

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
ESCOLA NACIONAL DE SAÚDE PÚBLICA SÉRGIO AROUCA
MESTRADO EM SAÚDE PÚBLICA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO TOXICOLOGIA OCUPACIONAL E AMBIENTAL

**AVALIAÇÃO DO EFEITO
GENOTÓXICO DO MEGAZOL**

KATIA SOARES DA POÇA

Rio de Janeiro
2005

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
ESCOLA NACIONAL DE SAÚDE PÚBLICA SÉRGIO AROUCA
MESTRADO EM SAÚDE PÚBLICA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO TOXICOLOGIA OCUPACIONAL E AMBIENTAL

AVALIAÇÃO DO EFEITO GENOTÓXICO DO MEGAZOL

Dissertação apresentada à Escola Nacional de
Saúde Pública – Fundação Oswaldo Cruz – para
obtenção do grau de Mestre em Saúde Pública –
área de concentração em Toxicologia

KATIA SOARES DA POÇA

Rio de Janeiro
2005

Ficha Catalográfica

Poça, Katia Soares

Avaliação do Efeito Genotóxico do Megazol / Katia Soares da Poça – 2005

xiv, p. 67

Orientador: Francisco José Roma Paumgarten

Dissertação (Mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, Julho de 2005

1. Megazol. 2. Tripanossomíases. 3. Genotoxicidade

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
ESCOLA NACIONAL DE SAÚDE PÚBLICA SÉRGIO AROUCA
MESTRADO EM SAÚDE PÚBLICA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO TOXICOLOGIA OCUPACIONAL E AMBIENTAL

**AVALIAÇÃO DO EFEITO
GENOTÓXICO DO MEGAZOL**

KATIA SOARES DA POÇA

Orientador: Francisco José Roma Paumgarten

Aprovada em ____ de Julho de 2005 pela banca examinadora:

Prof. Dr^a. _____
Ana Cristina Martins de Almeida Nogueira (externo)

Prof. Dr^a. _____
Isabella Fernandes Delgado (interno)

Prof. Dr. _____
Francisco José Roma Paumgarten (orientador)

Prof. Dr^a. _____
Maria Helena Simões Villas Boas (suplente externo)

Prof. Dr. _____
Sérgio Koifman (suplente interno)

AGRADECIMENTOS

A Deus que sempre me mostrou o caminho correto a seguir, mesmo nos momentos de dúvida.

A meus pais Sonia e Fernando, por me educar com todo o amor e carinho e por me fazer perceber o que é certo e errado. A vocês agradeço a pessoa que sou hoje.

Aos meus irmãos Alessandra e Rafael pelo incentivo e ajuda na digitação e elaboração de tabelas e gráficos deste trabalho.

Ao Antonio Vieira por fazer parte de minha vida e me ajudar em todos os momentos.

As amigas Karen Friedrich e Marcia Sarpa, pela ajuda nos experimentos e por sempre estarem por perto.

Aos amigos Bárbara, Valéria, Pedro e Renan e por serem voluntários na doação de sangue. Muito obrigada pela colaboração, sem vocês parte deste trabalho não teria sido realizado.

A Selma, Simone e Viviane do Laboratório do Hospital da Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca da FIOCRUZ, por realizarem a coleta das amostras sanguíneas.

A Todos do Laboratório de Toxicologia Ambiental, por fazer com que o trabalho se realizasse em clima de companheirismo e amizade.

Ao Francisco Paumgarten por me orientar na elaboração deste trabalho. Obrigada por toda a atenção dispensada.

Enfim, obrigada a todos que de uma forma ou de outra foram responsáveis pela realização deste trabalho.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACs – aberrações cromossômicas

AUC – area sobre a curva (*area under the curve*)

CAS – *chemical abstracts service*

CECAL – Centro de Criação de Animais de Laboratório

C_{max} – concentração plasmática máxima

CMC – carboximetilcelulose

CPA – ciclofosfamida

CTD – *Schistosomiais and Intestinal Parasites / Unit Division of Control of Tropical Diseases*

CYP450 – citocromo P450

DMSO – dimetil sulfoxido

DNA – ácido desoxirribonucleico

EPC – eritrócito policromático

EPCMN – eritrócito policromático micronucleado

ENC – eritrócito normocromático

et al – e colaboradores (*et alii*)

EUA – Estados Unidos da América

FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz

Fração S9 – fração microsomal centrifugada a 9000g

GSH – glutationa reduzida

IAEA – *International Atomic Energy Agency*

IARC – *International Agency for Research on Cancer*

IM – índice mitótico

i.e. – isto é (*id est*)

ip – via intraperitoneal

KCl – Cloreto de potássio

MMC – Mitomicina C

MGZ – Megazol

MNs – micronúcleos

MTZ – metronidazol

ND – não determinado

NO₂ – grupamento nitro

OECD – *Organization for Economic Cooperation and Development*

PA – para análise

PHA-M – Fitohemaglutinina forma M

PKC – proteína quinase C

po – por via oral (*per os*)

qsp – quantidade suficiente para

RNA – ácido ribonucleico

rpm – rotações por minuto

SNC – sistema nervoso central

TDR – Programa Especial para Pesquisa e Treinamento em Doenças Tropicais
(*Tropical Disease Research*)

T_{max} – Tempo máximo para que a concentração máxima seja atingida

VTE – vitamina E

v/v – volume a volume

WHO – *World and Health Organization*

w/v – peso a volume

α - TO[•] – radical alfa tocoferoxil

LISTA DE FIGURAS E FOTOS

Figura 1 – Distribuição da tripanossomíase americana.....	1
Figura 2 – Ciclo celular do <i>Trypanosoma cruzi</i>	2
Figura 3 – Distribuição da tripanossomíase africana.....	4
Figura 4 – Ciclo celular do <i>Trypanosoma brucei</i>	5
Figura 5 – Estrutura química do metronidazol e do megalol.....	11
Figura 6 – Esquema para diferenciar quebras e falhas cromossômicas e cromatídicas...	13
Figura 7 – Esquema de quebra cromatídica.....	14
Figura 8 – Esquema de cromossoma trirradial.....	14
Figura 9 – Esquema de cromossoma quadrirradial.....	14
Figura 10 – Esquema de quebra cromossômica.....	15
Figura 11 – Esquema de cromossoma dicêntrico.....	15
Figura 12 – Esquema de cromossoma tricêntrico.....	15
Figura 13 – Esquema de anel cêntrico.....	15
Figura 14 – Esquema de translocação.....	16
Figura 15 – Formação de micronúcleo.....	16
Figura 16 – Processo de maturação eritrocitária em medula óssea.....	17
Foto 1 – Linfócito humano em metáfase.....	30
Foto 2 – Células da medula óssea de camundongo coradas com Giemsa.....	38

LISTA DE TABELAS E GRÁFICOS

Tabela 1 – Incidência de aberrações cromossômicas em linfócitos humanos expostos por 20 horas ao megazol, à mitomicina C ou apenas ao DMSO.....	32
Tabela 2 – Frequência de aberrações cromossômicas e índice mitótico em cultura de linfócitos humanos expostos por 20 horas a mitomicina C, a diferentes concentrações de megazol e ao DMSO apenas.....	33
Tabela 3 – Incidência de aberrações cromossômicas em linfócitos humanos expostos por 20 horas às diferentes concentrações de vitamina E, de megazol e as associações de VTE e MGZ.....	35
Tabela 4 – Frequência de aberrações cromossômicas e índice mitótico em cultura de linfócitos humanos expostos por 20 horas a diferentes concentrações de vitamina E, megazol e a associação de VTE e MGZ.....	36
Tabela 5 – Efeitos genotóxico e mielotóxico do megazol administrado por entubação gástrica e da ciclofosfamida em camundongos <i>Swiss Webster</i>	40
Tabela 6 – Resultados do megazol em diferentes ensaios de <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> preditivos de genotoxicidade / clastogenicidade.....	47
Tabela 7 – Distribuição de aberrações cromossômicas em linfócitos, induzidas por mitomicina C e diferentes concentrações de megazol.....	63
Tabela 8 – Distribuição de aberrações cromossômicas em linfócitos, induzidas por diferentes concentrações de vitamina E, megazol e associação de VTE e MGZ.....	64
Tabela 9 – Efeitos genotóxico e mielotóxico megazol administrado por entubação gástrica e da ciclofosfamida em camundongos <i>Swiss Webster</i> . Medula óssea retirada 24 horas após o tratamento.....	65
Tabela 10 – Efeitos genotóxico e mielotóxico megazol administrado por entubação gástrica e da ciclofosfamida em camundongos <i>Swiss Webster</i> . Medula óssea retirada 36 horas após o tratamento.....	66

Tabela 11 – Efeitos genotóxico e mielotóxico megazol administrado por entubação gástrica e da ciclofosfamida em camundongos *Swiss Webster*. Medula óssea retirada 48 horas após o tratamento.....67

Gráfico 1 – Efeito genotóxico / calstogênico do megazol administrado a camundongos machos e fêmeas por via oral. O efeito clastogênico foi avaliado pela frequência de eritrócitos policromáticos com micronúcleos presentes na medula óssea de camundongos, determinadas 24, 36 e 48 horas após o tratamento.....43

Gráfico 2 – Efeito clastogênico do megazol administrado por via oral a camundongos machos e fêmeas.....44

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas	vi
Lista de figuras e fotos	viii
Lista de tabelas e gráficos	ix
Sumário	xi
Resumo	xiii
Abstract	xiv
1. Introdução.....	1
1.1 Doença de Chagas.....	1
1.2 Doença do Sono.....	3
1.3 Tratamento.....	6
1.3.1 Benznidazol.....	6
1.3.2 Nifurtimox.....	6
1.3.3 Pentamidina.....	7
1.3.4 Suramina.....	7
1.3.5 Melarsoprol.....	8
1.3.6 Eflornitina.....	8
1.3.7 Megazol.....	8
1.4 Análise Citogenética.....	12
1.4.1 Aberrações cromossômicas em linfócitos metafásicos.....	13
1.4.1.1 Aberrações cromatídicas.....	14
1.4.1.2 Aberrações cromossômicas.....	15
1.4.2 Micronúcleos em medula óssea de mamíferos.....	16
1.5 Contexto do Presente Estudo.....	17
2. Objetivo.....	18
2.1 Objetivo Geral.....	18
2.2 Objetivos Específicos.....	18
3. Material e Métodos.....	19
3.1 Substâncias.....	19
3.2 Preparo de Soluções.....	20
3.3 Análise de Aberrações Cromossômicas em Linfócitos.....	22
3.3.1 Voluntários.....	22
3.3.2 Avaliação do potencial mutagênico do megazol.....	23
3.3.3 Avaliação da inibição do efeito clastogênico do megazol pelo tocoferol....	26
3.4 Análise do Micronúcleo em Medula Óssea de Mamíferos.....	27

3.4.1 Animais.....	27
3.4.2 Biotério.....	27
3.4.3 Desenho experimental.....	28
3.5 Análise Estatística.....	29
4. Resultados.....	30
4.1 Ação do Megazol sobre a Frequência de Aberrações Cromossômicas em Linfócitos Humanos.....	30
4.1.1 Avaliação dos efeitos citotóxico e clastogênico de diferentes concentrações de megazol.....	31
4.1.2 Ação da vitamina E sobre a genotoxicidade do megazol.....	34
4.2 Ação do Megazol sobre a Frequência de Micronúcleos em Células da Medula Óssea de Camundongos.....	38
5. Discussão.....	45
5.1 Considerações Finais.....	53
6. Conclusões.....	55
7. Referências.....	56
8. Anexo.....	63

