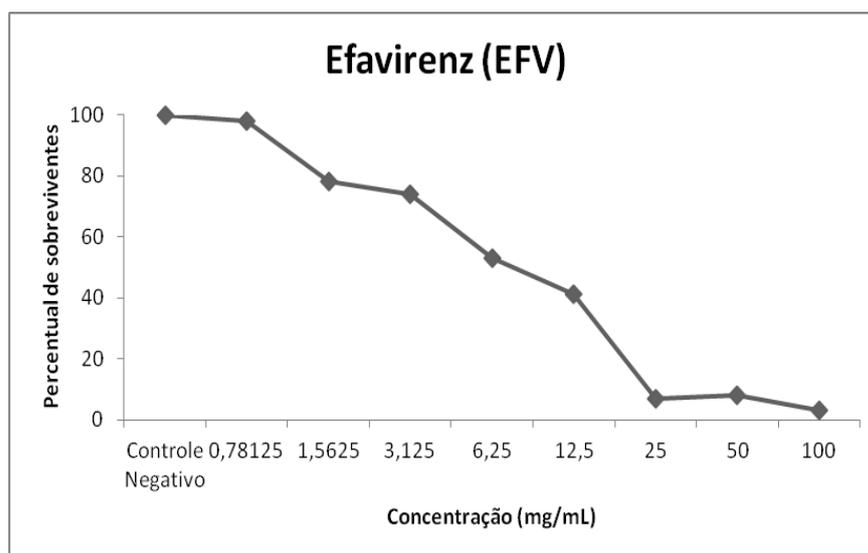
inconclusivo – aceita-se ambas hipóteses e fraco positivo – rejeita-se ambas hipóteses (ANDRADE; LEHMANN, 2003).

4 RESULTADOS

4.1 Efeito tóxico

Partiu-se de 100 mg/mL do EFV para realizar um experimento piloto a fim de determinar as concentrações que seriam utilizadas para análise de toxicidade genética. Para isso, grupos de 100 larvas foram distribuídos em tubos de tratamento com diferentes concentrações de cada composto onde permaneceram por 48 horas. Nas três maiores concentrações, o número de adultos nascidos foi menor do que 30% em relação ao controle (Gráfico 1) e na concentração de 12,5 mg/mL o número de machos não foi suficiente para montagem de lâminas. Portanto, para avaliar a toxicidade genética do EFV foram utilizadas as concentrações de 0,78125; 1,5625; 3,125 e 6,25 mg/mL.

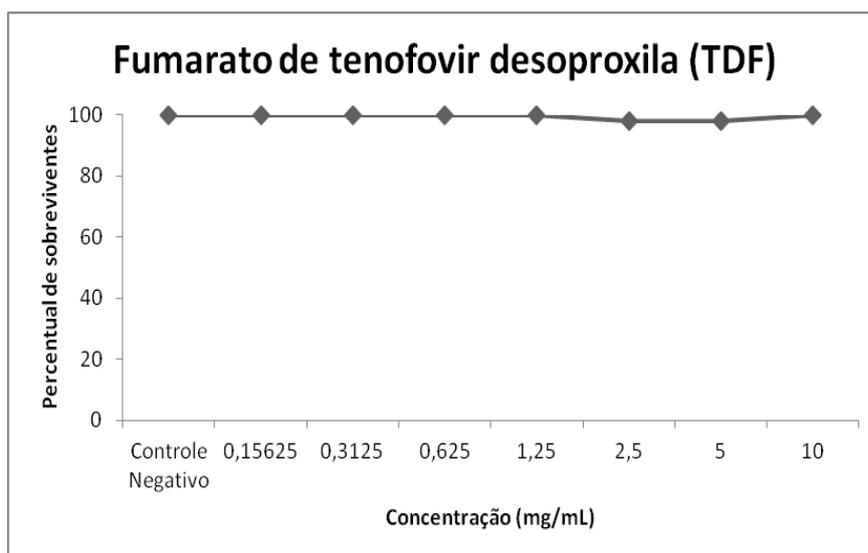
Gráfico 1 – Percentual de sobreviventes por concentração de EFV



O mesmo procedimento foi utilizado para obtenção das concentrações que seriam analisadas na avaliação da toxicidade genética do TDF. Porém, como a solubilidade máxima deste fármaco encontrada na literatura é de 13,4 mg/mL (<<http://dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/lookup.cfm?setid=33FD6418-FBDC-42CA-A50D->

CE2A476A5418#nlm34089-3>), para esses experimentos partiu-se de 10 mg/mL e diluiu-se as demais concentrações. Como o número de moscas adultas nascidas foi superior a 97% em todas as concentrações (Gráfico 2), para análise de toxicidade genética induzida pelo TDF foram utilizadas apenas as quatro maiores concentrações (1,25; 2,5; 5,0 e 10,0 mg/mL).

