

DR. AROLDO VIEIRA DE MORAES FILHO

EDITORA  
ALFREDO  
NASSER



FACULDADE  
ALFREDO NASSER

# A GENOTOXICIDADE DOS MEDICAMENTOS ANTIRRETROVIRAIS:

UM ESTUDO SOBRE OS COQUETÉIS ANTI-AIDS



Aroldo Vieira de Moraes Filho é professor da Faculdade Alfredo Nasser, coordenador e professor da 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).

Neste livro, proveniente da minha tese, dando continuidade ao volume anterior, produto da minha dissertação, no qual pesquisei as monoterapias, analiso os medicamentos antirretrovirais em combinação, conforme são utilizados na clínica. Os medicamentos foram testados em *Drosophila melanogaster* e camundongos para verificar a segurança destes.

Moraes Filho, Aroldo Vieira de

A Genotoxicidade dos medicamentos antirretrovirais: um estudo sobre os coquetéis anti-Aids. / Aroldo Vieira de Moraes Filho. - / Aparecida de Goiânia: Faculdade Alfredo Nasser, 2019.

ISBN: 978-85-68122-16-7.

57 páginas. Inclui Bibliografia.

1. Genotoxicidade. 2. AIDS 3. Medicamento. 4. Síndrome da Imunodeficiência Adquirida. 5. Vírus HIV. 6. 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<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. 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:  
um estudo sobre os coquetéis anti-AIDS**

**Aparecida de Goiânia**

**2019**

ISBN: 978-85-68122-16-7

## PREFÁCIO

Em decorrência das diversas mutações do HIV e consequentes falhas nos tratamentos com apenas um fármaco, tornou-se fundamental o emprego de combinações de dois ou mais medicamentos antirretrovirais em protocolos de tratamento da AIDS. Diante disso, as investigações realizadas neste trabalho concentraram-se na avaliação dos efeitos relacionados com a citotoxicidade e a genotoxicidade dos medicamentos Efavirenz (EFV) e Tenofovir (TDF) como medicamentos isolados e em combinação com Combivir<sup>®</sup> (AZT+3TC) e Lamivudina (3TC). Para isso, foram utilizados três sistemas-teste: (i) Ensaio Cometa em *Drosophila* e medula óssea de camundongos, visando a determinação da ação genotóxica dos medicamentos testados por meio de quebras na fita de DNA; (ii) Teste para Detecção de Mutação e Recombinação Somática (SMART) em *Drosophila melanogaster*, que avalia a atividade tóxica, mutagênica e recombinogênica dos compostos e (iii) Teste de Micronúcleo (MN) em medula óssea de camundongos que detecta o efeito aneugênico e clastogênico dos agentes. Os resultados demonstraram que o EFV foi tóxico nas maiores concentrações testadas e não apresentou indução de eventos mutagênicos e/ou recombinogênicos. Inversamente, Combivir e Combivir+EFV não atingiram dose letal 70 (DL 70) nas concentrações utilizadas para análise genotóxica, porém induziram efeitos mutagênicos e/ou recombinogênicos em todas as concentrações testadas, com prevalência de eventos recombinogênicos. Os antirretrovirais TDF, 3TC e TDF+3TC também não foram tóxicos, mas foram genotóxicos em todas as concentrações testadas, com prevalência de recombinogenicidade. Todos os compostos isolados e combinados apresentaram resultados positivos no Ensaio Cometa com *Drosophila melanogaster*. No entanto, as combinações Combivir+EFV e TDF+3TC foram negativas no Ensaio Cometa com medula óssea de camundongos. Combivir+EFV induziu MN em 24 e 48h. TDF+3TC induziu MN apenas no tratamento de 24h. Com base nesses resultados, espera-se ampliar o conhecimento a respeito da atividade tóxica e genotóxica dessas combinações e servir de apoio para o desenvolvimento de novos estudos nos protocolos de tratamento da AIDS.

Os resultados na íntegra deste livro foram publicados em dois artigos por mim e os colaboradores: “In vivo genotoxicity evaluation of efavirenz (EFV) and tenofovir disoproxil fumarate (TDF) alone and in their clinical combinations in *Drosophila melanogaster*” publicado na revista *mutation research-genetic toxicology and environmental mutagenesis*, v. 820, p. 31-38, 2017 e “Genotoxic and Cytotoxic Effects of Antiretroviral Combinations in Mice Bone Marrow” publicado na revista *Plos One*, v. 11, p. e0165706, 2016.

Tais resultados são oriundos da Tese de Doutorado em Ciências Biológicas – área de concentração: bioquímica e genética na Universidade Federal de Goiás, sob a orientação e parceria da Profa. Dra. Lee Chen Chen e da Profa. Dra. Kênya Silva Cunha que fizeram parte da construção dessa pesquisa.

## SUMÁRIO

|                                                                                          |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO À AVALIAÇÃO GENOTÓXICA DOS COQUETÉIS ANTI-AIDS</b> .....      | 10 |
| <b>1.1 Medicamentos antirretrovirais</b> .....                                           | 10 |
| <b>1.2 Terapia antirretroviral altamente ativa (HAART)</b> .....                         | 14 |
| <b>1.3 Organismos modelo: <i>Drosophila melanogaster</i> e <i>Mus musculus</i></b> ..... | 15 |
| <b>1.4 Genética toxicológica e testes utilizados</b> .....                               | 17 |
| <b>1.5 Objetivos</b> .....                                                               | 19 |
| 1.5.1 Geral .....                                                                        | 19 |
| 1.5.2 Específicos .....                                                                  | 19 |
| <b>CAPÍTULO II - MATERIAL E MÉTODOS</b> .....                                            | 21 |
| <b>2.1 Agentes antirretrovirais</b> .....                                                | 21 |
| <b>2.2 Testes com <i>Drosophila melanogaster</i></b> .....                               | 22 |
| 2.2.1. Teste para detecção de mutação e recombinação somática (SMART) .....              | 22 |
| 2.2.1.1 Linhagens teste de <i>Drosophila melanogaster</i> .....                          | 23 |
| 2.2.1.2 Procedimento experimental e tipos de larvas .....                                | 24 |
| 2.2.1.3 Montagem e análise microscópica das lâminas .....                                | 24 |
| 2.2.1.4 Bases genéticas e classificação dos clones .....                                 | 25 |
| 2.2.1.5 Análise estatística .....                                                        | 25 |
| 2.2.1.6 Cálculo do Índice de Combinação (IC) .....                                       | 26 |
| 2.2.2. Ensaio Cometa com <i>Drosophila melanogaster</i> .....                            | 26 |
| 2.2.2.1 Linhagem teste .....                                                             | 26 |
| 2.2.2.2 Extração da hemolinfa .....                                                      | 27 |
| 2.2.2.3 Preparo das lâminas e eletroforese .....                                         | 27 |
| 2.2.2.4 Análise microscópica .....                                                       | 28 |
| 2.2.2.5 Análise estatística .....                                                        | 29 |
| 2.2.2.6 Cálculo do Índice de Combinação .....                                            | 29 |
| <b>2.3 Testes com camundongos <i>Mus musculus</i></b> .....                              | 30 |
| 2.3.1 Ensaio Cometa com medula óssea .....                                               | 31 |
| 2.3.2 Teste do Micronúcleo .....                                                         | 32 |
| <b>CAPÍTULO III – DISCUSSÃO</b> .....                                                    | 35 |
| <b>CONCLUSÃO</b> .....                                                                   | 42 |



**REFERÊNCIAS** ..... 43

# CAPÍTULO I

## INTRODUÇÃO À AVALIAÇÃO GENOTÓXICA DOS COQUETÉIS ANTI-AIDS

### 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<sup>+</sup>, facilitando o contágio de “doenças oportunistas”, que variam desde resfriados até infecções mais graves (BRASIL, 2016a).

Segundo o Programa Conjunto das Nações Unidas sobre HIV/AIDS (UNAIDS), no mundo, aproximadamente 34 milhões de pessoas vivem com HIV. No Brasil, desde a detecção da doença em 1980 até junho de 2012 foram registrados 656.701 casos de AIDS, de acordo com o último boletim epidemiológico do Ministério da Saúde. Em 2011, foram notificados 38.776 casos e a taxa de incidência de AIDS no Brasil foi de 20,2 casos por 100 mil habitantes (BRASIL, 2016a, 2016b; UNAIDS, 2016).

Em 1982, dois anos após a identificação da AIDS como doença, iniciou-se uma busca intensa por compostos que inibissem a infectividade e replicação do vírus. Portanto, pesquisas científicas focaram nas etapas do ciclo de replicação do vírus para servirem como alvos para intervenção farmacológica no intuito de inibir essas etapas e, por conseguinte, tornarem-se eficazes no tratamento da doença (PEÇANHA *et al.*, 2002; DECLERCQ, 2009; TINTORI *et al.*, 2014).

A partir desses estudos, surgiram os medicamentos antirretrovirais usados 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, 2016c).

Portanto, de acordo com o alvo de sua interação no ciclo replicativo do HIV, os medicamentos antirretrovirais são divididos em diferentes categorias. Essas categorias são: (i) os inibidores de proteases (IPs) que atuam nessa enzima, bloqueando a 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 dessa

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 (TR), 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 (DECLERCQ, 2009).

No final de 2012, cerca de 9,7 milhões de pessoas no mundo tiveram acesso à terapia antirretroviral (UNAIDS, 2016b). Segundo dados do Ministério da Saúde, no Brasil, cerca de 313 mil pessoas recebem regularmente os remédios para tratar a doença. Desde 1996, o país distribui gratuitamente o coquetel anti-AIDS para todos que necessitam do tratamento (BRASIL, 2016c).

O primeiro composto que demonstrou capacidade 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 (3'-azido-3'-desoxitimidina; AZT). Esse antirretroviral pertence a classe dos NRTIs e sua metabolização no fígado ocorre por enzimas da via UDP-glicoronosiltransferase (UGT), excretando seu metabólito 5'-O-glicuronídeo na urina (CRETTON *et al.*, 2007; DECLERCQ, 2009).

Quando administrado por via oral, a solução de AZT nas doses de 2 a 10 mg/kg apresentou uma biodisponibilidade de aproximadamente 65% (CLOAD, 1989). Após sua entrada na célula, o AZT é fosforilado à sua forma ativa AZT-5'-trifosfato, que agirá como inibidor competitivo ou substrato alternativo da TR ao invés do desoxinucleosídeo trifosfato endógeno (dNTP). Por ser análogo da timidina-5'-trifosfato, o AZT competirá como o dTTP e agirá como terminador da cadeia de DNA (BARBIER *et al.*, 2000; DECLERCQ, 2009).

Outro NRTI muito utilizado no tratamento da AIDS é a lamivudina (3TC), também denominada de enantiômero negativo da 2'-desoxi-3'-tiacitidina. Sua fosforilação em 3TC monofosfato é catalisada pela enzima desoxicitidina quinase. Em seguida sua conversão da forma monofosfato em difosfato é realizada pelas enzimas citidina monofosfato quinase e desoxicitidina monofosfato quinase. Seu metabólito ativo (3TC-5'-trifosfato) é convertido pela enzima pirimidina nucleosídeo difosfato quinase que, por ser análogo da citidina, competirá com dCTP e será incorporado ao DNA viral, ocasionando o término do alongamento da cadeia. Quando administrado por via oral, sua disponibilidade média absoluta

variou entre 86 a 88% para solução oral, cápsula e comprimido (YUEN *et al.*, 1995; JOHANSON *et al.*, 1999; DECLERCQ, 2009).

Pertencente a classe NNRTIs dos antirretrovirais, o efavirenz (EFV) ou (4S)-6-cloro-4-(ciclopropiletinil)-1, 4-dihidro-4-(trifluorometil) 2-H-3, 1-benzoxazina 2-1 (RAJU; BEGON, 2008), destaca-se por ser 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 (RAKHMANNINA; ANKER, 2010). Diferentemente dos NRTIs, seu mecanismo de ação consiste na inibição alostérica da TR, por meio da ligação a um local diferente do sítio ativo dessa enzima, com a finalidade de alterar a sua configuração e, conseqüentemente, anular a sua capacidade catalítica. São moléculas não competitivas em relação a desoxirribonucleotídeos fosfatados (dNTPs) e, portanto, não tem qualquer efeito direto sobre o ácido nucleico de ligação à TR (IYIDOGAN; ANDERSON, 2012).

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-hidroxiefavirenz e 7-hidroxiefavirenz. O 8-hidroxiefavirenz é o principal metabólito do EFV *in vitro* e *in vivo*, e a contribuição de 7-hidroxilação à depuração total de EFV é considerada pequena. Estudos recentes sugerem que o CYP2A6 é o principal responsável pela 7-hidroxilação e catalisa a segunda etapa de hidroxilação do 8-hidroximetabólito para 8,14-dihidroxiefavirenz. Estima-se que aproximadamente 17% de 8-hidroxiefavirenz é ainda oxidado a 8,14-dihidroxiefavirenz *in vitro*. Os metabólitos hidroxilados de EFV sofrem excreção biliar e urinária subsequente após conjugação (OGBURN *et al.*, 2010; GOUNDEN *et al.*, 2010). Essa droga quando administrada por via oral apresenta uma disponibilidade variável entre 40 e 45% (CHIAPPETTA *et al.*, 2015).

Também muito utilizado nas terapias antirretrovirais, fumarato de tenofovir desoproxila (TDF) ou 9-((R)-2-((Bis (((isopropoxicarbonil)oxi) metoxi) fosfonil) metoxi) propil) adenina fumarato que é o pró-fármaco oral de tenofovir, com atividade antiviral contra

o vírus da hepatite B (HBV) e o HIV (RAJU; BEGON, 2008). O TDF é um NtRTI, análogo da 5'-monofosfato de adenosina, que não apresenta uma hidroxila no carbono 3 da desoxirribose. Portanto, uma incorporação de TDF no alongamento do DNA viral interrompe a sequência da transcrição, impedindo a ligação do próximo nucleotídeo (JOHNSON *et al.*, 2010). Essa classe de antirretrovirais 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 TR do HIV-1. Esses análogos competem com os substratos naturais, os desoxiribonucleosídeos trifosfatos (dNTP) e interrompem a formação da cadeia de DNA viral após a sua incorporação (IYIDOGAN; ANDERSON, 2012).