RESUMO

As tripanossomíases americana (doença de Chagas) e africana (doença do sono) são causadas por protozoários do gênero *Trypanosoma*, têm como vetores insetos hematófagos e exibem alta morbidade. As duas tripanossomíases estão entre as doenças humanas mais negligenciadas porque, em que pese a relevância de ambas em termos de saúde pública, não foi feito esforço importante para desenvolver medicamentos eficazes e seguros, principalmente para os estágios mais tardios quando os protozoários atingem e comprometem órgãos vitais como o coração e o SNC. O megalzol (MGZ) é um derivado nitroimidazólico com potente atividade contra os tripanossomas. O MGZ poderia ser considerado uma alternativa promissora aos fármacos atualmente empregados, não fossem os indícios de efeito genotóxico, problema freqüente entre os derivados nitroimidazólicos. Situado neste contexto, o objetivo deste trabalho foi reavaliar o potencial genotóxico do MGZ, e iniciar uma série de estudos para verificar se é possível bloqueá-lo com substâncias antimutagênicas, sem comprometer a eficácia tripanossomicida. A avaliação da genotoxicidade do MGZ foi realizada com ensaios *in vitro*, *i.e.*, indução de aberrações cromossômicas em linfócitos humanos em cultura, e também *in vivo*, *i.e.*, indução de micronúcleos em células da medula óssea de camundongos. No ensaio *in vitro*, o MGZ aumentou de forma concentração-dependente ($1,41 \cdot 10^{-4}M$, $2,81 \cdot 10^{-4}M$ e $5,63 \cdot 10^{-4}M$) a freqüência de células com aberrações cromossômicas, exibindo as duas maiores concentrações testadas um claro efeito citotóxico. No teste *in vivo*, a administração de dose oral única do MGZ a camundongos *Swiss Webster*, machos e fêmeas, produziu discreto aumento da freqüência de células micronucleadas nos três intervalos de tempo pós-tratamento (24, 36 ou 48 horas). Este discreto efeito clastogênico de doses orais do MGZ não exibiu clara relação de dose-dependência. Os resultados obtidos neste trabalho confirmaram que o MGZ é genotóxico. Os resultados do ensaio *in vivo* sugerem porém que a biodisponibilidade do fármaco administrado por via oral é reduzida. A investigação *in vitro* do antagonismo da genotoxicidade do MGZ pela vitamina E foi até certo ponto prejudicada pela acentuada citotoxicidade das concentrações de vitamina E (VTE) empregadas ($2,5 \cdot 10^{-6}M$ e $5,0 \cdot 10^{-6}M$). Apesar da pronunciada redução do índice mitótico dos linfócitos humanos em cultura, os resultados sugeriram que o efeito clastogênico induzido pelo MGZ $2,81 \cdot 10^{-4}M$ foi discretamente atenuado. Os efeitos da VTE, e de outras substâncias com atividade antioxidante, sobre a genotoxicidade do MGZ precisa ser melhor estudados antes de conclusões possam ser alcançadas a este respeito.

ABSTRACT

American (Chagas disease) and African (sleep sickness) trypanosomiasis are insect borne diseases caused by *Trypanosoma spp* protozoa. Despite the high morbidity and public health importance, both diseases are included among the most neglected diseases because no effort has been made by the pharmaceutical industry to develop safer and more effective anti-trypanosoma drugs. No truly effective drug is currently available for treating the late stages of these diseases in which vital organs such as heart and brain are severely damaged. Megazol (MGZ) is a nitro-imidazole compound with a rather potent trypanosomicidal activity. It could be an alternative to currently available drugs but reports on MGZ-induced genotoxicity have prevented its further development as trypanosomicidal drug. The present study was undertaken to provide data on the genotoxic potential of MGZ and to investigate whether it is feasible to attenuate its mutagenicity, by using antioxidant substances (e.g. vitamin E), without reducing its therapeutic efficacy. The genotoxicity of MGZ was evaluated *in vitro* (chromosome aberrations in human lymphocytes) as well as *in vivo* (frequency of cells with micronuclei in the bone marrow tissue of mice). In the *in vitro* assay, MGZ ($1,41 \cdot 10^{-4}M$, $2,81 \cdot 10^{-4}M$ e $5,63 \cdot 10^{-4}M$) increased in a concentration-dependent manner the frequency of cells with chromosome aberrations, showing the two highest concentrations a clear cut cytotoxic effect. In the *in vivo* assay, single oral doses of MGZ were administered to male and female *Swiss Webster* mice, and bone marrow cells were harvested at 24, 36 and 48 hours after treatment. In all intervals, MGZ caused a slight and non dose-dependent increase in the frequency of cells with micronuclei. Taken together, results from this study are consistent with previous data showing that MGZ is a genotoxic compound. Results from the *in vivo* assay, however, suggest that bioavailability of MGZ given by the oral route is low. *In vitro* investigation of a possible antagonism of MGZ-induced genotoxicity by vitamin E (VTE) and other anti-oxidant substances was to some extent inconclusive because concentrations of VTE ($2,5 \cdot 10^{-6}M$ e $5,0 \cdot 10^{-6}M$) used in the experiment were markedly cytotoxic. Despite the pronounced reduction of mitotic index, results suggested that the clastogenic effect of MGZ $2,81 \cdot 10^{-4}M$ was slightly attenuated by VTE. The effects of VTE, and of other substances with antioxidant properties, need to be better studied before conclusions can be drawn on this topic.

1 INTRODUÇÃO

Os tripanossomos são protozoários flagelados que parasitam vertebrados e são transmitidos por insetos hematófagos. As duas tripanosomíases de importância médica, a americana e a africana, acometem principalmente populações de baixa renda que habitam as regiões onde estas doenças são endêmicas. Não há ainda tratamento eficaz para as tripanosomíases, principalmente na fase crônica.

1.1 Doença de Chagas

A tripanosomíase americana ou doença de Chagas é uma protozoose endêmica no continente americano, onde ocorre do sul dos EUA até a Argentina e o Chile, com forte incidência no Brasil (Figura 1). Segundo a Organização Mundial de Saúde ¹ esta doença é endêmica em 21 países da América Central e do Sul, onde 16 à 18 milhões de pessoas têm a doença e 100 milhões de pessoas (25% da população da América Latina) estão sob risco de adquiri-la.



Figura 1: Distribuição da tripanosomíase americana.

A doença de Chagas é causada pelo *Trypanosoma cruzi* e tem como vetores várias espécies de hemípteros hematófagos da família *Reduviidae*. No Brasil, com a colonização européia, surgiram as casas com paredes de barro (“casas de pau-a-pique”)

e casebres de palha, habitados pelas famílias mais pobres das áreas rurais. Essas habitações são locais favoráveis para a criação e proliferação de várias espécies de triatomíneos, conhecidos popularmente como “barbeiro”, “chupança”, “bicho de parede”, “fincão”, “bicudo” ou “chupão”. Assim, originalmente silvestres, os triatomíneos aí se domiciliaram e passaram a transmitir a doença aos moradores e aos animais domésticos.

Em geral, a transmissão do inseto para o homem resulta da contaminação do tecido conjuntivo, mucosa ou lesões cutâneas com as fezes do hemíptero contendo o protozoário. O *T. cruzi* é considerado um parasito de “evolução posterior” e transmissão contaminativa.

Os “barbeiros” (hemíptero reduvídeo) são os hospedeiros invertebrados (intermediários) do *T. cruzi*. Os insetos se infectam ao ingerir sangue de vertebrados contendo as formas tripomastigotas aí encontradas. Na porção anterior do intestino médio do hemíptero, as formas tripomastigotas transformam-se em epimastigotas. Ao chegarem à porção posterior do intestino médio, as formas epimastigotas multiplicam por divisão binária longitudinal durante toda a vida do hemíptero. Quando as formas epimastigotas chegam à luz do intestino posterior, elas sofrem nova metamorfose e transformam-se em tripomastigotas metacíclicas, encerrando o ciclo evolutivo no inseto (Figura 2).

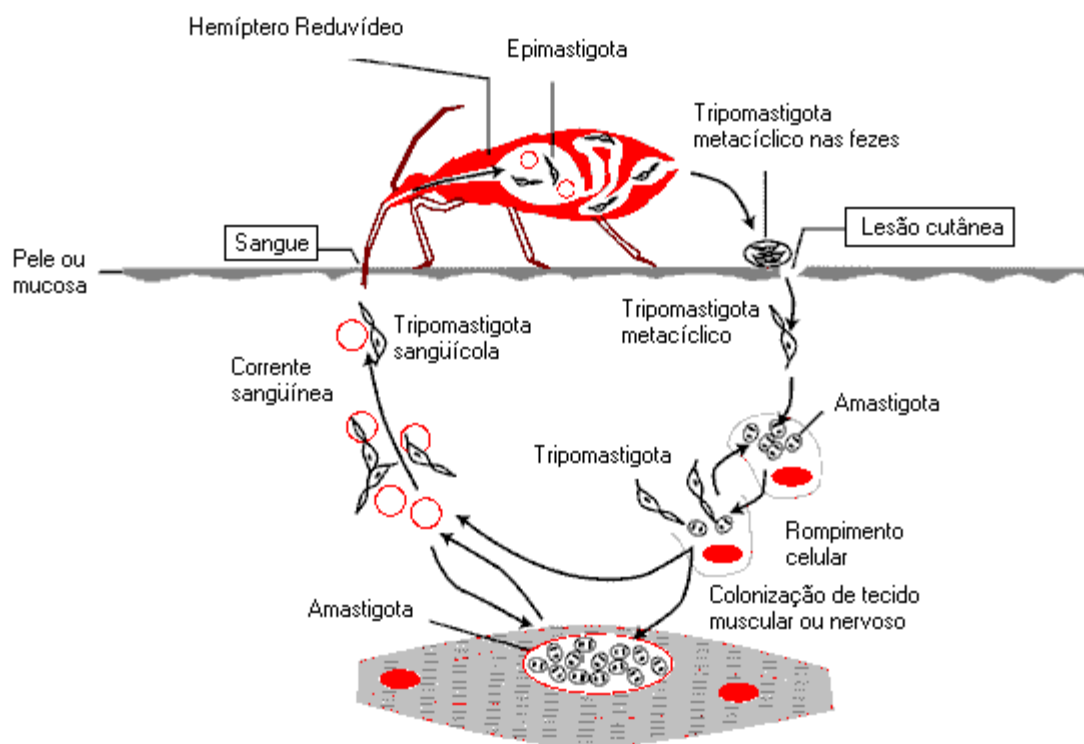


Figura 2: Ciclo celular do *Trypanosoma cruzi*.

Quando o triatomíneo (barbeiro) suga o sangue de um hospedeiro vertebrado e defeca, a forma tripomastigota metacíclica é introduzida pelo contato das fezes contaminadas com a lesão cutânea gerada pela picada. A forma infectante para vertebrados é, portanto, a tripomastigota metacíclica. No sangue do hospedeiro vertebrado, os tripomastigotas podem ser fagocitados ou podem invadir vários tipos celulares, principalmente as células do sistema fagocítico mononuclear, as fibras musculares estriadas cardíacas e esqueléticas, as fibras musculares lisas e as células nervosas. No interior dos vários tipos celulares, os tripomastigotas metacíclicos transformam-se em amastigotas, recuperando assim a capacidade de multiplicação por divisão binária simples. A medida que a forma amastigota prolifera, o citoplasma passa a ser totalmente ocupado até a ruptura da célula infectada. No meio intercelular, as formas amastigotas assumem a forma tripomastigota sanguícola, que pode invadir novas células ou ganhar a circulação sanguínea e infectar novos tecidos (Figura 2). O ciclo biológico do *T. cruzi* envolve portanto diferentes formas do parasito em seus hospedeiros vertebrados e invertebrados ².

Nas áreas endêmicas, a fase aguda da doença é geralmente vista em crianças e pode manifestar-se por inflamação no sítio de infecção e nos gânglios linfáticos, febre, sudorese, aumento do fígado e baço. Normalmente, entretanto, as manifestações clínicas são discretas e as pessoas infectadas podem permanecer assintomáticas por muitos anos. Aproximadamente um terço dos casos agudos evolui para a forma crônica da doença, 10 a 20 anos depois da infecção, com danos irreversíveis ao coração, esôfago e cólon, incluindo dilatação e comprometimento da condução nervosa nestes órgãos ³. A morte na fase crônica da doença ocorre principalmente por arritmias e insuficiência cardíaca.