Gráfico 2 – Percentual de sobreviventes por concentração do TDF



4.2 Toxicidade genética

Para a análise dos resultados, a frequência de manchas mutantes de cada grupo tratado foi comparada com o seu respectivo controle negativo (água destilada). Os indivíduos trans-heterozigotos tratados com EFV não apresentaram aumento estatisticamente significativo ($P > 0,05$) nas frequências do total de manchas mutantes em relação ao controle negativo, indicando a ausência de efeitos tóxico genéticos (Tabela 1). Desta forma, as análises dos indivíduos do genótipo BH não foram necessárias.

A Tabela 2 apresenta os dados obtidos pela análise dos indivíduos tratados com TDF. Em todas as concentrações, o fármaco foi capaz de promover danos no DNA, indicados pelo aumento dose-resposta na frequência total de manchas mutantes nos indivíduos trans-heterozigotos, inferindo-se que o TDF é capaz de produzir toxicidade genética por indução de eventos mutacionais e/ou recombinacionais. Como a frequência de indução de manchas simples pequena foi maior em relação aos demais tipos de manchas, sugere-se que o composto tenha efeitos tardios, gerando danos genéticos somente nos últimos estágios do desenvolvimento larval (ANDRADE *et al.*, 2004).

A análise dos indivíduos heterozigotos para o cromossomo TM3 demonstrou que as frequências de indução de manchas são menores ou próximas aos valores encontrados no controle negativo, ou seja, não houve diferença significativa entre as séries tratadas e o controle negativo. Estes resultados caracterizam a ausência de indução de mutações causadas pelo TDF.

Em sequência, calculou-se o potencial recombinogênico do fármaco por meio da diferença entre o total de manchas da progênie MH e BH. Na maioria das concentrações a contribuição da recombinação no total de eventos tóxico-genéticos induzidos foi praticamente 100%, indicando que este é o principal evento induzido pelo fármaco. Os dados acima de 100% ocorrem porque na progênie BH o diagnóstico foi negativo e, ao utilizarmos a fórmula que faz a relação entre a frequência de manchas da progênie MH a com a progênie BH ($R = 1 - [(n/NC \text{ em indivíduos BH}) / (n/NC \text{ em indivíduos MH})] * 100$), resulta nesses valores.

TABELA 1

Avaliação dos efeitos mutagênicos e/ou recombinogênicos do efavirenz (EFV) em células somáticas de larvas de terceiro estágio provenientes de cruzamento padrão

Genótipo e Concentrações (mg.mL ⁻¹)	N. de indivíduos (N)	Manchas por indivíduo (no. de manchas) diag. estatístico ^a				Total manchas <i>mwh</i> ^c
		Manchas simples pequena (1-2 células) ^b m = 2	Manchas simples grande (> 2 células) ^b m = 5	Manchas gêmeas m = 5	Total de manchas m = 2	(n)
EFV						
<i>mwh/flr</i> ³						
Controle	60	0,50 (30)	0,07 (04)	0,02 (01)	0,58 (35)	35
Negativo	60	0,47 (28) -	0,07 (04) i	0,00 (00) i	0,53 (32) -	32
0,78125	60	0,47 (28) -	0,02 (01) -	0,00 (00) i	0,48 (29) -	29
1,5625	60	0,38 (23) -	0,08 (05) i	0,03 (02) i	0,50 (30) -	29
3,125	60	0,53 (32) -	0,03 (02) i	0,07 (04) i	0,63 (38) -	36
6,25	60					

^a Diagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würzler (1988): +, positivo; -, negativo; i, inconclusivo. *m*, fator de multiplicação para a avaliação de resultados significativamente negativos. Níveis de significância a = b = 0,05. ^b Incluindo manchas simples *flr*³ raras. ^c Considerando os clones *mwh* para as manchas simples *mwh* e para as manchas gêmeas.

