

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS CLASTOGÊNICOS DO FLUCONAZOL, EM CELULAS DE
MEDULA ÓSSEA DE RATOS WISTAR TRATADOS *in vivo*

Edith Alba Luz Segovia Corrales

Monografia apresentada à Coordenação
do Curso de Ciências Biológicas, da
Universidade Federal de Uberlândia,
para obtenção do Grau de Bacharel em
Ciências Biológicas.

UBERLÂNDIA - MINAS GERAIS
DEZEMBRO - 1993

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS CLASTOGENICOS DO FLUCONAZOL, EM CÉLULAS DE
MEDULA ÓSSEA DE RATOS WISTAR TRATADOS *in vivo*

Edith Alba Luz Segovia Corrales

Prof. Dr. Mário António Spanó
Orientador

Monografia apresentada à Coordenação
do Curso de Ciências Biológicas, da
Universidade Federal de Uberlândia,
para obtenção do Grau de Bacharel em
Ciências Biológicas.

UBERLÂNDIA - MINAS GERAIS
DEZEMBRO - 1993

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS CLASTOGÊNICOS DO FLUCONAZOL, EM CÉLULAS DE
MEDULA ÓSSEA DE RATOS WISTAR TRATADOS *in vivo*

APROVADA PELA COMISSÃO EXAMINADORA EM ____/____/____.

Prof. Dr. Mário Antônio Spanó
-Orientador-

Prof. Júlio César Nepomuceno
-Conselheiro-

Prof. Dr. Malcon A. M. Brandeburgo
-Conselheiro-

UBERLÂNDIA - MINAS GERAIS
DEZEMBRO - 1993

HOMENAGEM ESPECIAL

Aos meus pais,
Domingo Segovia e Alicia Corrales,
por sempre me estimularem nos estudos.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao meu Orientador Prof. Dr. Mário Antônio Spanó, agradeço pelas orientações, paciência, dedicação e apoio, durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos professores Júlio César Nepomuceno e Ana Maria Bonetti, pelas orientações, apoio e estímulo.

A Edna Bruns Navarro, pela dedicação, carinho e disponibilidade em me ajudar.

I N D I C E

| | |
|----------------------------------|----|
| RESUMO | i |
| INTRODUÇÃO | 1 |
| MATERIAIS E MÉTODOS | 9 |
| RESULTADOS | 13 |
| DISCUSSÃO | 19 |
| CONCLUSÃO | 23 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 24 |

RESUMO

A análise de ocorrência de mutações genéticas sob a ação de fármacos utilizados na terapêutica humana, é necessário para garantir a completa eficiência dos mesmos.

Muitas drogas utilizadas pelo homem, e mesmo agentes físicos, podem causar perturbações no genoma humano.

Com a finalidade de testar a ação clastogênica do agente fungicida Fluconazol, foi realizado o teste *in vivo* com células de medula óssea de ratos Wistar.

Este teste consistiu em inocular doses diferentes (1,0; 1,5 e 2,0mg de Fluconazol/100g peso do animal) em ratos Wistar, sendo 1 dose 48 h e outra 24 h antes do sacrifício.

Após o sacrifício retiram-se as medulas ósseas e preparam-se as lâminas. Estas lâminas foram observadas ao microscópio óptico contabilizando-se o número de células com aberrações.

Como controle positivo foi utilizado o agente aquilante Ciclofosfamida. Os resultados obtidos com a Ciclofosfamida confirmam a efetividade do teste, assim como dados obtidos em outras pesquisas, que a classificam como uma substância altamente clastogênica.

Comparando-se as frequências de aberrações encontradas nas diferentes concentrações de Fluconazol com o controle negativo, observa-se que, estatisticamente, as diferenças foram não significativas.

Assim, podemos concluir que, nestas condições experimentais o Fluconazol não é um agente clastogênico.

I N T R O D U Ç Ã O

A análise da ocorrência de mutações genéticas, sob a ação de fármacos utilizados na terapêutica humana, faz-se necessário com a finalidade de garantir a completa eficiência dos mesmos. A ação de agentes físicos, químicos e biológicos podem levar a alterações cromossômicas, as quais podem ter efeitos letais nas gerações futuras, ou então acarretar alterações grosseiras nos fenótipos dos indivíduos. Isto vem se confirmando desde que MÜLLER, 1927, in RABELLO-GAY (1991) demonstrou que os Raios-X induzem mutações letais.

Os danos genéticos produzidos podem ocorrer num ponto específico do cromossomo (mutação gênica), ou alterar a estrutura e o número de cromossomos (aberrações cromossômicas) (HOFFMANN, 1991, in DIAZ, 1993).

As mutações podem ser de 2 tipos: substituição de pares de bases ou por mudança de matriz de leitura. As substituições podem ser de 2 tipos: transições - que consiste na substituição de uma purina por outra, ou uma pirimidina por outra; e transversões - que consiste na substituição de uma purina por uma pirimidina ou vice-versa. (Ayala & Kiger Jr., 1984).

As aberrações cromossômicas podem ser de vários tipos, dependendo da estrutura química do agente genotóxico; podemos ter aberrações cromossômicas com quebra direta da estrutura do DNA, distorção da dupla hélice, etc.

Assim, temos que, as aberrações cromossômicas (A.C.) são macro-lesões do DNA e podem ser numéricas (perda ou ganho), ou estruturais ("gaps", quebras, fragmentos ou rearranjos) e têm como consequência uma tentativa da célula retificar o dano no DNA, ou contorná-lo de algum modo durante a replicação (EVANS, 1977, in SAKAMOTO, 1986).

