



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

VICKELINE NAMBA

**GENOTOXICIDADE E INDUÇÃO DE APOPTOSE POR
FLUCONAZOL EM CÉLULAS DE MAMÍFEROS *IN VITRO***

Londrina
2011

VICKELINE NAMBA

**GENOTOXICIDADE E INDUÇÃO DE APOPTOSE POR
FLUCONAZOL EM CÉLULAS DE MAMÍFEROS *IN VITRO***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Ilce Mara de Syllos Cólus

Londrina
2011

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

N174g Namba, Vickeline.

Genotoxicidade e indução da apoptose por Fluconazol em células de mamíferos in vitro / Vickeline Namba. – Londrina, 2011.

54 f. : il.

Orientador: Ilce Mara de Syllos Cólus.

Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, 2011.

Inclui bibliografia.

VICKELINE NAMBA

**GENOTOXICIDADE E INDUÇÃO DE APOPTOSE POR FLUCONAZOL
EM CÉLULAS DE MAMÍFEROS *IN VITRO***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a Dr^a Ilce Mara de Syllos Cólus
UEL – Londrina – PR

Prof. Dr. Fábio Vieira dos Santos
Universidade Federal São João del Rei

Prof. Dr. Mário Sérgio Mantovani
UEL – Londrina – PR

Londrina, 07de janeiro de 2011.

DEDICATÓRIA

...A meus pais, Tiyoko e Cláudio. Sempre presentes, apoiando em todos os momentos de minha vida. Mais uma etapa vencida! Agradeço o amor e compreensão recebidos. Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

A Deus. Conflitos envolvendo religião e ciência são comuns quando ambas tentam explicar um mesmo fenômeno. Um pesquisador tende a ser um tanto cético, duvidando de tudo que não possa ser provado. Porém, é interessante o comportamento das pessoas quando os experimentos dão errado: geralmente rezam para que Deus e todos os Santos os ajudem em momentos de desespero no laboratório. Se há intervenção divina, ou não, as coisas parecem melhorar depois de orar! Portanto, agradeço todas as dádivas recebidas dele.

A orientadora, Ilce Mara de Syllos Cólus. Professor não é uma profissão, é um dom, no qual se tem a difícil tarefa de ensinar um aluno. Digo difícil, pois apenas alguns sabem transmitir a informação para que haja realmente um aprendizado. Assim, você conseguiu passar ensinamentos que ficarão para vida acadêmica, bem como para vida pessoal. Obrigada por tudo!

A banca. Por compreender a situação e sacrificar o recesso de fim de ano a fim de ler e dar contribuições para a melhora deste trabalho.

Ao professor Mário Sérgio Mantovani. Obrigado por ceder a linhagem celular HTC e sempre estar colaborando com a utilização de equipamentos de seu laboratório.

À professora Marialba Alves Avezum pela parceria no projeto envolvendo o antifúngico Fluconazol.

À professora Eiko Nakagawa. A utilização do espectrofotômetro foi essencial para podermos conduzir os experimentos de citotoxicidade.

Aos técnicos Dário e Melyssa pela disposição em ajudar-nos quando precisamos.

À Sueli, secretária da pós-graduação, pela paciência a perguntas impertinentes dos alunos.

À pós graduação em Genética e Biologia Molecular pelo suporte e qualidade de ensino.

Aos órgãos de fomento CAPES, CNPq e Fundação Araucária pelo suporte financeiro, sem os quais não seria possível o desenvolvimento dessa pesquisa.

À Priscila Matos, Priscilla Cardoso, Manoela e Mariana, ex-integrantes do laboratório, que iniciaram minha aprendizagem nos experimentos de mutagênese.

Aos colegas de laboratório Heloísa, Lucas, Milene, Lara, Maressa, André, Thamile, Adeline, Rossana e Valéria pelo auxílio em experimentos e manter sempre um clima agradável de trabalho. Formamos uma boa equipe!

A Dani. Essa menina super querida, inteligente e com disposição para ajudar todos no laboratório. Obrigada pela amizade e força na fase final do mestrado!

A família, pai e mãe, pessoas que merecem todo respeito e gratidão. Nossa relação não é simplesmente de pais e filhos, é uma relação de amizade e respeito mútuo, o qual me faz admirar e seguir seus passos. Incentivos para continuar uma carreira acadêmica não faltaram. Pai, é o princípio, mas estou chegando lá!

Ao Leonardo G. Androcioli, ao melhor acontecimento durante o mestrado! Amizade, cumplicidade e respeito são o tripé essencial em um relacionamento, posso dizer convictamente que possuímos todas! Aprendi o dom da paciência contigo, o que foi muito útil na fase final do mestrado. Obrigada por me auxiliar nos toques finais dessa dissertação! Sei que posso contar com você pra tudo, meu amor!

Aos amigos. Um trabalho não envolve somente pessoas que participaram diretamente, mas diversão e festas são necessárias para o bom andamento do mesmo. Por isso, agradeço a Edihanne, Juceli, Gláucia, Carina, Bruna, Luana, Virgínia e Leonardo Ribeirinho por serem amigos e parceiros nas comemorações de cada acontecimento durante esses dois anos.

Agradeço também aquelas pessoas que, mesmo não conhecendo, contribuíram para a realização deste trabalho, pois —cada vida afeta a outra, e a outra afeta a seguinte, e que no mundo está cheio de histórias, mas todas as histórias são uma só (Mitch Albom).

Muito obrigada!

*Grandes realizações não são feitas por impulsos,
mas por uma soma de pequenas realizações.
(Vicent van Gogh)*

NAMBA, Vickeline. **Avaliação da citotoxicidade, mutagenicidade e apoptose em células de mamíferos expostas ao antifúngico Fluconazol**. 2011. 54 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2011.

RESUMO

O Fluconazol é um antifúngico amplamente prescrito para combater candidíase e dermatomicoses, além de ser usado como medida profilática em transplantados, imunodeprimidos e pessoas com câncer. Apesar desse antimicótico já ser comercializado, é necessário farmacovigilância, que consiste em verificar efeitos prejudiciais dos medicamentos, visando prevenir possíveis danos aos seres humanos. No presente estudo, foram avaliadas 10 diferentes concentrações do Fluconazol para se determinar sua citotoxicidade e as concentrações a serem utilizadas nos experimentos posteriores. Esta avaliação foi realizada em uma linhagem de células de ovário de hamster Chinês (CHO-K1) e na linhagem de hepatoma de *Rattus norvegicus* (HTC), utilizando o teste MTT. As concentrações de 0,781, 1,5625 e 3,125 µg/mL foram avaliadas por meio do ensaio do cometa, teste do micronúcleo e teste de apoptose. Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente utilizando os testes de Kruskal-Wallis/Dunn para avaliar os dados de citotoxicidade e ANOVA/Tuckey para os demais resultados. O Fluconazol apresentou citotoxicidade para as células CHO-K1 a partir da concentração de 6,25 µg/mL, porém, a citotoxicidade não foi observada para as células HTC. Nas células CHO-K1, o Fluconazol foi genotóxico em todas as concentrações testadas após 24h de tratamento e não induziu mutagênese nem apoptose. O antimicótico apresentou genotoxicidade para a linhagem celular HTC em todas as concentrações testadas após 3h de tratamento, e após 24h de tratamento somente nas concentrações de 1,5625 e 3,125 µg/mL. Entretanto, após 24 horas de tratamento não foi mutagênico, mas induziu apoptose, que pode ter mascarado a formação de micronúcleos. A genotoxicidade e a ausência de mutagenicidade detectadas nas duas linhagens celulares sugerem que o sistema de reparo atuou, impedindo uma possível fixação do dano.

Palavras-chave: Genética molecular. Toxicologia experimental. Testes de mutagenicidade. Farmacogenética.

NAMBA, Vickeline. “**Fluconazole assessment of citotoxicity, mutagenicity and apoptosis in mammalian cells**”. 2011. 54 f. Dissertation (Master’s Degree in Genetics and Molecular Biology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2011.

ABSTRACT

Fluconazole is an antifungal widely prescribed for candidiasis and dermatomycosis treatment, in addition to be used as prophylaxis from transplanted patients, people with a suppressed immune system and with cancer. Despite this antimycotic be already commercialized, it is necessary pharmacovigilance, that consists in verify harmful effects of medicaments in order to prevent possible damage to humans. In present study, it was evaluated 10 different concentrations of Fluconazole to determine its citotoxicity and the concentrations to be evaluated in future tests. This evaluation was realized in Chinese hamster ovary cells (CHO) and *Rattus norvegicus* hepatoma (HTC), using MTT test. 0.781 µg/mL, 1.5625 µg/mL and 3.125 µg/mL concentrations were evaluated by comet assay, micronucleus test and apoptosis test. The results obtained were analyzed statistically using Kruskal-Wallis/Dunn’s test for citotoxicity data and ANOVA/Tuckey for the others data. Fluconazole showed citotoxicity at concentrations above 6.25 µg/mL in CHO-K1 cells, but no citotoxicity were observed in HTC cells. In CHO-K1 cells, Fluconazole was genotoxic in all tested concentrations after 24 hour of treatment and it neither induced mutagenesis nor apoptosis. The antimicotic was genotoxic for HTC line in all tested concentrations after 3 hours of treatment; and after 24 hours of treatment, only at 1.5625 e 3.125 µg/mL. Nevertheless, it was not mutagenic after 24 hours treatment, but it induced apoptosis, that could have masked micronucleus formation. Genotoxicity and the absent of mutagenicity detected for both cell lines suggest that repair system had operated, preventing a possible fixation of the damage.

Keywords: Molecular genetics. Mutagenicity testing.

LISTA DE FIGURAS

1 INTRODUÇÃO

- Figura 1** – Estrutura química do Fluconazol. (SULLIVAN et al., 2005).....15
- Figura 2** – Biossíntese de fitoesteróis, ergosterol e hormônios esteróides sexuais. Setas indicam uma ou mais reações enzimáticas. Reações catalisadas pela enzima 14 α - desmetilase (1) e aromatase (2) são indicadas. (ZARN et al., 2003).16
- Figura 3** – Perfil metabólico de indivíduos com diferentes polimorfismos em enzimas metabolizadoras. (METZGER et al., 2006)17
- Figura 4** – Ensaio do MTT em placa de 96 poços.22
- Figura 5** – Classes do cometa em células HTC: a- classe 0; b- classe 1; c- classe 2; d-classe 3. Aumento de 40X.23
- Figura 6** – Células HTC binucleadas: a- sem micronúcleo; b- com micronúcleo. Aumento de 40X.24
- Figura 7** – Linfócitos de sangue periférico humano: a- célula mononucleada; b-célula binucleada; c- célula trinucleada; d- célula polinucleada. Aumento de 40X. (CILIÃO, 2010)25
- Figura 8** – Diferenças na coloração de células CHO-K1 após utilização de laranja de acridina e brometo de etídeo. Aumento de 40X. (CÂNDIDO, 2009)26
-
- ### 4 ARTIGO
- Figura 1** – Curvas de viabilidade celular obtidas para as linhagens celulares CHO-K1 e HTC após 24 horas de tratamento.CN: controle negativo.35

LISTA DE TABELAS

1 INTRODUÇÃO

Tabela 1 – Espectro da atividade de diferentes antifúngicos (THOMPSON et al., 2009).	14
---	----

4 ARTIGO

Tabela 1 – Frequência de danos no DNA pelo teste do cometa após 3 e 24 horas de tratamento em células da linhagem CHO-K1.	37
Tabela 2 – Frequência de danos no DNA pelo teste do cometa após 3 e 24 horas de tratamento em células da linhagem HTC.	38
Tabela 3 – Frequências de células micronucleadas (MN) e índice de divisão nuclear obtidas na determinação de mutagenicidade de três concentrações do Fluconazol nas linhagens celulares CHO-K1 e HTC após 24 horas de tratamento.....	39
Tabela 4 – Frequências de células apoptóticas obtidas para as linhagens celulares CHO-K1 e HTC após 24 horas de tratamento com três concentrações do Fluconazol.....	40

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	FUNGOS QUE AFETAM SERES HUMANOS	13
1.2	FLUCONAZOL	14
1.3	MUTAGÊNESE E ANTIFÚGICOS	18
1.4	TESTES <i>IN VITRO</i>	20
1.5	TESTES EM CÉLULAS DE MAMÍFEROS <i>IN VITRO</i>	21
1.5.1	Teste de Citotoxicidade	21
1.5.2	Ensaio do Cometa	22
1.5.3	Teste do Micronúcleo	23
1.5.4	Teste de Apoptose	25
2	JUSTIFICATIVA	27
3	OBJETIVOS	28
3.1	OBJETIVO GERAL	28
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
4	ARTIGO	29
	REFERÊNCIAS	48

1 INTRODUÇÃO

1.1 FUNGOS QUE AFETAM SERES HUMANOS

Os fungos são micro-organismos eucariontes de ampla distribuição e diversidade no ambiente. Estima-se que haja cerca de 1,5 milhão de espécies de fungos habitando nosso planeta, mas menos de 100.000 dessas espécies foram identificadas. Assim, o contato entre seres humanos e fungos é constante e quando o sistema imune humano se encontra deficiente, os fungos encontram um ambiente favorável para sua colonização, podendo ocasionar doenças que, neste caso, são chamadas de micoses oportunistas. As infecções causadas por fungos podem ser classificadas de acordo com o local colonizado: quando abrangem apenas o epitélio são denominadas superficiais; quando se disseminam pelo corpo através da corrente sanguínea geram infecções sistêmicas (SULLIVAN et al., 2005).

Desde o ano 2000 houve um aumento na descoberta de agentes capazes de combater os fungos, mas apenas 15 foram aprovados para uso clínico. Para o tratamento de infecções causadas por esses micro-organismos faz-se o uso de antimicóticos com ação fungistática e fungicida. Esses medicamentos diferem quanto aos espectros de atividade entre as diferentes espécies de fungos (Tabela 1), biodisponibilidade, fórmula e reações colaterais; o que pode acarretar mudanças na administração de cada droga, dependendo do tipo de tratamento usado (THOMPSON et al., 2009).