TABELA 2

Avaliação dos efeitos mutagênicos e/ou recombinogênicos do fumarato de tenofovir desoproxila (TDF) em células somáticas de larvas provenientes do cruzamento padrão

Genótipos e Concentrações (mg.mL ⁻¹)	N. de indivíduos (N)	Manchas por indivíduo (no. de manchas) diag. estatístico ^a				Total manchas <i>mwh</i> ^c (n)	Frequencia de indução de manchas (por 10 ⁵ células por divisão celular) ^d n/NC ^e		Recombinação (%) ^g
		Manchas simples pequena (1-2 células) ^b m = 2	Manchas simples grande (> 2 células) ^b m = 5	Manchas gêmeas m = 5	Total de manchas m = 2		Observada	Corrigida pelo controle	
TDF									
<i>mwh/flr</i> ³									
Controle Negativo	40	0,55 (22)	0,05 (02)	0,10 (04)	0,70 (28)	28	1,43		
1,25	40	0,95 (38) +	0,10 (04) i	0,10 (04) i	1,15 (46) +	46	2,36	0,92	150
2,5	40	0,73 (29) i	0,35 (14) +	0,15 (06) i	1,23 (49) +	48	2,46	1,02	140,20
5	40	1,08 (43) +	0,48 (19) +	0,33 (13) +	1,88 (75) +	75	3,84	2,41	104,15
10	40	1,78 (71) +	1,03 (41) +	0,75 (30) +	3,55 (142) +	134	6,86	5,43	96,32
<i>mwh/TM3</i>									
Controle negativo	40	0,63 (25)	0,00 (00)		0,63 (25)	25	1,28		
1,25	40	0,38 (15) -	0,03 (01) i	f	0,40 (16) -	16	0,82	- 0,46	
2,5	40	0,43 (17) -	0,00 (00) i		0,43 (17) -	17	0,87	- 0,41	
5	40	0,53 (21) -	0,05 (02) i		0,58 (23) -	23	1,18	- 0,10	
10	40	0,65 (26) -	0,08 (03) i		0,73 (29) -	29	1,49	- 0,20	

^a Diagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würigler (1988): +, positivo; -, negativo; i, inconclusivo. *m*, fator de multiplicação para a avaliação de resultados significativamente negativos. Níveis de significância $\alpha = \beta = 0,05$.

^b Incluindo manchas simples *flr*³ raras. ^c Considerando os clones *mwh* para as manchas simples *mwh* e para as manchas gêmeas. ^d Calculado de acordo com Frei et al. (1992). ^e $C = 48.000$, isto é, número aproximado de células examinadas por indivíduo. ^f Apenas manchas simples *mwh* podem ser observadas nos indivíduos heterozigotos *mwh/TM3*, já que o cromossomo balanceador *TM3* não contém o gene mutante *flr*³. ^g Porcentagem de recombinação calculada de acordo com a fórmula $R = 1 - [(n/NC \text{ em indivíduos } mwh/TM3) / (n/NC \text{ em indivíduos } mwh/flr^3)] * 100$.

5 DISCUSSÃO

O bioensaio SMART, desenvolvido por Graf *et al.* (1984), é considerado um teste barato, rápido e confiável. O organismo teste, *D. melanogaster*, apresenta um ciclo de vida curto, pequeno número de cromossomos ($2n=8$) e linhagens geneticamente bem caracterizadas. Adicionalmente, os genes de *D. melanogaster* apresentam aproximadamente 80% de homologia aos genes humanos e o sistema enzimático relacionado ao citocromo P450 semelhante ao dos mamíferos, permitindo a análise de compostos que precisam ser metabolizados para causar efeitos tóxico-genéticos. Portanto, o SMART auxilia na detecção de compostos que causam danos ao DNA, incluindo a recombinação somática, uma das principais alterações genéticas relacionada à carcinogênese.

Além disso, a enzima desoxirribonucleosídeo quinase (Dm-dNK) de *D. melanogaster* que fosforila os quatro desoxirribonucleosídeos naturais, embora demonstre preferência por nucleosídeos de pirimidina, apresenta similaridades com enzimas de células de mamíferos, visto que, o nível mais elevado de semelhança no sequenciamento, foi com a enzima mitocondrial humana timidina quinase 2 com a qual compartilha muitos substratos (JOHANSSON *et al.*, 1999; MUNCH-PETERSEN *et al.*, 1998; SOLAROLI, 2003).