Os agentes químicos e físicos capazes de induzir a formação de A.C. são chamados de agentes clastogênicos e incluem análogos de base, agentes alquilantes, compostos que interferem na duplicação do DNA, agentes intercalantes, inibidores de reparo e outros (EVANS, 1977, in SAKAMOTO, 1986). Os agentes alquilantes reagem com o DNA adicionando grupamentos etil ou metil às bases. Isto resulta no mau pareamento da base afetada, ou em sua perda total, criando uma falha (BARNES, 1990).

Os agentes mutagênicos podem impedir o funcionamento correto ou alternando a estrutura do DNA ou interferindo com enzimas que estão envolvidas, direta ou indiretamente, em seu metabolismo (Ayala & Kiger Jr., 1984).

As substâncias químicas, em sua ação sobre o DNA, podem ser divididas em duas classes: as que produzem aberrações em todas as fases do ciclo celular (S-independentes), e as que dependem da síntese de DNA para manifestar seu efeito (S-dependentes). As S-independentes (ex: bleomicina) induzem quebras nas duas cadeias do DNA, produzindo aberrações cromossômicas em G₁, cromatídicas em G₂ e uma mistura dos dois tipos em S. As S-dependentes (ex:

agentes alquilantes) produzem seu efeito na fase S ou quando as células passam por uma fase de síntese entre a exposição e a observação do efeito, as aberrações surgem devido a erros na duplicação do DNA (RABELLO-GAY, 1991a).

Entre estas substâncias químicas temos a Ciclofosfamida (C.F.), agente químico comprovado como clastogênico. Comparando os efeitos clastogênicos da C.F., com uma dose de 2,5 mg/100g, em células de medula óssea de hamster Armênia (AH), camundongos, ratos, cobaias (porco da índia) e hamster chinês, observou-se ser a cobaia (porco da índia) o mais sensível à ação clastogênica da C.F. e o AH o mais resistente (NERSESSIAN et al, 1992).

Em doses relativamente baixas (10-50 mg/kg), as aberrações cromossômicas em Hamster harmênia foram somente do tipo quebras de cromátide e de isocromátide. Altas doses de Ciclofosfamida (100-300 mg/Kg) induziram um amplo espectro de dano cromossômico (intercâmbios, quebras cromatídicas e isocromatídicas, metáfases com múltiplas aberrações e "gaps"), com prevalência de quebras cromatídicas (NERSESSIAN et al, 1992).

Ações farmacológicas e citotóxicas da C.F.: a ação citotóxica geral da C.F. é semelhante à de outros agentes alquilantes, mas foram observadas algumas mais notáveis. Produz menos lesões nos megacariócitos e a trombocitopenia é menos comum (GOODMAN et al, 1991).

Absorção: é por via oral e é ativada pelo sistema hepático do citocromo P450 (GOODMAN et al, 1991).

Usos terapêuticos e toxicidade clínica: o espectro clínico de atividade da C.F. é muito amplo e assemelha-se à mostarda nitrogenada. Mostra-se eficaz na doença de Hodgkin e em outros linfomas. Foram relatadas remissões completas e curas expostas no

linfoma de Burkitt e na leucemia linfoblástica aguda de crianças quando a C.F. é utilizada com outros fármacos (GOODMAN et al, 1991).

Foram obtidos resultados benéficos no mieloma múltiplo, na leucemia linfocítica crônica, em carcinomas de pulmão, mamas, colo uterino e ovário e no neuroblastoma, retinoblastoma e outras neoplasias da infância (GOODMAN et al, 1991).

Em virtude de suas potentes propriedades imunossupressoras, a C.F. tem recebido considerável atenção para o controle da rejeição de órgãos após transplantes e em distúrbios não neoplásicos associados a uma alteração da reação imune. Aconselha-se muita cautela quando a droga é considerada para uso nessas condições, não apenas em razão dos efeitos tóxicos agudos, como também pelo seu alto potencial de induzir esterilidade, efeitos teratogênicos, mutações e câncer (GOODMAN et al, 1991).

Doses: a dose diária de 2 a 3 mg/kg, por via oral ou intravenosa, tem sido recomendada para pacientes com neoplasias mais susceptíveis, tais como linfomas e leucemia, ou com comprometimento da função medular. Para o tratamento de carcinomas e neoplasias mais resistentes utiliza-se dose de 4 a 8 mg/Kg por via intravenosa (i.v.), por 6 dias, seguida de uma dose de manutenção oral de 1 a 5 mg/kg ao dia, 3 a 5 mg/kg via i.v. a cada 7 a 10 dias (GOODMAN et al, 1991).

A análise dos efeitos genotóxicos de substâncias utilizadas no tratamento das diferentes doenças pode ser realizada em diferentes tipos de testes. O mais utilizado é o sistema de células de medula óssea de mamíferos tratados in vivo.

SISTEMA IN VIVO

Os estudos in vivo podem ser realizados no sistema de células de medula óssea de mamíferos, nos quais se inocula diferentes

concentrações da droga a ser testada, a fim de conhecer o potencial mutagênico.

A obtenção do material de estudo se faz retirando os femures e separando a medula óssea dos mesmos.