Tabela 1 – Espectro da atividade de diferentes antifúngicos (THOMPSON et al., 2009).

Organism	AMB	FLU	ITR	POS	VOR	ANI	MFG	CAS	5FC
<i>Aspergillus fumigatus</i>	+	-	+	+	+	+	+	+	-
<i>A flavus</i>	+/-	-	+	+	+	+	+	+	-
<i>A terreus</i>	-	-	+	+	+	+	+	+	-
<i>A niger</i>	+	-	+/-	+	+	+	+	+	-
<i>A nidulans</i>	+	-	+/-	+	+	+	+	+	-
<i>Candida albicans</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>C glabrata</i>	+	+/-	+/-	+	+	+	+	+	+
<i>C krusei</i>	+	-	+/-	+	+	+	+	+	+/-
<i>C tropicalis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>C parapsilosis</i>	+	+	+	+	+/-	+/-	+/-	+	+
<i>C guilliermondii</i>	+	+	+	+	-	-	-	+	+
<i>C lusitaniae</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Cryptococcus spp</i>	+	+	+	+	-	-	-	+	+
Blastomycoses	+	+	+	+	+	+/-	+/-	+/-	-
Histoplasmosis	+/-	+	+	+	+/-	+/-	+/-	-	-
Coccidioidomycosis	+	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>Fusarium spp</i>	+/-	-	-	+	+	-	-	-	-
Phaeohiphomyces	-	+	+	+	+	+	+	-	-
<i>Pichia spp</i>	+	+	+/-	+	+	+	+	+	+
<i>Saccharomyces spp</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Scedosporium apiospermum</i>	+/-	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>Scedosporium prolificans</i>	-	+/-	+/-	-	-	-	-	-	-
<i>Trichosporon spp</i>	+/-	+	+	+	-	-	-	+	+
Zygomycetes	+/-	-	-	+	-	-	-	-	-

(+) atividade antifúngica contra isolado; (-) nenhuma atividade ou atividade limitada contra isolado; (+/-) atividade variável contra isolado.

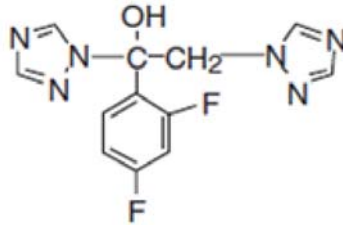
Abreviações: AMB, Anfotericina; FLU, Fluconazol; ITR, Itraconazol; POS, Posaconazol; VOR, Voriconazol; ANI, Anidulafungina; MFG, Micafungina; CAS, Caspofungina; 5FC, Flucitosina.

1.2 FLUCONAZOL

O Fluconazol faz parte do grupo dos triazóis, contendo três átomos de nitrogênio na composição do anel em estrutura química (Figura 1). É eficaz no tratamento de candidíase e dermatomicoses (BENNET, 2006). Como o sistema imunológico de pacientes com câncer e com Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) é menos eficiente do que o de indivíduos saudáveis, a administração deste antifúngico faz-se necessária para evitar micoses que possam acometer essas pessoas (MINAMOTO; ROSENBERG, 1997; JOHANSEN; GOTZSCHE, 2002). Além dessas doenças, o Fluconazol tem sido utilizado para

combater, juntamente com outros medicamentos, a doença de Chagas (BUCKNER, 2008).

Figura 1 – Estrutura química do Fluconazol. (SULLIVAN et al., 2005)

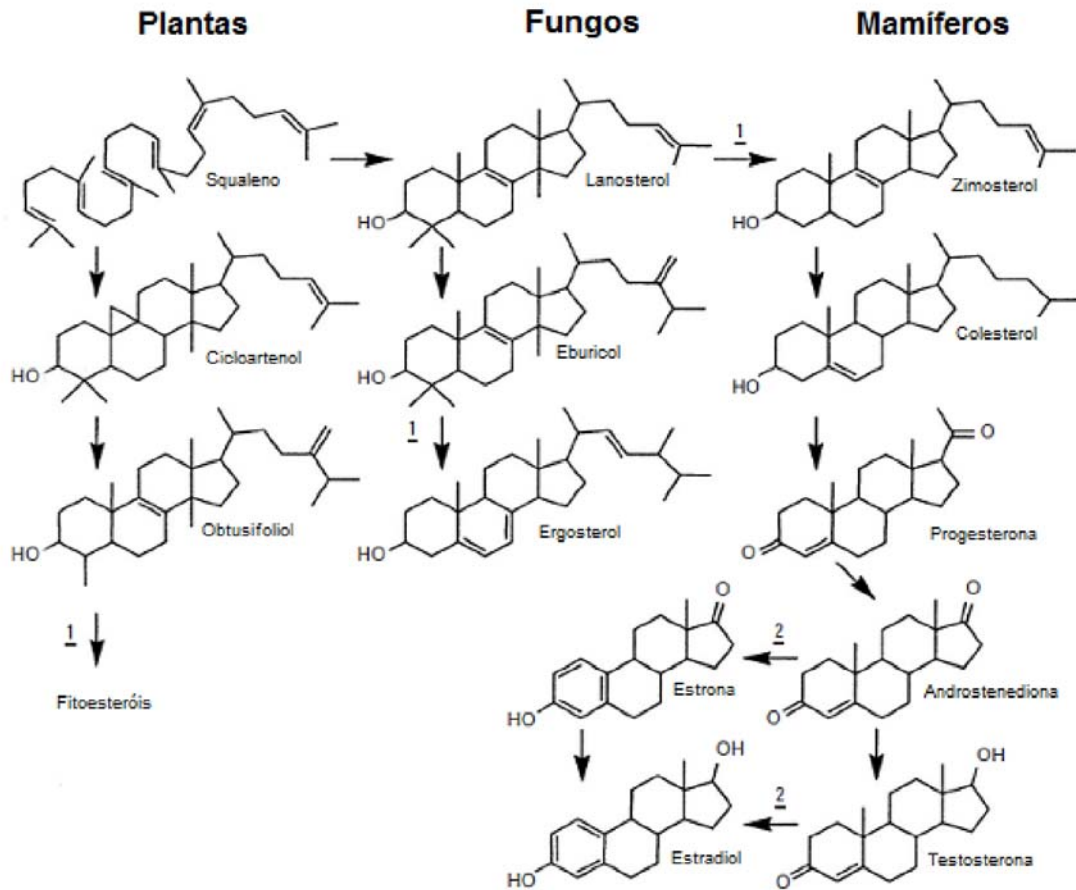


O mecanismo de ação do Fluconazol é baseado na inibição da enzima 14 α -desmetilase que atua em fungos, plantas e mamíferos (Figura 2). Em fungos, essa enzima converte lanosterol em ergosterol (BOSSCHE et al., 1989), alterando a permeabilidade e fluidez da membrana plasmática. Em plantas, participa da biossíntese de fitoesteróis. Em mamíferos, juntamente com a enzima aromatase, participa da via de produção de hormônios esteróides sexuais, influenciando na fertilidade, comportamento sexual e desenvolvimento do órgão reprodutivo em ambos os sexos (ZARN et al., 2003).

Apesar deste fármaco ser utilizado no tratamento de uma gama de doenças, estudos mostram a teratogenicidade deste medicamento em cobaias (FUSIC et al., 2008) por inibir a enzima CYP26, da família CYP-P450, que medeia o catabolismo do ácido retinóico (TIBONI et al., 2009).

Com relação à sua biodisponibilidade, o Fluconazol, após ser ingerido via oral possui uma absorção de mais de 90% quando comparado à via intravenosa. Esse medicamento apresenta boa penetração em todos os fluidos corpóreos humanos: as concentrações na saliva e no escarro são semelhantes às concentrações plasmáticas; na pele, o nível encontrado foi superior a concentrações séricas. No extrato córneo, após quatro meses de administração semanal de uma dose de 150 mg, foram detectados 4,05 $\mu\text{g/g}$ deste antifúngico em unhas saudáveis e 1,8 $\mu\text{g/g}$ em unhas infectadas. Sua excreção acontece por via renal e cerca de 80% do fármaco é encontrado de forma inalterada na urina, sendo aproximadamente 20% metabolizada pelo organismo (PFIZER, 2005).

Figura 2 – Biossíntese de fitoesteróis, ergosterol e hormônios esteróides sexuais. Setas indicam uma ou mais reações enzimáticas. Reações catalisadas pela enzima 14 α - desmetilase (1) e aromatase (2) são indicadas. (ZARN et al., 2003).

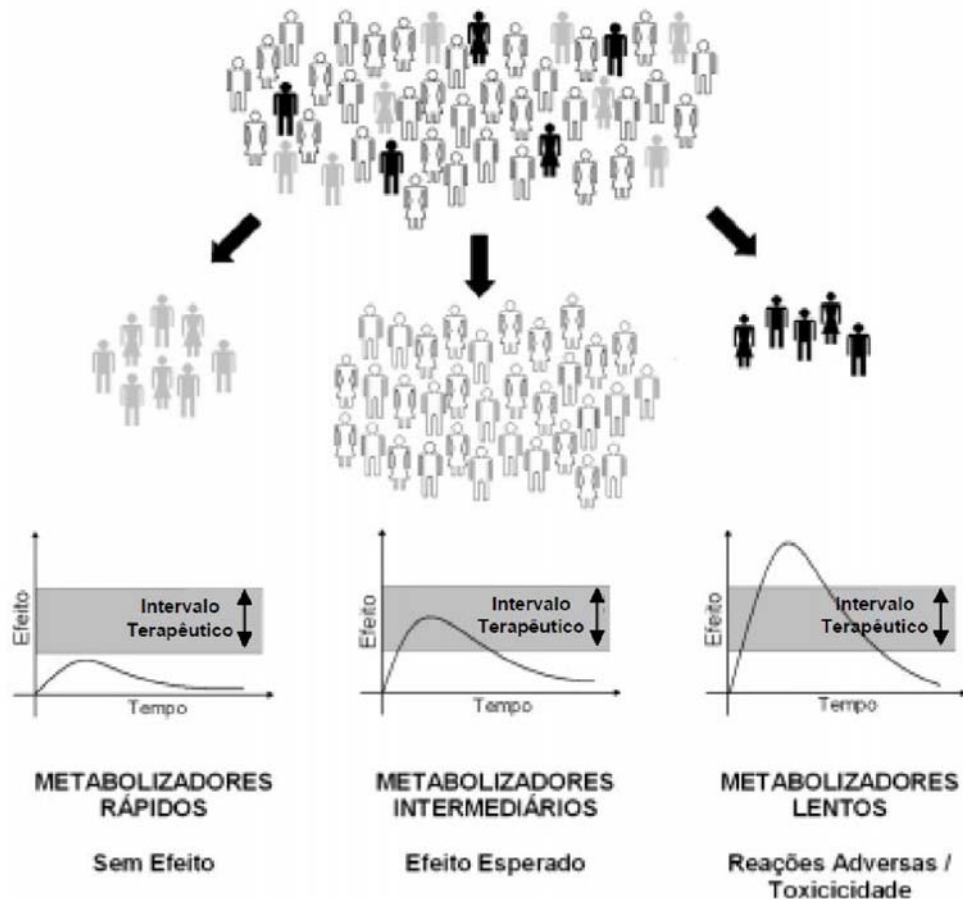


Em geral, os medicamentos são metabolizados por enzimas de Fase I (oxidação, redução e hidrólise) e Fase II (conjugação, acetilação, glucoronidação, sulfatação e metilação), facilitando sua excreção. Estas enzimas de metabolização exibem polimorfismos, que definem o perfil metabólico de cada indivíduo como metabolizadores lentos (diminuição ou ausência da enzima), intermediários (metabolismo normal) e rápidos (aumento na produção da enzima) (Figura 3) (METZGER et al., 2006).

Desse modo, polimorfismos genéticos podem contribuir para respostas diferentes a medicamentos (HOWLAND, 2009). Além disso, as modificações introduzidas pelas enzimas podem aumentar ou diminuir a capacidade dos medicamentos de interagirem com DNA, RNA ou proteínas, o que pode resultar

em morte celular, distúrbios no sistema imune e mutações (GUECHEVA; HENRIQUES, 2003).

Figura 3 – Perfil metabólico de indivíduos com diferentes polimorfismos em enzimas metabolizadoras. (METZGER et al., 2006)



Devido aos polimorfismos frequentes em enzimas de metabolização influenciarem no metabolismo de drogas (PIRMOHAMED; PARK, 2001; VAN PUIJENBROEK et al., 2009), associado ao fato do número amostral de indivíduos utilizados na triagem clínica ser pequeno para a determinação da mais rara RAM (ANVISA, 2003), medicamentos são inseridos no mercado com uma margem de risco, podendo causar danos à saúde humana.

1.3 MUTAGÊNESE E ANTIFÚGICOS

Todos os seres vivos estão expostos a agentes genotóxicos que interagem com o DNA e/ou com seus componentes moleculares, bem como com enzimas relacionadas ao seu metabolismo, causando lesões genômicas.

Esses danos podem ser corrigidos através do sistema de reparo das células, porém, se fixados, tornam-se mutações (DEARFIELD et al., 2002).

O termo mutação se refere a alterações na estrutura gênica, cromossômica ou no número de cromossomos que são transmitidos via divisão celular (SNUSTAD e SIMMONS, 2001). Apesar das mutações estarem geralmente relacionadas a uma série de problemas, elas são essenciais na evolução, pois sem elas não haveria ampla variabilidade genética existente entre os organismos e adaptações ao meio ambiente (ERDTMANN, 2003).

As mutações podem ser originadas de forma espontânea devido a erros metabólicos inerentes à célula ou ser induzidas por agentes químicos, biológicos ou físicos. Mutações que afetam células germinativas podem ser transmitidas para gerações seguintes; já, as que ocorrem nas células somáticas, apresentam papel relevante em doenças crônicas degenerativas, como arteriosclerose e doenças cardiovasculares, além de se relacionarem com processos de carcinogênese (DE FLORA et al., 1996).