A avaliação da relação risco/benefício carcinogênico deve ser realizada sempre antes de prescrever um medicamento (BRAMBILLA *et al.*, 2011; BRAMBILLA *et al.*, 2012). Estudos de longo prazo sobre carcinogenicidade em animais demonstraram que o TDF pode causar adenomas hepáticos em camundongos fêmeas, quando administrado em altas doses. Também o EFV pode causar adenomas e carcinomas hepatocelulares e adenomas alveolares/bronquiolares pulmonares em camundongos fêmeas, mas não em camundongos machos (BRASIL, 2008; WU *et al.*, 2012). Neste trabalho, ao avaliar os efeitos mutagênicos e recombinogênicos do EFV e do TDF, os resultados apontaram que o EFV foi tóxico em concentrações maiores (50, 25 e 12,5 mg/mL) e não apresentou indução de eventos tóxico genéticos. Inversamente, o TDF não apresentou toxicidade, porém apresentou indução de eventos tóxico genéticos em todas as concentrações testadas.

Nossos resultados de toxicidade corroboram o estudo de Díaz e Delfín (2011), que verificaram que, em baixas concentrações (0,5 e 4 μ M) o EFV não foi significativamente citotóxico, mas a 20 μ M causou morte celular extensa. Contrariamente, os resultados de Adjene e Igbigbi (2010) sugerem que a administração do EFV por tempo prolongado apresentou efeitos tóxicos sobre células do colículo inferior de ratos Wistar observado por

meio da diminuição das células que pode ser consequência de morte celular induzida pelo fármaco.

Porém, apesar das baixas taxas de toxicidade de muitos dos esquemas antirretrovirais mais recentes, o acúmulo de efeitos ao longo de décadas de tratamento é desconhecido (RICHMAN *et al.*, 2009).

Bumpus (2011) incubou hepatócitos humanos com EFV e 8-hidroxi-efavirenz (8-OHEFV), metabólito principal do EFV. Os resultados apresentaram morte celular, ativação de caspases-3, formação de espécies reativas de oxigênio, estimulação da fosforilação da via de sinalização JNK e estimulou a expressão da isoforma proapoptótica da proteína Bim (bcl-2, mediador de morte celular). Os dados sugerem que o metabólito oxidativo 8-OHEFV é um indutor mais potente da morte celular hepática do que o composto original do EFV.

Em estudos de revisão sobre genotoxicidade e carcinogenicidade de diversos medicamentos de uso frequente e longa duração realizados por Brambilla *et al.* (2011) e Wu *et al.* (2012), o EFV não apresentou efeitos genotóxicos em testes *in vitro* (cultura de células) e *in vivo* (micronúcleo, por exemplo) efetuados com diversos organismos e células, tais como *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, células do ovário de hamster chinês, camundongos.. A ausência de efeitos tóxicos genéticos do EFV foi confirmada em nossos resultados com o teste SMART.

Brambilla *et al.* (2012) realizaram uma revisão sobre carcinogenicidade de medicamentos, pois segundo as orientações para testes de carcinogenicidade de produtos farmacêuticos um estudo de carcinogenicidade a curto, médio e longo prazo utilizando sistema *in vivo* deve ser realizada para todos os produtos farmacêuticos. Neste estudo, o EFV não apresentou efeitos carcinogênicos em nenhum dos testes, enquanto que, o tenofovir apresentou resultados positivos no ensaio de carcinogênese de longo prazo com camundongos fêmeas.

Segundo Brambilla *et al.* (2011), apesar de não apresentar genotoxicidade positiva em *S. typhimurim* e camundongos (micronúcleo), o tenofovir foi genotóxico em linhagem celular L5178Y de linfoma de camundongos. No estudo de revisão realizado por Wu *et al.* (2012) o tenofovir foi genotóxico para cultura de células, confirmando assim, os resultados encontrados neste trabalho, utilizando o teste SMART.

Em um levantamento feito por Friedrich e Olejniczak (2011) sobre os dados de carcinogenicidade de medicamentos para uso humano autorizados na Europa entre 1995 e 2009, usando como fonte de pesquisa, Relatórios Europeus de Avaliação Pública (EPARs, do

inglês *European Public Assessment Reports*), o Resumo das Características dos Medicamentos (SPCs - *Summary of Product Characteristics*) e o website da Agência Europeia de Medicamentos (EMA - *European Medicines Agency*), demonstrou que o EFV não foi relatado como um medicamento genotóxico e foi negativo para carcinogenicidade em ratos, porém foi carcinogênico para camundongos. Em contraste, o TDF foi relatado como genotóxico e carcinogênico para ratos e camundongos, sendo relacionado com lipoma, pólipos do útero, tumores duodenais e adenoma hepático em camundongos, apresentando, portanto, risco carcinogênico para humanos.