1.2 Doença do Sono

A tripanosomíase africana ou doença do sono é uma zoonose do continente africano com forte incidência na África Tropical (Figura 3). Segundo a Organização Mundial de Saúde ⁴ esta doença atinge 36 países da África Subsaariana, onde mais de 60 milhões de pessoas estão sob o risco de contraí-la. Estima-se também que cerca de 300 mil novos casos surgem a cada ano.

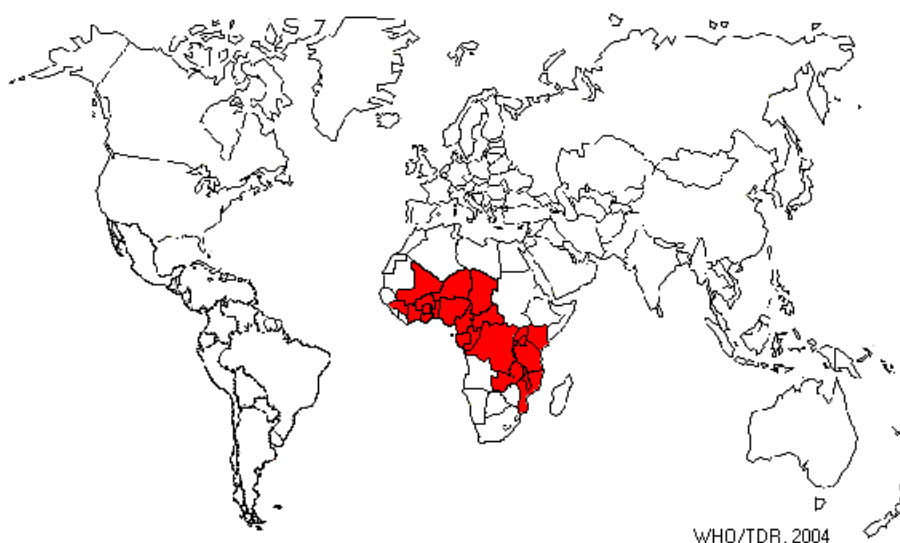


Figura 3: Distribuição da tripanosomíase africana.

O *Trypanosoma brucei* é o agente etiológico da doença do sono, cujos vetores são insetos do gênero *Glossina* (mosca tsé-tsé). Das várias subespécies de *Trypanosoma brucei*, apenas o *T. brucei gambiense* e o *T. brucei rhodesiense* são capazes de infectar o homem. A tripanosomíase gambiense é endêmica em países da África Ocidental e Central, enquanto a tripanosomíase rhodesiense é uma zoonose de animais selvagens que ataca o homem somente quando este vive ou visita áreas onde circula o parasito (África Oriental).

Com a independência, a situação epidemiológica agravou-se em muitos países africanos, seja devido ao retorno maciço de refugiados que se encontravam em áreas endêmicas de outros países, ou em consequência da desorganização dos serviços de saúde causada pelas guerras de libertação⁵. Assim, nos últimos vinte anos, constatou-se a ressurgência da doença do sono nos focos históricos da parasitose.

Em geral, a transmissão inseto-homem resulta da inoculação das formas contaminantes, presentes na saliva da mosca tsé-tsé, na corrente sanguínea do vertebrado durante a picada. O *T. brucei* é considerado um parasito de “evolução anterior” e transmissão por inoculação.

O ciclo evolutivo do *T. brucei* é semelhante ao do *T. cruzi*, sendo diferentes apenas no que se refere ao hospedeiro invertebrado. As moscas tsé-tsé se infectam ao se alimentarem com sangue de vertebrados contaminados com as formas tripomastigotas sanguícolas. Quando o sangue é digerido pela mosca, as formas tripomastigotas

sanguícolas transformam-se em tripomastigotas do estômago e iniciam um ativo processo de multiplicação. As tripomastigotas do estômago sofrem nova metamorfose transformando-se em tripomastigotas da cárdia, que continuam o processo de migração até alcançar as glândulas salivares. Nas glândulas salivares, continua o processo de multiplicação ativa e os tripanossomos adquirem finalmente a forma de tripomastigota metacíclica que é infectante para os hospedeiros vertebrados (Figura 4). Quando a mosca pica, o tripomastigota metacíclico presente na saliva é introduzido na corrente sanguínea do hospedeiro vertebrado⁵.

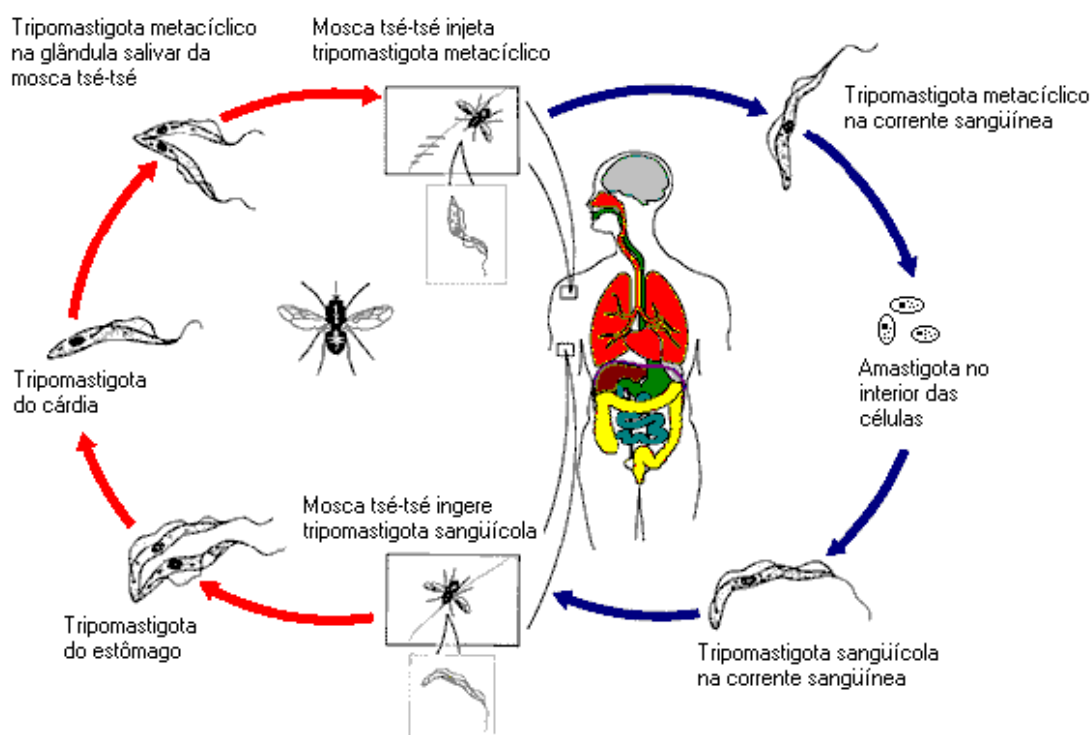


Figura 4: Ciclo celular do *Trypanosoma brucei*.

A fase aguda da doença do sono tem como principais sintomas o cansaço, as febres irregulares e o aumento das glândulas linfáticas e do baço. Na fase crônica, os sintomas se devem às alterações neurológicas e endócrinas. A infecção com *T. brucei rhodesiense* se manifesta agudamente por sintomas mais severos incluindo, além dos sintomas agudos já descritos, cefaléia, anemia, dores em articulações e tecidos moles. Assim que o parasita invade o sistema nervoso central (SNC), inicia-se um quadro de deterioração mental que pode levar ao coma e a morte em dias ou semanas. A infecção por *T. brucei gambiense* tende a ter progressão mais lenta, geralmente ao longo de

muitos anos, causando um quadro clínico menos severo do que o causado pelo *T. brucei rhodesiense*⁴.

1.3 Tratamento

Os medicamentos usados para tratar as tripanosomíases dependem da espécie e da linhagem do parasito (*Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei gambiense* ou *Trypanosoma brucei rhodesiense*) e da fase de evolução doença (fase aguda ou crônica).

1.3.1 Benznidazol

É um derivado nitroimidazólico usado no tratamento da tripanosomíase americana (doença de Chagas). Em virtude da acentuada toxicidade o benznidazol não pode ser empregado em larga escala e requer acompanhamento laboratorial. O emprego do medicamento requer termo de consentimento esclarecido assinado pelo paciente ou por seus responsáveis^{6, 7}. Nos pacientes tratados com este medicamento o xenodiagnóstico torna-se negativo durante a administração (efeito supressivo) mas, na grande maioria dos casos, o teste volta a ser positivo algum tempo depois do tratamento. O tratamento dura 60 dias e, após a segunda semana de administração, deve-se fazer semanalmente um hemograma para detectar o aparecimento de granulocitopenia, o que exige interrupção do medicamento⁶. Na fase crônica, há redução da parasitemia e interrupção da progressão da doença, mas não há reversão das alterações dos órgãos afetados que são controladas por tratamentos sintomáticos⁸.

1.3.2 Nifurtimox

O nifurtimox é outro derivado nitroimidazólico usado para tratar a doença de Chagas. Este medicamento não é mais disponível no Brasil^{6, 7}. Sabe-se que a enzima tripanotiona redutase dos tripanossomos reduz o grupamento nitroso destes compostos a radicais livres que são tóxicos para o parasito (superóxidos, peróxido de hidrogênio e radical hidroxila). O nifurtimox, entretanto, é um substrato pouco específico para esta enzima, sendo também tóxico para as células dos mamíferos⁹.

O nifurtimox não é medicamento aprovado para o tratamento da doença do sono, mas é utilizado como último recurso nos casos refratários aos compostos

arsenicais (melarsoprol), ou quando não se dispõe de eflornitina para o tratamento da doença crônica por *T. brucei gambiense*⁵. Os tipos e as frequências de reações adversas causadas pelo nifurtimox são pobremente documentados, sendo comum a anorexia e alterações neurológicas¹⁰.

1.3.3 Pentamidina

Usada para tratar a fase aguda da tripanosomíase gambiense, a pentamidina é uma diamidina aromática que se concentra no interior do parasita. O *Trypanosoma brucei* tem vários mecanismos transportadores de purina nucleosídica, um dos quais é o transportador amino-purina P2, que é capaz de carrear a pentamidina para o interior do parasita. O modo de ação deste medicamento, entretanto, ainda não está claro⁹. Este fármaco é administrado durante duas a três semanas. O medicamento é, em geral, bem tolerado desde que o paciente permaneça deitado depois de cada injeção intramuscular, o que evita o efeito hipotensor. Na primeira hora podem ocorrer ainda vômitos e dores abdominais, além de reações hipoglicêmicas. Neurites periféricas ocorrem raramente¹⁰.

1.3.4 Suramina

A suramina é um derivado naftalênico usado pela primeira vez para tratar a doença do sono em 1922. Este composto liga-se com facilidade às proteínas do soro, incluindo as lipoproteínas de baixa densidade, para as quais os tripanossomos apresentam receptor. A entrada da suramina no protozoário ocorre via endocitose das lipoproteínas de baixa densidade, mas o modo de ação deste fármaco ainda não é claro⁹. A suramina é usada na fase aguda da tripanosomíase rhodesiense, sendo capaz de matar 100% dos tripomastigotas sanguícolas presentes nos estágios iniciais da doença. Os efeitos adversos são frequentes e envolvem febre, principalmente depois da terceira ou quarta aplicação (5 semanas de tratamento), erupção papular irritativa, dores nas articulações e nas plantas dos pés e descamação extensa, predominantemente na sola plantar e na palma das mãos. Pessoas com insuficiência renal não devem fazer o uso deste medicamento^{5,10}.