É estabelecido que mutações em células somáticas têm um importante papel na iniciação e outros estágios do processo carcinogênico (DE FLORA; FERGUSON, 2005), pois o câncer tem como principal característica o acúmulo de danos genéticos que levam à disfunção de genes responsáveis por manter o correto controle da divisão celular (DIAZ, 2005). Assim, os mecanismos de mutagênese e carcinogênese estão ligados e, apesar da toxicidade genética não ser uma medida de carcinogenicidade, é um indicador para câncer (RIBEIRO; MARQUES, 2003).

Estudos realizados por Auerbach e Robson (1940) mostraram alterações deletérias no DNA de seres humanos induzidas por gás mostarda, alertando o perigo dos agentes químicos como potenciais mutágenos no meio ambiente. Essa e outras preocupações referentes à exposição a agentes químicos e físicos ambientais levaram à formação da Sociedade Americana de Mutagênese (Environmental Mutagen Society) em 1969 e à solicitação da introdução de testes de

mutagenicidade para agentes químicos em 1970. Seis anos mais tarde, a Agência de Proteção Ambiental Americana (EPA) padronizou as avaliações sobre mutagenicidade de compostos químicos e seus efeitos na saúde e ambiente (MACGREGOR et al., 2000). Dessa forma, medicamentos são avaliados com relação à mutagenicidade e constam na literatura análises de alguns antimicóticos.

Romero et al. (1992) avaliaram o potencial mutagênico do antimicótico Sertaconazol através do teste de mutação reversa em *Salmonella typhimurium*, mutações recessivas letais ligadas ao sexo em *Drosophila melanogaster* e aberrações cromossômicas em células de mamíferos *in vitro*, constatando que o Sertaconazol não induziu nenhum mecanismo pró-mutagênico, mutagênico ou clastogênico.

Estudos realizados por Hassan (1997) em camundongos demonstraram que o Miconazol induz aberrações cromossômicas e anormalidades na morfologia de espermatozoides, indicando efeito genotóxico tanto em células somáticas como germinativas.

Triadimefon, Propiconazol e Miclobutanil são importantes fungicidas agrícolas e terapêuticos que fazem parte do grupo dos conazóis. Estudos *in vivo* através do ensaio do camundongo *Big Blue*® constataram mutagenicidade em hepatócitos de camundongos dos dois primeiros medicamentos e ausência de efeito do Miclobutanil, indicando relação com o efeito hepato-tumorigênico desses conazóis (ROSS et al., 2009).

Terbinafina, um antifúngico prescrito para micoses superficiais, inibe a proliferação de células de câncer de colo *in vivo* e *in vitro* por interromper a transição das fases G0/G1 (LEE et al., 2003). Além disso, quando aplicado em células endoteliais do cordão umbilical humano em cultura, reduziu a proliferação celular por inibição da replicação do DNA na fase S do ciclo celular (HO et al., 2004).

Fusic et al. (2008) estudaram o efeito do Fluconazol em camundongos, relacionando diferentes idades com a exposição subaguda aos mesmos na concentração de 12 mg/kg e observaram que, durante as fases intra-uterina, recém nascido e infantil, o Fluconazol causava danos ao DNA; porém, esses danos não foram significativos para indivíduos na fase adulta.

Pesquisas feitas por Yüzbasioğlu et al. (2008) mostraram que em linfócitos humanos o Fluconazol apresentou-se mutagênico nas concentrações de 12,5; 25 e 50 µg/mL após 48 horas de tratamento, promovendo quebras

cromossômicas e cromatídicas, união de cromátides irmãs, cromossomos dicêntricos, trocas entre cromátides irmãs e fragmentação cromossômica.

Porém, quando o fármaco foi administrado em camundongos e analisadas as células da medula óssea após 24 horas de tratamento, não houve resultado positivo significativo. Estes dados sugerem que o Fluconazol pode ter atividades distintas, dependendo da capacidade metabolizadora das células/organismos utilizados nos ensaios biológicos. No entanto, devido ao número de estudos ser reduzido, há necessidade de trabalhos adicionais para auxiliar no entendimento sobre seu potencial mutagênico.

1.4 TESTES *IN VITRO*

Atualmente, nove de dez drogas avaliadas em testes laboratoriais e em estudos com animais quanto à carcinogênese ou toxicidade não fornecem respostas satisfatórias, porque não se pode prever com precisão como será o comportamento dessas em seres humanos (SHANKS et al., 2009). Em 1982, preocupada com a morte inevitável de animais em pesquisa e suas implicações éticas, a OECD (Organization for Economic Co-operation and Development) deu um importante passo para reduzir as duplicatas em testes com animais, com propósitos regulatórios. Em 1989, foi fundado o Centro de Documentação e Avaliação de Métodos Alternativos para Experimentos com Animais em Berlim, tendo como objetivo diminuir testes *in vivo* (SPIELMANN; LIEBSCH, 2001).

Em 1994 foram validados os testes de toxicidade *in vitro*, determinando-se que estes devem ser desenvolvidos em um único laboratório, em teste cego, independente e analisados por pesquisadores de outros laboratórios. Estes experimentos devem ser regidos por uma base bioestatística (LIEBSCH; SPIELMANN, 2002).

Embora o sistema *in vivo* reproduza com mais semelhança as condições humanas, testes *in vitro* possuem certas vantagens, como facilidade de padronização das condições experimentais, densidade populacional, pH, temperatura, composição do meio de cultivo; organização dos cromossomos e do seu DNA igual à das células *in vivo*; utilização de pequenas quantidades da substância-teste; possibilidade de serem realizados em replicatas; apresentação de poucos problemas éticos, além de praticamente todos os tecidos estarem

disponíveis para avaliação (RABELLO-GAY et al., 1991; HARTUNG; DASTON, 2009). Entretanto, a principal limitação da utilização do sistema-teste *in vitro* é a incapacidade de biotransformação, que possui um papel importante na toxicidade de muitos xenobióticos, principalmente na mutagênese e carcinogênese. Existem duas principais soluções para solucionar este problema: prover células com competência metabólica ou adicionar enzimas metabolizadoras no sistema (COECKE et al., 2006).

Para a análise de metabólitos que causam danos no DNA, o melhor sistema é aquele que utiliza células metabolizadoras provenientes de hepatócitos, tais como HepG2 e HTC, permitindo que metabólitos atuem dentro das células (COECKE et al., 2006).

1.5 TESTES EM CÉLULAS DE MAMÍFEROS *IN VITRO*

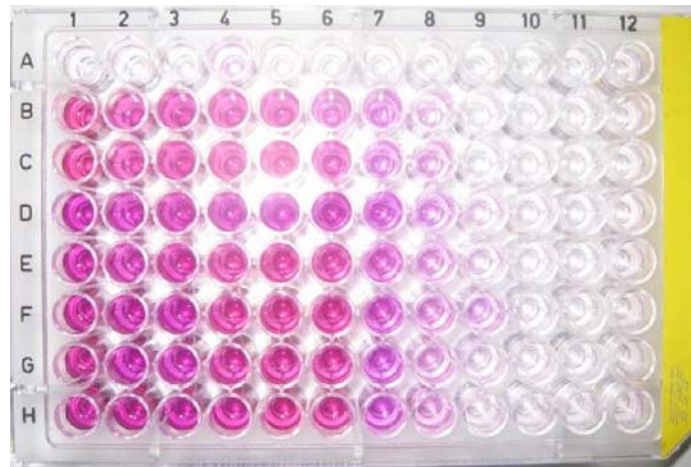
1.5.1 Teste de Citotoxicidade

O teste para verificar a toxicidade de substâncias químicas, como de compostos terapêuticos, é de suma importância para a definição das concentrações a serem utilizadas em experimentos *in vitro* posteriores (MELO et al., 2000).

A metabolização dos sais de tetrazólio em formazan tem sido amplamente utilizada para medir proliferação, viabilidade e toxicidade celular. O MTT (3-(dimetilthiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazólio) e NBT (tetrazólio nitroblue) formam formazan insolúvel, enquanto a segunda geração desses sais, XTT (2,3-bis (2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-5-[(fenilamino) carbonil]-2H-tetrazolio hidroxido), MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-il)-5-(3-carboxymethoxyphenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio) e WST-1 (8 [2-(2-metoxi-4-nitrofenil)-3-(4-nitrofenyl)-5-(2,4-disulfonil)-2H-tetrazolio]) geram formazan solúvel (BERRIDGE et al., 2005).

O ensaio de MTT proposto por Mosmann (1983) utiliza a enzima do ciclo de Krebs, succinato desidrogenase, presente nas mitocôndrias, para reduzir o MTT em cristais de formazan. Após adicionado dimetilsulfóxido (DMSO), há a solubilização desses cristais com o aparecimento da coloração roxa (BERNHARD et al., 2003), sendo os resultados quantificados colorimetricamente em espectrofotômetro (Figura 4). Portanto, infere-se que quanto maior a intensidade da cor roxa, maior é a quantidade de células viáveis.

Figura 4 – Ensaio do MTT em placa de 96 poços.



1.5.2 Ensaio do Cometa

O ensaio do cometa ou SCGE (*Single-Cell Gel Eletrophoresis*) avalia danos no DNA e reparo, sendo aplicado em testes de genotoxicidade, biomonitoramento humano e ecogenotoxicologia (COLLINS, 2004). Ele não é utilizado para detectar mutações, mas sim lesões genômicas que, após serem processadas podem levar a mutações (GONTIJO; TICE, 2003).

Ostling e Johanson (1984), baseando-se no modelo de nucleóide desenvolvido por Cook et al. (1976), foram os primeiros a quantificar danos no material genético utilizando eletroforese em microgel. A técnica consiste na lise de células com detergente e sal, imobilização do DNA em gel de agarose e subsequente corrida eletroforética em pH neutro, verificando a ocorrência de quebras em fita dupla de DNA. Mais tarde, Singh et al. (1988) desenvolveram a versão alcalina do ensaio do cometa, que permitiu a separação da dupla fita e consequente avaliação de quebras, tanto de fita dupla como de fita simples.

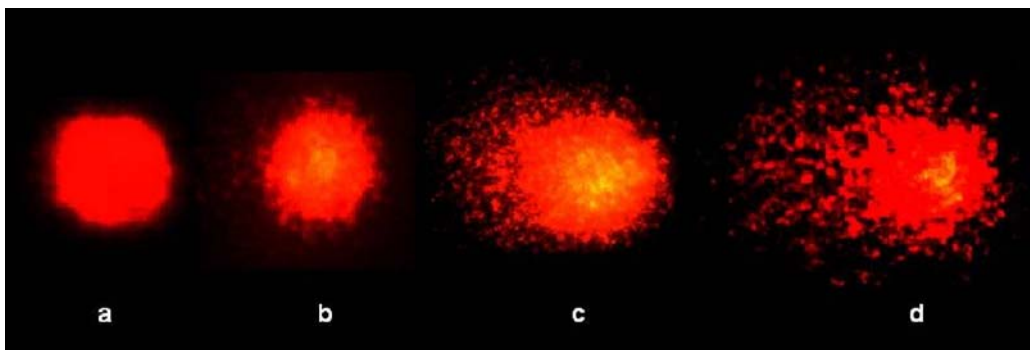
Os fragmentos obtidos pelas quebras da fita de DNA migram para o polo positivo durante a corrida eletroforética, formando caudas, semelhantes a cometas (LIAO et al., 2009). Assim, o dano é avaliado de acordo com o tamanho da cauda do cometa. Segundo Kobayashi et al. (1995), os cometas podem ser analisados visualmente e classificados em quatro classes: 0 – sem dano, não apresenta cauda; 1 – dano pequeno, cauda menor que o diâmetro do nucleóide; 2 – dano médio, cauda de tamanho entre uma a duas vezes o tamanho do nucleóide; 3

– dano máximo, cauda duas vezes maior que o diâmetro do nucleóide (Figura 5).

As vantagens dessa técnica são simplicidade, sensibilidade, versatilidade, rapidez e baixo custo (COLLINS, 2004). Quando comparado com outros testes, como aberração cromossômica, troca entre cromátides irmãs e teste do micronúcleo, o ensaio do cometa é mais sensível por detectar quantidades mínimas de danos no DNA.

Devido a essa sensibilidade, o uso de diferentes parâmetros de avaliação contribui para a variabilidade muitas vezes observada nos resultados do ensaio do cometa. Além dessa desvantagem, efeitos aneugênicos e epigenéticos não são detectados por esta metodologia. Entretanto, as vantagens superam as desvantagens e, portanto, o teste tem sido amplamente utilizado, desde a epidemiologia molecular até a genética toxicológica (DHAWAN et al., 2009).

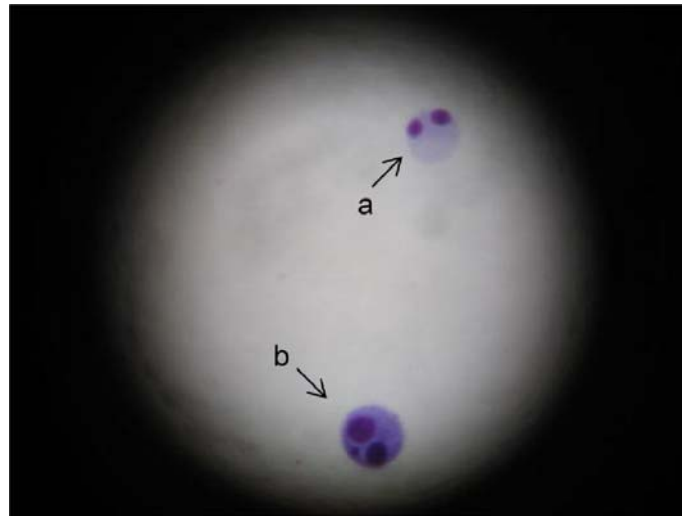
Figura 5 – Classes do cometa em células HTC: a- classe 0; b- classe 1; c- classe 2; d-classe 3. Aumento de 40X.



1.5.3 Teste do Micronúcleo

O micronúcleo é uma pequena massa nuclear envolta por uma membrana separada do núcleo principal da célula, consistindo de fragmentos ou de cromossomos inteiros que não se ligaram ao aparelho mitótico. Para sua formação, é necessário que a célula passe por divisão (FENECH, 2000). (Figura 6).

Figura 6 – Células HTC binucleadas: a- sem micronúcleo; b- com micronúcleo. Aumento de 40X.