Então, torna-se fundamental analisar constantemente o custo-benefício de medicamentos isolados e identificar a atividade tóxica e tóxico-genética de cada fármaco com o intuito de assegurar qualidade de vida dos pacientes que fazem uso de monoterapias. Além disso, o estudo dos medicamentos isolados oferece suporte para que realizem investigações com as terapias combinadas (HAART).

6 CONCLUSÃO

Foi proposta deste trabalho a investigação do potencial tóxico e tóxico genético do TDF e do EFV por meio do SMART que avalia duas alterações genéticas relacionadas com a carcinogênese: a mutação e a recombinação somática. Concluiu-se que:

I) o EFV foi tóxico nas maiores concentrações, enquanto o TDF não apresentou toxicidade nas concentrações utilizadas;

II) o EFV não induziu efeito tóxico genético em nenhuma das concentrações, contrariamente ao TDF que induziu aumento na frequência total de manchas em todas as concentrações analisadas, prevalecendo a indução de recombinação mitótica sobre a mutação.

Este trabalho apresenta resultados sobre o delineamento tóxico e tóxico genético de dois antirretrovirais isolados e poderá contribuir para que se trace um panorama mais amplo no que se refere aos possíveis efeitos secundários produzidos pelas terapias combinadas (HAART) que fazem uso desses medicamentos.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. **Imunologia celular e molecular**. 4. ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2003.

ADJENE, J. O.; AJAKAYE, I. O.; NOSAKHARE, P. O. *Morphological effects of chronic efavirenz administration on the kidney of adult Wistar rats*. **Genomic Medicine, Biomarkers, and Health Sciences**, v. 3, p. 76-80, 2011.

ADJENE, J. O.; IGBIGBI, P. S. *Effects of Chronic Administration of Efavirenz on the Inferior Colliculus of Adult Wistar Rats*. **Fooyin J Health Sci**, v. 2, p. 105-8, 2010.

ANDRADE, H. H. R.; LEHMANN, M. Teste para detecção de mutação e recombinação somática (SMART) em *Drosophila melanogaster*. In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. **Mutagênese ambiental**. Canoas: Editora ULBRA, 2003. p. 281-307.

ANDRADE, H. H. R.; REGULY, M. L.; LEHMANN, M. *Drosophila Cytogenetics Protocols*. Edited by: D. S. Henderson. **Methods in Molecular Biology**, v. 247, p. 389-409 2004.

ANDREONE, P. *et al.* *High risk of hepatocellular carcinoma in anti-HBe positive liver cirrhosis patients developing lamivudine resistance*. **Journal of Viral Hepatitis**, v. 11, p. 439-442, 2004.

BISHOP, A. J. R.; SCHIESTL, R. H. *Role of homologous recombination in carcinogenesis*. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 74, p. 94-105, 2003.

BOSSI, P. *et al.* *Mutations in the human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase gene observed in stavudine and didanosine strains obtained by in vitro passages*. **Res Virol**. v. 149, p. 355-361, 1998.

BRAMBILLA, G. *et al.* *Studies on genotoxicity and carcinogenicity of antibacterial, antiviral, antimalarial and antifungal drugs*. **Mutagenesis**, p. 1-27, 2011.

BRAMBILLA, G. *et al.* *Update of carcinogenicity studies in animals and humans of 535 marketed pharmaceuticals*. **Mutation Research**, v. 750, p. 1-51, 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Departamento de Vigilância, Prevenção e Controle das IST, do HIV/Aids e das Hepatites Virais. Disponível em: <<http://www.aids.gov.br/pagina/aids-no-brasil>>. Acesso em: 04 jul. 2012a.

_____. Ministério da Saúde. Departamento de Vigilância, Prevenção e Controle das IST, do HIV/Aids e das Hepatites Virais. Disponível em: <<http://www.aids.gov.br/pagina/o-que-e-aids>>. Acesso em: 04 jul. 2012b.

_____. Ministério da Saúde. Departamento de Vigilância, Prevenção e Controle das IST, do HIV/Aids e das Hepatites Virais. Disponível em: <<http://www.aids.gov.br/pagina/quais-sao-os-antirretrovirais>>. Acesso em: 04 jul. 2012c.

_____. Ministério da Saúde. Departamento de Vigilância, Prevenção e Controle das IST, do HIV/Aids e das Hepatites Virais. Disponível em: <http://www.aids.gov.br/noticia/2012/brasil_renova_licenciamento_compulsorio_do_efavirenz>. Acesso em: 07 jul. 2012d.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Programa Nacional de DST e AIDS: Recomendações para Terapia Anti-retroviral em Adultos Infectados pelo HIV.** Brasília, 2008. 136 p.