1.3.5 Melarsoprol

O melarsoprol é um melaminofenil arsênico orgânico usado como agente anti-tripanosômico desde 1949. Tal como ocorre com a pentamidina, o *Trypanosoma brucei* carrega o melarsoprol para o interior através do transportador amino-purina P2. A perda deste transportador confere resistência do *Trypanosoma brucei* ao melarsoprol. Embora seja conhecido que a exposição dos tripanossomos a compostos arsenicais promova rápida lise do protozoário, o modo de ação ainda não é completamente entendido⁹. O melarsoprol é usado na fase crônica da doença do sono, por ser capaz de ultrapassar a barreira hemato-encefálica. O tratamento dura quatro semanas com aparecimento de efeitos adversos graves tais como reação local com tumefação intensa de reabsorção lenta, quando o medicamento extravasa das veias; diarreia intensa, que pode exigir a interrupção do tratamento e, mais raramente, encefalopatia reacional. A encefalopatia afeta 5 a 10% dos casos e pode surgir lentamente com febre, dores de cabeça, dificuldade de fala, manifestações convulsivas e coma. A encefalopatia reacional evolui para a morte em 1 a 5% dos casos^{5, 8, 10}.

1.3.6 Eflornitina

A eflornitina é um análogo da ornitina capaz de atravessar a membrana plasmática do *Trypanosoma brucei* por difusão passiva. A redução do acúmulo intracelular de eflornitina tem sido relatada em tripanossomos resistentes, embora não se tenha determinado ainda se isso é devido a menor entrada na célula ou ao aumento da saída deste composto⁹. Este fármaco é uma alternativa ao melarsoprol por ser eficaz contra a tripanosomíase gambiense e por ser, via de regra, melhor tolerado pelos pacientes, apesar de poder causar diarreia, convulsões e alucinações^{5, 10}. Para ser eficaz, a eflornitina necessita ser administrada em altas doses, havendo a necessidade de internar o paciente para dar o medicamento por perfusão por pelo menos duas semanas. O tratamento é, portanto, extremamente caro¹¹.

1.3.7 Megazol

O megazol (MGZ) é um derivado nitroimidazólico que ainda não foi usado na prática clínica como medicamento para o tratamento das tripanosomíases. Estudos experimentais supõem, no entanto, que o MGZ pode vir a ser uma interessante

alternativa aos fármacos atualmente existentes. Os casos de resistência e os graves efeitos adversos limitam a utilidade dos medicamentos atualmente disponíveis. O MGZ, apesar de exibir também problemas de toxicidade (genotoxicidade), mostrou-se particularmente eficaz como tratamento para as tripanosomíases¹²⁻²⁰.

O MGZ foi sintetizado em 1968 por Berkelhammer & Asato como um agente antimicrobiano. O composto mostrou-se ativo contra protozoários tais como espécies de *Trichomonas*, *Leishmania donovani* e, principalmente, tripanossomos²¹⁻²³. Segundo os estudos encontrados na literatura, o MGZ é um agente tripanossomicida eficaz em todas as fases da doença (modelo experimental de tripanosomíase humana):

- Bouteille e colaboradores¹⁶ mostraram que é possível curar camundongos infectados com *T. brucei brucei*, na fase aguda da doença, através da administração de uma única dose de MGZ. Além disso, a associação entre MGZ e suramina mostrou-se capaz de curar camundongos na fase inicial do comprometimento neurológico, sem que se tenha observado indícios de reincidência do comprometimento do SNC.
- Jennings e colaboradores²⁴ mostraram que a associação de melarsoprol e MGZ é capaz de curar camundongos infectados com *T. brucei brucei*, que estão na fase inicial do comprometimento neurológico.
- Enanga e colaboradores²⁵ mostraram que a associação de suramina e MGZ é eficaz para curar camundongos infectados com *T. brucei*, mesmo quando estes estão em estágios avançados do comprometimento neurológico.
- Chauvière e colaboradores²⁶ mostraram que é possível curar camundongos infectados com *T. brucei brucei*, e macacos infectados com *T. brucei gambiense*, na fase aguda da doença, administrando uma única dose de MGZ. Durante a fase inicial do comprometimento neurológico, a associação de MGZ e suramina também mostrou-se capaz de curar camundongos e macacos, sem que se tenha observado indícios de reincidência do comprometimento do SNC.

Apesar de ter sido demonstrado que o MGZ é extremamente eficaz em modelos experimentais de tripanosomíases, o mecanismo de ação deste fármaco ainda é pouco claro:

- De Castro & Meirelles¹⁴ sugerem que, no caso do *T. cruzi* o efeito antiparasitário está relacionado, pelo menos no primeiro momento, a uma interferência com a síntese proteica das formas amastigotas. Os autores sugerem entretanto que este não seria o único mecanismo responsável pelo efeito encontrado.

- Viodé e colaboradores ¹⁸ demonstraram que redutases presentes na fração microssomal do *T. cruzi* catalisam a redução do MGZ, dando origem ao radical nitro-ânion. Os autores sugerem que o MGZ interfere com o metabolismo do oxigênio parasitário induzindo um estado de estresse oxidativo.
- Barrett e colaboradores ¹⁹ mostraram que o MGZ é capaz de se ligar ao transportador amino-purina P2 presente no *T. brucei*. A entrada do MGZ no parasito, entretanto, ocorreria predominantemente por difusão passiva já que a perda deste transportador pelo protozoário não acarreta resistência.
- Maya e colaboradores ⁷ sugeriram que a atividade tripanossomicida do MGZ envolveria o metabolismo do oxigênio, ou seja, o MGZ sofreria dismutação originando uma espécie eletrofílica (forma nitrosa) que seria tiol “scavenger” eficiente, principalmente para a tiol tripanotiona, co-fator para a detoxificação da tripanotiona redutase, enzima essencial para a sobrevivência do *T. cruzi*.

Embora os estudos realizados com o MGZ tenham mostrado que este fármaco é muito eficaz contra as tripanosomíases, ensaios toxicológicos sugerem que este derivado nitroimidazólico tem propriedades mutagênica / clastogênica:

- Ferreira & Ferreira ²⁷ verificaram que o MGZ é um potente agente mutagênico do tipo que causa “deslocamento do quadro de leitura” e “substituição de um par de bases” em *Salmonella tiphymurium* (cepas TA98 e TA102, respectivamente), na ausência de sistema extrínseco de ativação metabólica (fração S9). A adição do sistema metabólico não modificou o efeito mutagênico do MGZ no ensaio de *Salmonella*.
- Poli e colaboradores ²⁸ constataram que o MGZ é genotóxico no ensaio do cometa realizado com leucócitos de ratos e camundongos, com e sem ativação metabólica extrínseca. Por outro lado, ensaios de mutagenicidade realizados com culturas de *Saccharomyces cerevisiae* (cepa D7), com e sem fração S9, não revelaram efeitos genotóxicos, apesar de mostrarem citotoxicidade.
- Nessler e colaboradores ⁸ investigaram os efeitos genotóxicos do MGZ em dois estudos *in vitro*, na presença ou na ausência de ativação metabólica: (1) ensaio do micronúcleo em microescala, usando células de linfoma de camundongos e, (2) análises de linfócitos humanos em metáfase. Em ambos os estudos o MGZ apresentou atividade genotóxica. A genotoxicidade do MGZ foi confirmada em teste *in vivo*, ou seja, no ensaio do micronúcleo em células de medula óssea de ratos após o tratamento por via oral.

Compostos heterocíclicos que apresentam grupamento nitro na estrutura molecular são usados há muitos anos como medicamentos antimicrobianos, antiparasitários e drogas radiosensibilizadoras. Assim sendo, um grande número de derivados nitroimidazólicos, obtidos por síntese, têm tido amplo uso na medicina humana, além de serem importantes também na medicina veterinária ²⁹.

O metronidazol [1-(2-hidroximetil)-2-metil-5-nitroimidazol] é um derivado nitroimidazólico amplamente empregado na clínica médica, desde 1960, para tratar *Trichomonas vaginalis*, *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia* e *Helicobacter pylori*. Além disso, o metronidazol (MTZ) é droga de escolha para profilaxia de infecções parasitárias em cirurgias do trato digestivo e ginecológicas ³⁰. Como podemos ver na figura 5, a estrutura química do MTZ e do MGZ, ambos derivados nitroimidazólicos, é muito semelhante.

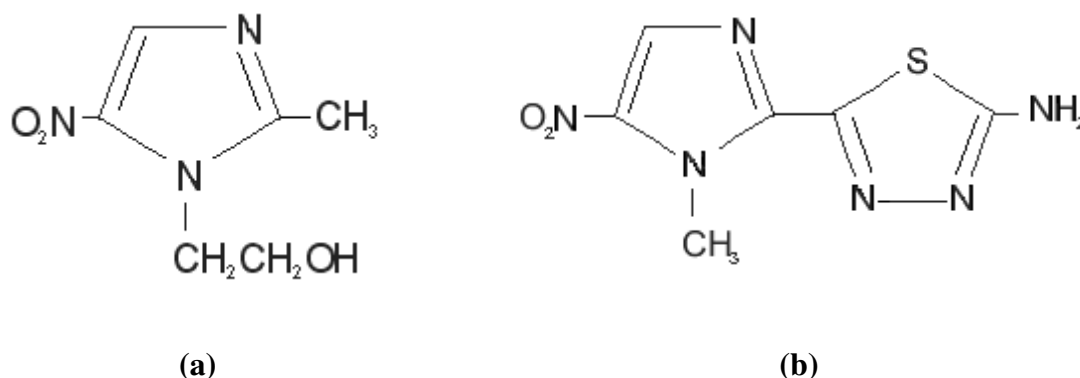


Figura 5: Estrutura química do metronidazol (a) e do megazol (b).

Ambos os fármacos têm estrutura heterocíclica que consiste basicamente em um núcleo imidazólico com um grupamento nitro (NO_2) na posição 5 ³¹. A presença deste grupamento NO_2 pode ter papel fundamental na atividade mutagênica do MGZ, como parece ocorrer também – embora em menor intensidade – com o MTZ ⁸. Não existe apenas uma hipótese sobre o mecanismo de ação do MTZ e de outros compostos nitroheterocíclicos, mas a hipótese mais difundida é que o efeito antimicrobiano pode estar relacionado a redução do grupamento nitro. Por outro lado, a presença do grupamento nitro e / ou localização na posição 5 do anel nitroimidazólico parece ser responsável também pela toxicidade deste composto, incluindo o efeito mutagênico ²⁹.

Embora o mecanismo subjacente ao efeito genotóxico do MGZ ainda não tenha sido esclarecido, uma das hipóteses para explicar a ação tripanossomicida envolve a redução enzimática do grupamento nitro, gerando radicais livres que matariam o

parasito^{7, 18}. O desequilíbrio entre a formação e a remoção dos radicais livres no organismo gera um estado pró-oxidante que favorece a ocorrência de lesões oxidativas em macromoléculas e estruturas celulares, podendo resultar inclusive na morte celular³². Em tese, a ação deletéria de radicais livres pode ser prevenida por antioxidantes.

O α -tocoferol (Vitamina E) é o antioxidante solúvel em lipídeo de maior importância para o homem. Ele é um antioxidante do tipo radical “*scavenger*” capaz de impedir o processo de peroxidação lipídica, suprimindo e reagindo com o oxigênio, sequestrando radicais superóxido e hidroxila, além de doar um átomo de hidrogênio para radicais peroxil e alcoxil derivados da oxidação dos ácidos graxos³².

Neste estudo utilizamos o antioxidante α -tocoferol (Vitamina E) para verificar se é possível atenuar o efeito mutagênico do MGZ. Esta investigação foi realizada *in vitro* empregando cultura de linfócitos humanos e avaliando como desfecho a frequência de aberrações cromossômicas em células metafásicas. Outro ensaio de genotoxicidade / clastogenicidade foi realizado para confirmar a atividade clastogênica do MGZ em teste *in vivo*, tendo como desfecho avaliado a frequência de micronúcleos em células da medula óssea de camundongo suíço albino.

1.4 Análise Citogenética

Um dos métodos mais utilizados para investigar a genotoxicidade (ou clastogenicidade) de agentes químicos é a determinação da frequência de aberrações cromossômicas (ACs) em culturas de linfócitos expostas a estas substâncias. A observação direta de alterações estruturais em cromossomas possibilita verificar se determinada substância é clastogênica, o que pode ser feito através de análise detalhada da estrutura cromossômica ao microscópio óptico³³. A necessidade de pessoas altamente especializadas para detectar e classificar as aberrações em células metafásicas tem estimulado o desenvolvimento de um sistema mais simples e mais rápido para medir o dano cromossômico.