O TDF possui um perfil de citotoxicidade favorável, por ser um inibidor muito fraco das DNA polimerases  $\alpha$  e  $\beta$  em mamíferos e DNA polimerase mitocondrial  $\gamma$  (LEE *et al.*, 2003; DECLERCQ; HOLLY, 2005; DELANEY *et al.*, 2006). Quando administrado por via oral, sua biodisponibilidade é de aproximadamente 25% (GALLANT; DERESINSKI, 2003).

No entanto, em alguns estudos com estes fármacos isolados foram relatados vários efeitos colaterais relacionados com genotoxicidade, mutagenicidade e carcinogenicidade. O TDF e o EFV foram capazes de induzir adenomas e carcinomas hepatocelulares e adenomas pulmonares alveolar/bronquiolar em camundongos fêmeas. A AZT mostrou efeitos clastogênicos, danos ao DNA nuclear e mitocondrial, troca de cromátides irmãs e redução dos telômeros. O 3TC mostrou efeitos clastogênicos com indução de micronúcleos (GONZALES CID; LARRIPA, 1994; SCHILLING *et al.*, 1995; BIALKOWSKA *et al.*, 2000; BISHOP *et al.*, 2004; VON TUNGELN *et al.*, 2004; JI *et al.*, 2005; CARTER *et al.*, 2007; BAYRAM; TOPAKTAS, 2008; OLIVERO *et al.*, 2008; DESAI *et al.*, 2009; LOURENÇO *et al.*, 2010; BUTT *et al.*, 2011; FRIEDRICH; OLEJNICZAK, 2011; WU *et al.*, 2012; ANDRÉ-SCHMUTZ *et al.*, 2013; OLIVERO *et al.*, 2013; CHIAPPINI *et al.*, 2014; MILLER *et al.*, 2014, KAUSHIK *et al.*, 2014).

Porém, em decorrência das diversas mutações do HIV e consequentes falhas nos tratamentos com apenas um fármaco, tornou-se fundamental a necessidade de combinar dois ou mais medicamentos antirretrovirais para a realização de protocolos de tratamento da AIDS (BOSSI *et al.*, 1998; DUAN *et al.*, 2001; RE *et al.*, 2003; TURNER *et al.*, 2004; PARIKH *et al.*, 2006; ENTHESHAMI *et al.*, 2008; WALKER *et al.*, 2009). Somado ao fato de que 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). Portanto, 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 Terapia antirretroviral altamente ativa (HAART)

As terapias que combinam dois ou mais medicamentos pertencentes à mesma classe ou a diferentes classes de antirretrovirais, também conhecidas como terapia antirretroviral altamente ativa (HAART, do inglês *Highly Active Antiretroviral Therapy*), favoreceram o tratamento da AIDS que, devido ao sucesso da supressão viral, da reconstituição imunológica do hospedeiro e, conseqüentemente, da prevenção de doenças oportunistas, fez com que essa doença passasse a ser considerada como uma doença crônica controlável, melhorando a qualidade e aumentando a expectativa de vida dos pacientes (HAWKINS, 2010).

No entanto, apesar da HAART ser utilizada desde 1990, faz-se necessários estudos que visem correlacionar eficácia e efeitos colaterais no intuito de oferecer protocolos alternativos que combatam a virulência, mas que diminuam a toxicidade e a resistência viral ao tratamento (BROWN *et al.*, 2009; DECLERCQ, 2009).

Comumente, diretrizes para o tratamento da infecção por HIV, por meio da utilização da HAART, incluem as combinações de medicamentos: TDF+3TC e EFV+Combivir (AZT+3TC) (GALLANT *et al.*, 2006; POZNIAK. *et al.*, 2006; HERD *et al.*, 2014; *GUIDELINES...*, 2015). Todavia, estas combinações podem potencializar os efeitos genotóxicos induzidos por essas drogas isoladas, uma vez que seus efeitos secundários são desconhecidos durante o tratamento (GUIMARÃES, 2013; GUIMARÃES *et al.*, 2013).

Por isso, tem-se analisado vários antirretrovirais que demonstraram ou não a indução de recombinação mitótica, utilizando o Teste para Detecção de Mutação e Recombinação Somática (SMART). Em estudo realizado em nosso laboratório foi demonstrado que, no total de eventos mutagênicos e/ou recombinogênicos 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. Moraes Filho (2013) comprovou a indução de recombinação mitótica

no DNA causadas pelo fumarato de tenofovir desoproxila (TDF) e a ausência de efeitos mutagênicos e/ou recombinogênicos induzidos pelo efavirez (EFV) quando testados isoladamente. Adicionalmente, Guimarães *et al.* (2013) demonstraram que NRTIs isolados são mutagênicos e/ou recombinogênicos e, quando combinados, podem ter potencial sinérgico, aditivo ou antagônico para a indução de mutação e/ou recombinação. Considerando que a AIDS é uma doença crônica de alta incidência, a ampliação dos estudos sobre os efeitos genotóxicos causados pelos medicamentos antirretrovirais, tornam-se fundamental para garantir a segurança dos pacientes que utilizam esses medicamentos (GUIMARÃES *et al.*, 2010).

Adicionalmente, na tentativa de amenizar a virulência do HIV/AIDS houve rápido licenciamento dos antirretrovirais e, conseqüentemente, rápido aumento das possibilidades de terapias combinadas. No entanto, há pouco conhecimento sobre a segurança desses fármacos a longo prazo, evidenciando assim, a importância do constante monitoramento dessas terapias (CARR; COOPER, 2000). Portanto, com base nesses dados, deve-se aumentar a atenção em relação à toxicidade da HAART.

### **1.3 Organismos modelo: *Drosophila melanogaster* e *Mus musculus***

O inseto *D. melanogaster* é um organismo eucarioto, diploide, com um total de quatro pares de cromossomos, sendo três deles portadores da maior parte do genoma. Essa espécie vem sendo utilizada em estudos da área de Genética desde o início do século XX, em estudos de genética mendeliana, seleção natural e teoria cromossômica da herança. Desde então, esse inseto passou a ser utilizado para diversos outros estudos da área incluindo transmissão de caracteres hereditários, interação gênica, aberrações cromossômicas, evolução, entre outros (FREIRE-MAIA; PAVAN, 1949; FONSECA; PEREIRA, 2004).

Apesar da *Drosophila melanogaster* possuir aproximadamente 17.000 genes a menos que os humanos, ambas espécies apresentam similaridades genéticas, bioquímicas e fisiológicas. As rotas bioquímicas e funções regulatórias entre as duas espécies são muito conservadas e, vários genes estudados na *D. melanogaster* provaram ser homólogos aos genes supressores de tumor e oncogenes humanos. Cerca de 75% dos genes relacionados a doenças humanas, entre eles os relacionados a regulação do ciclo celular, são homólogos aos da mosca-da-fruta (MIKLOS; RUBIN, 1996; ST. JOHN; XU, 1997; BIER, 2005; LLOYD; TAYLOR, 2010; PANDEY; NICHOLS, 2011).

Além desses genes, fatores transcricionais e seus reguladores, proteínas cromossomais, estruturais e sinalizadoras, canais iônicos, genes homeobox e a enzima desoxirribonucleosídeo quinase (Dm-dNK) apresentaram semelhanças entre *Drosophila* e mamíferos (JOHANSSON *et al.*, 1999). Portanto, devido a tanta similaridade, destaca-se a relevância de estudos que utilizam esse organismo modelo para o esclarecimento de problemas de saúde humana, inclusive ciclo celular e câncer. Além disso, existem várias linhagens de *Drosophila* com marcadores moleculares e propriedades diversas que auxiliam as manipulações genéticas e são bem conhecidas cientificamente (KORNBERG; KRASNOW, 2000).

Por esses motivos, a *D. melanogaster* é amplamente empregada como organismo modelo nas diversas áreas, destacando-se genética, biologia molecular, fisiologia, comportamento, desenvolvimento e ecologia. Dentre as diversas áreas, essa espécie tem sido utilizada constantemente em testes de genotoxicidade, pois acrescenta-se a essas vantagens acumuladas sobre o seu genoma, o rápido ciclo de vida, a fácil manipulação laboratorial e a capacidade de realizar algumas ativações metabólicas semelhantes às que acontecem em mamíferos (SOBELS; VOGEL, 1976; ADAMS *et al.*, 2000; LENZ *et al.*, 2013).

Além de participar de estudos para a detecção de agentes genotóxicos e antigenotóxicos, a *Drosophila* tornou-se um excelente modelo em estudos dos 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).

As linhagens mutantes de *Drosophila* são bem caracterizadas e possuem uma variedade de marcadores que permitiram a criação de vários sistemas-teste. Estes ensaios são capazes de detectar os mais variados tipos de eventos genéticos, como mutações gênicas, aberrações cromossômicas e recombinação mitótica (GRAF *et al.*, 1984; ANDRADE; LEHMANN, 2003; ANDRADE *et al.*, 2004).

Complementarmente, o Centro Europeu de Validação de Métodos Alternativos, indica a utilização desse organismo para minimizar questões bioéticas quanto ao uso de mamíferos em testes toxicológicos (FESTING *et al.*, 1998; BENFORD *et al.*, 2000; SIDDIQUE *et al.*, 2005).

Apesar de existirem métodos alternativos *in vitro*, os modelos animais são amplamente utilizados porque apresentam a vantagem de fornecer informações do organismo como um todo. Dentre esses animais, além da *D. melanogaster*, o camundongo da espécie *Mus*



*musculus* é um dos organismos mais utilizados, este apresenta 20 pares de cromossomos e um grande número de mutantes geneticamente conhecidos (CHORILLI *et al.*, 2007).

De acordo com Santos (2002), além das similaridades genéticas com humanos, o camundongo destaca-se como organismo modelo pelo curto período de gestação, por ser muito prolífero e pela fácil domesticação e manutenção devido ao seu tamanho.

Geneticamente, existe uma grande semelhança entre camundongos e humanos, pois 99% dos genes humanos foram mapeados em camundongos. Dessa maneira, esses animais são utilizados constantemente em pesquisas que buscam a cura de doenças, o desenvolvimento de novos produtos, vacinas, medicamentos ou cosméticos e em estudos de carcinogenicidade (CHORILLI *et al.*, 2007).

Ainda, segundo Carvalho e Lopes (2006), os mecanismos fisiológicos dos camundongos e dos humanos são próximos e, por ser possível inativar genes específicos, é interessante o emprego desse organismo modelo em pesquisas, pois a possibilidade de utilizar diversas linhagens geneticamente modificadas contribui com informações relevantes para diversas patologias.

#### **1.4 Genética toxicológica e testes utilizados**

A genética toxicológica é uma sub-área da genética que engloba estudos relacionados a efeitos genotóxicos, considerados como precursores para o desenvolvimento de neoplasias, como o câncer, por exemplo (SILVA *et al.*, 2003). Uma substância genotóxica é aquela capaz de causar danos no material genético, podendo causar uma toxicidade que abrange desde o nível celular (citotóxica) até o organismo (tóxica) (ERDTMANN, 2003). Por ser capaz de alterar a replicação do DNA e a transmissão genética, a substância genotóxica pode ou não ser mutagênica (FAIRBAIRN *et al.*, 1995), visto que o composto mutagênico é aquele capaz de aumentar a taxa de mutação (mudança estável e herdável numa sequência nucleotídica do DNA) em um organismo além da taxa espontânea (GATEHOUSE *et al.*, 1990). Embora sejam mais raras, podem ocorrer mutações favoráveis às células, mas em sua maioria, elas são deletérias à célula, podendo causar carcinogênese e teratogênese (LEHNINGER *et al.*, 1995; NUNES, 2000). Portanto, agentes mutagênicos são sempre genotóxicos, mas agentes genotóxicos nem sempre são mutagênicos (VOGEL, 1989).

Vários testes estão disponíveis para realizar a avaliação tóxico-genética de um agente físico ou químico. Cada método avalia um nível específico de dano, tais como, lesões no DNA, danos cromossômicos, eventos mutagênicos e recombinogênicos. Portanto, é

imprescindível a utilização de vários ensaios em estudos quantitativos dos eventos genotóxicos atribuídos para cada agente, assim como, para o entendimento dos mecanismos de formação das alterações e da ação do reparo de DNA (SILVA *et al.*, 2003).

No entanto, realizar avaliação da atividade genotóxica de novos fármacos é relevante para a introdução de compostos com menos efeitos colaterais. Adicionalmente, quando avalia-se o potencial genotóxico dos fármacos existentes, remete-se à busca de novos compostos (SANTOS *et al.*, 2007).

Dentre os diversos testes existentes, o Ensaio Cometa é muito utilizado para avaliar genotoxicidade e reparo do DNA, porque avalia lesões passíveis de reparo. Dentre as suas vantagens, destacam-se a possibilidade da utilização de vários tipos de células em diferentes organismos por detectar tipos de danos celulares distintos (SINGH *et al.*, 1998; HARTMANN *et al.*, 2004; CARMONA *et al.*, 2011a, 2011b; GOLDSCHALK *et al.*, 2013; GUANGGANG *et al.*, 2013; COLLINS *et al.*, 2014; KRAYNAK *et al.*, 2015; OGIWARA *et al.*, 2015).