BRENNER, B. G.; COUTSINOS, D. *The K65R mutation in HIV-1 reverse transcriptase: genetic barriers, resistance profile and clinical implications.* **HIV Ther.**, v. 6, n. 3, p. 583-94, 2009.

BUMPUS, N. N. *Efavirenz and 8-hydroxyefavirenz induce cell death via a JNK- and BimEL-dependent mechanism in primary human hepatocytes.* **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 257, p. 227-34, 2011.

CHEMFINDER. Disponível em:

<<http://www.chemfinder.com/chembiofinder/Forms/Search/ContentArea/ChemBioVizSearch.aspx?FormGroupId=8&AppName=CHEMBIOFINDER&AllowFullSearch=true&KeepRecordCountSynchronized=false&SearchCriteriaId=6&SearchCriteriaValue=efavirenz&CurrentIndex=0>>. Acesso em: 04 jul. 2012 (a)

_____. Disponível em:

<<http://www.chemfinder.com/chembiofinder/Forms/Search/ContentArea/ChemBioVizSearch.aspx?FormGroupId=8&AppName=CHEMBIOFINDER&AllowFullSearch=true&KeepRecordCountSynchronized=false&SearchCriteriaId=6&SearchCriteriaValue=tenofovir+disoproxil+fumarate&CurrentIndex=0>>. Acesso em: 04 jul. 2012 (b)

DE CLERCQ, E. *Pre-exposure chemoprophylaxis of HIV infection: Quo vadis?* **Biochemical Pharmacology**, v. 83, p. 567-73, 2012.

_____. *Anti-HIV drugs: 25 compounds approved within 25 years after the discovery of HIV.* **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 33, p. 307-20, 2009.

DE CLERCQ, E.; HOLY, A. *Acyclic nucleoside phosphonates: a key class of antiviral drugs.* **Nature Publishing Group**, v. 4, p. 928-40, 2005.

DELANEY, W. E. *et al. Intracellular metabolism and in vitro activity of tenofovir against hepatitis B virus.* **Antimicrob Agents Chemother.** v. 50, p. 2471-7, 2006.

DÍAZ-DELFIN, J. *et al. Effects of nevirapine and efavirenz on human adipocyte differentiation, gene expression, and release of adipokines and cytokines.* **Antiviral Research**, v. 91, p. 112-9, 2011. Disponível em:
<<http://dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/lookup.cfm?setid=33FD6418-FBDC-42CA-A50D-CE2A476A5418#nlm34089-3>>. Acesso em: 05 jan. 2012.

DUAN, C. *et al. Inhibition of Purified Recombinant Reverse Transcriptase from Wild-Type and Zidovudine-Resistant Clinical Isolates of Human Immunodeficiency Virus Type 1 by Zidovudine, Stavudine, and Lamivudine Triphosphates.* **The Journal of Infectious Diseases**, v. 184, p. 1336-40, 2001.

DUARTE-ROJO, A.; HEATHCOTE, E. J. *Efficacy and safety of tenofovir disoproxil fumarate in patients with chronic hepatitis B.* **Therapeutic Advances in Gastroenterology**. v. 3, n. 2, p. 107-19, 2010.

ELFOLK, M. *et al. Regulation of Human Vitamin D3 25-Hydroxylases in Dermal Fibroblasts and Prostate Cancer LNCaP Cells.* **Mol. Pharmacol.**, v. 75, p. 1392-9, 2009.

ENTESHAM, M. *et al. Mutations M184V and Y115F in HIV-1 Reverse Transcriptase Discriminate against "Nucleotide-competing Reverse Transcriptase Inhibitors".* **The Journal of Biological Chemistry**, v. 283, p. 29904-11, 2008.

FERREIRA, R. C. S.; RIFFEL, A.; SANT'ANA, A. E. G. HIV: mecanismo de replicação, alvos farmacológicos e inibição por produtos derivados de plantas. **Quím. Nova**, v. 33, n. 8, p. 1743-55, 2010.

FRANCHI, L. P. *et al.* Mutagenic and recombinagenic effects of lamivudine and stavudine antiretrovirals in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Food and Chemical Toxicology**, 2009.

FREI, H. *et al.* The genotoxicity of the anti-cancer drug mitoxantrone in somatic and germ cells of *Drosophila melanogaster*. **Mutation Research/Genetic Toxicology**, v. 279, p. 21-33 (1992).