Heddle³⁴ e Schmid³⁵ propuseram a quantificação de micronúcleos como uma alternativa mais simples para evidenciar o dano cromossômico. O micronúcleo nada mais é que um pequeno núcleo distinto, mas próximo ao núcleo principal da célula, que é produzido durante a telófase da mitose ou meiose, devido a perda de fragmentos cromossômicos ou de todo o cromossomo³⁶.

1.4.1 Aberrações Cromossômicas em Linfócitos Metafásicos

Os cromossomas metafásicos constituem o melhor material para a análise de alterações cromossômicas estruturais e numéricas. As aberrações cromossômicas numéricas são aquelas em que ocorre aumento ou diminuição do número cariotípico normal da espécie, enquanto as aberrações cromossômicas estruturais dizem respeito a casos em que um ou mais cromossomas apresentam alterações de sua estrutura, perceptíveis ao microscópio óptico ³⁷.

É conhecido que agentes ambientais podem provocar rupturas na estrutura dos cromossomas, levando ao aparecimento de aberrações cromossômicas. Esses agentes clastogênicos de ocorrência ambiental podem ser radiações ionizantes, infecções virais, produtos químicos ou até mesmo alterações metabólicas em tecidos tumorais ³⁸.

Entre as aberrações cromossômicas estruturais podem ser encontradas as quebras cromatídicas (Figura 6 - a, b) ou cromossômicas (Figura 6 - c, d), caso afetem apenas uma ou ambas as cromátides, respectivamente. É interessante assinalar que, ao microscópio óptico, os cromossomas corados de acordo com as técnicas clássicas de coloração podem apresentar descontinuidades, denominadas falhas (“*gap*” - Figura 6 - e, f) que, do mesmo modo que as quebras, podem atingir uma ou ambas as cromátides ³⁷. Apesar de alguns pesquisadores considerarem tais descontinuidades como artefatos ou falhas de coloração, outros sustentam que as falhas deveriam ser incluídas entre as aberrações cromossômicas estruturais, pois se não fossem fraturas de fato, seriam pelo menos locais predispostos a tais lesões. Predomina, entre os toxicologistas genéticos, a conduta de registrar as falhas à parte, sem incluí-las entre as aberrações cromossômicas quando da análise dos resultados.

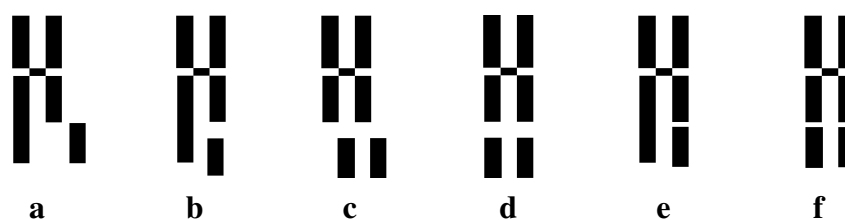


Figura 6: Esquema para diferenciar quebras e falhas cromossômicas e cromatídicas. (a), (b): Quebra cromatídica; (c), (d): Quebra cromossômica; (e): Falha cromatídica; (f): Falha cromossômica.

Segundo Beiguelman ³⁷ as quebras (Figura 6, a - d) são descontinuidades cromossômicas de comprimento maior do que a espessura de uma cromátide podendo, nesses casos, haver deslocamento do fragmento distal em relação ao eixo

cromossômico. As falhas (Figura 6, e - f) seriam, por outro lado, alterações cuja descontinuidade cromossômica teria comprimento inferior à espessura da cromátide e que, além disso, teriam as extremidades proximal e distal na mesma direção.

As aberrações cromatídicas e cromossômicas encontradas nos linfócitos expostos a agentes genotóxicos são classificadas em uma variedade de subtipos, agrupados como se segue:

1.4.1.1 Aberrações cromatídicas

➤ Quebra cromatídica

É formada pela deleção terminal ou intersticial em uma das cromátides do cromossoma (Figura 7). O fragmento acêntrico nem sempre é encontrado próximo ao cromossoma danificado, mas é usado para a confirmação da quebra ³⁹.



Figura 7: Esquema de quebra cromatídica

➤ Cromossoma trirradial

Decorre da interação de um cromossoma com deleção terminal do tipo cromossômico (as duas cromátides são afetadas) com um cromossoma com deleção intersticial do tipo cromatídico ³⁹. Os rearranjos mais comuns encontrados em células de mamíferos estão presentes na figura 8.

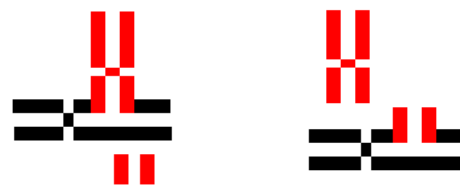


Figura 8: Esquema de cromossoma trirradial

➤ Cromossoma quadrirradial

Ocorre devido a interação de dois cromossomas que apresentam quebra cromatídica. A interação pode ser simétrica (equivalente a translocação), ou assimétrica, que equivale aos cromossomas dicêntricos ³⁹. Os fragmentos acêntricos sofrem rearranjos com os cromossomas danificados para dar origem à morfologia característica deste tipo de alteração (Figura 9).

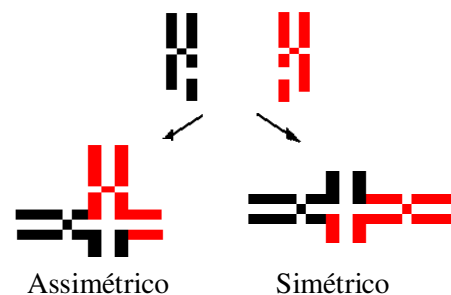


Figura 9: Esquema de cromossoma quadrirradial

1.4.1.2 Aberrações cromossômicas

➤ Quebra cromossômica

Tem origem na deleção terminal ou intersticial de ambas as cromátides, havendo a formação de dois fragmentos acêntricos (sem centrômero). Os fragmentos oriundos da deleção intersticial podem formar dois anéis acêntricos ou, quando a deleção é muito pequena, formar uma estrutura chamada “minuto”, *i.e.*, dois pequenos pontos pareados (Figura 10). Os fragmentos acêntricos são usados para a confirmação da quebra cromossômica³⁹.



Figura 10: Esquema de quebra cromossômica

➤ Cromossoma dicêntrico e tricêntrico

- **Dicêntrico:** Decorre do rearranjo de dois cromossomas com deleção terminal, antes da duplicação do material genético (Figura 11). Esta alteração é acompanhada de um fragmento acêntrico usado para a confirmação deste tipo de alteração³⁹.

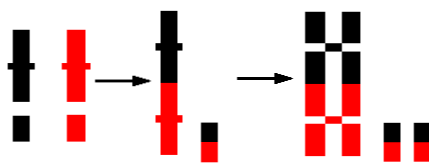


Figura 11: Esquema de cromossoma dicêntrico

- **Tricêntrico:** É formado pelo rearranjo de três cromossomas que sofreram deleção terminal, antes de ocorrer à duplicação do material genético (Figura 12). Os dois fragmentos acêntricos são usados para a confirmação do dano genético³⁹.

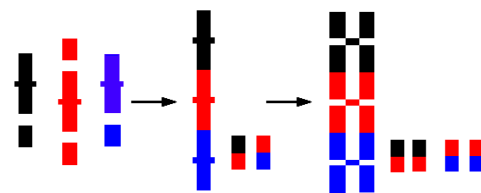


Figura 12: Esquema de cromossoma tricêntrico

➤ Anel cêntrico

Ocorre devido a duas quebras, uma em cada extremidade do cromossoma, antes deste ser duplicado (Figura 13). O anel cêntrico é acompanhado de um fragmento acêntrico, usado para a confirmação da alteração cromossômica³⁹.

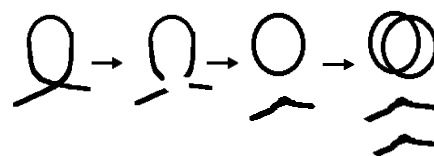


Figura 13: Esquema de anel cêntrico

➤ Translocação

Esta alteração é formada pelo rearranjo de dois cromossomas que sofrem deleção terminal, antes da replicação do material genético (Figura 14). Este tipo de alteração não é de fácil visualização através da coloração clássica, a não ser que a troca origine dois cromossomas com morfologia muito diferente do cariótipo normal ³⁹.

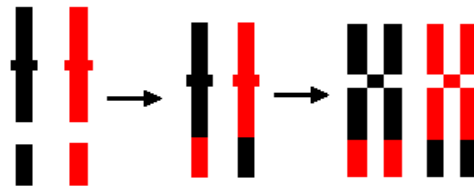


Figura 14: Esquema de translocação

1.4.2 Micronúcleo em Medula Óssea de Mamíferos

Inicialmente os micronúcleos (MNs) foram classificados como “material de fragmento nuclear” por Howell no final de 1800 e, no início de 1900, Jolly classificou estes corpos como “corpúsculos intraglomerulares”. Assim sendo, os hematologistas chamam os MNs de “corpos de Howell-Jolly” ⁴⁰.

Independente do tipo celular, os MNs são encontrados apenas em células que passaram por processo de divisão. Durante a divisão, pode haver a produção de fragmentos cromossômicos sem centrômero (fragmento acêntrico) e/ou todo o cromossomo pode ser incapaz de se prender ao fuso mitótico (Figura 15). Na telófase, ocorre a formação de um envelope nuclear ao redor do fragmento cromossômico e do cromossomo perdido, dando um aspecto de núcleo interfásico menor, entretanto, que o núcleo principal, daí o nome micronúcleo ⁴¹.

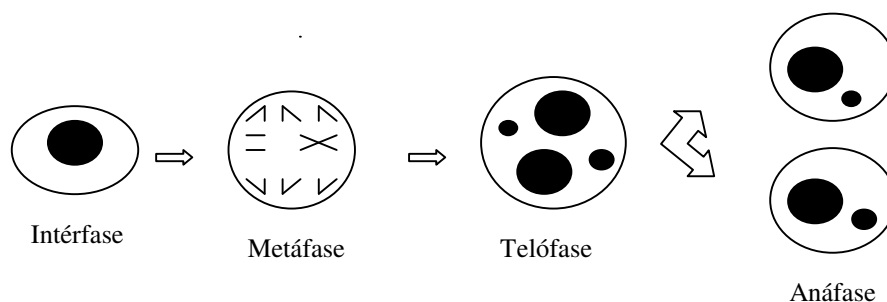


Figura 15: Formação de micronúcleo.

A quantificação de MNs pode ser feita em uma variedade de tipos celulares, as células da medula óssea, entretanto, parecem ser as mais convenientes para a realização de ensaios de genotoxicidade de substâncias químicas.

Dentre as células da medula óssea, os eritrócitos policromáticos são as células de escolha para a quantificação de micronúcleos. A escolha dos eritrócitos é justificada pela ausência de núcleo neste tipo celular, o que facilita sua diferenciação as demais células da medula. Além disso, os eritrócitos policromáticos são células que tem vida relativamente curta, fazendo com que qualquer MN presente seja resultado de dano cromossômico recente ⁴².

Quando o eritroblasto da medula óssea se transforma em um eritrócito policromático, o núcleo principal é expulso (Figura 16). Caso tenha sido formado um MN, este permanecerá no citoplasma celular, o que irá facilitar a sua visualização na célula já que ela não exibe o núcleo principal. Um aumento na frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados é um indicativo claro de dano cromossômico (clastogênese).

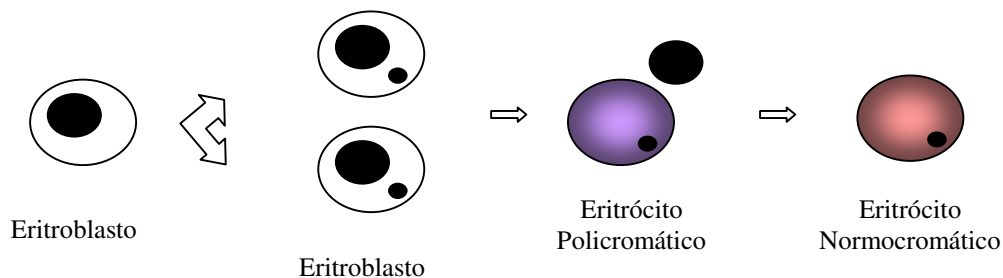


Figura 16: Processo de maturação eritrocitária em medula óssea.