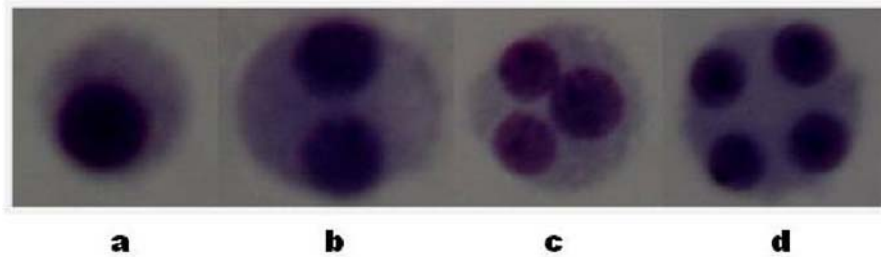


O teste do micronúcleo, primeiramente padronizado *in vivo* por Schmid (1973), é um dos principais testes realizados para avaliar uma substância quanto a sua mutagenicidade. O teste *in vitro* foi proposto por Heddle (1976) utilizando cultura de linfócitos periféricos humanos. Posteriormente, Fenech e Morley (1985) passaram a utilizar a citocalasina B no teste do micronúcleo *in vitro*.

A citocalasina B inibe a polimerização da actina e impede que ocorra a citocinese, formando células binucleadas. Dessa forma, permitiu-se analisar apenas as células que passaram pela divisão celular, certificando que o micronúcleo formado era decorrente do tratamento aplicado, (FENECH, 2000) tornando o trabalho mais preciso e fácil, uma vez que anteriormente era analisado o dobro de células mononucleadas para se avaliar o mesmo dano (FENECH, 1997).

Quando se usa este teste, é importante também que seja analisado o Índice de Divisão Nuclear (IDN), para verificar o efeito citostático do composto sobre a célula (FENECH et al., 1999). Dessa forma, a cada 500 células com o citoplasma íntegro, contam-se as que contenham de 1 a 4 núcleos (Figura 7), utilizando-se em seguida a fórmula proposta por Eastmond e Tucker (1989), no qual é realizada a média ponderada das células com diferentes número de núcleos.

Figura 7 – Linfócitos de sangue periférico humano: a- célula mononucleada; b-célula binucleada; c- célula trinucleada; d-célula polinucleada. Aumento de 40X. (CILIÃO, 2010)



1.5.4 Teste de Apoptose

Pesquisadores que trabalham com cultivo de células precisam ter o conhecimento sobre morte celular, mesmo que a viabilidade não seja o objetivo principal do trabalho, pois condições de cultivo e tratamento podem influenciar na sobrevivência da célula e alterarem resultados posteriores.

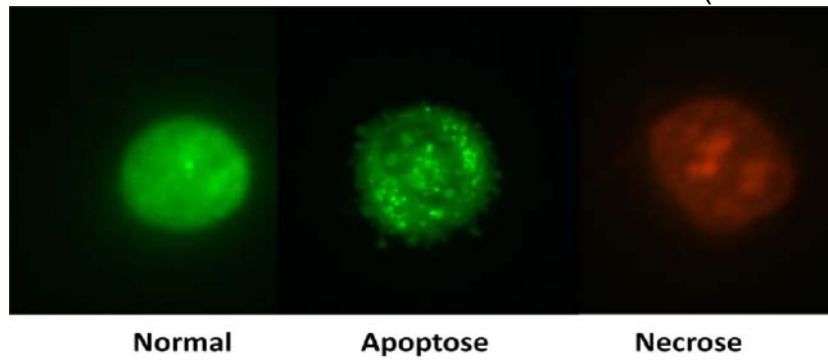
Segundo Yuan e Kroemer (2010), a morte celular pode ser classificada em várias categorias, destacando-se a apoptose, necrose, autofagia, mitose catastrófica e senescência, sendo as duas primeiras as mais estudadas. Agentes químicos em baixas concentrações podem lesar a célula de forma branda e causar apoptose. A necrose, ao contrário, é causada por agentes em concentrações mais altas, que lesionam a célula intensamente (MALUF; POMPÉIA, 2005).

A morte celular programada é um mecanismo importante para a manutenção de tecidos adultos como o tecido embrionário. Além disso, serve como mecanismo de defesa, em que células alteradas são eliminadas para salvar o organismo como um todo, como por exemplo, células com danos severos no DNA que podem levar ao desenvolvimento de um câncer (COOPER, 2001).

McGahon et al. (1995) desenvolveram uma técnica que faz uso dos corantes laranja de acridina e brometo de etídio para identificação de células apoptóticas e necróticas. O laranja de acridina penetra apenas em células vivas, intercalando-se no DNA e corando-o em verde; o brometo de etídeo consegue entrar somente em células mortas, onde a membrana encontra-se rompida, intercalando-se no DNA e corando-o em alaranjado. Dessa forma, ao microscópio de fluorescência, células normais possuem núcleo corado em verde de forma maciça; células apoptóticas possuem o núcleo fragmentado, o que faz a coloração verde ser

visualizada de forma não homogênea; e na necrose, a célula é corada em alaranjado (Figura 8).

Figura 8 – Diferenças na coloração de células CHO-K1 após utilização de laranja de acridina e brometo de etídeo. Aumento de 40X. (CÂNDIDO, 2009)



2 JUSTIFICATIVA

Nas últimas décadas, novos medicamentos têm sido desenvolvidos com o objetivo de promover o mínimo de danos ou efeitos colaterais para o organismo humano. Entre os medicamentos mais utilizados pela população estão os antifúngicos, destacando-se entre eles, o Fluconazol. Esse medicamento é indicado para o tratamento de criptococose, da candidíase orofaríngea, esofágica e vaginal e de dermatomicoses, além de ser utilizado por pessoas imunodeprimidas, chagásicas e que tenham câncer.

O Fluconazol age alterando a permeabilidade e fluidez do ergosterol, componente da membrana celular de fungos. O princípio da ação de qualquer medicamento é atingir somente o microorganismo patogênico que vem ocasionando a doença; porém, estudos mostram que, em linfócitos humanos, o Fluconazol induziu poliploidia e seis tipos de aberrações cromossômicas estruturais: quebras cromossômicas e cromatídicas, união de cromátides irmãs, cromossomos dicêntricos, trocas entre cromátides e fragmentação cromossômica.

As mutações desencadeadas por agentes endógenos ou fatores ambientais, tais como o Fluconazol, podem desencadear um processo de carcinogênese. No entanto, quando este fármaco foi testado em camundongos adultos, não apresentou resultados positivos significativos em relação à ação mutagênica.

O fato de que são necessárias várias alterações genéticas ocorrendo de maneira progressiva para que o processo carcinogênico se instale, associado à divergência dos resultados relatados na literatura com relação aos efeitos do Fluconazol, sugere que mais estudos sejam feitos.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Verificar os potenciais citotóxico, genotóxico, mutagênico e apoptótico do antifúngico Fluconazol em células de mamíferos *in vitro*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Utilizar uma linhagem celular não metabolizadora proveniente de células de ovário de hamster Chinês (CHO-K1) e uma linhagem metabolizadora obtida de hepatoma de *Rattus norvegicus* (HTC), com o intuito de:

- avaliar, através do ensaio de citotoxicidade do MTT, o efeito citotóxico do Fluconazol, determinando as concentrações a serem utilizadas nos testes de genotoxicidade e mutagenicidade.
- realizar o ensaio do cometa avaliando três concentrações do Fluconazol, a fim de determinar sua possível genotoxicidade.
- investigar o potencial mutagênico e o Índice de Divisão Nuclear (IDN) de três concentrações do antifúngico, utilizando o teste do micronúcleo com bloqueio de citocinese.
- avaliar o potencial do Fluconazol em induzir a morte celular por apoptose em três concentrações desse fármaco.

4 ARTIGO

Artigo a ser submetido à Revista Mutation Research – Genetic Toxicology and
Environmental Mutagenesis

ISSN: 1383-5718

Fator de impacto: 2,552

Avaliação da citotoxicidade, genotoxicidade e apoptose do antifúngico Fluconazol em células CHO-K1 e HTC

Vickeline Namba^a, Heloísa Cilião^a, Marialba Alves Avezum Castro-Prado^b, Ilce Mara
de Syllos Cólus^{a*}

^a Departamento de Biologia Geral, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brasil

^b Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR, Brasil.

^{a*} Autor correspondente: Departamento de Biologia Geral, Centro de Ciências Biológicas Universidade Estadual de Londrina (UEL) – Campus Universitário CEP: 86051-990 – Londrina, Paraná, Brasil Telefone: 43 33714608 / Fax: 43 3371 4191 E-mail: colus@sercomtel.com.br

Resumo

A alta mortalidade causada por reações adversas a medicamentos (RAM) tem sido motivo de preocupação e os antifúngicos estão entre os medicamentos que podem causar RAM. O Fluconazol é um dos antifúngicos mais prescritos pelos médicos para combater candidíase e dermatomicoses, além de ser usado como medida profilática em imunodeprimidos, pessoas com câncer e transplantados. Assim, apesar desse antimicótico já ser comercializado, estudos mostram que este antifúngico causa efeitos teratogênicos em roedores *in vivo* e *in vitro*, mas apresentou tanto efeito mutagênico como ausência deste em bactérias e células de mamíferos. Diante desses resultados contraditórios, o presente estudo teve como objetivo avaliar 10 concentrações do Fluconazol em células de ovário de hamster Chinês (CHO-K1) e hepatoma de *Rattus norvegicus* (HTC), utilizando o teste MTT, para se determinar sua citotoxicidade. Três concentrações não citotóxicas para ambas as linhagens celulares, 0,781 µg/mL, 1,5625 µg/mL e 3,125 µg/mL, foram avaliadas por meio do ensaio do cometa, teste do micronúcleo e teste de apoptose. O Fluconazol apresentou citotoxicidade a partir da concentração de 6,25 µg/mL para as células CHO-K1; porém, nenhuma citotoxicidade foi observada para as células HTC. O antimicótico foi genotóxico em ambas as linhagens, mas não foi mutagênico. Resultados distintos foram obtidos para as duas linhagens com relação ao teste de apoptose o que sugere diferentes mecanismos para explicar a ausência de mutagenicidade das células CHO-K1 e HTC.

Palavras-chave: Fluconazol. Genotoxicidade. Mutagenicidade. Apoptose. CHO-K1. HTC .

Introdução

Os seres humanos podem, muitas vezes, propiciar um ambiente favorável para a colonização de microorganismos e, conseqüentemente, o aparecimento de micoses [1]. Para combater as micoses, um dos antifúngicos mais utilizados é o Fluconazol, eficaz no tratamento de candidíase e dermatomicoses [2]. Este antifúngico é também prescrito como medida profilática para pessoas com câncer, transplantados e imunodeprimidos [3,4,5], que apresentam o sistema imune deficiente e propício para que ocorra a invasão por fungos.

O Fluconazol pode ser administrado via oral ou intravenosa, atingindo o pico da sua concentração plasmática (2 µg/mL) entre 2 a 4 horas [6]. A meia vida do Fluconazol é de aproximadamente 25 horas [7]. Sua excreção acontece por via renal e aproximadamente 80% do fármaco é encontrado de forma inalterada na urina [8].

Este antimicótico atua na inibição da síntese da enzima 14 α -desmetilase, a qual converte lanosterol em ergosterol, alterando a permeabilidade e fluidez da membrana dos fungos e agindo de forma fungistática contra estes [9, 10]. Em ratos, o Fluconazol induz a produção de enzimas da família citocromo P-450 e reduz a quantidade de UDP-glucuronosiltransferase, enzima de fase II do metabolismo, podendo aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) [11]. Além disso, esse antifúngico apresenta efeito teratogênico em camundongos, atuando no aumento da expressão do gene CYP26, cuja função é manter níveis de ácido retinóico adequados no tecido embrionário [12].

Essas enzimas, em geral, metabolizam os medicamentos para facilitar sua excreção e podem exibir polimorfismos que contribuem para diferentes respostas dos indivíduos a medicamentos, podendo causar possíveis efeitos danosos aos seres humanos [13]. Assim, faz-se essencial a prática da farmacovigilância, que impede a ineficácia dos fármacos, eventos de hospitalização, efeitos teratogênicos e até mesmo a ocorrência de morte [14].

Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivos avaliar a citotoxicidade, genotoxicidade, mutagenicidade e indução de apoptose do Fluconazol em células de ovário de hamster Chinês (CHO-K1) e hepatoma de *Rattus norvegicus* (HTC).

Material e Métodos

Agentes Químicos

Nos testes de genotoxicidade e mutagenicidade, o Fluconazol (CAS: 86386-73-74, Sigma-Aldrich, USA), foi dissolvido em PBS e utilizado em três concentrações (0,781; 1,5625 e 3,125 $\mu\text{g/mL}$), previamente determinadas pelo teste de citotoxicidade.

O cloridrato de doxorubicina (CAS: 25316-40-9, Sigma-Aldrich, USA) foi dissolvido em DMSO e utilizado como controle positivo na concentração de 0,75 $\mu\text{g/mL}$ em cultura.

A citocalasina B (CAS: 14930-96-2, Acros, USA), foi diluída em Dimetilsufóxido (DMSO) (CAS: 67-68-5, Mallinckrodt, USA) e utilizada na concentração final de 3 $\mu\text{g/mL}$ em cultura no teste de mutagenicidade.

O sal MTT (CAS: 298-93-1, Sigma-Aldrich, USA) foi diluído em PBS e utilizado na concentração final de 5 mg/mL em cultura

Linhagens Celulares

A linhagem celular CHO-K1 foi cedida ao nosso laboratório pela Profa. Dra. Sakamoto-Hojo (FFCLRP-USP) e a linhagem celular HTC, pelo Prof. Dr. Mantovani (UEL). As células CHO-K1 e HTC apresentam, respectivamente, ciclo celular de 12 e 24 horas, sendo mantidas, respectivamente, em meio DMEM/Ham F-10 e em meio DMEM/F-12 em frascos de 25 cm² suplementadas com 10% de soro bovino fetal (GIBCO), sendo incubadas a 37°C em estufa B.O.D.(Fanem).