Esse teste é utilizado para detectar danos no DNA causados por agentes alquilantes, intercalantes e oxidantes. Na versão neutra do teste é possível detectar quebras duplas das moléculas de DNA e *crosslinks*, enquanto a versão alcalina detecta quebras de fita simples e dupla, sítios alcaliláveis e *crosslinks*. O Ensaio Cometa pode ser aplicado em qualquer tipo celular nucleado de organismos eucariotos, independente das células estarem ou não em proliferação (VILLELA *et al.*, 2003; KRAYNAK *et al.*, 2015; OGIWARA *et al.*, 2015).

Outro teste que tem sido amplamente utilizado na avaliação do potencial mutagênico de substâncias-teste é o Teste do Micronúcleo (MN) (MAFFEI *et al.*, 2002; CHUNG *et al.*, 2002; DING *et al.*, 2003; KRAYNAK *et al.*, 2015, OGIWARA *et al.*, 2015; RIM; KIM, 2015). Esse bioensaio é aplicado para detectar agentes clastogênicos (que causam alterações estruturais nos cromossomos) e aneugênicos (indutores de alterações numéricas, seja por aneuploidia ou por segregação cromossômica anormal), portanto, avalia danos no DNA em nível cromossômico (HEDDLE, 1973; RIM; KIM, 2015). Os micronúcleos representam o material genético que foi perdido pelo núcleo principal, devido a ação de agentes físicos, químicos ou biológicos que causaram um dano genético no cromossomo (VILLELA *et al.*, 2003; RIM; KIM, 2015).

Esse teste pode ser aplicado em populações celulares que estão constantemente em divisão, por isso é amplamente executado em células da medula óssea de mamíferos, uma vez que suas células levam de 22 a 24 horas para completar um ciclo de divisão celular (HEDDLE, 1973; KRAYNAK *et al.*, 2015; OGIWARA *et al.*, 2015). Entre 10 e 24 horas, os eritrócitos imaturos ou eritrócitos policromáticos (EPC) apresentam RNA ribossômico e,

nesse estágio, pode-se detectar o aparecimento de MN. Posteriormente, diferenciam-se em eritrócitos maduros ou normocromáticos (ENC) que não possuem RNA ribossômico (RABELO-GAY, 1991; KRISHNA; HAYASHI, 2000).

Tanto o Ensaio Cometa quanto o Teste do MN não são capazes de detectar a indução de recombinação mitótica, que é um dos principais processos envolvido com a carcinogênese, mediada por agentes genotóxicos (ANDRADE; LEHMANN, 2003). Portanto, torna-se importante a aplicação do teste para detecção de mutação e recombinação somática (SMART). Esse bioensaio realiza a detecção simultânea de eventos mutacionais e recombinação mitótica, além de possibilitar a quantificação desses eventos com o intuito de avaliar a contribuição de cada um deles para a genotoxicidade total dos medicamentos em estudo (GRAF *et al.*, 1984; ANDRADE; LEHMANN, 2003; ANDRADE *et al.*, 2004; ÁVALOS *et al.*, 2015; KOKSAL; GURBUZEL, 2015).

O SMART se baseia no conceito de que durante o desenvolvimento embrionário de *Drosophila melanogaster*, grupos de células – discos imaginais – se proliferam mitoticamente para formar as partes do corpo da mosca adulto. A perda de heterozigose de dois genes marcadores recessivos (*mwh* e *flr<sup>3</sup>*) pode levar à formação de clones de células mutantes que são expressas fenotipicamente como manchas contendo pelos mutantes, presentes nas células das asas de moscas adultas (GRAF *et al.*, 1984; ANDRADE; LEHMANN, 2003; ANDRADE *et al.*, 2004; ÁVALOS *et al.*, 2015; KOKSAL; GURBUZEL, 2015).

## 1.5 Objetivos

### 1.5.1 Geral

Avaliar o efeito tóxico, citotóxico e genotóxico dos antirretrovirais EFV e TDF administrados isolados e em combinações (Combivir+EFV e TDF+3TC).

### 1.5.2 Específicos

I) Avaliar o efeito citotóxico, genotóxico e mutagênico dos medicamentos antirretrovirais EFV e TDF isolados e em combinações (Combivir+EFV e TDF+3TC) por meio do Ensaio Cometa em *Drosophila melanogaster* e camundongos *Mus musculus*.

II) Avaliar o efeito mutagênico, recombinogênico e tóxico dos medicamentos antirretrovirais em estudo por meio do SMART em *Drosophila melanogaster*.

III) Avaliar o efeito aneugênico e clastogênico das combinações de medicamentos antirretrovirais (Combivir+EFV e TDF+3TC) em medula óssea de camundongos *Mus musculus* por meio do Teste MN.

IV) Quantificar a frequência dos diferentes eventos genotóxicos (mutagênicos, recombinogênicos, aneugênicos e clastogênicos) induzidos pelos combinados que possuem EFV e TDF pelo Teste MN e SMART em *Drosophila melanogaster* e camundongos *Mus musculus*.

V) Comparar os possíveis efeitos genotóxicos dos medicamentos antirretrovirais em estudo quando utilizados isoladamente e em combinações por meio do Ensaio Cometa e SMART em *Drosophila melanogaster*.

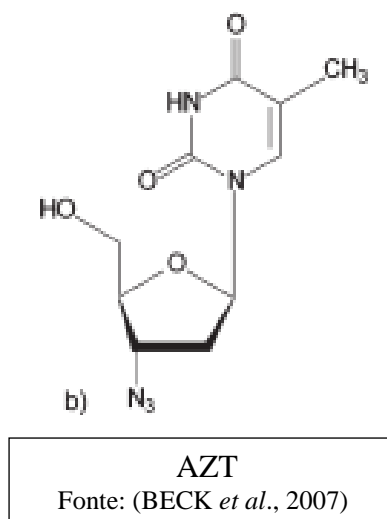
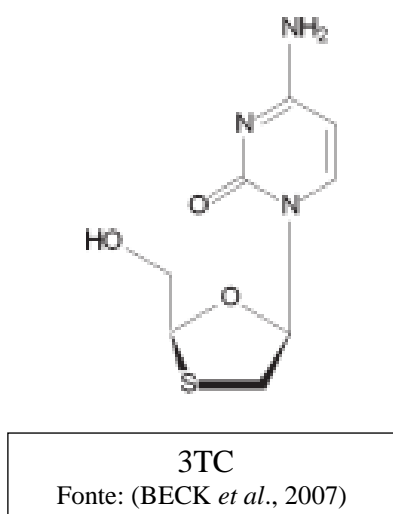
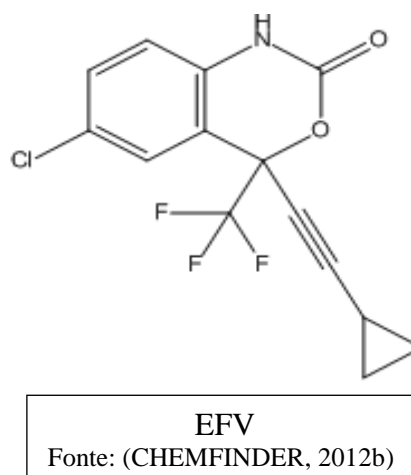
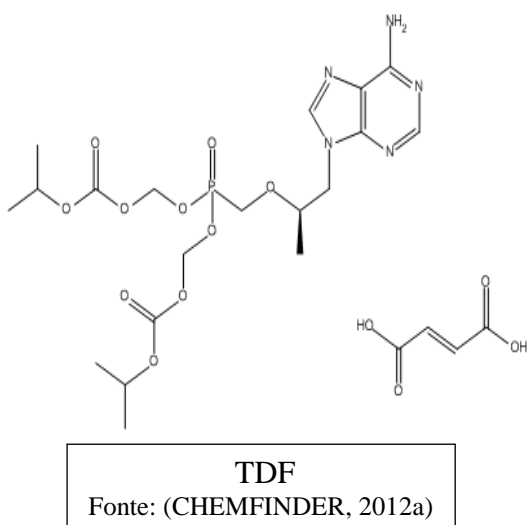
## CAPÍTULO II

### MATERIAL E MÉTODOS

#### 2.1 Agentes antirretrovirais

Os medicamentos Viread<sup>®</sup>, Lamivudina, Estiva-600<sup>®</sup> e Combivir<sup>®</sup> foram utilizados neste estudo. Cada comprimido de Viread<sup>®</sup> contém 300 mg de TDF (CAS 202138-50-9); o comprimido de Lamivudina contém 150 mg de 3TC (CAS 134678-17-4); o comprimido de ESTIVA-600 contém 600 mg de EFV (CAS 154598-52-4) e o comprimido de Combivir<sup>®</sup> contém 300 mg de AZT (CAS 30516-87-1) mais 150 mg de 3TC. Todos os medicamentos foram cedidos pelo Hospital de Doenças Tropicais Dr. Anuar Auad (HDT, Goiânia, GO, Brasil). As estruturas químicas dos antirretrovirais estão representadas na Figura 1.

Figura 1 – Estrutura química dos agentes antirretrovirais



Todas as concentrações utilizadas foram determinadas de acordo com a proporção que é administrada aos pacientes em tratamento antirretroviral: EFV+Combivir (AZT+3TC) = 4:2:1 e TDF+3TC = 2: 1.

As soluções foram preparadas imediatamente antes do uso e em todos os experimentos o solvente (água destilada) foi utilizado como controle negativo.

## 2.2 Testes com *Drosophila melanogaster*

Nos testes com *D. melanogaster* foram realizados experimentos com os medicamentos isolados (Combivir; EFV; TDF e 3TC) e combinados (Combivir+EFV; TDF+3TC) para comparar a contribuição genotóxica dos medicamentos individuais e em combinação.

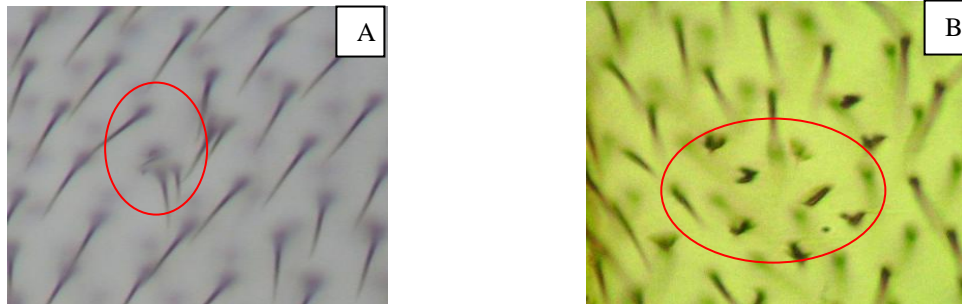
Para definir as concentrações que seriam utilizadas nos testes, foram realizados experimentos piloto de acordo com a solubilidade máxima do EFV e do TDF. Foram utilizadas as concentrações que não apresentaram dose letal maior que 70% (DL 70) nas curvas de sobrevivência, ou seja, concentrações nas quais o número de adultos sobreviventes eram igual ou superior a 30%. A partir desse resultado, foram calculadas as concentrações dos combinados baseadas na proporção utilizada em pacientes. As mesmas concentrações foram utilizadas para os dois testes.

### 2.2.1 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 imaginiais que, por sucessivas divisões mitóticas, darão origem às asas dos adultos, ocasionando a perda de heterozigose de dois genes marcadores para forma dos pelos presentes nas asas: os genes *mwh* e *flr<sup>3</sup>* (GRAF *et al.*, 1984; ANDRADE; LEHMANN, 2003; ANDRADE *et al.*, 2004).

O gene selvagem origina um pelo por célula. O gene *mwh* origina pelos múltiplos (Figura 2a) e o gene *flr<sup>3</sup>*, pelos geralmente com formato de chama de vela (Figura 2b), indicando a ocorrência de lesões mutacionais e/ou recombinacionais.

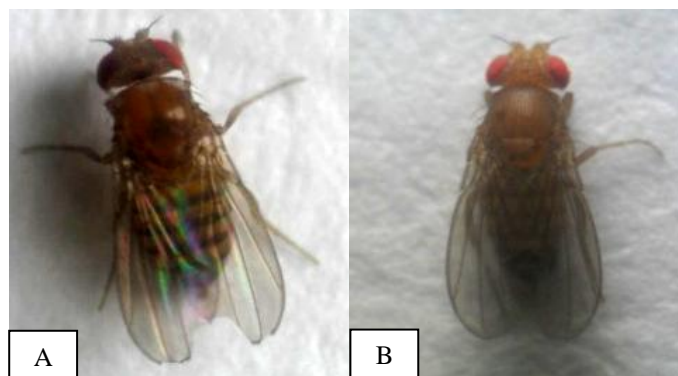
Figura 2 – Visualização dos fenótipos de: (A) pelos múltiplos e (B) pelo *flare*



### 2.2.1.1 Linhagens teste de *Drosophila melanogaster*

No presente trabalho foram utilizadas as linhagens com as seguintes características genótípicas: (i) **flr<sup>3</sup>** - *flr<sup>3</sup>/In(3LR)TM3,rip<sup>p</sup> sep l(3)89Aa bx<sup>34e</sup> e Bd<sup>S</sup>* (Figura 3a); (ii) **mwh** - *mwh/mwh* (Figura 3b) e (iii) **ORR;flr<sup>3</sup>** - *ORR/ORR; flr<sup>3</sup>/In(3LR)TM3,rip<sup>p</sup> sep l(3)89Aa bx<sup>34e</sup> e Bd<sup>S</sup>*. 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. Fenotipicamente, a linhagem flr<sup>3</sup> assemelha-se a linhagem ORR;flr<sup>3</sup>, no entanto essa última possui alto nível de enzimas de metabolização (CYP)6A2, sendo, portanto, utilizada para avaliar compostos que dependem de ativação via citocromo P450 (Graf e van Schaik, 1992).