Este sistema oferece grandes vantagens. Entre elas podemos citar: o metabolismo do animal (que nunca pode ser totalmente reproduzido num sistema *in vitro*) e também a reprodução das condições de exposição a que o homem está sujeito, seja via de administração, duração do tratamento e/ou condições nutricionais (RABELLO-GAY, 1991).

O sistema *in vivo* é muito acessível economicamente, já que os mamíferos a serem utilizados (ratos Wistar) são fáceis de serem adquiridos; e do ponto de vista científico, oferecem maiores garantias com relação à veracidade dos efeitos, já que os indivíduos tratados apresentam características fisiológicas semelhantes às do homem.

FLUCONAZOL

É um novo agente fungicida, aparentemente melhor que os fungicidas anteriormente utilizados (KOWALSKY et al, 1991).

O nome químico do Fluconazol é 2,4-difluor- α,α -bis (1H-1,2,4-triazol-1-ilmetil) benzil álcool. A sua fórmula molecular é $C_{12}H_{12}F_2N_4O$ e seu peso molecular PM= 306,3 (KOWALSKY et al, 1991).

MECANISMO DE AÇÃO: A forma de ação de agentes fungicidas azoles (clotrimazol, miconazol, ketoconazol) e triazoles (Fluconazol, itraconazol) parece ser a de originar distúrbios na permeabilidade da membrana celular dos fungos (VANDEN BOSSCHE, 1985; VANDEN BOSSCHE et al, 1983).

Em concentrações obtidas com o uso sistêmico o principal efeito dos imidazóis e triazóis sobre os fungos é a inibição da

esterol 14- α -desmetilase, um sistema enzimático dependente do citocromo P₄₅₀ microsossômico. Os imidazóis e triazóis prejudicam a biossíntese do ergosterol para a membrana citoplasmática e levam ao acúmulo de 14- α -metil esteróis (VANDEM BOSCHE et al, 1986) (in GOODMAN, 1991) estes esteróis metílicos podem romper o íntimo agrupamento das cadeias acil dos fosfolipídeos, alterando as funções de certos sistemas enzimáticos ligados à membrana e inibindo o crescimento (GOODMAN, 1991b).

Ao contrário da anfotericina B, que se liga ao ergosterol na membrana celular dos fungos, formando poros ou canais que conduzem o vasamento de constituintes intracelulares vitais (BRAJTBURG et al, 1990), os azoles especificamente inibem a C-14 demetilação do lanosterol, o qual é necessário para o biossíntese do ergosterol (KOWALSKY et al, 1991).

ABSORÇÃO: O Fluconazol é hidro-solúvel e é imediatamente absorvido no trato gastro intestinal. O pico de concentração plasmática em humanos é alcançado dentro de 2 h a 4 h após a administração oral e alcança de 1,4 ug/ml após uma dose de 50 ug a 2,82 ug/ml após uma dose de 150 ug (HUMPHREY et al, 1985; HOUANG et al, 1990).

DISTRIBUIÇÃO: O Fluconazol é uma molécula pequena, hidro-solúvel e apresenta baixo grau de ligação com proteínas, característica que acentua a habilidade da droga para penetrar nos diversos compartimentos dos tecidos, incluindo o sistema nervoso central (S.N.C.) (KOWALSKY et al, 1991). Muitos estudos em animais (WALSH et al, 1989; PERFECT et al, 1986) e humanos (FOULDS et al, 1988a; FOULDS et al, 1988b; TUCKER et al, 1988) têm demonstrado a habilidade do Fluconazol em penetrar o S.N.C na presença ou ausência de irritação meningial.

ELIMINAÇÃO: O rim faz o maior papel na eliminação do Fluconazol (KOWALSKY et al, 1991). TOON et al (1988) investigando a farmacocinética do Fluconazol em 3 grupos de pacientes com graus variáveis de função renal, estabeleceram que, enquanto o volume de distribuição não era afetado pela função renal, a meia-vida no soro e a eliminação renal o eram. Em casos de insuficiência renal, a meia-vida é longa, requerendo doses ajustadas à eliminação de creatinina (DEBRUYNE & RYCKELYNCK, 1993).

EFICÁCIA: a) Contra infecções criptocócicas: devido a sua excelente penetração no fluido cerebrospinal, o Fluconazol é o mais indicado para ser usado no tratamento de micoses do S.N.C.; Cryptococosis representam as mais importantes micoses em sua categoria e, na terapia da mesma, o Fluconazol gerou muita excitação, especialmente com respeito a pacientes com Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), que têm 10% de incidência de meningites criptocócicas (KOWALSKY et al, 1991).

Estudos realizados em vários centros franceses, em pacientes com AIDS e meningite criptocócica, demonstraram que 400 mg/dia de Fluconazol foi efetivo em transformar as culturas de fluido cérebro espinais para negativo, assim como dose de manutenção da terapia para impedir uma recaída (DUPONT, 1988).

b) Contra Candidíases: o uso do Fluconazol no tratamento e prevenção de infecções por *Candida* sp em pacientes com AIDS foi avaliado em numerosos experimentos clínicos. A maioria dos investigadores avaliam o fluconazol só, e outros o fazem com ketoconazol, clotrimazol ou itraconazol (KOWALSKY, 1991), apresentando o Fluconazol uma porcentagem de cura de 92%, frente a 58% do Ketoconazol.

c) Contra outras infecções fúngicas: o Fluconazol foi utilizado no tratamento de aspergilloses e coccidioidomycoses (KOWALSKY, 1991).

d) Também foi testado a segurança, tolerância em crianças com doenças neoplásicas. Algumas destas crianças apresentaram um aumento assintomático dos valores de aminotransferase hepática antes da 4.^a ou 6.^a dose. A eliminação renal de Fluconazol esteve entre 65% e 5% do total de eliminação e demonstrou a predominância da excreção renal desta droga. A curta meia-vida e a alta frequência da elevação da aminotransferase em comparação com as doses de adultos justifica cuidadosas investigações do Fluconazol em provas clínicas (LEE et al, 1992).

OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivos:

- Verificar os possíveis efeitos clastogênicos do Fluconazol, utilizando, como sistema teste, células de medula óssea de ratos Wistar tratados *in vivo*.
- Estabelecer uma possível relação dose-efeito genotóxico.
- Contribuir com a classe médica no que se refere à escolha e emprego de medicamentos menos prejudiciais à saúde humana.

M A T E R I A I S E M É T O D O S

A droga que foi utilizada é o Fluconazol, agente fungicida, cujo nome químico é 2,4-difluor- α,α -bis(1H-1,2,4-triazol-1-ilmetil) benzil álcool, e de fórmula molecular $C_{13}H_{12}F_2N_4O$ e $PM = 306,3$ (KOWALSKY et al, 1991).

O material utilizado foi o sistema de células de medula óssea de mamíferos (ratos Wistar).

Foram utilizados 5 animais por grupo de tratamento (Tabela 1), num total de 25, considerando-se os utilizados como controle.

Os animais tratados com o Fluconazol receberam duas injeções i.p. num intervalo de 24 h. Após 24 h da 2.^a injeção os mesmos foram sacrificados.

A figura 1 mostra esquemas dos diferentes tempos de tratamento de ratos Wistar, com Fluconazol e Ciclofosfamida.

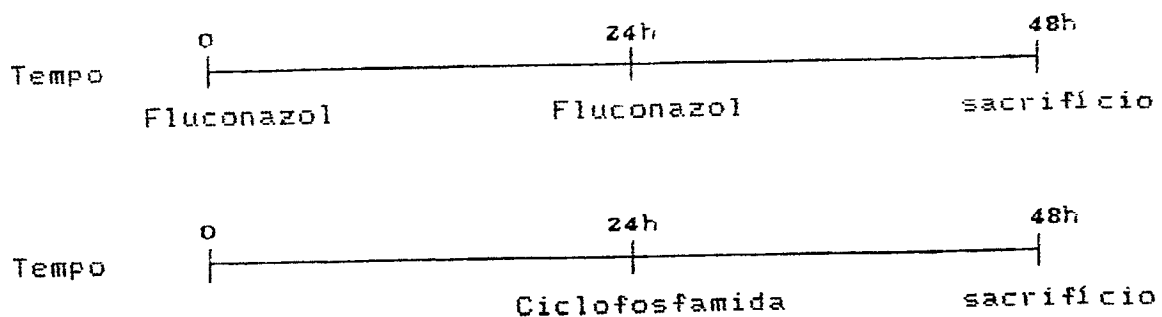


Figura 1: Esquema dos tempos de tratamentos de rato Wistar com Fluconazol e Ciclofosfamida.

| GRUPO DE TRATAMENTO |
|--|
| 1. Controle |
| 2. Controle positivo: 2,0mg Ciclofosfamida/100g peso do animal |
| 3. 1,0mg Fluconazol/100g peso do animal |
| 4. 1,5mg Fluconazol/100g peso do animal |
| 5. 2,0mg Fluconazol/100g peso do animal |

Tabela 1: Diferentes grupos de tratamento de ratos Wistar com Fluconazol e Ciclofosfamida.

ETAPAS

- Animais com aproximadamente 100g de peso, foram tratados intraperitonealmente (i.p.) com concentrações de :
 - 2 x 1,0mg/100g de peso do animal
 - 2 x 1,5mg/100g de peso do animal
 - 2 x 2,0mg/100g de peso do animal
- Aos controles positivos foi inoculado Ciclofosfamida (CF), 2,0mg/100g de peso do animal.
- Após 24 h do último tratamento foi injetado i.p. colchicina a 0,16% na proporção de 0,5ml para cada 100g de peso do animal, a fim de obter células em metáfase; esta aplicação foi feita 1:30 horas antes do sacrifício.
- Após o sacrifício com éter, procedeu-se a retirada dos fêmures e foram cortadas as epífises. A medula óssea foi removida com o auxílio de uma seringa contendo 5ml de solução hipotônica de KCl 0,075 M. Após a homogeneização do material, foi colocada a suspensão de células na estufa a 37°C, durante 10 minutos, contados a partir da retirada da medula.

- Foi centrifugado o material a 800 r.p.m. durante 5 minutos.
- Foi desprezado o sobrenadante e adicionados 5 ml de fixador Metanol-Ácido acético (3:1). Foi trocado o fixador duas vezes, sendo a última quantidade variável, conforme diluição desejável, e foram feitas as lâminas.

PREPARAÇÃO DAS LÂMINAS

- Em lâmina molhada e gelada, pingou-se uma gota da suspensão, mantendo-se a lâmina levemente inclinada para espalhar o material.
- Passou-se a lâmina na chama, tendo cuidado em não aquecê-la muito.
- A coloração foi processada com o corante Giemsa diluído numa solução tampão (NaH_2PO_4 0,06 M e KH_2PO_4 0,06 M - pH 6,8), na proporção 1:30, durante 5 minutos.