Ensaio de Citotoxicidade – MTT

O ensaio do MTT foi realizado de acordo com o protocolo descrito por Mosmann [15], com algumas modificações. Os experimentos com as duas linhagens celulares ocorreram de forma independente, no qual células CHO-K1 e HTC foram semeadas em diferentes placas de 96 poços. Aproximadamente 2×10^4 células da linhagem CHO-K1 e 1×10^4 células da linhagem HTC foram semeadas em cada poço contendo 200 µL de meio completo em um período de 15 horas para CHO-K1 e 24 horas para HTC. As células CHO-K1 foram expostas a 10 concentrações crescentes do Fluconazol (0,781; 1,5625; 3,125; 6,25; 12,5; 25; 50; 100; 200; 400 µg/mL), e as células HTC a 11 concentrações de Fluconazol (0,3905; 0,781; 1,5625; 3,125; 6,25; 12,5; 25; 50; 100; 200; 400 µg/mL) durante 24 horas em meio sem soro. Decorrida a lavagem com PBS, foram colocados 100 µL da solução de MTT (5 mg/mL) por 4 horas, retirada essa solução e adicionados 200 µL de DMSO em cada poço, com posterior análise em espectrofotômetro (Uniscience) a 550 nm.

Ensaio do Cometa (SCGE)

O ensaio do cometa foi feito conforme o protocolo descrito por Singh et al. [16] com algumas modificações. Os experimentos com as duas linhagens

celulares foram realizados de maneira independente, com os seguintes grupos experimentais em triplicata: controles positivo (doxorrubicina) e negativo (PBS) e três concentrações de Fluconazol (0,781; 1,5625; 3,125 µg/mL). Decorridas 3 e 24 horas do tratamento em meio sem soro, as células foram lavadas com PBS, tripsinizadas e centrifugadas por 5 minutos a 64,4 g. As suspensões celulares foram ressuspendidas e 20 µL dessas foram misturados com 120 µL de agarose *low-melting* 0,5% e aplicados em lâminas cobertas com agarose normal 1,5%. As lâminas foram submersas na solução de lise alcalina (2,5 M NaCl; 100 mM ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA); 10 mM Tris; 10% dimetilsulfoxido (DMSO); 1% Triton X-100, pH 10) por, no mínimo, 1 hora. As lâminas foram incubadas por 20 minutos em tampão de eletroforese (0,3 M NaOH; 1 mM EDTA, pH 13) e em seguida realizada a corrida (1,5 V/cm; 300 mA) por 20 minutos. Depois, as lâminas foram neutralizadas (Tris 0,4 M, pH 7,5) por 5 minutos, repetindo-se três vezes esta etapa e finalizando com a submersão por 5 minutos em álcool absoluto para fixação. As lâminas foram coradas com Gelredtm 30X (CAS:76544-02-0, Biotium, CA) e analisadas em microscópio de fluorescência (Leica), com filtro de excitação 450-490 nm e filtro de emissão (barreira) de 515 nm, em objetiva de 40X.

O dano foi avaliado visualmente de acordo com o tamanho da cauda do cometa. Segundo Kobayashi et al. [17], os cometas analisados visualmente são classificados em quatro classes: 0 (células sem dano) a 3 (dano máximo). A frequência de células danificadas (CD) foi calculada pelas somatórias dos danos de classe 0, 1, 2 e 3 e dividido pelo total de células analisadas em cada tratamento. O escore total foi obtido de acordo com Manoharan e Banerjee [18]: $(0x n_0) + (1x n_1) + (2x n_2) + (3x n_3)$, onde n= número de células de cada classe analisada. Assim, o escore total pode variar de 0 (100 células sem danos) a 300 (todas as células com dano classe 3).

Teste do Micronúcleo *in vitro*

O protocolo utilizado para o teste do micronúcleo (MN) *in vitro* foi baseado naquele descrito por Fenech e Morley [19] com algumas modificações.

Foram realizados experimentos independentes com as duas linhagens celulares, utilizando cinco grupos de tratamento em triplicata: controle

positivo (DXR), controle negativo (PBS) e três concentrações não citotóxicas do Fluconazol (0,781; 1,5625 e 3,125 µg/mL).

Todas as culturas foram tratadas por 24 horas em meio sem soro. Após este período foi adicionada citocalasina B a 1% (0,3 mg/mL) por 20 horas nas culturas de células CHO-K1 e por 30 horas nas HTC. As células foram lavadas com PBS, tripsinizadas e centrifugadas por 5 minutos a 64,4 g. As suspensões celulares foram ressuspensas e adicionados 1,5 mL de solução hipotônica (citrato de sódio 1%) com 1 gota (aproximadamente 25 µL) de formol 1%. Os materiais foram centrifugados a 64,4 g por 5 minutos e a fixação das células foi feita com 3 mL de metanol/ácido acético (3:1), repetindo-se essa última etapa 3 vezes.

As lâminas foram confeccionadas e coradas com o corante Giemsa 5% diluído em tampão fosfato (Na_2HPO_4 0,06M e KH_2PO_4 0,06M - pH 6,8) durante 5 minutos. Após esse procedimento as células binucleadas foram analisadas em microscópio óptico (Nikon), com objetiva de 40X.

Para determinar as frequências de micronúcleo foram analisadas 3000 células binucleadas com citoplasma íntegro (1000 células por repetição). O critério de identificação foi de acordo com Fenech [20] e Titenko-Holland et al. [21].

Índice de Divisão Nuclear (IDN)

Foram analisadas 500 células com o citoplasma íntegro e anotadas as células que continham de 1 a 4 núcleos. O IDN foi calculado de acordo com Eastmond e Tucker [22]:

$$\text{IDN} = [\text{M1} + 2(\text{M2}) + 3(\text{M3}) + 4(\text{M4})]/\text{N}$$

Onde, M1 - M4 = número de células com 1, 2, 3 e 4 núcleos, respectivamente;

N= número total de células viáveis.

Teste de Apoptose

O protocolo utilizado para o teste de apoptose foi baseado em McGahon et al. [23]. Foram utilizados 25 µL da suspensão celular (aproximadamente $1,5 \times 10^3$ células) obtidos no teste do MN antes da hipotonização e acrescentados 10

μL de corante (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de laranja de acridina + 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de brometo de etídio). Essa solução foi depositada em uma lâmina limpa e seca, coberta com lamínula e a análise citológica realizada com microscópio de fluorescência (Leica), com filtro de excitação 450-490 nm e filtro de emissão (barreira) de 515 nm, em objetiva de 40X.

Análise Estatística

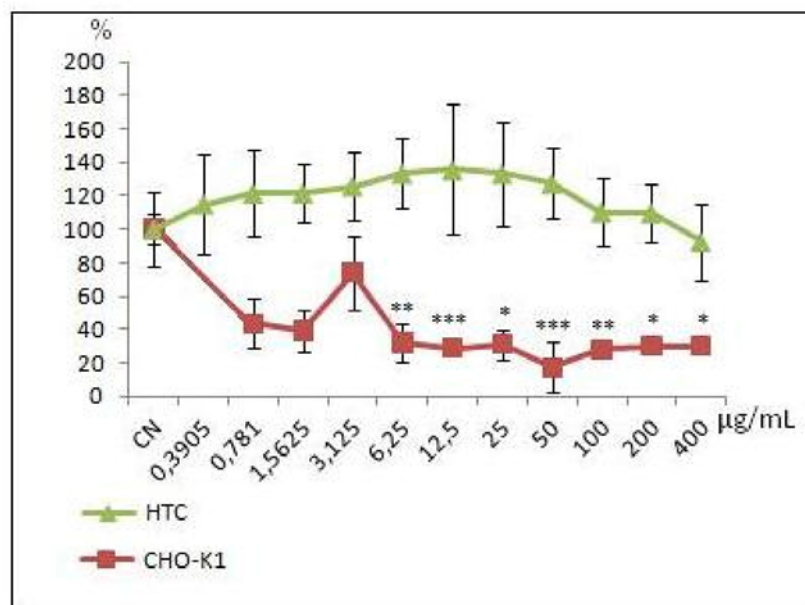
Para os dados obtidos no teste de citotoxicidade foram utilizado os testes não-paramétricos Kruskal-Wallis/Dunn ($P < 0,05$). Os resultados do ensaio do cometa, teste do micronúcleo, índice de divisão nuclear e apoptose foram analisados através dos testes paramétricos ANOVA/Tukey ($P < 0,05$).

Resultados

Teste de Citotoxicidade (MTT)

Na linhagem celular CHO-K1, a citotoxicidade do Fluconazol foi observada a partir da concentração de 6,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Para a linhagem celular HTC, nenhuma das concentrações testadas foi citotóxica (Figura 1).

Figura 1 – Curvas de viabilidade celular obtidas para as linhagens celulares CHO-K1 e HTC após 24 horas de tratamento. CN: controle negativo.



Valores estatisticamente diferentes do controle: *($P < 0,05$); **($P < 0,01$); ***($P < 0,001$)

Ensaio do Cometa

Nenhuma das concentrações testadas do Fluconazol (0,781; 1,5625 e 3,125 μ g/mL) foi genotóxica para as células CHO-K1 no tratamento de 3 horas; porém, após 24 horas de tratamento, todas as concentrações avaliadas induziram genotoxicidade (Tabela 1). Na linhagem celular HTC, o Fluconazol apresentou genotoxicidade em todas as concentrações avaliadas após 3 e, após 24 horas de tratamento, apenas nas concentrações de 1,5625 e 3,125 μ g/mL (Tabela 2).

Teste do Micronúcleo com Bloqueio da Citocinese

Nas duas linhagens celulares o Fluconazol não induziu um aumento na frequência de micronúcleos em relação ao grupo controle negativo (Tabela 3).

Índice de Divisão Nuclear

Não foi observada alteração na proliferação celular em nenhuma das linhagens celulares sob tratamento com o Fluconazol (Tabela 3).

Teste de Apoptose

Em células CHO-K1, nenhuma das concentrações testadas do antifúngico induziu apoptose; porém, em células HTC o medicamento induziu apoptose em todas as concentrações avaliadas (Tabela 4).

Tabela 1 – Frequência de danos no DNA pelo teste do cometa após 3 e 24 horas de tratamento em células da linhagem CHO-K1.

Tempo de tratamento	Tratamento (µg/mL em cultura)	Classes				Escore (média±SD)	CD (média±SD)
		0	1	2	3		
3 horas	PBS (50µL)	75,67±1,15	24,33±1,15	0,00±0,00	0,00±0,00	0,24±0,01 ^a	0,24±0,01 ^a
	DXR	25,67±21,22	52,33±2,08	21,67±19,06	0,33±0,58	0,97±0,41 ^b	0,74±0,21 ^b
	Fluconazol						
	0,781	55,33±10,79	44,33±10,21	0,33±0,58	0,00±0,00	0,45±0,11 ^a	0,45±0,11 ^a
	1,5625	42,00±5,00	58,00±7,21	0,67±1,15	0,00±0,00	0,59±0,07 ^{a,b}	0,59±0,07 ^{a,b}
	3,125	58,67±3,21	47,33±3,21	0,00±0,00	0,00±0,00	0,3±0,26 ^{a,b}	0,46±0,01 ^{a,b}
24 horas	PBS (50µL)	90,00±5,29	10,00±5,29	0,00±0,00	0,00±0,00	0,10±0,05 ^a	0,10±0,05 ^a
	DXR	4,67±4,51	75,00±7,00	18,67±11,15	1,67±0,58	1,17±0,15 ^b	0,95±0,05 ^b
	Fluconazol						
	0,781	12,67±19,40	15,67±21,36	8,00±1,00	3,61±2,31	1,03±0,17 ^b	0,87±0,19 ^b
	1,5625	12,67±15,95	74,33±7,02	10,00±7,94	3,00±3,46	1,03±0,27 ^b	0,87±0,16 ^b
	3,125	1,00±1,00	80,00±11,36	16,33±10,12	2,67±2,08	1,21±0,15 ^b	0,99±0,01 ^b

Valores com a mesma letra não diferem estatisticamente entre si. DXR: doxorubicina; SD: desvio padrão; CD: frequência de célula danificada.

Tabela 2 – Frequência de danos no DNA pelo teste do cometa após 3 e 24 horas de tratamento em células da linhagem HTC.

Tempo de tratamento	Tratamento (µg/mL em cultura)	Classes				Score	CD
		0	1	2	3	(média±SD)	(média±SD)
3 horas	PBS (50µL)	91,33±3,21	8,67±3,21	0,00±0,00	0,00±0,00	0,09±0,03 ^a	0,09±0,03 ^a
	DXR	0,00±0,00	69,33±14,47	30,33±13,43	0,67±1,15	1,32±0,14 ^b	1,00±1,01 ^b
	Fluconazol						
	0,781	5,33±1,53	67,33±43,59	27,33±44,77	0,00±0,00	1,22±0,46 ^{b,c}	0,95±0,02 ^{b,c}
	1,5625	3,77±3,06	90,33±2,52	6,00±5,57	0,00±0,00	1,02±0,09 ^{b,c}	0,96±0,03 ^{b,c}
	3,125	0,67±0,58	11,33±15,31	87,00±14,80	1,33±2,31	1,22±1,07 ^b	1,00±0,01 ^b
24 horas	PBS (50µL)	90,00±5,20	10,00±5,20	0,00±0,00	0,00±0,00	0,10±0,05 ^a	0,10±0,05 ^a
	DXR(0,75µg/mL)	44,33±8,50	48,67±8,74	4,67±0,58	2,33±2,08	0,65±0,09 ^b	0,56±0,09 ^b
	Fluconazol(µg/mL)						
	0,781	64,00±18,03	29,33±13,20	5,33±3,79	1,33±1,53	0,44±0,24 ^{a,b}	0,36±0,18 ^{a,b}
	1,5625	57,67±9,07	37,67±9,29	4,33±0,58	0,67±0,58	0,48±0,08 ^b	0,43±0,09 ^b
	3,125	60,00±8,19	31,33±6,03	6,33±4,73	2,33±2,52	0,51±0,15 ^b	0,40±0,08 ^b

Valores com a mesma letra não diferem estatisticamente entre si. DXR: doxorubicina; SD: desvio padrão; CD: frequência de célula danificada.