Figura 3 – Linhagens teste de *D. melanogaster*: (A) *flr<sup>3</sup>*, (B) *mwh*



### 2.2.1.2 Procedimento experimental e tipos de larvas

Para a realização do SMART, larvas de 3º estágio oriundas do cruzamento padrão (ST – *standard cross*) - 40 machos *mwh* x 80 fêmeas *flr<sup>3</sup>* - foram distribuídas em frascos contendo 0,9 g de meio de cultura alternativo (purê de batata) 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). O mesmo procedimento foi realizado para o cruzamento aprimorado (HB) - 40 machos *mwh* x 80 fêmeas *ORR;flr<sup>3</sup>* (ANDRADE; LEHMANN, 2003; GRAF; VAN SCHAİK, 1992).

As larvas provenientes desses cruzamentos deram origem a indivíduos adultos de duas constituições genótípicas: (i) MH – trans-heterozigotos para os marcadores recessivos *mwh* e *flr<sup>3</sup>* (*mwh +/+ flr<sup>3</sup>*) e (ii) BH - heterozigotos para o cromossomo balanceador TM3 (*mwh +/TM3, Bd<sup>S</sup>*). O cromossomo TM3 é indispensável para manter a heterozigose do gene marcador *flare* (*flr<sup>3</sup>*) na linhagem parental e contém múltiplas inversões, tornando inviáveis os produtos de recombinação. Dessa forma, os indivíduos expressam somente mutações gênicas e aberrações cromossômicas. O gene marcador *Bd<sup>S</sup>* determina a forma recortada das asas das moscas adultas, permitindo facilmente a sua diferenciação em relação ao genótipo MH, que determina a forma arredondada das asas. (GRAF *et al.*, 1984; ANDRADE; LEHMANN, 2003; ANDRADE *et al.*, 2004).

### 2.2.1.3 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, as lâminas foram cobertas com 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 foi retirado e a lamínula foi fixada com esmalte. A relação entre o total de manchas da progênie MH e o total de manchas da progênie BH possibilita avaliar o potencial recombinôgenico dos compostos (ANDRADE *et al.*, 2004).

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

#### 2.2.1.4 Bases genéticas e classificação das manchas

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  $flr^3$ , os pelos mutantes  $flr^3$  se expressam como pelos com a base alargada e com formato de chama de vela.

Essas manchas foram classificadas como: (i) mancha simples (ocorrem somente fenótipos mwh ou  $flr^3$ ), originadas por mutação pontual, alteração cromossômica ou recombinação mitótica e (ii) manchas gêmeas (ocorrem os fenótipos mwh e  $flr^3$  simultaneamente), indicando, exclusivamente, a ocorrência de recombinação mitótica entre o centrômero e o *locus flr<sup>3</sup>*. 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 manchas induzidos em um grupo tratado fornece dados quantitativos sobre a atividade mutagênica e/ou recombinogênica do composto (ANDRADE *et al.*, 2004).

#### 2.2.1.5 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 Würigler (1988), testando as hipóteses: (i)  $H_0$ : não há diferença entre a frequência de mutação do grupo controle (frequência espontânea) e do grupo tratado; (ii)  $H_A$ : 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: (i) positivo – aceita-se  $H_A$  e rejeita-se  $H_0$ ; (ii) negativo – aceita-se  $H_0$  e rejeita-se  $H_A$ ; (iii) inconclusivo – aceita-se ambas hipóteses e (iv) fraco positivo – rejeita-se ambas hipóteses (ANDRADE; LEHMANN, 2003).

#### 2.2.1.6 Cálculo do Índice de Combinação (IC)

De acordo com o princípio da aditividade de Loewe (1957), utilizou-se a frequência de indução de clones por  $10^5$  células, corrigidas pelo controle negativo, para calcular o índice de combinação (IC) entre os fármacos (RAMAKRISHNAN; JUSKO, 2001; GUIMARÃES *et al.*, 2013). Portanto,  $IC = [(f_A / f_{AB}) + (f_B / f_{AB})]$ , onde  $f_A$  e  $f_B$  são as frequências induzidas por cada fármaco individualmente (A ou B) e  $f_{AB}$  as frequências induzidas pelos fármacos em combinação (AB). Os resultados  $IC < 1$ ,  $IC = 1$  e  $IC > 1$  representam a ocorrência de sinergismo, aditividade e antagonismo, respectivamente.

#### 2.2.2 Ensaio Cometa com *Drosophila melanogaster*

Foi aplicada a versão alcalina do Teste Cometa *in vivo* com hemócitos de *D. melanogaster*, que são as células correspondentes aos linfócitos do sangue dos mamíferos, para avaliar os níveis de danos no DNA causados pelos antirretrovirais isolados e combinados (CARMONA *et al.*, 2011a, 2011b).

##### 2.2.2.1 Linhagem teste

Nesse estudo foi utilizada a linhagem Oregon R<sup>+</sup> de *D. melanogaster* que é eficiente para todos os tipos de mecanismos de reparo do DNA. A linhagem foi cultivada em frascos de vidro contendo meio de cultura para *D. melanogaster* em uma temperatura de 25°C e umidade relativa de aproximadamente 60%.

### 2.2.2.2 Extração da hemolinfa

Para o procedimento experimental, larvas de terceiro estágio foram inseridas em tubos de tratamento contendo 0,9 g de meio de cultura alternativo (purê de batata) e 3 mL das soluções de tratamento nas mesmas concentrações utilizadas no SMART. Os medicamentos foram diluídos em água destilada, a hora do tratamento, e o solvente foi utilizado como controle negativo. O grupo controle positivo foi tratado com ciclofosfamida na concentração de 1 mg/mL. As larvas se alimentaram por  $24 \pm 2$  horas.

Foram utilizadas 60 larvas por tubo de tratamento e cada concentração foi realizada em triplicata, portanto, para cada concentração foram analisados hemócitos de 180 larvas.

Os hemócitos foram coletados de acordo com o protocolo de Carmona *et al.*, (2011a, 2011b), com modificações. As larvas de  $96 \pm 2$  horas foram removidas dos tubos de tratamento, lavadas duas vezes em água, para a retirada de resíduos do meio de cultivo, e resfriadas a 4°C por 1 minuto para facilitar a manipulação por meio da diminuição metabólica. As cutículas de 60 larvas foram desfeitas com o auxílio de bisturi e pinça de relojoeiro nº 5. A hemolinfa, contendo os hemócitos circulantes, foi coletada em solução de EDTA e colocadas em uma lâmina escavada. Em seguida, o *pool* de células das 180 larvas foi transferido para tubos de microcentrífuga de 1,5 mL. De acordo com Braun *et al.* (1998), há em torno de 1.000 a 1.500 hemócitos por larva. Na fase larval, existem três subtipos de hemócitos: (i) plasmócitos que representam cerca de 95% dos hemócitos; (ii) células cristais, encontradas em pequena proporção e (iii) lamelócitos que geralmente não são encontrados em larvas saudáveis. Contudo, a necessidade de um *pool* de células partiu em decorrência de poucas células por indivíduos.

Em cada tubo de microcentrífuga havia um volume final de EDTA+hemolinfa de 0,5 mL. O *pool* de hemolinfa foi centrifugado, duas vezes, a 3.000 rpm por 3 minutos. Seguidamente, 100 µL do sobrenadante foi descartado para diminuir impurezas e, conseqüentemente, aumentar a qualidade das amostras. O *pellet* foi ressuspensão com 100 µL de EDTA para ser centrifugado novamente nas mesmas condições anteriores.

### 2.2.2.3 Preparo das lâminas e eletroforese

As lâminas foram lixadas, para aumentar a adesão da agarose, lavadas em água destilada, higienizadas com álcool e colocadas para secar em caixas porta-lâminas. Logo após, as lâminas de pré-cobertura foram preparadas por meio de mergulho em solução contendo 100

mL de PBS (tampão fosfato-salino) e 1,5 g de agarose padrão e, posteriormente, ficaram secando *overnight*.

As amostras de células (aproximadamente 60  $\mu$ L) foram resuspensas em 100  $\mu$ L de solução de agarose de baixo ponto de fusão (agarose *low melting*) e distribuídas em camadas sobre lâminas de pré-cobertura. Por ser uma etapa fotossensível, esta foi realizada toda na ausência de luz (luz recoberta com paflon vermelho).

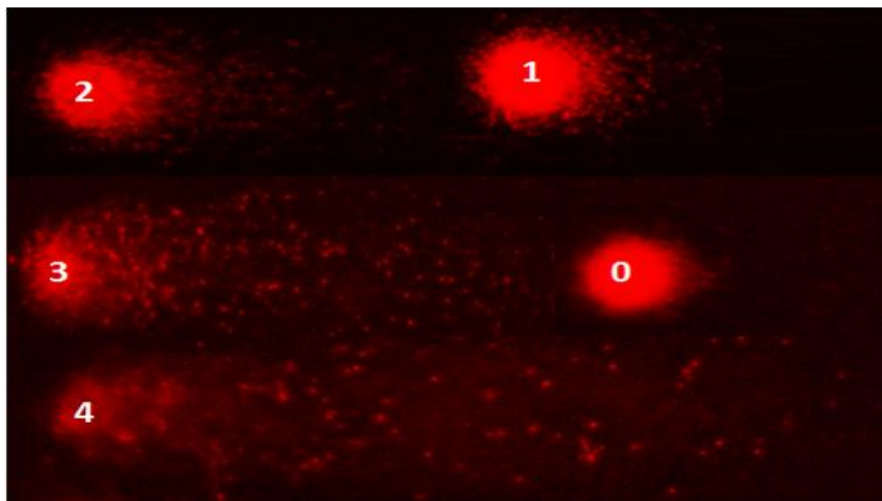
As lâminas foram cobertas com lamínulas e, imediatamente após a solidificação de agarose (por 10 min a 4 °C), as lamínulas foram removidas, e as lâminas imersas em solução de lise (2,5 M NaCl; 100 mM EDTA; 1 M NaOH; 10 mM Tris; 1% Triton X-100 e 10% DMSO) ajustada para pH 10, e mantidas por 72 h a 4°C em câmara escura. Quando retiradas da solução de lise, as lâminas foram colocadas em uma solução tampão (1M NaOH e 200 mM EDTA, pH > 13) durante 20 min a 4 °C para permitir o desenrolamento do DNA. Na sequência, foi realizada a eletroforese no mesmo tampão durante 20 minutos a 40 V/cm e 300 mA (0,73 V/cm). Após a eletroforese, as lâminas foram neutralizadas por 15 minutos com 0,4 M de Tris-HCl (pH 7,5) e, em seguida, fixadas (imersas em etanol absoluto por 5 min) e armazenadas até a análise microscópica.

#### 2.2.2.4 Análise microscópica

As lâminas foram coradas minutos antes da análise, com 50  $\mu$ L de solução de GelRed™, diluído em água deionizada na proporção de 1:500  $\mu$ L por cada gel. Em seguida, as lâminas foram examinadas em microscópio de fluorescência (Zeiss-Imager, M2) com aumento de 400X, e na presença do filtro Alexa Fluor 546. Um total de 100 nucléoides por réplica (duas ou mais lâminas), foram selecionados aleatoriamente e analisados utilizando-se o programa de captura de imagens Axiovision versão 4.8.2.0.

Os cometas encontrados foram avaliados com base em dois parâmetros: Índice de Dano (ID) e Frequência de Dano (FD%). De acordo com Silva (2012), o ID classifica os nucleóides em cinco classes (de 0 a 4), considerando-se o comprimento e o tamanho da cauda: (i) classe 0, ausência de cauda, ou seja, sem dano; (ii) classe 1, cauda menor do que o diâmetro da cabeça; (iii) classe 2, cauda até duas vezes o diâmetro da cabeça (iv) classe 3, cauda maior que duas vezes o diâmetro da cabeça e (v) classe 4, sem cabeça (Figura 4).

Figura 4 – Imagens de nucleóides de leucócitos humanos, corados por GelRed™ e analisado em microscopia fluorescente. Classificação visual.



Fonte: Silva (2012).

Os valores de ID foram calculados, com base na fórmula: **IDtotal = 0.(nº de cometas classe 0) + 1.(nº classe 1) + 2.(nº classe 2) + 3.(nº classe 3) + 4.(nº classe 4)**.

O segundo parâmetro utilizado (FD%), representa a porcentagem de nucleóides que apresentaram danos, em relação ao total de nucleóides e foi calculado pela fórmula: **Frequência de Dano = [(nº total – nº classe 0).100] / nº total**.

#### 2.2.2.5 Análise estatística

Foi realizado o teste de Kolmogorov-Smirnov (K-S) para verificar a normalidade dos parâmetros do cometa. Sendo atendida a normalidade dos dados, a comparação do índice de dano genômico medido pelo Ensaio Cometa entre o grupo controle e os demais tratamentos foi realizada com base na análise da variância (ANOVA) seguida do teste *Tukey a posteriori*. Em relação a análise entre os grupos controle positivo e controle negativo foi utilizado o Teste T. Em todas as situações foi adotado um nível de significância  $\alpha = 0,05$ , utilizando o pacote estatístico *Statistical Package of Social Sciences* (SPSS v22).

#### 2.2.2.6 Cálculo do Índice de Combinação

Com base no ID, foi calculado o índice de combinação (IC): **IC = [(IDa/IDab) + (IDb/IDab)]**. Este índice calcula os efeitos da interação de substâncias e classifica-os como

aditivo (IC = 1), antagônico (IC > 1) ou sinérgico (IC <1) (LOEWE , 1957 ; RAMAKRISHNAN; JUSKO , 2001; GUIMARÃES *et al.*, 2013).

### 2.3 Testes com camundongos *Mus musculus*

Este estudo teve o protocolo aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Goiás (CEUA-PRPPG-UFG) sob o nº 046/13 e seguiu todas as normas de manejo e experimentação animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Foram utilizados camundongos *Mus musculus* (Swiss Webster) *out bred*, do sexo masculino, pesando entre 30 e 40g com idade variando de 7 a 12 semanas, procedentes do Biotério Central da Universidade Federal de Goiás (UFG). Antes da realização dos experimentos, os animais permaneceram por 7 dias no Laboratório de Radiobiologia e Mutagênese, local onde foram realizados os experimentos. Cinco animais foram mantidos em cada gaiola de polipropileno com dimensão de 40x30x16 cm forrada com maravalha trocada diariamente, e alimentados com ração comercial e água filtrada, ambos oferecidos *ad libitum*. Os animais foram mantidos a temperatura ambiente de 25°C, umidade 50±20% e um ciclo de luz 12h claro/12h escuro.