ANÁLISE CROMOSSÔMICA

A análise cromossômica foi realizada em teste cego, com a finalidade de se evitar tendenciosidade de interpretação.

As lâminas codificadas foram examinadas em microscópio óptico, com objetiva de imersão 100X. Os cromossomos foram desenhados esquematicamente e identificados de acordo com o número, tamanho e posição relativa do centrômero.

Foram analisados 100 células metafásicas por animal.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística destes dados foi feita de acordo com um teste desenvolvido por (Gold, 1962; in Spanó, 1981) por meio do qual é possível dizer se a diferença existente entre duas proporções é ou não estatisticamente significativa. Este teste

consiste na determinação de um intervalo de confiança calculado

por:

$$\theta_1 - L_k \cdot S(\theta_1)$$

onde

$$\theta_1 = P_1 - P_2$$

P_1 = proporção de metáfases com aberrações encontrada num determinado grupo de tratamento (1), dado por x_1/n_1 , onde x_1 é o número de metáfases com aberrações encontrado no grupo de tratamento 1 e n_1 é o número total de metáfases analisadas deste grupo 1.

P_2 = proporção de metáfases com aberrações encontrada num outro grupo de tratamento 2, dado por x_2/n_2 , onde x_2 é o número de metáfases com aberrações encontrado no grupo 2 e n_2 é o número total de metáfases analisadas deste grupo 2.

L_k = fator de proporcionalidade, variável de acordo com o grau de liberdade.

$$S(\theta_1) = S^2(\theta_1)$$

$$S^2(\theta_1) = \sqrt{\frac{x_1(n_1 - x_1)}{n_1^3} + \frac{x_2(n_2 - x_2)}{n_2^3}}$$

Sempre que o intervalo de confiança contiver o valor 0,0 (zero), diz-se que a diferença entre as proporções não é estatisticamente significativa. Se não estiver incluso o valor zero, a diferença entre as proporções é estatisticamente significativa.

RESULTADOS

Ratos Wistar de aproximadamente 100g foram tratados com diferentes doses de Fluconazol (1,0; 1,5 e 2,0mg/100g de peso do animal).

Os animais receberam 02 (duas) doses de Fluconazol, com intervalo de 24h entre a primeira e a segunda dose e foram sacrificados 24h após a segunda dose.

Para cada dose de Fluconazol foram tratados 05 (cinco) animais. De cada animal foram analisadas 100 metáfases, perfazendo um total de 500 metáfases analisadas por tratamento.

Como controle positivo foi feito tratamento de 05 (cinco) animais com uma dose única de 2,0mg de Ciclofosfamida para cada 100g de peso do animal. O tratamento com a Ciclofosfamida foi feito junto com o segundo tratamento com Fluconazol, permitindo, desta forma, que todos os animais fossem sacrificados ao mesmo tempo.

Foram analisadas 100 metáfases por animal. No entanto, devido a problemas técnicos, foram descartadas da amostragem, as lâminas de um animal tratado com Ciclofosfamida. Assim sendo, foram analisadas, no total, apenas 400 metáfases para o grupo controle positivo.

Como controle negativo, foram sacrificados 5 (cinco) animais, sem que tivessem sido submetidos a qualquer tipo de tratamento. De cada animal do grupo controle foram analisadas 100 metáfases por animal, perfazendo um total de 500 metáfases analisadas.

Desta forma, este trabalho representa o resultado obtido na análise total de 2.400 metáfases analisadas.

A análise foi feita por meio de teste cego, com o objetivo de se evitar tendenciosidade de interpretação.

A Tabela n.º 1 apresenta o número de células com aberrações cromossômicas observadas em 100 células analisadas por animal e o número total de aberrações encontrado em 500 células de cada concentração de Fluconazol e do controle, e em 400 células do grupo tratado com Ciclofosfamida.

A Tabela n.º 2 apresenta a distribuição dos diferentes tipos de aberrações cromossômicas observadas.

As aberrações observadas nos animais tratados com o Fluconazol foram apenas do tipo "gaps", quebras e fragmentos, enquanto que os tratados com Ciclofosfamida apresentaram além de "gaps", quebras e fragmentos, rearranjos cromossômicos dos tipos: figuras trirradial quadri-radiais, translocação, cromossomos em anel, etc.

Os rearranjos cromossômicos foram observados apenas em células com múltiplas aberrações cromossômicas e por este motivo não são descritos na Tabela 2.

Tabela 1. Número de células com aberrações cromossômicas observadas em 100 células analisadas por animal em ratos Wistar tratados intraperitonealmente (i.p) com diferentes concentrações de Fluconazol e Ciclofosfamida

| Tratamentos | Animal | | | | | No total de aberrações (%) |
|--------------------|--------|----|----|----|----|----------------------------------|
| | A1 | A2 | A3 | A4 | A5 | |
| Controle | 1 | 2 | 4 | 0 | 4 | 11 (2,2) |
| Fluconazol(mg) | | | | | | |
| 1,0 | 2 | 1 | 2 | 0 | 4 | 9 (1,8) |
| 1,5 | 7 | 6 | 1 | 2 | 8 | 24 (4,8) |
| 2,0 | 3 | 3 | 6 | 1 | 5 | 18 (3,6) |
| Ciclofosfamida(mg) | | | | | | |
| 2,0 | 31 | - | 19 | 10 | 44 | 104 (26,0) |
| | | | | | | > 124(> 31,0) |