Tabela 3 – Frequências de células micronucleadas (MN) e índice de divisão nuclear obtidas na determinação de mutagenicidade de três concentrações do Fluconazol nas linhagens celulares CHO-K1 e HTC após 24 horas de tratamento.

Linhagem	Tratamento ($\mu\text{g/mL}$ em cultura)	Frequência de MN (1000cél/repet.)				Índice de divisão nuclear (500 céls/repet.)			
		Repetições				Repetições			
		I	II	III	X \pm SD	I	II	III	X \pm SD
CHO-K1	PBS (50 μL)	6	6	8	6,67 \pm 1,16 ^a	1,43	1,5	1,43	1,45 \pm 0,02 ^a
	DXR (0,75) Fluconazol	18	16	17	17 \pm 1 ^b	1,41	1,48	1,46	1,45 \pm 0,02 ^a
	0,781	4	6	6	5,33 \pm 1,15 ^a	1,44	1,42	1,45	1,44 \pm 0,01 ^a
	1,5625	6	6	4	5,33 \pm 1,15 ^a	1,39	1,38	1,44	1,40 \pm 0,02 ^a
	3,125	10	3	5	6 \pm 3,61 ^a	1,45	1,42	1,46	1,44 \pm 0,01 ^a
	HTC	PBS (50 μL)	19	21	17	19 \pm 2 ^a	1,27	1,35	1,49
DXR (0,75) Fluconazol	131	85	90	102 \pm 25 ^b	1,41	1,49	1,54	1,48 \pm 0,06 ^a	
0,781	26	45	37	36 \pm 9,54 ^a	1,54	1,41	1,38	1,44 \pm 0,08 ^a	
1,5625	24	29	21	24,67 \pm 4,04 ^a	1,5	1,32	1,39	1,40 \pm 0,09 ^a	
3,125	28	33	32	24,67 \pm 4,04 ^a	1,33	1,42	1,39	1,38 \pm 0,04 ^a	

Valores com a mesma letra não diferem estatisticamente entre si. MN: micronúcleo; DXR: doxorubicina; X: média; SD: desvio padrão.

Tabela 4 – Frequências de células apoptóticas obtidas para as linhagens celulares CHO-K1 e HTC após 24 horas de tratamento com três concentrações do Fluconazol.

Linhagem	Tratamento ($\mu\text{g/mL}$ em cultura)	Apoptose % (200cél/repet.)			
		Repetições			
		I	II	III	X \pm SD
CHO-K1	PBS (50 μL)	5	8	8,5	7,16 \pm 1,89 ^a
	DXR (0,75)	19,5	13	15,5	16 \pm 3,28 ^b
	Fluconazol				
	0,781	8	5,5	7	6,83 \pm 1,26 ^a
	1,5625	7	9,5	10	8,83 \pm 1,61 ^a
	3,125	5,5	6	6	5,83 \pm 0,29 ^a
HTC	PBS (50 μL)	3,5	3	5	3,83 \pm 1,04 ^a
	DXR (0,75)	22	18	10,5	16,83 \pm 5,84 ^b
	Fluconazol				
	0,781	25,5	20,5	12,5	19,5 \pm 6,56 ^b
	1,5625	18,5	14,5	16,5	16,5 \pm 2 ^b
	3,125	21,5	19	22	20,83 \pm 1,60 ^b

Valores com a mesma letra não diferem estatisticamente entre si. DXR: doxorubicina; X: média; SD: desvio padrão

Discussão

Todos os seres vivos estão expostos a agentes mutagênicos, como por exemplo, medicamentos que causam danos no DNA, podendo se fixar como mutações [24]. Dessa forma, constam na literatura análises com relação à mutagenicidade de alguns antimicóticos, como Sertaconazol, utilizando como sistema teste *Salmonella typhimurium*, *Drosophila* e linfócitos humanos [25]; Miconazol, usando camundongos [26] e Fluconazol, testado em camundongos e linfócitos humanos [27, 28].

Pesquisas feitas por Yüzbasioğlu et al. [28] mostraram que em linfócitos humanos o Fluconazol apresentou-se mutagênico, promovendo quebras cromossômicas e cromatídicas, união de cromátides irmãs, cromossomos dicêntricos, trocas entre cromátides irmãs e fragmentação cromossômica. Porém, quando o fármaco foi administrado em camundongos, não houve resultado positivo

significativo em células da medula óssea. Estes dados sugerem que o Fluconazol pode ter atividades distintas, dependendo da capacidade metabolizadora do ensaio biológico utilizado.

Devido à toxicidade de um determinado agente influenciar as respostas biológicas obtidas [29], o teste de citotoxicidade foi realizado a fim de se detectar a partir de qual concentração o Fluconazol é citotóxico para as linhagens celulares CHO-K1 e HTC. Para a linhagem celular HTC não foi possível determinar a citotoxicidade deste antifúngico devido ao limite de solubilidade do composto. No entanto, Somchit et al. [30,31], utilizando hepatócitos de ratos tanto *in vitro* quanto *in vivo* relataram a citototoxicidade desse antimicótico na concentração de 1 mM .

Respostas distintas foram obtidas para as duas linhagens celulares no teste do cometa. Enquanto nenhuma genotoxicidade foi detectada nas células CHO-K1 após 3 horas de tratamento, todas as concentrações promoveram danos após 24 horas de tratamento, sendo a maioria destes danos de classe 1. Este fato, aliado à ausência de mutagenicidade observada no teste do micronúcleo, indica que a migração do DNA detectada no ensaio do cometa pode ser decorrente da ação de enzimas de reparo [32,33] e da transformação, em pH básico, de sítios AP em quebras [34]. Assim, três horas de tratamento não foram suficientes para que o fármaco causasse genotoxicidade, necessitando de um período mais prolongado para a detecção de danos no material genético.

Segundo Shaik et al. [35], o Fluconazol induz a produção de enzimas citocromo P-450 em hepatócitos de ratos, dentre elas, CYP2B1 e CYP3A2 [36], as quais aumentam a produção hepática de espécies reativas de oxigênio. Entretanto, o Fluconazol diminui a quantidade de UDP-glucuronosiltransferase, enzima de fase II. Dessa forma, o fármaco promove um desequilíbrio entre as enzimas de fase I e II e, como consequência, a produção de metabólitos tóxicos para as células, podendo ocasionar danos no material genético [11]. Este mecanismo pode explicar o resultado positivo obtido no presente estudo, quando células HTC foram submetidas a tratamentos de 3 e 24 horas com o Fluconazol e avaliadas no ensaio do cometa, pois estas células, diferentemente das células CHO-K1, são capazes de metabolizar drogas.

Ao analisar a frequência dos danos após 3 e 24 horas de tratamento no ensaio do cometa, nota-se que houve um aumento de danos nas células CHO-K1, causado provavelmente pelo fato dessas células terem permanecido sob

tratamento por cerca de dois ciclos celulares, enquanto que a diminuição de danos observada nas células HTC tem como possível causa o efeito apoptótico do Fluconazol nessa linhagem.

A ausência de mutagenicidade observada em ambas as linhagens celulares diverge dos resultados obtidos por Yüzbasıoglu et al. [28] em linfócitos humanos, que detectaram indução de troca entre cromátides irmãs, aberrações cromossômicas e micronúcleos. A discordância entre os trabalhos pode ser devida à utilização por Yüzbasıoglu et al. [28] de concentrações que, no presente estudo, foram citotóxicas para a linhagem celular CHO-K1 e, conseqüentemente, não avaliadas nos testes do micronúcleo e cometa para ambas as linhagens.

O fato do teste do MTT realizado anteriormente ao teste do micronúcleo não ter indicado citotoxicidade e o teste de apoptose ter sido positivo em células HTC mostram que o Fluconazol não interfere na atividade da enzima mitocondrial succinato desidrogenase, mas atua em alguma das vias da apoptose. Esta hipótese é reforçada pela afirmação de Green e Reed [37] sobre a necessidade de atividade mitocondrial para que ocorra o processo apoptótico.

De acordo com Fenech et al. [38] e Decordier et al. [39], as taxas de apoptose e de micronúcleo estão associadas, de forma que um aumento de células apoptóticas leva à diminuição da quantidade de células micronucleadas, o que pode explicar a ausência de mutagenicidade encontrada na linhagem HTC no presente trabalho. A relação entre esses fenômenos também foi discutida por Sablina et al. [40], que constataram o efeito de micronucleação como um forte sinal apoptótico, aumentando níveis da proteína p53, que eleva a expressão do gene *BAX* (indutor de apoptose) e diminui a expressão de *BCL2* (supressor de apoptose).

Além do teste de apoptose, também foi analisado no presente estudo o Índice de Divisão Nuclear (IDN), para verificar o efeito citostático do composto sobre a célula, pois segundo Fenech et al. [38], estes testes estão interrelacionados e seus resultados podem influenciar na determinação da genotoxicidade e mutagenicidade de um determinado xenobiótico. Neste trabalho, o ciclo celular não foi alterado pelo Fluconazol. Esse resultado corrobora o trabalho desenvolvido por Senior e Shaw [41] e Yüzbasıoglu et al. [28], que testaram o efeito deste antimicótico em linfócitos e também não obtiveram alteração de proliferação celular.

Na maioria dos testes realizados nesse trabalho, a linhagem celular HTC apresentou maior quantidade de danos quando comparada à linhagem CHO-K1. Essa diferença na resposta entre as duas linhagens pode ser devido a duas características da linhagem celular HTC: a instabilidade genética [42, 43] e a capacidade de metabolização de xenobióticos [11].

Apesar das células HTC terem apresentado maior sensibilidade nas respostas biológicas frente ao antifúngico, a genotoxicidade foi observada para ambas as linhagens estudadas. No entanto, não foi detectada mutagenicidade. Assim, infere-se que o dano gerado pôde ser reparado e não fixado. Portanto, as informações obtidas quanto à genotoxicidade e à mutagenicidade deste antifúngico servirão como suporte para que outros estudos sejam realizados na tentativa de elucidar quais são os mecanismos pelos quais o Fluconazol atua nas células de mamíferos.

Agradecimentos

À Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Paraná pelo suporte financeiro. À CAPES pela concessão da bolsa de mestrado a Vickeline Namba e ao CNPq pela concessão das bolsas Pq para Ilce Mara de Syllos Cólus e Marialba Alves Avezum Castro-Prado. À professora Dra Eiko Nakagawa pela utilização do espectrofotômetro.

Referências

- [1] SULLIVAN, D.; MORAN, G.; COLEMAN, D. Fungal desiases of humans. In: KAVANAGH, K. (ed.). **Fungi: Biology and applications**. England: John Wiley and Sons, 2005. p. 171-190.
- [2] BENNET, J. E. Agentes antimicrobianos. In: BRUNTON, L. L.; LAZO, J. S.; PARKER, K. L. (eds.), **As bases farmacológicas da terapêutica**. Rio de Janeiro: McGraw-Hil, 2006. p. 1108-1111.
- [3] JOHANSEN, H. K.; GOTZSCHE, P. C., Amphotericin B versus Fluconazole for controlling fungal infections in neutropenic cancer patients. **Database Syst Rev.**, Cochrane, v. 2, 2002.

- [4] MARR, K. A.; SEIDEL, K.; SLAVIN, M. A.; BOWDEN, R. A.; SCHOCH, H. G. Flowers, L. Corey, M. Boeckh, Prolonged Fluconazole prophylaxis associated with persistent protection against candidiasis-related death in allogeneic marrow transplant recipients: long term follow up a randomized, placebo-controlled trial, **Blood**, v. 96, p.2055-2061, 2000.
- [5] MINAMOTO, G. Y.; ROSENBERG, A. S. Fungal infections in patients with acquired immunodeficiency syndrome. **Med Clin North Am**, v. 81, n.1997, p. 381-409.
- [6] DEBRUYNE, D. Clinical pharmacokinetics of fluconazole in superficial and systemic mycoses. **Clin Pharmacokinet**, v. 33, p. 52-77, 1997.
- [7] RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. **Farmacologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 1997. p. 606.
- [8] PFIZER, 2005. Bula Zoltec®. **Fluconazol**. Disponível em: <<http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/BM/BM%5B26073-1-0%5D.PDF>>. Acesso em: 3 nov. 2009.
- [9] BOSSCHE, H. V. D.; MARICHAL, P.; GORRENS, J.; COENE, M. C.; WILLEMSSENS, G.; BELLENS, D.; ROELS, I.; MOEREELS, H.; JANSSEN, P. A. Biochemical approaches to elective antifungal activity. Focus on azole antifungals. **Mycoses**, v. 32, n. 1, p. 35-52, 1989.
- [10] HITCHCOCK, C. A.; DICKINSON, K.; BROWN, S. B.; EVANS, E. G.; ADAMS, D J. Interaction of azole antifungal antibiotics with cytochrome P-450-dependent 14 α -sterol demethylase purified from *Candida albicans*. **Biochem. J.** v. 266, p. 475-480, 1990.
- [11] LAVRIJSEN, K. L. M.; VAN HOUTT, J. M. G.; VAN DYCK, D. M. J.; MEULDERMANS, W. E. G.; HEYKANTS, J. J. P. Induction potential of Fluconazole toward drug-metabolizing enzymes in rats. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 34, n. 3, p. 402-408, 1990.
- [12] TIBONI, G. M.; MAROTTA, F.; CARLETTI, E. Fluconazole alters CYP26 gene expression in mouse embryos. **Reprod Toxicol**, v. 27, p. 199-202, 2009.
- [13] METZGER, I. F.; SOUZA-COSTA, D. C.; TANUS-SANTOS, J. E. Farmacogenética: princípios, aplicações e perspectivas. **Medicina**, Ribeirão Preto, v. 39, p. 515-521, 2006,
- [14] WHO – World Health Organization. The importance of pharmacovigilance: safety monitoring of medicinal products, 2002. Disponível em: <<http://infocooperation.org/hss/en/d/Js4893e/2.html>>. Acesso em: 15 dez. 10.
- [15] MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Meth**, v. 65, p. 55–63, 1983.
- [16] SINGH, N. P.; MCCOY, M. T.; TICE, R. R.; SCHNEIDER, E. L. A simple

technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. **Exp Cell Res.**, v. 175, p. 184-191, 1988.