Para o procedimento experimental, grupos de cinco camundongos foram tratados, via gavagem, com três concentrações da combinação dos antirretrovirais e sacrificados em diferentes tempos: 24 e 48 horas. Com os camundongos foram realizados experimentos apenas com as combinações dos medicamentos. As concentrações dos combinados foram baseadas no estudo de Von Tungeln *et al.* (2002) com AZT e 3TC isolados e, a partir delas, utilizou-se a proporção usada em protocolos clínicos: TDF+3TC = 2:1; Combivir (AZT+3TC)+EFV = 2:1:4. Portanto, para o combinado TDF+3TC foram testadas as concentrações: 800+400, 1600+800 e 3200+1600 mg/kg. Para o combinado Combivir+EFV foram testadas as concentrações: 200+100+400, 400+200+800 e 800+400+1600 mg/kg.

O grupo controle negativo foi tratado com água destilada esterilizada enquanto o grupo controle positivo recebeu uma dose padrão de ciclofosfamida (50 mg/kg). Apenas o controle positivo foi administrado via intraperitoneal.

Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e os fêmures retirados. Em seguida, as epífises foi cortada e a medula óssea lavada com 1 mL de soro fetal bovino a 37°C. Após homogeneização, a solução foi centrifugada a 1500 rpm durante 5 minutos. O

sobrenadante foi parcialmente descartado para a preparação das lâminas ser realizada com o precipitado homogeneizado com pipeta Pasteur.

### 2.3.1 Ensaio Cometa com medula óssea

O Ensaio Cometa foi realizado de acordo com o protocolo descrito por Attia *et al.* (2013), com pequenas modificações. Foi aplicada a versão alcalina do teste (SINGH *et al.*, 1998).

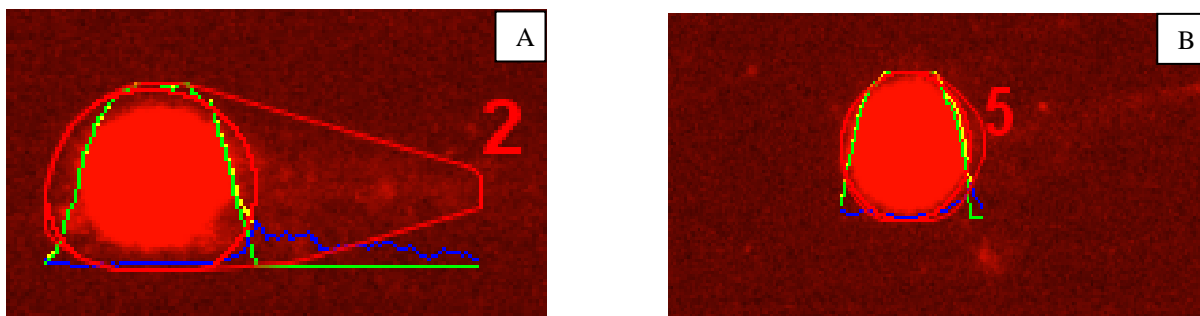
As lâminas de pré-cobertura foram preparadas por meio de mergulho em solução contendo 100 mL de PBS (tampão fosfato-salino) e 1,5 g de agarose padrão que, posteriormente, ficaram secando *overnight* na horizontal em temperatura ambiente.

No dia seguinte, as lâminas foram preparadas com 10 µL de amostra da medula óssea homogeneizada e misturada com 120 µL de agarose *low-melting* (baixa fusão) e imediatamente espalhado nas lâminas de pré-cobertura e acrescido de lamínula. A lâmina com as duas camadas de agarose foi mantida a 4°C por 5 minutos para solidificar a agarose. Após este período, a lamínula foi retirada e as lâminas foram incubadas em uma solução de lise: 2,5M NaCl, 10mM Tris, 100mM ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), 1% Triton X-100 e 10% dimetilsulfóxido (DMSO) em pH 10. As lâminas foram mantidas a 4°C por 24 horas nessa solução. Posteriormente, as lâminas foram colocadas em tampão de eletroforese (300mM NaOH, 1mM EDTA, pH > 13,0) por 30 minutos. Em seguida, foi realizada a eletroforese por 25 minutos, a 25 V e 300 mA e a 4°C. Todo o procedimento foi feito no escuro para prevenir danos ao DNA. Após a eletroforese, as lâminas foram mergulhadas em solução de neutralização (0,4M Tris, pH 7,5), lavadas com água destilada e secas a temperatura ambiente. Para a captura das imagens, as lâminas foram coradas com 20 µL de brometo de etídeo (0,02 mg/mL), minutos antes da análise. As lâminas foram preparadas em duplicatas e 100 nucleóides foram analisados, 50 nucleóides para cada lâmina. Utilizou-se o microscópio de fluorescência Axioplan - Imaging® e o *software* Isis com um filtro de excitação de 510-560 nm e um filtro barreira de 590 nm, em aumento de 200x.

Os nucleóides foram avaliados pelo *software* OpenComet, versão 1.3 (Figura 5). Foram selecionados os quatro parâmetros mais utilizados para as análises: comprimento da cauda (TL, *tail length*), porcentagem de DNA na cauda (% DNA in tail), momento da cauda (*tail moment*) e momento da cauda de Olive (OTM, *Olive Tail Moment*) (TRIPATHI *et al.*, 2008). O OTM é o resultado da razão entre os parâmetros TL e a porcentagem de DNA na

cauda, e tem sido o parâmetro para quantificação de danos no DNA mais comumente utilizado (COLLINS, 2014).

Figura 5 – Imagens de nucleóides capturados do *software* Open Comet, versão 1.3; Figura 5-A – Nucleóide com danos no DNA; e, Figura 5-B – Nucleóide sem danos no DNA.



Para análise estatística, foi realizado o teste ANOVA, seguido do teste de Tukey *a posteriori*. Em todas as situações foi adotado um nível de significância  $\alpha=0,05$ , utilizando o pacote estatístico *SigmaStat*, versão 3.5.

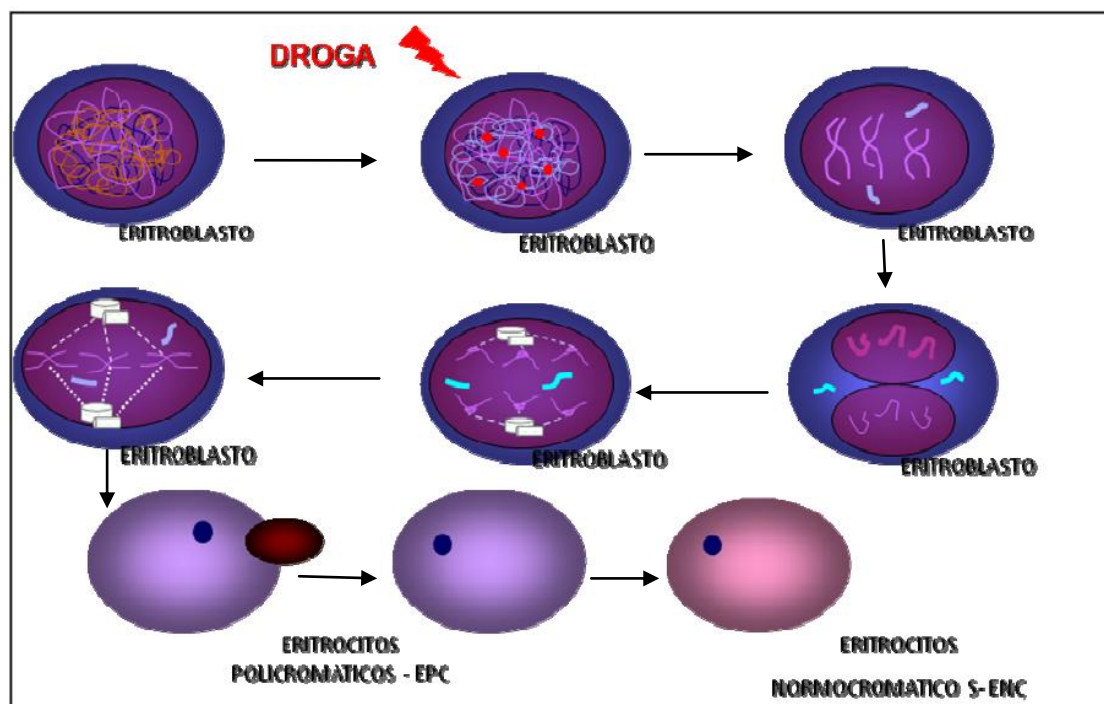
### 2.3.2 Teste do Micronúcleo

O teste do micronúcleo (MN) é utilizado para detectar danos cromossômicos, como clastogênese e aneugênese (Figura 6) (HEDDLE, 1973; VILLELA *et al.*, 2003, RIBEIRO, 2003).

A análise da indução de MN utilizou a mesma amostra do precipitado contendo células de medula óssea, descrito anteriormente no tópico “Teste com camundongos”. Para essa análise, 20  $\mu\text{L}$  da amostra foi transferida para a lâmina e com o auxílio de uma lâmina extensora, fez-se um esfregaço. Após secagem, as lâminas foram fixadas em metanol absoluto e coradas em soluções de Giemsa tamponada com pH 6,8 por um período de 15 minutos (HEDDLE, 1973). Após este período, as lâminas foram lavadas em água corrente e deixadas secar em temperatura ambiente. Em seguida, foram analisadas em microscópio óptico com aumento de 1000x.



Figura 6 – Formação de micronúcleos nos eritrócitos da medula óssea



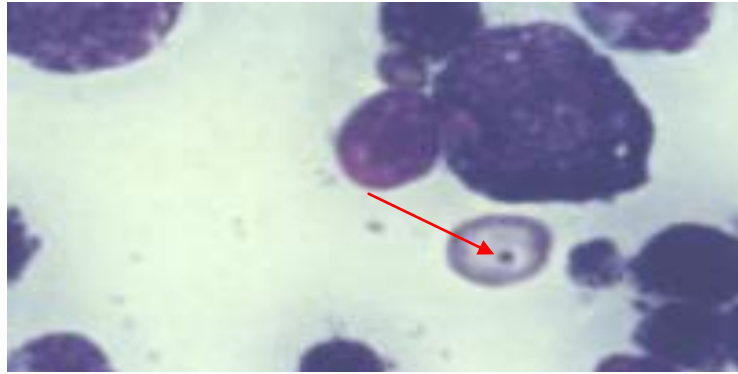
Fonte: Ribeiro (2003).

Na determinação da citotoxicidade foram computados 2000 eritrócitos policromáticos (EPC), sendo 1000 EPC/lâmina. Simultaneamente, foi determinada a frequência de eritrócitos normocromáticos (ENC) (Figura 7) para realizar o cálculo da razão EPC/ENC, que permite inferir o potencial citotóxico dos medicamentos. Essas frequências foram comparadas com o grupo controle negativo ou positivo pelo teste qui-quadrado. Para comparar a citotoxicidade nos dois tempos (24 e 48 horas), foi realizado o teste qui-quadrado.

As frequências obtidas de MN por 2000 EPC em todos os tratamentos foram comparadas com o grupo controle negativo pelo teste ANOVA, que permite concluir sobre a presença ou ausência da ação clastogênica e/ou aneugênica induzida por estes medicamentos. Para comparar a mutagenicidade nos dois tempos, foi realizado o teste t-Student entre os dados de 24 e 48 horas.

Em todas as situações foi adotado um nível de significância de  $\alpha = 0,05$ , utilizando o *software* estatístico *SigmaStat*, versão 3.5.

Figura 7 – Fotografia de eritrócito policromático micronucleado (seta)



Fonte: Roll (2005).

### CAPÍTULO III

#### DISCUSSÃO

Os testes que usaram a *D. melanogaster* como organismo experimental, SMART e Ensaio Cometa, nos permitiram avaliar a genotoxicidade dos medicamentos antirretrovirais isolados (EFV, Combivir, TDF e 3TC) e em combinação (Combivir+EFV e TDF+3TC). O SMART permite avaliar simultaneamente dois processos que estão comprovadamente relacionados com a carcinogênese: as mutações e a recombinação homóloga (GRAF *et al.*, 1984; ANDRADE *et al.*, 2003; BISHOP; SCHIESTL, 2003; ANDRADE; LEHMANN, 2004).

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

O Ensaio Cometa é um dos testes mais utilizados para avaliação de genotoxicidade e reparo do DNA, uma vez que pode ser empregado em quase todos os tipos de células de diversos organismos, incluindo a *D. melanogaster*. Esse teste pode detectar níveis baixos de diferentes tipos de danos celulares incluindo quebra simples de DNA e sítios alcalilábeis (HARTMANN *et al.*, 2004; DHAWAN *et al.*, 2009; CARMONA *et al.*, 2011a; CARMONA *et al.*, 2011b; BRENNAN *et al.*, 2012; GODSCHALK *et al.*, 2013; GUANGGANG *et al.*, 2013; COLLINS *et al.*, 2014; GAIVÃO; SIERRA, 2014).