Um eritrócito policromático difere de um eritrócito normocromático pela fase de maturação, *i.e.*, o eritrócito policromático ou eritrócito imaturo ainda apresenta ribossomos, sendo, portanto RNA positivo, exibindo coloração azulada; já os eritrócitos normocromáticos ou maduros não mais apresentam ribossomos e portanto são RNA negativos, exibindo cor rosada quando corados por método convencional.

1.5 Contexto do Presente Estudo

Se o efeito genotóxico do MGZ for mediado por lesões oxidativas e o efeito tripanossomicida envolver um mecanismo diferente, não oxidativo, seria – em princípio – possível melhorar o perfil de segurança do tratamento associando este fármaco a um antioxidante.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo Geral

- Este estudo teve como objetivo avaliar o efeito genotóxico do megalol – CL 64,855 [2-amino-5-(1-metil-5-nitro-2-imidazol)-1,3,4-tiadiazol] em sistema *in vitro* e *in vivo*, além de, investigar se é possível atenuar o efeito mutagênico do MGZ empregando o anti-oxidante α -tocoferol (Vitamina E), o que permitiria melhorar a relação risco / benefício em eventuais usos terapêuticos do MGZ na doença do sono e em outras tripanosomíases.

2.2 Objetivos Específicos

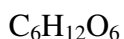
- Avaliar, em ensaio *in vitro*, o efeito genotóxico e citotóxico do MGZ analisando a frequência de aberrações cromossômicas em linfócitos metafásicos humanos, expostos por 20 horas a substância.
- Avaliar em ensaio *in vitro* (aberrações cromossômicas em linfócitos humanos) o resultado da vitamina E sobre a genotoxicidade e citotoxicidade induzidas pelo MGZ.
- Avaliar *in vivo* o efeito genotóxico (clastogênico) e citotóxico do MGZ determinando a frequência de micronúcleos em células da medula óssea de camundongos *Swiss Webster*, 24, 36 e 48 horas após dose única da substância administrada por via oral.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Substâncias

As seguintes substâncias foram usadas neste estudo.

➤ **Carboximetilcelulose (Sodium Carboxymethylcellulose)**

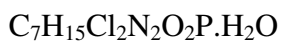


PM: 180,14

CAS: 9004-32-4

Procedência: Doação Farmanguinhos – FIOCRUZ (Vetec)

➤ **Ciclofosfamida**

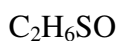


PM: 279,08

CAS: 6055-19-2

Procedência: Doação Fosfaseron – Itaca Laboratórios

➤ **DMSO (Demetil Sulfoxido)**



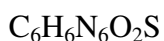
PM: 78,13

CAS: 67-68-5

Lote: 30H0608

Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)

➤ **Megazol (2-amino-5-(1-metil-5-nitro-2-imidazol)-1,3,4-tiadiazol)**



PM: 226,22

CAS: 19622-55-0

Procedência: Farmanguinhos – FIOCRUZ

➤ **Mitomicina C**

$C_{29}H_{32}N_8O_{10}$

PM: 652,61

CAS: 50-07-7

Lote: 115H2504

Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)

➤ **Tocoferol (DL- α -tocoferol)**

$C_{29}H_{50}O_2$

PM: 430,72

CAS: 10191-41-0

Lote: 063K0796

Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)

3.2 Preparo de Soluções

➤ **Solução de Fitohemaglutinina M – 1mg/mL (Sigma – Lote: L8902)**

PHA-M ----- 25mg

Água milli Q estéril ----- 25mL

Foram armazenadas alíquotas de 1mL em *freezer* a - 20° C até o momento do uso.

➤ **Solução de Colchicina – 0,16mg/mL (Sigma – Lote: 115H0545)**

Colchicina ($C_{22}H_{25}NO_6$) ----- 1,6mg

Água milli Q estéril ----- 10mL

Foram armazenadas alíquotas de 1mL em *freezer* a - 20° C até o momento do uso.

➤ **Solução Hipotônica de KCl – 0,075M (Merck – Lote: 4933.0500)**

Cloreto de potássio (KCl) ----- 1,4g

Água milli Q q.s.p ----- 250mL

Foi preparada no dia do uso e mantida a 37°C.

➤ **Fixador (Metanol e ácido acético 3:1)**

Metanol PA (Merck – Lote: 6009) ----- 20mL

Ácido acético glacial PA (Merck – Lote: 63) ----- 10mL

Foi preparado no dia do uso em capela química com exaustão.

➤ **Tampão fosfato (pH 6,8)**

- Solução 1:

Fosfato dibásico de sódio diidratado ----- 8,9g

Na₂HPO₄.2H₂O (Merck - art. 6580)

Água milli Q q.s.p. ----- 500mL

- Solução 2:

Fosfato monobásico de sódio diidratado

NaH₂PO₄.2H₂O (Merck –Lote: 6346) ----- 7,3g

Água milli Q q.s.p. ----- 500mL

- Solução final (0,1M):

Solução 1 ----- 500mL

Solução 2 ----- 500mL

O pH foi ajustado em 6,8 e mantido em geladeira até o momento do uso.

➤ **Solução de Giemsa**

- Solução estoque:

Azur-eosina-azul de metileno segundo Giemsa (Merck –Lote: 9203) ----- 2g

Glicerina PA (Merck –Lote: 4094) ----- 108mL

Manter em banho-maria, a 60°C, por 2 horas e homogeneizado de vez em quando.

Esperar a solução atingir temperatura ambiente e adicionar:

Metano PA (Merck – Lote: 6009) ----- 168mL

Deixar descansar por uma semana em frasco bem fechado e ao abrigo da luz.

Filtrar a solução e armazenada em frasco escuro.

Manter na geladeira até o momento do uso.

- Solução final:

Solução estoque ----- 3mL

Tampão fosfato ----- 100mL

Descartar após o uso.

➤ **Solução May-Gruenwald's**

Eosina azul de metileno segundo May Grunwald's (Isofar – Lote: 611) ----- 0,225g

Metanol PA q.s.p (Merck – Lote: 6009) ----- 75mL

Filtrar a solução

Diluir 1:1 em solução tampão fosfato pH 6,8.

Descartar após o uso.

3.3 Análise de Aberrações Cromossômicas em Linfócitos

Metafásicos (Ensaio *in vitro*)

Os experimentos realizados neste estudo seguiram em linhas gerais a técnica descrita por Moorhead e colaboradores⁴³ sendo os testes planejados e executados de acordo com as recomendações da OECD 473⁴⁴.

Este estudo foi realizado em duas etapas: *i.* Avaliação da clastogenicidade de diferentes concentrações de MGZ e *ii.* Investigação da inibição do efeito clastogênico do MGZ pela exposição simultânea ao tocoferol.

3.3.1 Voluntários

Os voluntários que doaram sangue para a avaliação citogenética, responderam a um breve questionário informando sexo, idade, hábito de fumar e beber, exposição recente a radiações ionizantes, tratamento com antineoplásicos e uso de medicamentos. Os voluntários foram uma mulher de 26 anos e um homem de 29 anos, não fumantes e declararam ser abstêmio ou ingerir bebidas alcoólicas apenas ocasionalmente. Nenhum dos participantes declarou ter sido exposto à radiação ionizante, radioterapia e / ou a fármacos antineoplásicos, nem estar fazendo uso de medicamento. Os dois voluntários doaram sangue para as duas etapas do estudo (*i.* Avaliação do potencial mutagênico do MGZ e *ii.* Investigação da inibição do efeito clastogênico do MGZ pelo tocoferol).

3.3.2 Avaliação do Potencial Mutagênico do Megazol

Este ensaio foi realizado para avaliar o efeito genotóxico do MGZ aos linfócitos humanos em cultura. Esta avaliação possibilitou determinar a curva concentração-efeito, o que permitiu escolher as concentrações de MGZ a serem usadas no experimento subsequente de inibição do efeito genotóxico pelo tocoferol.

O ensaio incluiu 6 grupos:

- Controle negativo (solvente para o MGZ): DMSO 0,5% v/v
- Controle negativo (solvente para o MGZ): DMSO 1% v/v
- Controle positivo: Mitomicina C – $3,83 \cdot 10^{-7} \text{M}$
- MGZ – $1,41 \cdot 10^{-4} \text{M}$
- MGZ – $2,81 \cdot 10^{-4} \text{M}$
- MGZ – $5,63 \cdot 10^{-4} \text{M}$

Cada grupo foi constituído por amostras de sangue dos dois voluntários em duplicata, totalizando quatro amostras de sangue, com exceção dos grupos controle negativo em que não houve duplicata.

Aproximadamente 5mL de sangue foram retirados da veia do braço de cada voluntário no dia do teste, havendo um intervalo máximo de duas horas entre a coleta do sangue e sua adição ao meio de cultura. O sangue foi coletado em tubo "vacutainer" estéril contendo o anticoagulante heparina (sal sódico), marca B-D (Becton Dickinson). Logo após a coleta, os tubos foram invertidos várias vezes para homogeneizar a heparina com o sangue e, em seguida, marcados com o código de identificação do indivíduo. Os tubos com as amostras de sangue foram acondicionados em geladeira até o início da cultura.

No início da cultura o sangue total foi homogeneizado invertendo-se o tubo "vacutainer" várias vezes. Duzentos microlitros de sangue foram transferidos para frasco do tipo Erlenmeyer, contendo 5 mL do meio de cultura. O meio de cultura foi preparado como se segue:

- Em um frasco contendo 84,6mL de meio RPMI 1640 (Cultilab, Lote: PU8383/04), foram adicionados 21,1mL de soro fetal bovino estéril (Cripion, Lote: 20302) e 4,3mL de solução de PHA-M resultando em 110mL de volume final de meio de cultura. Foram feitas então 20 alíquotas de 5mL em frascos tipo Erlenmeyer com capacidade para 50mL. Todo material usado na preparação do meio de cultura foi previamente esterilizado em autoclave vertical por 20 minutos a 121°C (Autoclave vertical – Fanem, Mod. 415).

Após a adição do sangue total às culturas, os frascos foram agitados e incubados a 37°C por 48 horas (Estufa Heraeus). Ao final deste período, os frascos de cultura receberam 26µL de DMSO ou soluções de mitomicina C (MMC) e MGZ, dependendo do grupo de origem, e foram novamente incubadas à 37°C por mais 20 horas. Após 65h e 20min do início da cultura, adicionamos 150µL de solução de colchicina (160µg/mL) a todos os frascos para interromper a mitose na fase de metáfase. Os frascos de cultura foram então incubados a 37°C por mais 2h e 40min.

Toda a manipulação das amostras (preparo do meio e obtenção das células) foi realizado em fluxo laminar (Holten Lamin Air MS 2010 / 1,8), previamente desinfetado com álcool etílico 70 % e luz ultravioleta germicida por 1 hora.

Após 68h de cultura (20h de tratamento contínuo – aproximadamente 1,5 divisões celulares), as amostras foram homogeneizadas e vertidas em tubos Falcon de fundo cônico com capacidade para 15mL. Os tubos foram centrifugados (Centrífuga refrigerada Eppendorf 5804 R) a 1000 rpm (16.1 x g) durante 18 minutos e o sobrenadante (meio de cultura) desprezado com auxílio de pipeta Pasteur.

Sob agitação mecânica, em agitador de tubos tipo Vórtex, foram adicionados a cada tubo 8mL de solução hipotônica de KCl (0,075M), preparada no mesmo dia e previamente aquecida a 37°C. As células em solução hipotônica foram incubadas por 20 minutos a 37°C, para aumentar o volume celular. Após 20 minutos, os tubos foram centrifugados a 1000 rpm (16.1 x g) por 18 minutos, e o sobrenadante desprezado.