[17] KOBAYASHI H.; SUGIYAMA, C.; MORIKAWA, Y.; HAYASHY, M.; SOFUNI, T. A comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the single cell gel electrophoresis. **MMS Commun.**, v. 3, p.103-115, 1995.

[18] MANOHARAN, K.; BANERJEE, M. R. β -Carotene reduces sister chromatid exchange induced by chemical carcinogens in mouse mammary cells in organ culture. **Cell Biol Int Rep.**, v. 9, p. 783-789, 1985.

[19] FENECH, M.; MORLEY, A. A. Measurement of micronuclei in lymphocytes. **Mutat Res.**, v. 147, p. 29-36, 1985.

[20] FENECH, M. The cytokinesis-block micronucleus technique: A detailed description of the method and its application to genotoxicity study in human populations. **Mut Res.**, v. 285, p.35-44, 1993.

[21] TITENKO-HOLLAND, N.; WINDHAM, G.; KOLACHANA, P.; REINISCH, F.; PARVATHAM, S.; OSORIO, A. M.; SMITH, M. T. Genotoxicity of malathion in human lymphocytes assessed using the micronucleus assay *in vitro* and *in vivo*: a study of malathion-exposed workers, **Mut Res.**, v. 627, p. 78-91, 1997.

[22] EASTMOND, D. A.; TUCKER, J. D. Identification of aneuploidy inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochore antibody. **Environ Mol Mutagen.**, v. 13, n. 1, p. 34-43, 1989.

[23] MCGAHON, A. J.; MARTIN, S. J.; BISSONNETTE, R. P.; MAHBOUDI, A.; SHI, Y.; MOGIL, R. J.; NISHIOKA, W. K.; GREEN, D. R. The end of the (cell) line: Methods for the study of apoptosis *in vitro*. In: SCHURARTZ, L. M.; OSBOURNE, B. A. (eds.). **Methods in Cell Biology**, v. 46, p.153-184, 1995.

[24] RIBEIRO, L. R.; MARQUES, E. K. A importância da mutagênese ambiental na carcinogênese humana. In: RIBEIRO, R. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. (eds.). **Mutagênese ambiental**. Canoas: Ulbra, 2003. p. 21-26.

[25] ROMERO, A.; PALACÍN, C.; MOSESSO, C.; HODSON-WALKER, G.; MARCOS, R.; BATISTE-ALENTORN M.; VILLAMAYOR, F.; SACRISTÁN, A.; ORTIZ, J. A. Genotoxicity studies on Sertaconazole. **Arzneimittelforschung**, v. 42, n. 5, p. 743-745, 1992.

[26] HASSAN, N. H. Miconazole genotoxicity in mice. **J Appl Toxicol.**, v. 17, n. 5, p. 313-319, 1997.

[27] FUSIC, A.; MARKOVIC, D.; HERCEG, Z.; GAMULIN, M.; KATIC, J.; STOJKOVIC, R.; FERENCIC, Z.; MILDNER, B.; JAZBEC, A.; DOBRANIC, T. Developmental and transplacental genotoxicology: Fluconazole. **Mutat Res.**, v. 657, p. 43-47, 2008.

- [28] YÜZBASIOGLU, D.; ÜNAL, F.; YILMAZ, S.; AKSOY, H.; ÇELİK, M. Genotoxicity testing of Fluconazole *in vivo* and *in vitro*, **Mutat Res.**, v. 649, p.155-160, 2008,
- [29] FELLOWS, M. D.; O'DONOVAN, M. R. Cytotoxicity in cultured mammalian cells is a function of the method used to estimate it. **Mutagenesis**, v. 22, n. 4, p. 275-280, 2007.
- [30] SOMCHIT, N.; NORSHAHIDA, A. R.; HASIAH, A. H.; ZURAINI, A.; SULAIMAN, M. R.; NOORDIN, M. M. Hepatotoxicity induced by antifungal drugs Itraconazole and Fluconazole in rats: a comparative *in vivo* study. **Hum Exp Toxicol.** v. 23, p. 519-525, 2004.
- [31] SOMCHIT, N.; NGEER, C. S.; YAAKOB, A.; AHMAD, Z.; ZACARIA, Z. A. Effects of cytochrome P450 inhibitors on Itraconazole and Fluconazole induced cytotoxicity in hepatocytes. **J Toxicol.** v. 2009, p. 1-7, 2009.
- [32] COLLINS, A. R. The comet assay for DNA Damage and Repair: principles, applications, and limitations. **Mol Biotechnol.**, v. 26, p. 249-261, 2004.
- [33] DECORDER, I.; LOOCK, K. V.; KIRSCH-VOLDERS, M. Phenotyping for DNA repair capacity. **Mutat Res.** v. 705, p. 107-129, 2010.
- [34] COLLINS, A. R.; OSCOZ, A. A.; BRUBORG, G.; GAIVÃO, I.; GIOVANNELLI, L.; KRUSZEWSKI, M.; SMITH, C. C.; STETINA, F. The comet assay: topical issues. **Mutagenesis**, v. 23, n. 3, p.143-151, 2008.
- [35] SHAIK, I. H.; MEHVAR, R. Cytochrome P450 induction by phenobarbital exacerbates warm hepatic ischemia-reperfusion injury in rat livers. **Free Radic Res.** v. 44, n. 4, p. 441-453, 2010.
- [36] SUN, G.; THAI, S.; LAMBERT, G. R.; WOLF, D. C.; TULLY, D. B.; GOETZ, A. K.; GEORGE, M. H.; GRINDSTAFF, R. D.; DIX, D. J.; NESNOW, S. Fluconazole-induced hepatic cytochrome P450 gene expression and enzymatic activities in rats and mice. **Toxicol Lett.**, v. 164, p. 44-53, 2006.
- [37] GREEN, D. R.; REED, J. C. Mitochondria and apoptosis. **Science**, v. 281, p. 1309-1312, 1998.
- [38] FENECH, M.; CROTT, J.; TURNER, J.; BROWN, S. Necrosis, apoptosis, cytotoxicity and DNA damage in human lymphocytes measured simultaneously within the cytokinesis-block micronucleus assay description of the method and results for hydrogen peroxide. **Mutagenesis**, v. 14, n. 6, p. 605-612, 1999.
- [39] DECORDER, I.; DILLEN, L.; CUNDARI, E.; KIRSCH-VOLDERS, M. Elimination of micronucleated cells by apoptosis after treatment with inhibitors of microtubules. **Mutagenesis.**, v. 17, n. 4, p. 337-344, 2002.
- [40] SABLINA, A. A.; ILYINSKAYA, G. V.; RUBTSOVA, S. N.; AGAPOVA, L. S.; CHUMAKOV, P. M.; KOPNIN, B. P. Activation of p53-mediated cell cycle checkpoint in response to micronuclei formation. **J Cell Sci.** v. 111, p. 977-984, 1998.

[41] SENIOR, D. S.; SHAW, J. T. B. In vitro effects of Fluconazole (UK-49,858) and ketoconazole on mouse lymphocyte proliferation and on Candida Blastopore destruction by human polymorphonuclear leukocytes. **Int J Immunopharmacol.**, v. 10, n. 2, p. 169-173, 1988.

[42] NEGRINI, S.; GORGOULIS, V. G.; HALAZONETIS, T. D. Genomic instability — an evolving hallmark of cancer. **Mol Cell Biol.**, v. 11, p. 220-228, 2010.

[43] THOMPSON, L.; BAKHOUM, S. F.; COMPTON, D. A. Mechanisms of Chromosomal Instability. **Curr Biol.**, v. 20, p. 285-295, 2010.

REFERÊNCIAS

- ANVISA – AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Considerações e definições para pesquisa clínica.** Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/pesquisa/def.htm>> Acesso em: 04 nov. 10
- AUERBACH, C.; ROBSON, J. M. Chemical production of mutations. **Nature**, v. 157, p. 302, 1940.
- BENNET, J. E. Agentes antimicrobianos. In: BRUNTON, L. L.; LAZO, J. S.; PARKER, K. L. 11.ed. **Goodman e Gilman: as bases farmacológicas da terapêutica.** Rio de Janeiro: McGraw-Hil Interamericana do Brasil, 2006. p.1108-1111.
- BERNHARD, D.; SCHWAIGER, W.; CRAZZOLARA, R.; TINHOFER, I.; KOFLER, R.; CSORDAS, A. Enhanced MTT-reducing activity under growth inhibition by resveratrol in CEM-C7H2 lymphocytic leukemia cells. **Cancer Letters**, v. 195, p. 193–199, 2003.
- BERRIDGE, M. V.; HERST, P. M.; TAN, A. S. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. **Biotechnology Annual Review**, v. 11, p. 127-152, 2005.
- BOSSCHE, H. V. D.; MARICHAL P.; GORRENS, J.; COENE, M. C.; WILLEMSSENS, G.; BELLENS, D.; ROELS, I.; MOEREELS, H.; JANSSEN, P. A. Biochemical approaches to elective antifungal activity. Focus on azole antifungals. **Mycoses**, v. 32, n.1, p. 35–52, 1989.
- BUCKNER, F. S. Sterol 14-demethylase inhibitors for Trypanosoma cruzi infections. **Drug Targ. Kinetoplast Paras.**, v. 625, p. 61-80, 2008.
- CANDIDO, P. M. **Citotoxicidade, genotoxicidade, mutagenicidade e potencial apoptótico da isatina em células de mamíferos in vitro e in vivo.** 2010. Dissertação. (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, 2010.
- CILIÃO, H. L. **Avaliação da genotoxicidade e mutagenicidade da ciclosporina A, um imunossupressor utilizado em transplantados renais em linfócitos humanos in vitro.** 2010. Trabalho de conclusão de curso. (Graduação) – Universidade Estadual de Londrina, 2010.
- COLLINS, A. R. The Comet Assay for DNA Damage and Repair: Principles, Applications, and Limitations. **Molecular Biotechnology**, v. 26, p. 249-261, 2004.
- COLLINS, A. R.; OSOZ, A. A.; BRUBORG, G.; GAIVÃO, I.; GIOVANNELI.; KRUSZEWSKI, M.; SMITH, C. C.; STETINA, F. The comet assay: topical issues. **Mutagenesis**, v. 23, p.143-151, 2008.
- COECKE, S.; AHR, H.; BLAAUBOER, B. J.; BREMER, S.; CASATI, S.; CASTELL, J.; COMBES, R.; CORVI, R.; CRESPI, C.L.; CUNNINGHAM, M.L.; ELAUT, G.; ELETTI, B.; FREIDIG, A.; GENNARI, A.; GHERSI-EGEA, J. F.; GUILLOUZO, A.; HARTUNG,

T.; HOET, P.; INGELMAN-SUNDBERG, M.; MUNN, S.; JANSSENS, W.; LADSTETTER, B.; LEAHY, D.; LONG, A.; MENEGUZ, A.; MONSHOUWER, M.; MORATH, S.; NAGELKERKE, F.; PELKONEN, O.; PONTI, J.; PRIETO, P.; RICHERT, L.; SABBIONI, E.; SCHAACK, B.; STEILING, W.; TESTAI, E.; VERICAT, J.A.; WORTH, A. Metabolism: a bottleneck in *in vitro* toxicological test development. **Alternatives to laboratory animals**, v. 34, p. 48-84, 2006.

COOK, P.R.; BRAZELL, I. A.; JOST, E. Characterization of nuclear structures containing superhelical DNA. **Journal of Cell Science**, v. 22, p. 303-324, 1976.

COOPER, G. M. **A célula: uma abordagem molecular**. 2.ed. Porto Alegre: Artmed, 2001.

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

DEARFIELD, K. L.; CIMINO, M. C.; MCCARROLL, N. E.; MAUER, I.; VALCOVIC, L. R. Genotoxicity risk assessment: a proposed classification strategy. **Mutation Research**, v. 521, p. 121-135, 2002.

DEBRUYNE, D. Clinical pharmacokinetics of fluconazole in superficial and systemic mycoses. **Clin Pharmacokinet**, v. 33, p. 52-77, 1997.

DECORDIER, I.; DILLEN, L.; CUNDARI, E.; KIRSCH-VOLDERS, M. Elimination of micronucleated cells by apoptosis after treatment with inhibitors of microtubules. **Mutagenesis**, v. 17, p. 337-344, 2002.

DECORDIER, I.; LOOCK, K. V.; KIRSCH-VOLDERS, M. Phenotyping for DNA repair capacity. **Mutation Research**, v. 705, p. 107-129, 2010.

DE FLORA, S.; IZZOTI, A.; RANDEPATH, E.; BARTSCH, H.; NAIR, J.; BALANSKY, R. M.; VAN SCHOOTEN, F. J.; DEGAN, P.; FRONZA, G. WALSH, D.; LEWTAS, J. DNA adducts in chronic degenerative diseases. Pathogenetic relevance and implications in preventive medicine. **Mutation Research**, v. 366, p. 197-238, 1996.

DE FLORA, S.; FERGUSON, L. R. Overview of mechanisms of cancer chemopreventive agents. **Mutation Research**, v. 591, p. 8-15, 2005.

DIAZ, L. A. The current clinical value of genomic instability. **Seminars in Cancer Biology**, v. 15, p. 67-71, 2005.

EASTMOND, D. A. TUCKER, J. D. Identification of aneuploidy inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochore antibody. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 13, n. 1, p. 34-43, 1989.

ERDTMANN. A genotoxicidade nossa de todos os dias. In: SILVA, J.; ERDTMANN B.; HENRIQUES, J. A. P. **Genética toxicológica**. Porto Alegre: Alcance, 2003. p. 23-50.