Na avaliação dos efeitos mutagênicos e recombinogênicos do EFV, os resultados demonstraram que esse medicamento foi tóxico nas maiores concentrações testadas (12,5; 25 e 50 mg/mL) e não apresentou indução de eventos mutagênicos e/ou recombinogênicos. Nossos resultados de toxicidade corroboram com o estudo de Díaz e Delfín (2011) que verificaram que, em baixas concentrações (0,5 e 4 µM), o EFV não foi significativamente citotóxico, mas na concentração de 20 µM causou morte celular extensa em cultura de células de adipócitos humanos. Adicionalmente, os resultados de Adjene e Igbigbi (2010) sugeriram que a administração do EFV por tempo prolongado apresentou efeitos tóxicos sobre células do cóliculo inferior de ratos Wistar observado por meio da diminuição das células que pode ser consequência de morte celular induzida pelo fármaco.

Apesar de baixos índices de toxicidade de muitos regimes antirretrovirais, o acúmulo de efeitos ao longo de décadas de tratamento é controverso e não devidamente comprovado (RICHMAN *et al.*, 2009).

Bumpus (2011) incubou hepatócitos humanos com EFV e 8-hidroxiefavirenz (8-OHEFV), principal metabólito do EFV. Os resultados mostraram morte celular, ativação de caspases-3, formação de espécies reativas de oxigênio, estimulação da fosforilação da via de sinalização JNK e estimulação da expressão da isoforma proapoptótica da proteína Bim (bcl-2, mediador de morte celular). Os dados sugeriram que o metabólito oxidativo 8-OHEFV é um indutor mais potente da morte celular hepática do que o composto original do EFV. Também, em nosso estudo, o EFV induziu efeitos tóxicos somente na maior concentração testada e não mostrou efeitos mutagênicos e/ou recombinogênicos quando testado em linhagens que apresentam alto nível de enzimas de metabolização.

Estudos de revisão sobre genotoxicidade e carcinogenicidade de diversos medicamentos de uso frequente e de longa duração mostram que o EFV não apresenta efeitos genotóxicos em testes *in vitro* e *in vivo* efetuados com diversos organismos e células, tais como *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, células do ovário de hamster chinês e camundongos (BRAMBILLA *et al.*, 2011; WU *et al.* 2012). A ausência de efeitos mutagênicos e recombinogênicos do EFV foi confirmada em nossos resultados com o SMART. No entanto, o EFV mostrou efeitos genotóxicos no Ensaio Cometa em *D. melanogaster*. Dessa maneira, sugere-se que o mecanismo de reparo possa estar atuando nos danos causados pelo EFV no DNA e, portanto, não foram possíveis de serem detectados por ensaios que avaliam lesões fixadas.

Em relação ao Combivir, nossos dados corroboram um estudo realizado em nosso laboratório com AZT, 3TC e AZT+3TC no qual os resultados não apresentaram efeitos tóxicos, mas mostraram efeitos mutagênicos e/ou recombinogênicos em concentrações equivalentes às testadas em nosso estudo (GUIMARÃES *et al.*, 2013). Nossos dados mostraram que a combinação Combivir+EFV reduziu os efeitos genotóxicos induzidos pelo Combivir tanto no Ensaio Cometa como no SMART. Assim, podemos concluir que, quando combinados, Combivir e EFV são antagônicos para indução de efeitos genotóxicos.

Em relação ao TDF, nosso trabalho demonstrou ausência de toxicidade e indução de eventos genotóxicos em todas as concentrações de TDF testadas. Segundo Brambilla *et al.* (2011), apesar de não apresentar genotoxicidade em *S. typhimurium* e camundongos, o TDF foi genotóxico em linhagem celular L5178Y de linfoma de camundongos. O estudo de revisão

realizado por Wu *et al.* (2012) descreve a ação genotóxica do TDF e cultura de células, confirmando assim, os resultados encontrados neste trabalho com *D. melanogaster*.

Brambilla *et al.* (2012) realizaram uma revisão sobre carcinogenicidade de medicamentos e verificaram que o EFV não apresentou efeitos carcinogênicos em nenhum dos testes aplicados, enquanto que, o TDF apresentou resultados positivos no ensaio de carcinogênese de longo prazo com camundongos fêmeas.

No levantamento feito por Friedrich e Olejniczak (2011) sobre os dados de carcinogenicidade de medicamentos para uso humano, autorizados na Europa entre 1995 e 2009, o EFV não foi um medicamento genotóxico e apresentou efeito negativo para carcinogenicidade em ratos, porém foi carcinogênico em camundongos. Em contraste, o TDF foi relatado como genotóxico e carcinogênico para ratos e camundongos, sendo relacionado com a indução de lipoma, pólipos no útero, tumores duodenais e adenoma hepático em camundongos, apresentando, portanto, risco carcinogênico para humanos.

Anteriormente, em um estudo conduzido por Guimarães *et al.* (2013), em nosso laboratório, demonstrou-se que a 3TC apresenta efeito mutagênico e/ou recombinogênico, no entanto, predominantemente recombinogênico no teste SMART. No presente estudo, quando combinado com TDF, de acordo com os nossos resultados, 3TC e TDF apresentaram antagonismo para efeitos genotóxicos, tanto no Ensaio Cometa, como no SMART. Estes medicamentos antirretrovirais, tanto isolados como combinados apresentaram prevalência de eventos recombinogênicos. A recombinação homóloga é um parâmetro importante para ser considerado na avaliação de risco/benefício carcinogênico e deveria ser realizada antes da prescrição de um medicamento.

Apesar dos genes de *D. melanogaster* apresentarem alta homologia aos genes humanos e o sistema enzimático relacionado ao citocromo P450 semelhante ao dos mamíferos (ANDRADE; LEHMANN, 2003), o período de divergência evolutiva entre humanos e camundongos (cerca de 60 milhões de anos) é mais recente quando comparados humanos e *D. melanogaster*. Portanto, a homologia, tanto em nível genotípico quanto na fisiologia e vias metabólicas, entre humanos e camundongos, pode chegar até a 90%, aumentando a possibilidade de existência de genes ortólogos. Adicionalmente, depois do homem, o mamífero com o genoma melhor estudado é o camundongo (GODARD, 2015).

Complementarmente, por sua alta confiabilidade e baixo custo, o teste do MN, que utiliza camundongos como organismo modelo, faz parte da bateria de testes genotóxicos recomendados para o registro de novos produtos químicos no mercado mundial, portanto é um método de triagem usado no desenvolvimento de novos fármacos (HAYASHI *et al.*, 2000;

RIBEIRO, 2003; BONASSI *et al.*, 2007). No entanto, não foram encontrados registros desse teste com os combinados Combivir+EFV e TDF+3TC na literatura. Além disso, para não sacrificar um número excessivo de animais, a proposta deste estudo foi avaliar a citotoxicidade e genotoxicidade apenas das combinações de antirretrovirais Combivir+EFV e TDF+3TC. Para isso, foi aplicado o Ensaio Cometa e o teste do MN em medula óssea de camundongos.

Os dois combinados apresentaram resultados negativos no Ensaio Cometa, mas foram positivos no Teste do MN em 24 horas. Como no Teste do MN são observados danos no DNA em níveis cromossômicos, sugere-se que as combinações Combivir+EFV e TDF+3TC induziram efeitos clastogênicos e/ou aneugênicos que não são detectados no Ensaio Cometa. Do mesmo modo, ao verificar a complementariedade entre o Ensaio Cometa e o Teste MN com 39 substâncias testes Hartmann *et al.* (2001) verificaram que, das 16 foram negativas no Ensaio Cometa e positivas no Teste do MN. Além disso, como a razão EPC/ENC foi elevada para ambos combinados, sugere-se que eles possam ser mitogênicos e que esta indução possa causar mais quebras cromossômicas, pois existirá um maior número de células em divisão.

De acordo com Hecht *et al.* (2013), o EFV têm efeito citotóxico seletivo em várias células tumorais, pois conduz à fosforilação e ativação da proteína supressora de tumor p53, apresentando um potencial antitumor e citostático. Como nossos testes foram realizados com células não-tumorais, sugere-se que essa seletividade do EFV ou ainda a interação entre os medicamentos no combinado possa ser a causa dos resultados negativos para citotoxicidade do Combivir+EFV observados em nossos dados.

Os medicamentos antirretrovirais que compõem o Combivir (AZT e 3TC) foram previamente descritos como citotóxicos para o crescimento de células CrFK. No entanto, não demonstram inibição significativa do crescimento de células CrFK falsamente infectadas (BISSET *et al.*, 2002). Nos nossos resultados, o Combivir em combinação com EFV não induziu citotoxicidade e demonstrou efeito indutor de mitose por meio do aumento de eritrócitos policromáticos, portanto a combinação desses medicamentos pode reduzir o potencial citotóxico dos medicamentos isolados. Em relação a genotoxicidade, na concentração de 400 mg/kg administrada por via oral em camundongos, a AZT mostrou efeitos genotóxicos sobre linfócitos de sangue periférico, células do fígado e rins no Ensaio Cometa e indução de micronúcleos em células da medula óssea (TRIPATHI *et al.*, 2008). A AZT foi genotóxica (Ensaio Cometa) em células H9 linfoblastóides humanas, mostrando relação dose-dependente nas concentrações de 0,05, 0,2, 0,4, 0,8, e 1,2 mM, sugerindo que os

danos no DNA era lesões nos sítios alcalilábeis e não quebra de cadeia dupla de DNA, pois foi positivo apenas em pH 13,0, mas não em pH 8,0 ou pH 12,1 (ESCOBAR *et al.*, 2007).

Em outras investigações, a AZT foi genotóxica e 3TC não foi genotóxico quando administrado a camundongos recém-nascidos. Quando combinado 3TC não altera as respostas observadas com AZT isolado (VON TUNGELN *et al.*, 2002).

No estudo conduzido por Oliveira *et al.* (2014), o EFV apresentou efeitos genotóxicos pelo aumento da frequência de lesões do DNA apenas no cérebro de camundongos no tratamento subcrônico a uma concentração de 10 mg/kg, quando avaliou-se o potencial mutagênico e genotóxico do EFV pelo Ensaio Cometa em sangue periférico, coração, fígado e cérebro e pelo Teste do MN em células da medula óssea de camundongos com o tratamento agudo e subcrônico. No entanto, para os outros órgãos testados no Ensaio Cometa e também no Teste do MN, o EFV não apresentou efeitos genotóxicos e mutagênicos na mesma concentração.

Em nosso estudo a combinação Combivir+EFV demonstrou efeitos mutagênicos em níveis cromossômicos (aneugênese e/ou clastogênese) nos dois tempos testados (24 e 48 horas). Estes resultados podem ser consequência da contribuição da AZT para a genotoxicidade deste combinado, uma vez que nos dados do Shafik *et al.* (1991), a AZT causou aberrações cromossômicas em cultura de células de pacientes que ingeriram uma dose de 1200 mg/dia. Ainda pode haver a contribuição do Combivir, pois os nossos dados corroboram o estudo de Von Tungeln *et al.* (2007) com camundongos recém-nascidos, demonstrando que tanto a AZT quanto AZT+3TC (Combivir) causaram uma diminuição na percentagem de reticulócitos (RETs), mas aumentaram a percentagem de RETs micronucleadas e de eritrócitos normocromáticos micronucleados.

Ao analisar os dados do combinado TDF+3TC no tempo de 24 horas, foi demonstrado ausência de indução de danos primários no DNA (Ensaio Cometa) ausência de citotoxicidade e indução de EPCMN. No tempo de 48 horas, este combinado não induziu dano primário no DNA, não mostrou citotoxicidade e não induziu EPCMN em comparação com o controle negativo ( $p > 0,05$ ).

A indução de mitose em EPC por esse combinado, observado pelo aumento da razão EPC/ENC, pode ser a resposta da ação dos resultados de 3TC, pois Baar *et al.* (2007), trabalharam com cultura de células HepG2 tratadas com 3TC, AZT e ABC, e demonstraram que as células apresentaram elevadas taxas de replicação do mtDNA (DNA mitocondrial) quando comparado com o grupo controle. Por outro lado, o TDF não teve nenhum efeito na replicação do mtDNA nesta linhagem celular. Como 3TC interfere na replicação do mtDNA,

sugere-se que esse medicamento possa interferir na proliferação celular e, conseqüentemente, causar a indução de mitose.

Além disso, em um estudo que avaliou o perfil citotóxico de alguns antirretrovirais em vários tipos de células, o TDF exibiu efeitos citotóxicos menores do que os demais NRTIs em todos os tipos de células testadas (CIHLAR *et al.*, 2002). Esta ausência de citotoxicidade foi confirmada nos nossos resultados, mesmo em combinação com 3TC.

Com relação à genotoxicidade, o TDF isolado não foi genotóxico no teste de Ames, no teste de aberração cromossômica em células pulmonares de hamster chinês (CHL) e no ensaio de MN nas condições experimentais testadas por Xing-lei *et al.* (2011). No entanto, tanto AZT como 3TC isolados mostraram indução de micronúcleos, por clastogenicidade, nas células binucleadas de cultura de linfócitos humanos, utilizando o ensaio de MN com bloqueador de citocinese (CBMN) (BAYRAM; TOPAKTAS, 2008; LOURENÇO *et al.*, 2010). Em nossos dados, quando combinados, TDF+3TC mostraram efeitos aneugênicos e/ou clastogênicos por indução de EPCMN.

Ao comparar os dois tempos (24 e 48 horas), Combivir+EFV aumentou a razão EPC/ENC em todas as concentrações testadas e TDF+3TC aumentou essa razão nas duas menores concentrações. Portanto, em 48 horas, a frequência do ENC diminuiu nessas concentrações. Em contraste, a indução de EPCMN diminuiu significativamente no tempo de 48 horas em todas as concentrações testadas dos dois combinados. Sugere-se que esta redução possa estar relacionada com a meia-vida dos compostos que é relativamente baixa em relação ao tempo de exposição: AZT trifosfato (5-9 horas) e 3TC trifosfato (11-33 horas) (ANDERSON *et al.*, 2003); em pacientes com genótipos GG, GT e TT na posição CYP2B6 516, o EFV apresentou meia-vida de 23, 27 e 48 horas, respectivamente Ribaud *et al.*, (2006); Barditch-Corvo *et al.* (2001) relataram que, quando administrados 300 a 600 mg de TDF a adultos infectados com HIV-1, as concentrações do fármaco no soro diminuem rapidamente com uma meia-vida entre 12 a 15 h.