Tabela 2. Distribuição dos diferentes tipos de aberrações cromossômicas observadas em células de medula óssea de ratos wistar tratados com diferentes concentrações de Fluconazol e ciclofosfamida (C= cromátide; IC= Isocromátide)

| Tratamento | Nº de células analisadas | Gap | | Quebras | | Fragmentos | Múltiplas aberrações | Nº total de aberrações (%) |
|---------------------|--------------------------|-----|----|---------|----|------------|----------------------|----------------------------|
| | | C | IC | C | IC | | | |
| Controle | 500 | 4 | 0 | 4 | 2 | 2 | 0 | 12 (2,4) |
| Fluconazol (mg) | | | | | | | | |
| 1,0 | 500 | 2 | 0 | 4 | 0 | 5 | 0 | 11 (2,2) |
| 1,5 | 500 | 11 | 1 | 7 | 2 | 4 | 0 | 25 (4,4) |
| 2,0 | 500 | 7 | 0 | 10 | 0 | 5 | 0 | 22 (4,4) |
| Ciclofosfamida (mg) | | | | | | | | |
| 2,0 | 400 | 23 | 0 | 22 | 12 | 24 | > 43 | > 124 (>31,0) |

A análise estatística foi feita por meio do teste de GOLD (1962). A Tabela 3 apresenta os dados utilizados no teste de GOLD.

Tabela 3: número total de células de medula óssea de ratos Wistar, tratados com Fluconazol (1,0; 1,5 e 2,0mg/100g), Ciclofosfamida (2,0mg/100g) e controle, e o número de células com aberrações encontradas em cada tratamento.

| | FLUCONAZOL | | | C.F. 2,0 | CONTROLE |
|---|------------|-----|-----|-------------|----------|
| | 1,0 | 1,5 | 2,0 | | |
| n | 500 | 500 | 500 | 400 | 500 |
| x | 9 | 24 | 18 | 104 | 11 |

$$L_k = 3,327$$

x = número de metáfases com aberrações

n = número de metáfases analisadas

Foram não significativas as diferenças entre as proporções de metáfases com aberrações entre:

Fluconazol 1,0mg e controle.

Fluconazol 1,5mg e controle.

Fluconazol 2,0mg e controle.

Foi significativa a diferença entre as proporções de metáfases com aberrações induzidas pela Ciclofosfamida e o controle.

A Figura n.º 1 mostra as porcentagens de células com aberrações cromossômicas encontradas no controle e nos diversos grupos de tratamento com Fluconazol (1,0; 1,5 e 2,0mg/100g) e C.F. (2,0mg/100g).

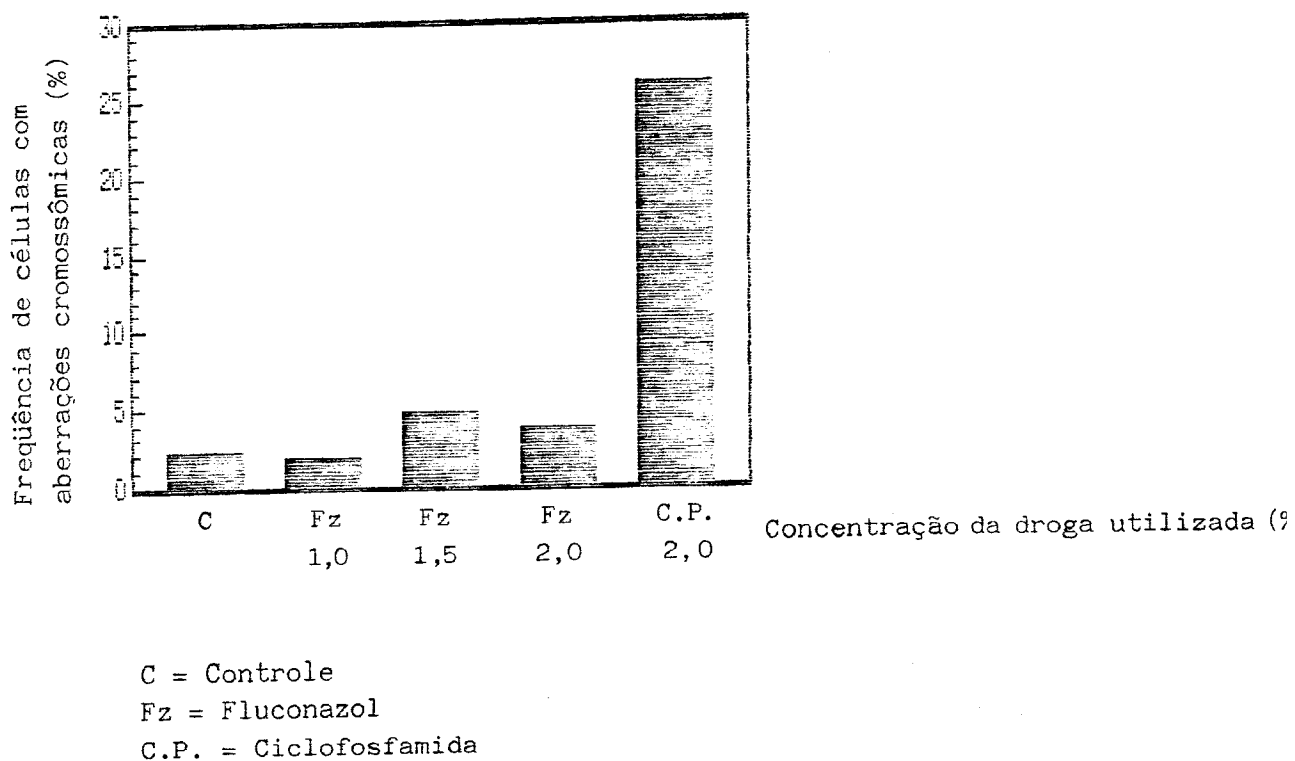


Figura 1: Frequência (%) de células com aberrações cromossômicas observadas em medula óssea de ratos Wistar tratados com Fluconazol (1,0; 1,5 e 2,0mg/100g) e Ciclofosfamida (2,0mg/100g).