FREI, H.; WURGLER, F. E. Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assay indicate a positive, negative, or inconclusive result. **Mutation Research**, v. 203, p. 297-308, 1988.

FRIEDRICH, A.; OLEJNICZAK, K. Evaluation of carcinogenicity studies of medicinal products for human use authorised via the European centralised procedure (1995–2009). **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 60, p. 225-48, 2011.

GOMEZ-SUCERQUIA, L. J. *et al.* Profile of stress and toxicity gene expression in human hepatic cells treated with Efavirenz. **Antiviral Research**, 2012.

GOODMAN; GILMAN. **As bases farmacológicas da terapêutica**. Revisão de conteúdo Almir Lourenço da Fonseca. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil, 2006.

GOUNDEN, V. *et al.* Presence of the CYP2B6 516G> T polymorphism, increased plasma Efavirenz concentrations and early neuropsychiatric side effects in South African HIV-infected patients. **AIDS Research and Therapy**, v. 7, 2010.

GRAF, U. *et al.* Somatic Mutation and Recombination Test in *Drosophila melanogaster*. **Environmental Mutagenesis**, v. 6, p. 153-88, 1984.

GRIGSBY, I. F. *et al.* Tenofovir treatment of primary osteoblasts alters gene expression profiles: implications for bone mineral density loss. **Biochem Biophys Res Commun**. v. 394, n. 1, p. 48-53, 2010a.

_____. Downregulation of *Gnas*, *Got2* and *Snord32a* following tenofovir exposure of primary osteoclasts. **Biochem Biophys Res Commun**. v. 391, n. 3, p. 1324-9, 2010b.

GUIMARÃES, N. N. *et al.* The genetic toxicity effects of lamivudine and stavudine antiretroviral agents. **Expert Opin. Drug Saf.**, v. 9, n. 4, p. 1-11, 2010.

GUIMARÃES, N. N. *et al.* Comparative Analysis of Genetic Toxicity of AZT and ddI Antiretrovirals in Somatic Cells of *Drosophila melanogaster*. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 49, p. 312-7, 2008.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. *Hallmarks of Cancer: The Next Generation*. **Cell**, v. 144, 2011.

_____. *The Hallmarks of Cancer*. **Cell**, v. 100, p. 57-70, 2000.

IYIDOGAN, P.; ANDERSON, K. S. *Understanding the molecular mechanism of sequence dependent Tenofovir removal by HIV-1 reverse transcriptase: Differences in primer binding site versus polypurine tract*. **Antiviral Research**, 2012.

JAMALUDDIN, M. S. *et al.* Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor efavirenz increases monolayer permeability of human coronary artery endothelial cells. **Atherosclerosis**, v. 208, p. 104-11, 2010.

JOHANSSON, M. *et al.* Cloning and Characterization of the Multisubstrate Deoxyribonucleoside Kinase of *Drosophila melanogaster*. **The Journal of biological chemistry**, v. 274, p. 23814-19, 1999.

JOHNSON, T. J. *et al.* Segmented polyurethane intravaginal rings for the sustained combined delivery of antiretroviral agents dapivirine and tenofovir. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 39, p. 203-12, 2010.

KASTENBAUM, M. A.; BOWMAN, K.O. *Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies*. **Mutation Research**, v. 9, p. 527-49, 1970.

LEE, H.; HANES, J; JOHNSON, K. A. *Toxicity of Nucleoside Analogues Used to Treat AIDS and the Selectivity of the Mitochondrial DNA Polymerase*. **Biochemistry**, v. 42, n. 50, p. 14712-9, 2003.

LISÓN, L. C. F.; PEREIRA, L. M. F.; CHALA, S. R. *Tasa de mutaciones genotípicas y resistencia a antirretrovirales en un hospital general*. **Farm Hosp.**, v. 35, n. 4, p. 191-6, 2011.

MIKLOS, G. L. G.; RUBIN, G. M. *The Role of the Genome Project Review in Determining Gene Function: Insights from Model Organisms*. **Cell**, v. 86, p. 521-9, 1996.

MUNCH-PETERSEN, B.; PISKUR, J.; SONDERGAAR, L. *Four Deoxynucleoside Kinase Activities from Drosophila melanogaster Are Contained within a Single Monomeric Enzyme, a New Multifunctional Deoxynucleoside Kinase. The Journal of Biological Chemistry*, v. 273, p. 3926-31, 1998.