Adicionalmente, como uma consequência de apoptose, pode ocorrer eliminação de células micronucleadas (DECORDIER *et al.*, 2002; BONASSI *et al.*, 2007; DECORDIER *et al.*, 2008), sugerindo portanto que a apoptose seja uma possível causa da diminuição dos EPCMN em 48 horas. Complementarmente, como foi indicado por Schlegel e MacGregor (1984) há uma eliminação seletiva de EPCMN no sangue periférico, por conseguinte, sugere-se que o mesmo pode ocorrer na medula óssea.

A avaliação genotóxica de combinações de medicamentos aumenta a complexidade da avaliação dos seus efeitos colaterais incluindo as interações como o material genético. Como



a genotoxicidade pode estar relacionada com a carcinogênese faz-se necessário o monitoramento de medicamentos antirretrovirais de uso crônico para traçar um perfil no que diz respeito aos possíveis efeitos secundários produzidos pelas terapias de combinação de medicamentos e, assim, servir de apoio para o desenvolvimento de novas estratégias nos protocolos de tratamento da AIDS.

## CONCLUSÃO

Por meio desse estudo, demonstra-se que no SMART o medicamento isolado que mais aumenta a frequência total de manchas e, portanto apresentou maiores efeitos mutagênicos e/ou recombinogênicos, foi a 3TC, seguido pelo Combivir e TDF. O EFV foi negativo nesse teste. Quando combinados, TDF+3TC induziu maior frequência total de manchas quando comparado com o Combivir+EFV.

No Ensaio Cometa com *D. melanogaster*, apesar do Índice de Dano (ID) ser bem próximo, quando isolados, de maneira geral, os medicamentos que mais causaram danos no DNA foram: Combivir, TDF, 3TC e EFV. O combinado TDF+3TC causou mais dano ao DNA do que Combivir+EFV.

No Ensaio Cometa com medula óssea de camundongos os dois combinados foram negativos em todas as concentrações testadas para os dois tempos (24 e 48 horas).

No teste do MN, Combivir+EFV induziram mais EPCMN do que TDF+3TC nos dois tempos testados, portanto apresentou maior efeito mutagênico. Contrariamente, a razão EPC/NPC foi maior no combinado TDF+3TC, indicando maior potencial mitogênico desse combinado, nos dois tempos testados.

Com os resultados obtidos nesse estudo espera-se ampliar o conhecimento a respeito da atividade tóxica e genotóxica dessas combinações para que se trace um panorama mais amplo no que se refere aos possíveis efeitos secundários produzidos por essas terapias combinadas, visto que, é fundamental analisar constantemente o custo-benefício de medicamentos de uso frequente e de longa duração para oferecer informação a respeito da segurança para a saúde humana, auxiliando na garantia da qualidade de vida dos pacientes que fazem uso de antirretrovirais.

## REFERÊNCIAS

- ADAMS, M. D. *et al.* *The genome sequence of Drosophila melanogaster.* **Science**, v. 287, p. 2185-95, 2000.
- 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.
- ANDERSON, P. L. *et al.* *Antiviral dynamics and sex differences of zidovudine and lamivudine triphosphate concentrations in HIV-infected individuals.* **AIDS**, v. 17, p. 2159-68, 2003.
- 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**. Edição Única. 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.
- ANDRÉ-SCHMUTZ, A. *et al.* *Genotoxic signature in cord blood cells of newborns exposed in utero to a zidovudine-based antiretroviral combination.* **J Infec Dis**, v. 208, p. 235-43, 2013.
- ATTIA, S. M. *et al.* *Genotoxic evaluation of chloroacetonitrile in murine marrow cells and effects on DNA damage repair gene expressions.* **Mutagenesis**, v. 29, p. 55-62, 2013.
- ÁVALOS, A. *et al.* *In vivo genotoxicity assesment of silver nanoparticles of different sizes by the Somatic Mutation and Recombination Test (SMART) on Drosophila.* **Food and Chemical Toxicology**, 2015.
- BAAR, M. P. *et al.* *Effects of apricitabine and other nucleoside reverse transcriptase inhibitors on replication of mitochondrial DNA in HepG2 cells.* **Antiviral research**, v. 76, p. 68-74, 2007.
- BARBIER, O. *et al.* *3'-Azido-3'-deoxythymidine (AZT) is glucuronidated by human UDP-glucuronosyltransferase 2B7 (UGT2B7).* **Drug Metab Dispos**, v. 28, p. 497-502, 2000.

BARDITCH-CORVO, P. *et al.* Phase I/II trial of the pharmacokinetics, safety, and antiretroviral activity of tenofovir disoproxil fumarate in human immunodeficiency virus-infected adults. ***Antimicrobial agentes and chemotherapy***, v. 45, p. 2733-9, 2001.

BAYRAM, S.; TOPAKTAS, M. Confirmation of the Chromosome Damaging Effects of Lamivudine in In Vitro Human Peripheral Blood Lymphocytes. ***Environ Mol Mutagen***, v. 49, p. 328-33, 2008.

BECK, R. C. R. *et al.* Validação de método por cromatografia líquida de alta eficiência para determinação da lamivudina e zidovudina em comprimidos. ***Quim. Nova***, v. 30, n. 5, p. 1225-8, 2007.

BENFORD, D. J. *et al.* Biomarkers as predictive tools in toxicity testing. ***Altern. Lab. Anim.***, v. 28, p. 119-31, 2000.

BIALKOWSKA, A. *et al.* Oxidative DNA damage in fetal tissues after transplacental exposure to 3'-azido-3'-deoxythymidine (AZT). ***Carcinogenesis***, v. 21, p. 1059-62, 2000.

BIER, E. *Drosophila*, the golden bug, emerges as a tool for human genetics. ***Nat Rev Genet.***, v. 6, p. 9-23, 2005.

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

BISHOP, J. B. *et al.* Genetic damage detected in CD-1 mouse pups exposed perinatally to 3'-azido-3'-deoxythymidine and dideoxyinosine via maternal dosing, nursing, and direct gavage. ***Environ. Mol. Mutagen.***, v. 43, p. 3-9, 2004.

BISSET, L. R. *et al.* Combined effect of zidovudine (ZDV), lamivudine (3TC) and abacavir (ABC) antiretroviral therapy in suppressing in vitro FIV replication. ***Antiviral Research***, v. 53, p. 35-45, 2002.

BONASSI, S. *et al.* An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. ***Carcinogenesis***, v. 28, p. 625-31, 2007.

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. 355-61, 1998.

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

\_\_\_\_\_. *Studies on genotoxicity and carcinogenicity of antibacterial, antiviral, antimalarial and antifungal drugs.* **Mutagenesis**, p. 1-27, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Disponível em: <<http://www.aids.gov.br/pagina/aids-no-brasil>>. Acesso em: 20 set. 2016a.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. Disponível em: <<http://www.aids.gov.br/pagina/o-que-e-aids>>. Acesso em: 20 set. 2016b.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. Disponível em: <<http://www.aids.gov.br/pagina/quais-sao-os-antirretrovirais>> Acesso em: 20/09/2016c.

BRENNAN, L. J. *et al.* Disruption of redox homeostasis leads to oxidative DNA damage in spermatocytes of *Wolbachia*-infected *Drosophila simulans*. **Insect. Mol. Biol.**, v. 21, p. 510-20, 2012.

BROWN, K. C.; PAUL, S.; KASHUBA, A. D. M. Drug interactions with new and investigational antiretrovirals. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 48, n. 4, p. 211-41, 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.

BUTT, A. A. *et al.* Risk of heart failure with human immunodeficiency virus in the absence of prior diagnosis of coronary heart disease. **Arch Intern Med.**, v. 171, p. 737-43, 2011.

CARMONA, E. R.; CREUS, A.; MARCOS, R. Genotoxicity testing of two lead-compounds in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Mutation Research**, v. 724, p. 35-40, 2011.

CARMONA, E. R. *et al.* Proposal of an In Vivo Comet Assay Using Haemocytes of *Drosophila melanogaster*. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 52, p. 165-9, 2011.

CARR, A.; COOPER, D. A. Adverse effects of antiretroviral therapy. **The Lancet.**, v. 356, p. 1423-30, 2000.

CARTER, M. M. *et al.* *Relative mutagenic potencies of several nucleoside analogs, alone or in drug pairs, at the HPRT and TK loci of human TK6 lymphoblastoid cells.* **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 48, p. 239-47, 2007.

CARVALHO, T. H. F.; LOPES, O. U. O emprego de camundongo geneticamente modificado como modelo de estudo para doenças cardiovasculares. In: X Simpósio Brasileiro de Fisiologia Cardiovascular. **Medicina Ribeirão Preto (online)**, v. 39, n. 1, p. 110-6, 2006.

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).

CHIAPETTA, D. A. *et al.* *Efavirenz-loaded polymeric micelles for pediatric anti-HIV pharmacotherapy with significantly higher oral bioavailability.* **Nanomedicine**, v. 5, n. 1, p. 11-23. Disponível em: <<http://www.futuremedicine.com/doi/full/10.2217/nnm.09.90>>. Acesso em: 27 jul. 2015.

CHIAPPINI, E. *et al.* *Pediatric Human Immunodeficiency Virus infection and cancer in the Highly Active Antiretroviral Treatment (HAART) era.* **Cancer Lett.**, v. 28, n. 347, p. 38-45, 2014.

CHORILLI, M.; MICHELIN, D. C.; SALGADO, H. R. N. Animais de laboratório: o camundongo. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, n. 1, p. 11-23, 2007.

CHUNG, H. W.; KANG, S. J.; KIM, S. Y. *A combination of the micronucleus assay and a FISH technique for evaluation of the genotoxicity of 1,2,4-benzenetriol.* **Mutation Research**, v. 516, p. 49-56, 2002.

CIHLAR, T. *et al.* *Tenofovir exhibits low cytotoxicity in various human cell types: comparison with other nucleoside reverse transcriptase inhibitors.* **Antiviral Research**, v. 54, p. 37-45, 2002.

CLOAD, P. A. *A review of the pharmacokinetics of zidovudine in man. Journal of Infection*, v. 18, p. 15-21, 1989.

COLLINS, A. R. *Measuring oxidative damage to DNA and its repair with the comet assay. Biochim Biophys Acta*. v. 1840, p. 794-800, 2014.

COLLINS, A. *et al. The comet assay as a tool for human biomonitoring studies: the ComNet project. Mutat. Res.*, v. 759, p. 27-39, 2014.

CRETTON, E. M. *et al. Pharmacokinetics of 3'-azido-3'-deoxythymidine and its catabolites and interactions with probenecid in rhesus monkeys. Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 35, n. 5, p. 801-7, 2007.

DECLERCQ, E. *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.

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

DECORDIER, I.; CUNDARI, E.; KIRSCH-VOLDERS, M. *Survival of aneuploid, micronucleated and/or polyploid cells: Crosstalk between ploidy control and apoptosis. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, v. 651, p. 30-9, 2008.

DECORDIER, I. *et al. Elimination of micronucleated cells by apoptosis after treatment with inhibitors of microtubules, Mutagenesis*, v. 17, p. 337-44, 2002.

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.

DESAI, V. G. *et al. Effect of short-term exposure to zidovudine (AZT) on the expression of mitochondria-related genes in skeletal muscle of neonatal mice. Mitochondrion*, v. 9, p. 9-16, 2009.

DHAWAN, A.; BAJPAYEE M.; PARMAR, D. *Comet assay: a reliable tool for the assessment of DNA damage in different models. Cell Bio Toxicol*, v. 25, p. 5-32, 2009.

DING, G. R.; NAKAHARA, T.; MIYAKOSHI, J. *Induction of kinetochore-positive and kinetochore-negative micronuclei in CHO cells by ELF magnetic fields and/or X-rays. **Mutagenesis***, v. 18, p. 439-43, 2003.

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.

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.

ENTESHAMI, 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.

ERDTMANN, B. A genotoxicidade nossa de todos os dias. In: SILVA, J.; ERDTMANN, B.; PÊGAS-HENRIQUE, J. A. **Genética Toxicológica**. Porto Alegre: Ed. Alcance, 2003. p. 23-47.

ESCOBAR, P. A. *et al. Genotoxicity assessed by the comet and GPA assays following in vitro exposure of human lymphoblastoid cells (H9) or perinatal exposure of mother child pairs to AZT or AZT-3TC. **Environmental and Molecular Mutagenesis***, v. 48, p. 330-43, 2007.

FAIRBAIRN, D. W.; OLIVE, P. L.; O'NEIL, K. L. *The comet assay: a comprehensive review. **Mutation Research***, v. 339, p. 37-59, 1995.

FESTING, M. F. W. *et al. Reducing the use of laboratory animals in biomedical research: problems and possible solutions. **Altern. Lab. Anim.***, v. 26, p. 283-301, 1998.

FONSECA, C. A; PEREIRA, D. G. Aplicação da genética toxicológica em planta com atividade medicinal. **Infarma**, v. 16, p. 7-8, 2004.

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.; 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.

FREIRE-MAIA, N.; PAVAN, C. Introdução ao estudo da drosófila. *Cultus*, v. 1, n. 1, 1949.

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.

GAIVÃO, I.; SIERRA, M. *Drosophila comet assay: insights, uses and future perspectives. Frontiers in Genetics*, v. 5, p. 1-8, 2014.

GALLANT, J. E.; DERESINSKI, S. *Tenofovir Disoproxil Fumarate. Clin Infect Dis.*, v. 37, n. 7, p. 944-50, 2003.

GALLANT, J. E. *et al. Tenofovir DF, Emtricitabine, and Efavirenz vs. Zidovudine, Lamivudine, and Efavirenz for HIV. N Engl J Med*, v. 354, p. 251-60, 2006.