D I S C U S S Ã O

Para que um fármaco seja lançado no mercado para uso público faz-se necessário a avaliação genotóxica do mesmo, tanto em testes in vivo como in vitro.

O Fluconazol, fungicida de uso recente, foi testado no sistema de células de ratos Wistar, in vivo.

Os animais foram tratados intraperitonealmente, onde o contato com a corrente sanguínea é muito grande.

Os compostos são absorvidos pelo sistema porta, passando pelo fígado antes de alcançarem os outros órgãos, garantindo assim a metabolização hepática do composto (KLASSEN e ROZMAN, 1991, in DIAZ, 1993).

Foram utilizadas 3 doses de Fluconazol (1,0; 1,5; 2,0mg/100g de peso do animal) fazendo-se 2 aplicações, 48 h e 24 h antes do sacrifício.

Se um composto está sendo testado pela primeira vez deve-se usar um esquema de dois tratamentos a 0 h e 24 h e colher a amostra 48 horas após o primeiro tratamento. O efeito do tratamento duplo, geralmente é aditivo (RABELLO-GAY, 1990).

O sacrifício dos animais para a coleta do material, ocorreu 24 h após o último tratamento, que é o tempo médio de duração de um ciclo de divisão das células da medula óssea (FACHECO DE OLIVEIRA, 1990 in DIAZ, 1993). Esse tempo é importante para assegurar que as células que estavam em G₀ durante o tratamento se exponham ao Fluconazol em todas as fases de seu ciclo de divisão. De acordo com SAVAGE (1990) as lesões induzidas por um agente podem ou não resultar em uma alteração visível, uma aberração que pode ser analisada (DIAZ, 1993).

O achado de um aumento significativo da frequência de aberrações cromossômicas no estudo *in vivo* é indicativo de exposição a uma substância clastogênica e de dano genético. A ausência desse aumento, entretanto, não significa que a substância em questão não represente um risco para o homem. (NATARAJAN, 1984 in RABELLO-GAY, 1990).

A maior porcentagem de aberrações cromossômicas foi detectada no grupo tratado com 1,5mg de Fluconazol, seguido de uma queda na porcentagem de aberrações cromossômicas no grupo tratado com 2,0mg de Fluconazol.

Tal queda deve-se, provavelmente à alta toxicidade da droga, impedindo o processo de um número maior de células afetadas e permitindo a detecção de um número maior de células não afetadas.

As aberrações encontradas foram, principalmente, aberrações dos tipos "gaps" e quebra de cromátide, o que indica que a droga é ciclo dependente, agindo principalmente nas fases S, G₂ e M, não agindo em G₁.

Além dos grupos de tratamento, foram incluídos no experimento os grupos controle negativo e positivo. EDLLER (1992) sugere a inclusão de controles no sentido de avaliar se as diferenças

encontradas entre animais são provenientes da heterogeneidade genética ou do efeito do tratamento. O controle positivo serve para confirmar a eficiência do sistema teste (PRESTON et al, 1987, in DIAZ, 1993).

EDLLER, (1992) e PRESTON et al (1987) consideram importante que, como controle positivo, seja utilizado um composto que seja clastogênico fraco, ou doses baixas de um clastogênico potente, para permitir a detecção dos compostos não clastogênicos ou clastogênicos fracos (DIAZ, 1993).

Como controle positivo usado nos experimentos com Fluconazol foi utilizado a Ciclofosfamida, injetando-se 2,0mg/100g peso do animal, por via i.p. em ratos Wistar. a frequência de aberrações cromossômicas induzidas foi > 31,0%, cerca de 6 vezes a frequência da dose intermediária do Fluconazol, a qual teve maior porcentagem de aberrações, 5% do total de células analisadas.

Em tratamento de Hamster harmênia doses relativamente baixas de C.P. (1,0 - 5,0mg/100g peso do animal), leva a aberrações somente do tipo quebra de cromátide e isocromátide, enquanto que altas doses (10-30mg/100g) induziram um amplo espectro de dano cromossômico (intercâmbios, quebras cromatídicas e isocromatídicas, aberrações e "gaps") (NERSESSIAN et al, 1992).

No nosso experimento com medula óssea de ratos Wistar, foi observado uma alta porcentagem de quebras cromatídicas e isocromatídicas, fragmentos, figuras trirradiais e quadrirradiais, anéis, etc.

Dados referentes à ação da C.P. na dose de 2,5mg/100g em células de medula óssea de 5 espécies de roedores mostram que a C.P. induziu aumento estatisticamente significativo de aberrações cromossômicas em células de medula óssea de Hamster chinês,

camundongos, ratos e porco da Índia, do que em células de medula óssea de Hamster harmênia. Foi observado que a C.P., nesta dose, induz 11,5; 15,3; 8,9 e 5,2 vezes mais células aberrantes em medula óssea de ratos, porco da Índia, camundongos e Hamster chinês, respectivamente, do que em células de Hamster harmênia.