- FELLOWS, M. D.; O'DONOVAN, M. R. Cytotoxicity in cultured mammalian cells is a function of the method used to estimate it. **Mutagenesis**, v. 22, p. 275-280, 2007.
- FENECH, M.; MORLEY, A. Solutions to the kinetic problem in the micronucleus test. **Cytobios**, v. 43, p. 233-246, 1985.
- FENECH, M. The cytokinesis-block micronucleus technique: A detailed description of the method and its application to genotoxicity study in human populations. **Mutation Research**, v. 285, p. 35-44, 1993.
- FENECH, M. The advantages and disadvantages of cytokinesis-block micronucleus method. **Mutation Research**, v. 392, p. 11-18, 1997.
- FENECH, M.; CROTT, J.; TURNER, J.; BROWN, S. Necrosis, apoptosis, cytotoxicity and DNA damage in human lymphocytes measured simultaneously within the cytokinesis-block micronucleus assay description of the method and results for hydrogen peroxide. **Mutagenesis**, v. 14, n. 6, p. 605-612, 1999.
- FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research**, v. 455, p. 81-95, 2000.
- FUSIC, A.; MARKOVIC, D.; HERCEG Z.; GAMULIN, M.; KATIC, J.; STOJKOVIC, R.; FERENCIC, Z.; MILDNER, B.; JAZBEC, A.; DOBRANIC, T. Developmental and transplacental genotoxicology: Fluconazole. **Mutation Research**, v. 657, p. 43-47, 2008.
- GONTIJO, A. M. M. C.; TICE, R. Teste do cometa para a detecção de dano do DNA e reparo em células individualizadas. In: RIBEIRO, L. R.; SAVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. **Mutagênese Ambiental**. Canoas: Ulbra, 2003. p. 247-279.
- GREEN, D. R.; REED, J. C. Mitochondria and apoptosis. **Science**, v. 281, p. 1309-1312, 1998.
- GUECHEVA, T. N.; HENRIQUES, J. A. P. Metabolismo de xenobióticos: citocromo P-450. In: SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J. A. P. **Genética toxicológica**. Porto Alegre: Alcance, 2003. p. 225-250.
- HEDDLE, J. A. Measurement of chromosomal breakage in cultured cells by micronucleus technique. In: EVANS, H. J.; LLOYD, D. C (eds.). **Mutation-Induced Chromosome damage to Man**. Edinburg: University Press, 1976.
- HARTUNG, T.; DASTON, G. Are in vitro suitable for regulatory use?. **Toxicological sciences**, v. 111, p. 233-237, 2009.
- HASSAN, N. H. Miconazole genotoxicity in mice. **Journal of applied toxicology**, v. 17, n. 5, p. 313-319, 1997.

- HITCHCOCK, C. A.; DICKINSON, K.; BROWN, S. B.; EVANS, E. G.; ADAMS, D. J. Interaction of azole antifungal antibiotics with cytochrome P-450-dependent 14 α -sterol demethylase purified from *Candida albicans*. **Biochemical Journal**, v. 266, p. 475-480, 1990.
- HO, P. Y.; LIANG, Y. C.; HO, Y. S.; CHEN, C. T.; LEE, W. S. Inhibition of human vascular endothelial cells proliferation by terbinafine. **International Journal of Cancer**, v. 111, p. 51–59, 2004.
- HOWLAND, R. H. Pharmacogenetics and pharmacovigilance. **Drug Safety**, v. 32, p. 265-270, 2009.
- JOHANSEN, H. K.; GOTZSCHE, P. C. Amphotericin B versus fluconazole for controlling fungal infections in neutropenic cancer patients. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, v.2, 2002.
- KOBAYASHI, H.; SUGIYAMA, C.; MORIKAWA, Y.; HAYASHY, M.; SOFUNI, T. A comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the single cell gel electrophoresis assay. **MMS Communications**, v. 3, p. 103-115, 1995.
- LAVRIJSEN, K. L. M.; VAN HOUDT, J. M. G.; VAN DYCK, D. M. J.; MEULDERMANS, W. E. G.; HEYKANTS, J. J. P. Induction potential of Fluconazole toward drug-metabolizing enzymes in rats. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 34, p. 402-408, 1990.
- LEE, W. S.; CHEN, R. J.; WANG, Y. J.; TSENG, H.; JENG, J. H.; LIN, S. Y.; LIANG, Y. C.; CHEN, C. H.; LIN, C. H.; LIN, J. K.; HO, .P.; CHU, J. S.; HO, W. L.; CHEN, L. C.; HO, Y. S. *In vitro* and *in vivo* studies of the anticancer action of terbinafine in human cancer cell lines: G0/G1 p53- associated cell cycle arrest. **International J Cancer** , v. 106, p. 125–137, 2003.
- LIAO, W.; MCNUTT, M. A.; ZHU, W. G. The comet assay: a sensitive method for detecting DNA damage in individual cells. **Methods**, v. 48, p. 46-53, 2009.
- LIEBSCH, M.; SPIELMANN, H. Currently available *in vitro* methods used in the regulatory toxicology. **Toxicology Letters**, v. 127. p. 127-134, 2002.
- MALUF, L. M. P.; POMPÉIA, C. Morte celular: apoptose e necrose. In: PERES, C. M.; CURI, R. **Como cultivar células**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. p.200-223.
- MANOHARAN, K.; BANERJEE, M. R. β -Carotene reduces sister chromatid exchange induce chemical carcinogens in mouse mammary cells in organ culture. **Cell Biology International Reports**, v. 9, p. 783-789, 1985.

MARR, K. A.; SEIDEL, K.; SLAVIN, M. A.; BOWDEN, R. A.; SCHOCH, H. G.; FLOWERS, M. E.; COREY, L.; BOECKH, M. Prolonged Fluconazole prophylaxis associated with persistent protection against candidiasis-related death in allogeneic marrow transplant recipients: long term follow up a randomized, placebo-controlled trial. **Blood**, v. 96, p. 2055-2061, 2000.

MCGAHON, A. J., MARTIN, S. J., BISSONNETTE, R. P., MAHBOUDI, A., SHI, Y., MOGIL, R. J., NISHIOKA, W. K., GREEN, D. R. The End of the (Cell) Line: Methods for the Study of Apoptosis *In Vitro*, In: SCHURARTZ, L. M.; OSBOURNE, B. A. **Methods in cell biology**. [s.l.]: Academic Press, 1995. v. 46, p. 153-184.

MACGREGOR, J. T.; CASCIANO, D.; MÜLLER, L. Strategies and testing methods for identifying mutagenic risks. **Mutation Research**, v. 455, p. 3-20, 2000.

MELO, P. S.; MARIA, S. S.; VIDAL, B. C.; HAUN, M.; DURAN, N. Violacein cytotoxicity and induction of apoptosis in V79 cells. **In vitro Cellular & Developmental Biology: Animal**, v. 36, p. 639-543, 2000.

METZGER, I. F.; SOUZA-COSTA, D. C.; TANUS-SANTOS, J. E. Farmacogenética: princípios, aplicações e perspectivas. **Medicina Ribeirão Preto**, v. 39, p. 515-521, 2006.

MINAMOTO, G. Y.; ROSENBERG, A. S. Fungal infections in patients with Acquired Immunodeficiency Syndrome. **Medical Clinics of North America**, v. 81, n. 2, p. 381-409, 1997.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunology Method**, v. 65, p. 55-63, 1983.

NEGRINI, S.; GORGOULIS, V. G.; HALAZONETIS, T. D. Genomic instability — an evolving hallmark of cancer. **Molecular Cell Biology**, v. 11, p. 220-228, 2010.

OSTLING, O.; JOHANSEN, K. J. Microeletrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 123, n. 1, p. 291-298, 1984.

PFIZER, 2005. Bula Zoltec ®. Fluconazol. Disponível em: <<http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/BM/BM%5B26073-1-0%5D.PDF>>. Acesso em: 3 nov. 2009.

PIRMOHAMED, M.; PARK, B. K. Genetic susceptibility to adverse drug reactions. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 22, p. 298-305, 2001.

RABELLO-GAY, M. N.; RODRIGUES, M. A. R.; MONTELEONE-NETO, R. (eds). **Mutagênese, teratogênese e carcinogênese: métodos e critérios de avaliação**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética/Revista Brasileira de Genética, 1991. p. 67.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. **Farmacologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997.

RIBEIRO, L. R.; MARQUES, E. K. A importância da mutagênese ambiental na carcinogênese humana. In: RIBEIRO, R. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. **Mutagênese ambiental**. Canoas: Ulbra, 2003. p. 21-28.

ROMERO, A.; PALACÍN, C.; MOSESSO, C.; HODSON-WALKER, G.; MARCOS, R.; BATISTE-ALENTORN, M.; VILLAMAYOR, F.; SACRISTÁN, A.; ORTIZ, J. A. Genotoxicity studies on sertaconazole. **Arzneimittel-Forschung**, v. 42, n. 5, p. 743-745, 1992.

ROSS, J. A.; MOORE, T.; LEAVITT, S. A. *In vivo* mutagenicity of conazole fungicides correlates with tumorigenicity. **Mutagenesis**, v. 24, n. 2, p. 149-152, 2009.

SABLINA, A. A.; ILYINSKAYA, G. V.; RUBTSOVA, S. N.; AGAPOVA, L. S.; CHUMAKOV, P. M.; KOPNIN, B. P. Activation of p53-mediated cell cycle checkpoint in response to micronuclei formation. **Journal of Cell Science**, v. 111, p. 977-984, 1998.

SCHIMID, W. Chemical mutagen testing on *in vivo* somatic mammalian cells. **Agents and Actions**, v. 3, p. 77-85, 1973.

SENIOR, D. S.; SHAW, J. T. B. *In vitro* effects of Fluconazole (UK-49,858) and ketoconazole on mouse lymphocyte proliferation and on Candida Blastopore destruction by human polymorphonuclear leukocytes. **Internacional Journal of Immunopharmacology**, v. 10, p. 169-173, 1988.

SHAIK, I. H.; MEHVAR, R. Cytochrome P450 induction by phenobarbital exacerbates warm hepatic ischemia-reperfusion injury in rat livers. **Free Radical Research**, v. 44, p. 441-453, 2010.

SHANKS, N.; GREEK, R.; GREEK, J. Are animal models predictive for humans?. **Philosophy, Ethics, and Humanities Medicine**, v. 4, p. 2, 2009.

SINGH, N. P.; MCCOY, M. T.; TICE, R. R.; SCHNEIDER, E. L. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, v. 175, p. 184-191, 1988.

SNUSTAD, D. P.; SIMMONS, M. J. Mutação, reparo do DNA e recombinação. In: SNUSTAD, D. P.; SIMMONS, M. J. **Fundamentos de genética**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001, p. 311-344.

SOMCHIT, N.; NORSHAHIDA, A. R.; HASIAH, A. H.; ZURAINI, A.; SULAIMAN, M. R.; NOORDIN, M. M. Hepatotoxicity induced by antifungal drugs itraconazole and Fluconazole in rats: a comparative *in vivo* study. **Human and Experimental Toxicology**, v. 23, p. 519-525, 2004.

SOMCHIT, N.; NGEER, C. S.; YAAKOB, A.; AHMAD, Z.; ZACARIA, Z. A. Effects of cytochrome P450 inhibitors on Itraconazole and Fluconazole induced cytotoxicity in hepatocytes. **Journal of Toxicology**, v. 2009, p. 1-7, 2009.

SPIELMANN, H.; LIEBSCH, M. Lessons learned from validation of *in vitro* toxicity test: from failure to acceptance into regulatory practice. **Toxicology in Vitro**, v. 15, p. 585-590, 2001.

SUN, G.; THAI, S.; LAMBERT, G. R.; WOLF, D. C.; TULLY, D. B.; GOETZ, A. K.; GEORGE, M. H.; GRINDSTAFF, R. D.; DIX, D. J.; NESNOW, S. Fluconazole-induced hepatic cytochrome P450 gene expression and enzymatic activities in rats and mice. **Toxicology Letters**, v. 164, p. 44-53, 2006.

SULLIVAN, D.; MORAN, G.; COLEMAN, D. Fungal diseases of humans. In: KAVANAGH, K. **Fungi: biology and applications**. England: John Wiley and Sons, 2005. p. 171-190.

THOMPSON, G. R.; CADENA, J.; PATTERSON, T. F. Overview of Antifungal Agents. **Clinics in Chest Medicine**, v. 30, p. 203-215, 2009.

THOMPSON, L.; BAKHOUM, S. F.; COMPTON, D. A. Mechanisms of Chromosomal Instability. **Current Biology**, v. 20, p. 285-295, 2010.

TIBONI, G. M.; MAROTTA, F.; CARLETTI, E. Fluconazole alters CYP26 gene expression in mouse embryos. **Reproductive toxicology**, v. 27, p. 199-202, 2009.

TITENKO-HOLLAND, N.; WINDHAM, G.; KOLACHANA, P.; REINISCH, F.; PARVATHAM, S.; OSORIO, A. M.; SMITH, M. T. Genotoxicity of malathion in human lymphocytes assessed using the micronucleus assay *in vitro* and *in vivo*: a study of malathion-exposed workers. **Mutation Research**, v. 627, p. 78-91, 1997.

VAN PUIJENBROEK, E.; CONEMANS, J.; VAN GROOTHEEST, K. Spontaneous ADR Reports as a trigger for pharmacogenetic research: A prospective observational study in the Netherlands. **Drug Safety**, v. 32, n. 3, p. 255-264, 2009.

YUAN, J.; KROEMER, G. Alternative cell death mechanisms in development and beyond. **Genes and development**, v. 24, n. 23, p. 2592-2602, 2010.

YÜZBASIOGLU, D.; ÜNAL, F.; YILMAZ, S.; AKSOY, H.; ÇELİK, M. Genotoxicity testing of fluconazole *in vivo* and *in vitro*. **Mutation Research**, v. 649, p. 155-160, 2008.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The importance of pharmacovigilance: safety monitoring of medicinal products**. 2002. Disponível em: <<http://infocooperation.org/hss/en/d/Js4893e/2.html>>. Acesso em: 15 dez. 2010.

ZARN, J. A.; BRUSCHWEILER, B. J.; SCHLATTER, J. R. Azole fungicides affect mammalian steroidogenesis by inhibiting sterol 14 α -Demethylase and Aromatase. **Environmental Health Perspectives**, v. 111, n. 3, p. 255-26, 2003.