O fixador (metanol e ácido acético, 3:1), preparado no dia do uso, foi adicionado sob agitação (agitador tipo Vórtex), gota a gota até completar o volume de 2mL e, depois, rapidamente até o volume de 8mL. Os tubos foram guardados em geladeira por 24 horas para possibilitar um melhor espalhamento celular.

No dia seguinte, os tubos foram centrifugados a 1000 rpm (16.1 x g) por 18 minutos e o sobrenadante desprezado. A cada tubo foram adicionados, sob agitação no Vórtex, 3mL de fixador. As células foram centrifugadas novamente, sob as mesmas condições, e o sobrenadante foi desprezado. Foram adicionados, sob agitação no Vórtex, 2mL de fixador. Em seguida, os tubos foram centrifugados, sob as mesmas condições anteriormente descritas, e o sobrenadante foi desprezado.

As células foram suspensas em pequeno volume de fixador, geralmente de 0,3 a 0,5mL, estimado visualmente, de modo que a concentração das células na suspensão fosse adequada para o posterior preparo das lâminas. Os tubos com a suspensão das células foram armazenados em congelador (*'freezer'*) por 3 dias, para melhorar o espalhamento celular.

As lâminas utilizadas passaram previamente por um rigoroso processo de limpeza que consistiu na lavagem com detergente neutro e enxágüe até que um filme de água se formasse na superfície das lâminas após serem enxaguadas. As lâminas foram então colocadas em recipientes próprios para coloração de lâminas, tipo Coplin, e deixadas de molho em mistura de etanol absoluto (Quimex - Lote: 6542) com 20% de ácido clorídrico concentrado PA (Synth - Lote: 19584), por tempo variável, mas nunca inferior a um dia.

Após o enxágüe em água corrente por 5 minutos, os recipientes tipo Coplin contendo as lâminas foram imersos em água destilada contendo gelo. Sobre uma lâmina molhada e gelada foram gotejadas (5 gotas), com pipeta Pasteur de ponta fina, as suspensões celulares. As lâminas foram secas em contato com o ar, à temperatura ambiente, e marcadas com o código de identificação da amostra.

A coloração das lâminas foi realizada em recipiente tipo Coplin contendo 100mL de tampão fosfato (pH 6,8) e 3mL de solução estoque de Giemsa por 8 minutos. Depois de coradas, as lâminas foram lavadas em água destilada corrente e secas à temperatura ambiente e em contato com o ar.

As lâminas foram então analisadas ao microscópio ótico (Olympus Cover - 018), equipado com lentes oculares (WH 10x / 22) e lentes objetivas planocromáticas de 10x e 100x. As células em metáfase foram localizadas utilizando objetivas de 10x e, após a sua visualização, examinava-se os cromossomos com objetivas de 100x, com o auxílio de óleo de imersão. Na análise de cada célula metafásica, inicialmente, contava-se o número de figuras cromossômicas, sendo consideradas apenas aquelas com 46 ou mais figuras (presença de fragmentos acêntricos). Observou-se a morfologia dos cromossomas, verificando a presença de aberrações estruturais do tipo cromatídica e cromossômica.

A OECD 473 ⁴⁴ recomenda a análise de pelo menos 200 metáfases por concentração, divididas entre as duplicatas. Neste estudo, o número de células analisadas foi de 400 metáfases por concentração dividida entre as duplicatas, *i. e.*, 200 metáfases analisadas por voluntário, sendo que, em cada réplica, foram lidas 100 metáfases. Além da análise de genotoxicidade em linfócitos metafásicos, foi realizada também a avaliação de citotoxicidade através da determinação do índice mitótico. O índice mitótico representa o número de metáfases encontradas em um total de 1000 células em interfase.

3.3.3 Avaliação da Inibição do Efeito Clastogênico do Megazol pelo Tocoferol

A partir dos resultados obtidos no ensaio anterior, foi possível planejar o estudo da inibição do efeito genotóxico do MGZ pela vitamina E (α -Tocoferol).

O Experimento incluiu 9 grupos:

- Controle negativo (solvente usado para o tocoferol e o MGZ): DMSO 0,5% v/v
- Tocoferol – $2,5 \cdot 10^{-6}$ M
- Tocoferol – $5,0 \cdot 10^{-6}$ M
- MGZ – $2,81 \cdot 10^{-4}$ M
- MGZ – $5,63 \cdot 10^{-4}$ M
- $2,5 \cdot 10^{-6}$ M de tocoferol + $2,81 \cdot 10^{-4}$ M de MGZ
- $2,5 \cdot 10^{-6}$ M de tocoferol + $5,63 \cdot 10^{-4}$ M de MGZ
- $5,0 \cdot 10^{-6}$ M de tocoferol + $2,81 \cdot 10^{-4}$ M de MGZ
- $5,0 \cdot 10^{-6}$ M de tocoferol + $5,63 \cdot 10^{-4}$ M de MGZ.

Cada grupo foi constituído por amostras de sangue dos dois voluntários em duplicata, totalizando quatro amostras de sangue por grupo, com exceção dos dois grupos tratados com tocoferol ($2,5 \cdot 10^{-6}$ M e $5,0 \cdot 10^{-6}$ M) em que não houve duplicata.

No início da cultura, o sangue total foi homogeneizado e 200 μ L foram transferidos para frasco tipo Erlenmeyer, contendo 5mL do meio de cultura. O meio de cultura foi previamente preparado como se segue:

- Em um frasco contendo 130,8mL de meio RPMI 1640, foram adicionados 32,7mL de soro fetal bovino e 6,5mL de solução de PHA-M atingindo 170mL de volume final de meio de cultura. Foram preparadas então 32 alíquotas de 5mL em frascos tipo Erlenmeyer, com capacidade para 50mL

Toda a metodologia de coleta de sangue venoso, início da cultura, tratamento das amostras, coleta das células, preparação e coloração das lâminas, seguiu exatamente o que foi descrito para o ensaio anterior.

A análise das lâminas seguiu também o procedimento anteriormente descrito, com exceção do número de células avaliadas no desfecho genotoxicidade / clastogenicidade. Neste estudo, o número de células analisadas foi de 200 metáfases por concentração dividida entre as duplicatas, *i. e.*, 100 metáfases analisadas por voluntário, sendo que, em cada réplica, foram lidas 50 metáfases. Desta maneira, a recomendação da OECD 473⁴⁴ foi respeitada (análise de pelo menos 200 metáfases por concentração, divididas entre as réplicas).

3.4 Análise do Micronúcleo em Medula Óssea de Mamíferos (Ensaio *in vivo*)

Os experimentos realizados neste estudo seguiram a técnica descrita por Schmid³⁵ e as recomendações da OECD 474³⁶.

3.4.1 Animais

Foram utilizados camundongos *Swiss Webster*, machos e fêmeas, com 10 semanas de vida, originários do Biotério Central da Fundação Oswaldo Cruz (Centro de Criação de Animais de Laboratório - CECAL). Os camundongos foram fornecidos com 9 semanas de idade e, a partir de então, foram mantidos no Biotério do Laboratório de Toxicologia Ambiental, onde o experimento foi realizado.

Os animais foram distribuídos ao acaso a cada grupo experimental e alojados em grupos de 5 (quando fêmeas) ou individualmente (quando machos). Foram usadas caixas de camundongo de plástico (33,5 x 40,5 x 17,0 cm) com tampa de aço inoxidável e cama de maravalha de pinho branco.

3.4.2 Biotério

Durante o período de aclimação (1 semana) e durante todo o experimento, água e ração comercial para ratos (Nuvilab® - Nuvital Ltda., Curitiba, Paraná) foram fornecidas *ad libitum*.

No biotério foram mantidos os seguintes controles ambientais: temperatura (23 ± 2°C), umidade relativa do ar (aproximadamente 70%) e ciclo claro-escuro constante (período claro de 7 às 19 horas). As trocas das camas de maravalha, água e ração foram realizadas três vezes por semana.

3.4.3 Desenho Experimental

Para a avaliação do efeito genotóxico do MGZ em células da medula óssea de roedores e posterior determinação da relação dose-efeito, foram constituídos 7 grupos:

- Controle negativo (veículo usado para o MGZ): carboximetilcelulose 0,5% w/v
- Controle positivo: ciclofosfamida – 25mg/kg
- MGZ – 125mg/kg
- MGZ – 250mg/kg
- MGZ – 500mg/kg
- MGZ – 1000mg/kg
- MGZ – 2000mg/kg

Cada um desses grupos foi subdividido em três tempos de coleta das células a serem analisadas: 24, 36 e 48 horas. Cada grupo, em cada um dos tempos de coleta, foi composto por 10 camundongos Suíço albino (*Swiss Webster*), 5 machos e 5 fêmeas, com 10 semanas de vida.

Após uma semana de aclimação, os animais foram pré-selecionados por peso, a fim de minimizar a variação individual. Os machos apresentaram peso médio de 41,5g e as fêmeas, 36,4g. Em seguida, os animais foram tratados com uma única dose, de acordo com seus grupos de origem:

- Grupo controle negativo: Os camundongos foram tratados com carboximetilcelulose 0,5% w/v no volume de 10mL/kg, através da via oral, usando sonda uretral número 4 com um furo.
- Grupo controle positivo: Os animais deste grupo foram tratados com ciclofosfamida (25mg/kg; 10mL/kg) por via intraperitoneal, usando seringa de 1mL e agulha de 13x3mm.
- Grupos tratados com MGZ: Os animais destes grupos foram tratados com MGZ (125, 250, 500, 1000 e 2000mg/kg; 10mL/kg) por via oral, usando sonda uretral número 4 com um furo.

Após o tratamento, os animais tiveram livre acesso à água e a ração. Vinte e quatro, trinta e seis ou quarenta e oito horas após o tratamento os animais foram mortos por deslocamento cervical e os dois fêmures retirados para a extração das células da medula em 2mL de soro fetal bovino.

As amostras foram centrifugadas a 1000 rpm (16.1 x g) por 5 minutos e o sobrenadante foi desprezado. Foram feitos esfregaços a partir das respectivas

suspensões e as lâminas foram codificadas e secas à temperatura ambiente e em contato com o ar.

Para obter os melhores resultados da coloração, as lâminas foram coradas um dia depois de terem sido preparadas. As lâminas foram coradas com corante azur-eosina-azul de metileno segundo Giemsa e corante eosina azul de metileno segundo May-Gruenwald's, de acordo com o seguinte protocolo:

- Corar por 3 minutos em solução May-Gruenwald.
- Corar por 2 minutos em solução May-Gruenwald diluída em água milli Q (1:1).
- Corar por 10 minutos em solução de Giemsa diluído em água milli Q (1:6).
- Lavar com água destilada.
- Secar com papel filtro.
- Limpar o verso da lâmina com metanol.
- Clarear a lâmina em xileno (Merck – Lote: 8685) por 5 minutos.

Ao microscópio ótico (Olympus Cover – 018), equipado com lentes oculares WH 10x / 22, lente objetiva planocromática de 100x e óleo de imersão, foi avaliado o efeito genotóxico do MGZ através da frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados em 2000 eritrócitos policromáticos para cada animal. Determinamos também o número de eritrócitos policromáticos em 200 eritrócitos totais (eritrócitos policromáticos + eritrócitos normocromáticos) para evidenciar a presença de citotoxicidade.

3.5 Análise estatística

Os dados foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido do teste U de Mann-Whitney ou pelo teste do Qui-quadrado (proporções). Diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p \leq 0,05$.

Os cálculos estatísticos foram realizados empregando o software MINITAB 10.5 (MINITAB Statistical SoftwareTM, Minitab Inc., PA, USA, 1995).

4 RESULTADOS

Os efeitos genotóxicos do MGZ foram avaliados tanto em ensaios *in vitro* (frequência de aberrações cromossômicas em linfócitos humanos) quanto em testes *in vivo* (frequência de micronúcleos em células da medula óssea de camundongos). Em ambos os casos procuramos evidenciar a relação entre dose (*in vivo*) ou concentração (*in vitro*) e efeitos clastogênicos e compará-los com o de um clastógeno conhecido (ciclofosfamida ou mitomicina C). Empregando apenas testes *in vitro* investigamos também as ações do α -tocoferol (vitamina E) sobre a genotoxicidade do MGZ.