OGBURN, E. T. *et al. Efavirenz Primary and Secondary Metabolism In Vitro and In Vivo: Identification of Novel Metabolic Pathways and Cytochrome P450 2A6 as the Principal Catalyst of Efavirenz 7-Hydroxylation. Drug metabolism and disposition*. v. 38, n. 7, p. 1218-29, 2010.

PARIKH, U. M. *et al. The K65R Mutation in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Reverse Transcriptase Exhibits Bidirectional Phenotypic Antagonism with Thymidine Analog Mutations. Journal of virology*, v. 80, p. 4971-7, 2006.

PEÇANHA, E. P.; ANTUNES, O. A.; TANURI, A. Estratégias farmacológicas para a terapia anti-AIDS. *Química Nova*, v. 25, n. 6B, p. 1108-16, 2002.

PETER, K.; GAMBERTOGLIO, J. G. *Intracellular phosphorylation of zidovudine (ZVD) and other nucleoside reverse transcriptase inhibitors (RTI) used for human immunodeficiency virus (HIV) infection. Pharmaceutical Research*, v. 15, n. 6, p. 819-25, 1998.

PINEDA, J. A. *et al. Hepatic safety of efavirenz in HIV/hepatitis C virus-coinfected patients with advanced liver fibrosis. Journal of Infection*, v. 64, p. 204-11, 2012.

RAJU, N. A.; BEGON, S. *Simultaneous RP-HPLC Method for the Estimation of the Emtricitabine, Tenofovir Disoproxil Fumarate and Efavirenz in Tablet Dosage Forms. Research J. Pharm. and Tech.* v. 4, n.1, p. 522-5, 2008.

RAKHMANINA, N. Y.; ANKER, J. N. *Efavirenz in the Therapy of HIV Infection. Expert Opin Drug Metab Toxicol.* v. 6, p. 95-103, 2010.

RE, M. C. *et al. Mutation patterns of the reverse transcriptase genes in HIV-1 infected patients receiving combinations of nucleoside and non nucleoside inhibitors. International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 22, p. 388-94, 2003.

RERKS-NGARM, S. *et al. Vaccination with ALVAC and AIDSVAX to Prevent HIV-1 Infection in Thailand. N Engl J Med*, v. 361, p. 2209-20, 2009.

RIBEIRO, L. R.; MARQUES, E. K. A importância da mutagênese ambiental na carcinogênese humana. In: **Mutagênese Ambiental**. Canoas: ULBRA, 2003. p. 21-7.

ISBN: 978-85-68122-17-4

RICHMAN, D. D. *et al.* *The Challenge of Finding a Cure for HIV Infection.* **Science**, v. 323, p. 1304-7, 2009.

SOLAROLI, N. *et al.* *Active site mutants of Drosophila melanogaster multisubstrate deoxyribonucleoside kinase.* **Eur. J. Biochem.**, v. 270, p. 2879-84, 2003.

ST. JOHN, M. A. R.; XU, T. *INSIGHTS FROM MODEL SYSTEMS - Understanding Human Cancer in a Fly?* **Am. J. Hum. Genet.**, v. 61, p. 1006-10, 1997.

Sustiva® Prescribing Information. Bristol-Myers Squibb Company. March (2009). Disponível em: <http://packageinserts.bms.com/pi/pi_sustiva.pdf>. Acesso em: 04 jul. 2012.

TURNER, D.; BRENNER, B.; WAINBERG, M. A. *Relationships among various nucleoside resistance-conferring mutations in the reverse transcriptase of HIV-1.* **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 53, p. 53-7, 2004.

VRIES-SLUIJS, T. E. M. S. de *et al.* *Long-term Therapy With Tenofovir Is Effective for Patients Co-Infected With Human Immunodeficiency Virus and Hepatitis B Virus.* **Gastroenterology**, v. 139, p. 1934-41, 2010.

WALKER, D. M. *et al.* *WR1065 Mitigates AZT-ddI-Induced Mutagenesis and Inhibits Viral Replication.* **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 50, p. 460-72, 2009.

WINSTON, A. *et al.* *Minor changes in calculated creatinine clearance and anion-gap are associated with tenofovir disoproxil fumarate-containing highly active antiretroviral therapy.* **HIV Medicine**, v. 7, p. 105-11, 2010.

WU, K. M.; POWLEY, M. W.; GHANTOUS, H. *Timing of carcinogenicity studies and predictability of genotoxicity for tumorigenicity in anti-HIV drug development.* **International Journal of Toxicology**, v. 31, n. 3, p. 211-21, 2012.