Assim sendo, os dados observados no nosso experimento com a C.P. (indução de quebras, "gaps", fragmentos, rearranjos, etc) estão de acordo com os dados obtidos por NERSESSIAN et al (1992).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AYALA, F.J., KIGER Jr. J.A. - Genética Moderna, edição Omega S.A. Platón 26, Barcelona - 1984; pp:536-541
- BRAJTBURG, J., POWDERLY W.G., KOSAYASHI G.S. - Amphotericin B: Current understanding of mechanisms of action. *Antimicrob Agents Chemother.* 1990;34:183-188.
- BURNS, G.W., BOTTINO, P.J. - Genética. Edição Guanabara, Koogan - 6.ª edição, Rio de Janeiro - 1990; pp:107.
- DEBRUYNE, D. RYCKELINCK, J.P. - Clinical pharmacokinetics of Fluconazole. *Clin Pharmacokinet.* 1993. Jan. 24(1): 10-27.
- DIAZ, F. Estudo da Genotoxicidade in vivo e in vitro dos Cercaricidas Naturais : Óleo de Sucupira e Eremantina em Células de Mamíferos. Tese de doutorado. Universidade de São Paulo, 1993;pp:1-105.
- FOULDS, G., BRENNAN, D.R., WAJSZCUK, C. Fluconazole penetration into cerebrospinal fluid in humans. *J. Clin. Pharmacol.* 1988a; 28:363-366.

FOULDS, G., WAJSZCZUK, C., WEIDLER, D.J. Steady state parenteral kinetics of fluconazole in man. *Ann.N.Y. Acad. Sci.* 1988b; 544:427-430.

GOODMAN, G. A., RALL, T.W., NIES, A.S., TAYLOR, P., Goodman e Gilman: As bases Farmacológicas da Terapêutica. 8.^o edição. Editora Guanabara Koogan. Rio de Janeiro - 1991a;pp:810-811.

GOODMAN, G.A., RALL, T.W., NIES, A.S., TAYLOR, P. Goodman e Gilman: As bases Farmacológicas da Terapêutica. 8.^o edição. Editora Guanabara Koogan. Rio de Janeiro - 1991b;pp:776.

KOWALSKY, S.F., DIXON, D.M. - Fluconazole: A new antifungal agent. *Clin. Pharm.* 1991. 10:179-194.

LEE, J.W., SEIBEL, N.L.; AMANTEA, M. Safety and pharmacokinetics of fluconazole in children with neoplastic diseases. *Pediatr.* 1992, Jun. 120(6);pp:987-93.

NERSESSIAN, A.K., ZILFIAN, V.N., KOUKOUADJIAN, V.A. Comparative investigation of Cyclophosphamide action on bone marrow cells of the Armenian hamster and 4 other species of rodents. *Mutation Research.* 1992; 268:211-215.

PERFECT, J.R., SAVARI, D.V., DURACK, D.T. Comparison on itraconazole and fluconazole in treatment of cryptococcal meningitis and *Candida* pyelonephritis in rabbits. *Antimicrob Agents Chemother.* 1986; 29:579-583.

RABELLO-GAY, M.N. - Teste com linfócitos do sangue periférico. In: *Mutagenese, Teratogenese e Carcinogenese*. Editores: M.N. Rabello-Gay, M.A. Regina Rodrigues e R. Monteleone-Neto, Sociedade Brasileira de Genética. 1991a. pp:98.

RABELLO-GAY, M.N. - Teste de metáfases de medula óssea. In: *Mutagenese, Teratogenese e Carcinogenese*. Editores: M.N. Rabello-Gay, M.A. Regina Rodrigues e R. Monteleone-Neto, Sociedade Brasileira de Genética. 1991b. pp:77-106.

SAKAMOTO-HOJO, E.T. Ação Clastogênica da elipticina em células de mamíferos. Tese de doutorado. USP - Ribeirão Preto. 1984. pp:1-133.

SPANÓ, M.A. Efeitos Clastogênicos de drogas anti-neoplásicas (Ciclofosfamida, 5-Fluorouracil, Methotrexate) e Raios-X, in vivo e in vitro. Tese de doutorado. USP - Ribeirão Preto. 1981. pp:1-163.

TOON, S., ROSS, C.E., GOKAL, R. Effects of impaired renal function on the oral pharmacokinetics of Fluconazole. Paper presented at 10th International Congress of the Society for Human and Animal Mycology. Barcelona, Spain: 1988. Jun 27 - Jul 1.

TUCKER, R.M., WILLIAMS, P.L., ARATHOON, E.G. Pharmacokinetics of Fluconazole in cerebrospinal fluid and serum in human coccidioidal meningitis. *Antimicrob Agents Chemother*. 1988; 32:369-373.

VANDER BOSSCHE, H., Biochemical targets for antifungal azole-derivatives. Hypothesis of the mode of action. *Curr. Top. Med. Mycol.* 1985; 1:313-351.

VANDER BOSSCHE, H., WILLWMSSEN, G., COOLS, W. Hypothesis on the molecular basis of the antifungal activation of N-substituted imidazoles and triazoles. *Biochem. Soc. Trans.* 1983; 11:665-667.

WALSH, T.J., FOULDS, G., PIZZO, P.A. Pharmacokinetics and tissue penetration of Fluconazole in rabbits. *Antimicro. Agents. Chemother.* 1989; 33:467-469.