GATEHOUSE, D. G. *et al. Bacterial mutation assays. In: KIRKLAND, D. J. Basic mutagenicity tests: UKEMS recommended procedures. New York, Cambridge University Press (Ed.), 1990. p. 13-61.*

GODARD, A. L. B. **O camundongo como modelo animal de patologia humana.**

Disponível em: <<https://www.ufmg.br/proex/cpinfo/educacao/docs/02i.pdf>>. Acesso em: 25 jul. 2015.

GOLDSCHALK, R. W. *et al. DNA-repair measurements by use of the modified comet assay: an inter-laboratory comparison within the European Comet Assay Validation Group (ECVAG). Mutat. Res.*, v. 757, p. 60-7, 2013.

GONZALEZ CID, M.; LARRIPA, I. *Genotoxic activity of azidothymidine (AZT) in in vitro systems. Mutat. Res.*, v. 321, p. 113-8, 1994.

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.; VAN SCHAIK, N. *Improved high bioactivation cross for the wing somatic mutation and recombination test in Drosophila melanogaster*. **Mutat. Res.**, v. 271, p. 59-67, 1992.

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

GUANGGANG, X. *et al.* *Carbamate insecticide methomyl confers cytotoxicity through DNA damage induction*. **Food Chem Toxicol.**; v. 53, p. 352-8, 2013.

**GUIDELINES FOR THE USE OF ANTIRETROVIRAL AGENTS IN HIV-1-INFECTED ADULTS AND ADOLESCENTS**. Washington, D.C.: **Department of Health and Human Services**. Disponível em: <<http://AIDSinfo.nih.gov/guidelines>>. Acesso em: 19 jul. 2015.

GUIMARÃES, N. N. **Estudo tóxico genético de combinações de antirretrovirais inibidores nucleosídeos da transcriptase reversa**. Tese. Programa de Pós-Graduação em Biologia da Universidade Federal de Goiás, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2013.

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.

GUIMARÃES, N. N. *et al.* *Comparative analysis of genetic toxicity of antiretroviral combinations in somatic cells of Drosophila melanogaster*. **Food and Chemical Toxicology**, v. 53, p. 299-309, 2013.

HARTMANN, A. *et al.* *Use of the alkaline in vivo Comet assay for mechanistic genotoxicity investigations*. **Mutagenesis**, v. 19, p. 51-9, 2004.

HARTMANN, A. *et al.* *Use of the alkaline comet assay for industrial genotoxicity screening: comparative investigation with the micronucleus test*. **Food and Chemical Toxicology**, v. 39, p. 843-58, 2001.

HAWKINS, T. *Understanding and managing the adverse effects of antiretroviral therapy*. **Antiviral Res**, v. 85, p. 201-9, 2010.

HAYASHI, M. *et al.* *In vivo rodent erythrocyte micronucleus assay. Some aspect of protocol design including repeated treatments, integration with toxicity testing and automated scoring.* ***Environmental and Molecular Mutagenesis***, v. 35, p. 234-52, 2000.

HECHT, M. *et al.* *Cytotoxic effect of efavirenz is selective against cancer cells and associated with the cannabinoid system.* ***AIDS***, v. 27, p. 2031-40, 2013.

HEDDLE, J. A. *A rapid in vivo test for chromosomal damage.* ***Mutation Research***, v. 18, p. 187-90, 1973.

HERD, O. *et al.* *The Effect of HIV and Antiretroviral Therapy on Chromosomal Radiosensitivity.* ***AIDS Clin Res***, v. 5, p. 1-6, 2014.

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.

Ji, H. J. *et al.* *Cyclic induction of senescence with intermittent AZT treatment accelerates both apoptosis and telomere loss.* ***Breast Cancer Res. Treat.***, v. 93, p. 227-36, 2005.

JOHANSSON, M. *et al.* *Cloning and Characterization of the Multisubstrate Deoxyribonucleoside Kinase of Drosophila melanogaster.* ***The Journal of biological chemistry***, v. 274, p. 23814-9, 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.

KOKSAL, P. M.; GURBUZEL, M. *Analysis of genotoxic activity of ketamine and rocuronium bromide using the somatic mutation and recombination test in Drosophila melanogaster.* ***Environmental Toxicology and Pharmacology***, v. 39, n. 2, p. 628-34, 2015.

KORNBERG, T. B.; KRASNOW, M. A. *The Drosophila genome sequence: implications for biology and medicine.* ***Science***, v. 287, p. 2218-20, 2000.

KRAYNAK, A. R. *et al.* Alkaline comet assay in liver and stomach, and micronucleus assay in bone marrow, from rats treated with 2-acetylaminofluorene, azidothymidine, cisplatin, or isobutyraldehyde. **Mutatio Research/ Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 786-8, p. 77-86, 2015.

KRISHNA, G.; HAYASHI, M. *In vivo* rodent micronucleus assay: Protocol, conduct and data interpretation. **Mutation Research**, v. 455, p. 155-66, 2000.

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.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica**. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 1995. p. 839.

LENZ S. *et al.* *Drosophila* as a screening tool to study human neurodegenerative diseases. **J. Neurochem.**, v. 127, p. 453-60, 2013.

LLOYD, T. E.; TAYLOR, J. P. *Flightless Flies: Drosophila models of neuromuscular disease*. **Ann N Y Acad Sci.**, v. 1184, p. 1-20, 2010.

LOEWE, S. Antagonism and antagonist. **Pharmacol. Rev.**, v. 9, p. 237-42, 1957.

LOURENÇO, E. D. *et al.* Micronuclei induced by reverse transcriptase inhibitors in mononucleated and binucleated cells as assessed by the cytokinesis-block micronucleus assay. **Genetics and Molecular Biology**, v. 33, p. 756-60, 2010.

MAFFEI, F. *et al.* Biomarkers to assess the genetic damage induced by alcohol abuse in human lymphocytes. **Mutation Research**, v. 514, p. 49-58, 2002.

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.

MILLER, C. J. *et al.* Adjudicated Morbidity and Mortality Outcomes by Age among Individuals with HIV Infection on Suppressive Antiretroviral Therapy. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, 2014.

MORAES FILHO, A. V. **Estudo da toxicidade genética de Efavirenz (EFV) e Fumarato de Tenofovir Desoproxila (TDF) em células somáticas de *Drosophila melanogaster*.**

Dissertação. Programa de Pós-Graduação em Biologia da Universidade Federal de Goiás, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2013.

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.

NUNES, W. B. **Avaliação do potencial mutagênico e/ou recombinogênico do algodãozinho do campo em células somáticas e germinativas de D. melanogaster.** Dissertação. Programa de Pós-Graduação em Biologia da Universidade Federal de Goiás, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2000.

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.

OGIWARA, Y. *et al. Evaluation of the repeated-dose liver, bone marrow and peripheral blood micronucleus and comet assays using kojic acid. Mutatio Research/ Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, v. 780-1, p. 111-6, 2015.

OLIVEIRA, H. M. *et al. Effect of antirretroviral drugs on the DNA damage in mice. Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 37, p. 390-5, 2014.

OLIVERO, A. *et al. Human inter-individual variability in metabolism and genotoxic response to zidovudine. Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 228, p. 158-64, 2008.

OLIVERO, O. A. *et al. Perinatal exposure of patas monkeys to antirretroviral nucleoside reverse-transcriptase inhibitors induces genotoxicity persistent for up to 3 years of age. J Infect Dis.*, v. 208, p. 244-8, 2013.

PANDEY U. B.; NICHOLS, C. D. *Human Disease Models in Drosophila melanogaster and the Role of the Fly in Therapeutic Drug Discovery. Pharmacol Rev.*, v. 63: p. 411-36, 2011.

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.

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

POZNIAK, A. L. *et al.* Tenofovir Disoproxil Fumarate, Emtricitabine, and Efavirenz Versus Fixed-Dose Zidovudine/Lamivudine and Efavirenz in Antiretroviral-Naive Patients Virologic, Immunologic, and Morphologic Changes—A 96-Week Analysis. **J Acquir Immune Defic Syndr**, v. 43, 2006.

RABELO-GAY, M. N. Teste do Micronúcleo em medula óssea. In: RABELO-GAY, M. N.; RODRIGUES, M. A. L. R.; MONTELEONE-NETO, R. **Mutagênese, carcinogênese e teratogênese: métodos e critérios de avaliação**. Ribeirão Preto: FCA, 1991. 246 p.

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.

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

RAMAKRISHNAN, R.; JUSKO, W. J. Interactions of aspirin and salicylic acid with prednisolone for inhibition of lymphocyte proliferation. **Inter. Immunophar.**, v. 1, n. 12, p. 2035-42, 2001.

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.

RIBAUDO, H. J. *et al.* Pharmacogenetics of plasma efavirenz exposure after treatment discontinuation: an adult AIDS clinical trials group study. **Clin Infect Dis.**, v. 42, p. 401-7, 2006.

RIBEIRO, L. R. Teste do micronúcleo em medula óssea de roedores *in vivo*. In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. **Mutagênese ambiental**. Canoas: ULBRA, 2003. p. 173-200.

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

RIM, K-T.; KIM, S-J. *A Review on Mutagenicity Testing for Hazard Classification of Chemicals at Work: Focusing on in vivo Micronucleus Test for Allyl Chloride.* **Safety and Health at Work**, 2015.

SANTOS, B. F. Criação e manejo de camundongos. In: ANDRADE, A.; PINTO, S. C.; OLIVEIRA, R. S. **Animais de laboratório: criação e experimentação.** Rio de Janeiro: Fiocruz, 2002. p. 115-8.

SANTOS, J. L. *et al.* Avaliação da atividade mutagênica da talidomida pelo teste de ames. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 4, n. 2, p. 154-8, 2007.

SCHILLING, B. E. *et al.* The nonclinical toxicologic profile of stavudine. **Current Therapy Research**, v. 56, p. 201-18, 1995.

SCHLEGEL, R.; MACGREGOR, J. T. *The persistence of micronucleated erythrocytes in the peripheral circulation of normal and splenectomized Fischer 344 rats Implications for cytogenetic screening.* **Mutation Research**, v. 127, p. 169-74, 1984.

SHAFIK, H. M.; NOKTA, M. A.; POLLARD, R. B. *Recombinant human interferon beta ser protects against zidovudine-induced genetic damage in AIDS patients.* **Antiviral Research**, v. 16, p. 205-12, 1991.

SIDDIQUE, H. R. *et al.* Genotoxicity of industrial solid waste leachates in *Drosophila melanogaster*. **Environ Mol Mutagen.**, v. 46, p. 189-97, 2005.

SILVA, E. J. **Avaliação dos efeitos genotóxicos de agrotóxicos: risco ocupacional e alimentar.** Dissertação. Programa de Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente da Universidade Federal de Pernambuco, Universidade Federal de Pernambuco, Vitória de Santo Antão, 2012.

SILVA, J. *et al.* **Genética Toxicológica.** Porto Alegre: Alcance, 2003. p. 193-4.

SINGH, N. P. *et al.* A simple technique for quantitation o flow levels of DNA damage in individual cells. **Exp Cell Res.** v. 175, p. 184-91, 1998.

SOBELS, F. H.; VOGEL, E. *The capacity of Drosophila for detecting relevant genetic damage.* **Mutat Res.**, v. 41, p. 95-106, 1976.

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.

TINTORI, C. *et al.* Protein-protein interactions and human cellular cofactors as new targets for HIV therapy. **Curr Opin Pharmacol**, v. 18, p. 1-8, 2014.

TRIPATHI, V. N. *et al.* Use of the alkaline comet assay for the detection of transplacental genotoxins in newborn mice. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 653, p. 134-9, 2008.

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.

UNAIDS. Disponível em:

<[http://www.unaids.org.br/documentos/UNAIDS\\_GR2012\\_em\\_en.pdf](http://www.unaids.org.br/documentos/UNAIDS_GR2012_em_en.pdf)>. Acesso em: 27 jul. 2016. (2016a).

\_\_\_\_\_. Disponível em:

<[http://www.unaids.org.br/documentos/Treatment\\_Report\\_2015.pdf](http://www.unaids.org.br/documentos/Treatment_Report_2015.pdf)>. Acesso em: 28 jul. 2015. (2016b).

VILLELA, I. V. *et al.* Bioensaios para o monitoramento de genotoxicidade ambiental. In: SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J. A. P. **Genética Toxicológica**. Porto Alegre: Alcance, 2003. p. 158-61.

VOGEL, E. W. **Introduction into Basic Principles of Genetic Toxicology**. Netherlands: Leinden, 1989.

VON TUNUNGEN, L. S. *et al.* Frequency of *Tk* and *Hprt* lymphocytemutants and bone marrow micronuclei in mice treated neonatally with zidovudine and didanosine. **Mutagenesis**, v. 19, p. 307-11, 2004.

VON TUNGEN, L. S. *et al.* Frequency of *Tk* and *Hprt* lymphocyte mutants and bone marrow micronuclei in B6C3F<sub>1</sub>/*Tk*+/- mice treated with zidovudine and lamivudine. **Carcinogenesis**, v. 23, p. 1427-32, 2002.



VON TUNGELN, L. S. *et al.* *Transplacental drug transfer and frequency of Tk and Hprt lymphocyte mutants and peripheral blood micronuclei in mice treated transplacentally with Zidovudine and Lamivudine.* ***Environmental and Molecular Mutagenesis***, v. 48, p. 258-69, 2007.

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.

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.

XING-LEI, F. *et al.* *Genetic toxicity of tenofovir dipivoxil fumarate.* ***Chinese Journal of Antibiotics***, 2011.

YUEN, G. J. *et al.* *Pharmacokinetics, Absolute Bioavailability, and Absorption Characteristics of Lamivudine.* ***The Journal of Clinic Pharmacology***, v. 35, n. 12, p. 1174-80, 1995.