4.1 Ação do Megazol sobre a Frequência de Aberrações Cromossômicas em Linfócitos Humanos (teste *in vitro*)

Como mencionado anteriormente, o efeito genotóxico (clastogênico) do MGZ foi investigado em cultura primária de linfócitos humanos, obtidos do sangue periférico. Para avaliar o efeito genotóxico determinamos a frequência de aberrações cromossômicas em linfócitos humanos cuja divisão celular foi interrompida na metáfase (Foto 1).

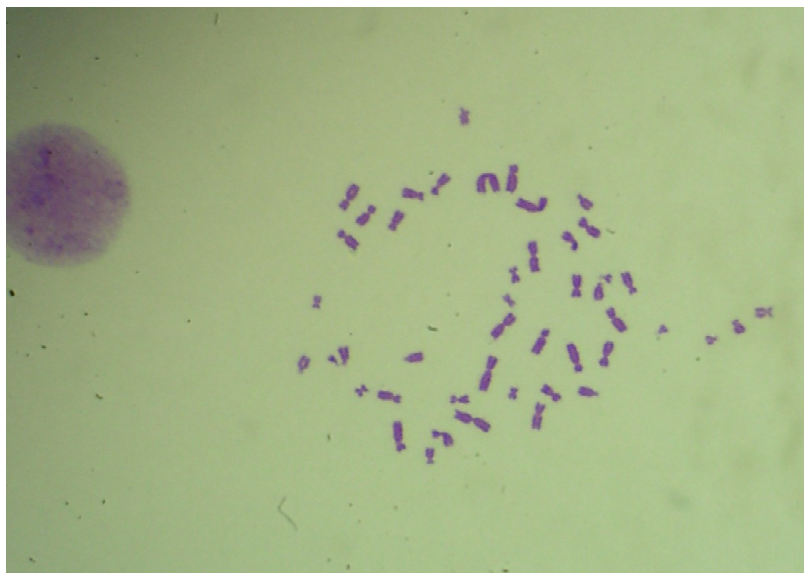


Foto 1: Linfócito humano em metáfase.

4.1.1 Avaliação dos Efeitos Citotóxico e Clastogênico de Diferentes Concentrações de Megazol

Os resultados da exposição de culturas de linfócitos – por 20 horas – a diferentes concentrações de MGZ são apresentados nas tabelas 1 e 2. Na tabela 7 (anexo), constam em detalhes as alterações encontradas para cada cultura de linfócitos tratada, *i.e.*, para cada doador e cada réplica de um mesmo doador.

O DMSO (solvente do MGZ) e o agente clastogênico MMC foram usados como controles negativo e positivo, respectivamente. Duas concentrações de DMSO (0,5% e 1% v/v) foram testadas porque correspondem aos volumes finais máximos deste solvente nas culturas que receberam megazol (MGZ $1,41 \cdot 10^{-4}$ M: 0,5% de DMSO; MGZ $2,81 \cdot 10^{-4}$ M: 0,5% de DMSO e MGZ $5,36 \cdot 10^{-4}$ M: 1% de DMSO).

Como pode ser constatado nas tabelas 1 e 2, nem a incidência dos vários tipos de aberrações cromossômicas, nem o índice mitótico, diferiram entre as culturas de linfócitos expostas apenas a DMSO 0,5% v/v e aquelas tratadas com o dobro da concentração do solvente, *i.e.*, DMSO 1% v/v. Esses resultados indicaram que o aumento da concentração do solvente até 1% v/v não causou citotoxicidade nem elevou a incidência de aberrações cromossômicas. Em ambos os casos, neste experimento, os valores encontrados para os parâmetros índice mitótico (IM) e frequência de aberrações cromossômicas foram baixos e correspondem aos que são usualmente obtidos neste tipo de ensaio para controles negativos que não exibem toxicidade.

Como não foram evidenciadas diferenças entre as duas concentrações do solvente DMSO, quanto ao IM e quanto à incidência de aberrações cromossômicas, reunimos, para fins de análise estatística dos resultados, os dados dos dois grupos expostos apenas ao DMSO (0,5% e 1% v/v) em um único grupo controle negativo.

Tabela 1: Incidência de aberrações cromossômicas em linfócitos humanos expostos por 20 horas ao megazol (MGZ), à mitomicina C (MMC, controle positivo), ou apenas ao solvente DMSO (controle negativo).

Tratamento	Metáfases Analisadas	Aberrações Cromossômicas							Metáfases Alteradas		Metáfases / 4000 células
		Falhas		Q'		Q''	Trir	Quad	Anel	(-) F	
		F'	F''	Q'	Q''	Trir	Quad	Anel	(-) F	(+) F	
DMSO											
0,5% v/v	200	8	3	6	1	0	0	0	7	16	[24] ⁺
1,0% v/v	200	4	0	6	3	0	0	0	9	13	[28] ⁺
(0,5% + 1,0%)	400	12	3	12	4	0	0	0	16	29	52
MMC											
$3,83 \cdot 10^{-7}$ M	368	47	19	82	93	0	2	1	124	154	42
MGZ											
$1,41 \cdot 10^{-4}$ M	400	19	2	17	9	0	1	0	26	44	36
$2,81 \cdot 10^{-4}$ M	390	30	2	34	15	0	0	0	43	66	36
$5,63 \cdot 10^{-4}$ M	358	69	6	94	60	1	0	1	95	126	37

Os valores (falhas e aberrações) indicam o número total (N) de alterações encontradas nas metáfases analisadas. Alterações: F': Falha cromatídica, F'': Falha cromossômica; Q': Quebra cromatídica; Q'': Quebra cromossômica; Trir: Cromossoma trirradial; Quad: Cromossoma quadrirradial. (-) F: Metáfases alteradas sem considerar as falhas. (+) F: Metáfases alteradas incluindo as falhas. DMSO: Dimetil sulfóxido; MMC: Mitomicina C; MGZ: Megazol. []⁺ : número de células metafásicas em 2000 células examinadas.

O MGZ, nas concentrações testadas neste experimento, causou um efeito clastogênico, aumentando de forma concentração-dependente a frequência de aberrações cromossômicas nos linfócitos expostos (Tabela 2). O efeito clastogênico do MGZ foi evidente tanto quando incluímos, quanto quando excluimos as falhas ('gaps') no cômputo das células metafásicas com alterações (metáfases alteradas / anormais).

Tabela 2: Frequência de aberrações cromossômicas e índice mitótico (IM) em culturas de linfócitos humanos expostas por 20 horas à mitomicina C (MMC $3,83 \cdot 10^{-7}$ M), à diferentes concentrações de megazol (MGZ $1,41 \cdot 10^{-4}$ M, $2,81 \cdot 10^{-4}$ M, $5,63 \cdot 10^{-4}$ M) e ao DMSO apenas (controle-solvente).

Tratamento	Metáfases Analisadas	Metáfases Anormais		Aberrações Cromossômicas		IM (%)
		(-) Falhas	(+) Falhas	(-) Falhas	(+) Falhas	
DMSO						
0,5% v/v	200	$3,5 \pm 0,71$	$8,0 \pm 0,00$	$3,5 \pm 0,71$	$9,0 \pm 1,41$	-
1,0% v/v	200	$4,5 \pm 0,71$	$6,5 \pm 0,71$	$4,5 \pm 0,71$	$6,5 \pm 0,71$	-
(0,5% +1,0%)	400	$4,0 \pm 0,82$	$7,3 \pm 0,96$	$4,0 \pm 0,82$	$7,8 \pm 1,71$	1,30
MMC						
$3,83 \cdot 10^{-7}$ M	368	$34,0 \pm 3,41^a$	$42,0 \pm 2,19^a$	$49,7 \pm 5,76^a$	$67,5 \pm 7,35^a$	1,05
MGZ						
$1,41 \cdot 10^{-4}$ M	400	$6,5 \pm 1,00^a$	$11,0 \pm 1,83^a$	$7,0 \pm 1,15^a$	$12,3 \pm 2,75$	0,90
$2,81 \cdot 10^{-4}$ M	390	$10,8 \pm 2,75^{a,b}$	$16,5 \pm 4,80^a$	$12,3 \pm 4,03^a$	$20,3 \pm 7,68^a$	0,90
$5,63 \cdot 10^{-4}$ M	358	$26,8 \pm 3,02^{a,b,c}$	$35,3 \pm 5,27^{a,b,c}$	$44,2 \pm 2,22^{a,b,c}$	$64,7 \pm 5,16^{a,b,c}$	0,93

Valores: Média \pm DP da percentagem de alterações encontradas em cada cultura tratada. IM (%): Índice mitótico: % de células metafásicas (1000 células examinadas por cultura). DMSO: Dimetil sulfóxido. As comparações entre médias foram feitas pelo teste U de Mann-Whitney e as diferenças ($p \leq 0,05$) encontradas foram assinaladas por sobrescritos como se segue: ^a Diferente do controle negativo ^b Diferente de MGZ $1,41 \cdot 10^{-4}$ M. ^c Diferente de MGZ $2,81 \cdot 10^{-4}$ M.

Como esperado para o controle positivo a exposição à MMC, na concentração de $3,83 \cdot 10^{-7}$ M, produziu claro efeito genotóxico aumentando a frequência de células com aberrações cromossômicas (Tabela 2). Digno de nota é o fato do efeito clastogênico da maior concentração de MGZ ter sido comparável ao da concentração de MMC usada no experimento.

O DMSO e a MMC não alteraram o índice mitótico indicando que nas concentrações empregadas não foram citotóxicos. Pode-se também dizer que o MGZ, nas concentrações utilizadas, não apresentou efeito citotóxico claro neste experimento (Tabela 2) apesar das duas maiores concentrações, terem produzido discreta diminuição

no número de linfócitos em metáfase (Concentração $2,81 \cdot 10^{-4}M$: 390 metáfases analisadas; concentração $5,36 \cdot 10^{-4}M$: 358 metáfases analisadas).

4.1.2 Ação da Vitamina E sobre a Genotoxicidade do Megazol

O experimento cujos resultados são apresentados a seguir foi realizado para verificar se seria possível antagonizar o efeito clastogênico do MGZ com uso da vitamina E (α -tocoferol).

As culturas de linfócitos humanos foram expostas por 20 horas ao solvente apenas (DMSO 0,5% v/v, controle-negativo), à vitamina E (VTE), ao megazol (MGZ) e a associação VTE + MGZ e os resultados obtidos são mostrados tabela 3. Na tabela 8 (anexo), constam em detalhes as alterações encontradas para cada cultura de linfócitos tratada, *i.e.*, para cada doador e cada réplica de um mesmo doador.

Para investigar um eventual efeito inibitório da VTE, escolhemos as duas maiores concentrações de MGZ empregadas no ensaio anterior. Estas concentrações de MGZ ($2,81 \cdot 10^{-4}M$ e $5,63 \cdot 10^{-4}M$) haviam produzido uma boa resposta clastogênica (*i.e.*, aumento no número de metáfases com aberrações cromossômicas) sem exibir, por outro lado, acentuada citotoxicidade. As concentrações de VTE que selecionamos para testar foram elevadas porque não esperávamos qualquer efeito citotóxico ou clastogênico. Os resultados obtidos são apresentados na tabela 3.

Tabela 3: Incidência de aberrações cromossômicas em linfócitos humanos expostos por 20 horas às diferentes concentrações de vitamina E (VTE, α -tocoferol), de megazol (MGZ) e às associações de VTE e MGZ.

Tratamento	Metáfases Analisadas	Aberrações Cromossômicas							Metáfases Alteradas		Metáfases /4000 células
		Falhas		Quebras		Tri	Quad	Anel	(-) F	(+) F	
		F'	F''	Q'	Q''						
DMSO											
0,5%	200	3	4	4	4	0	0	0	8	15	47
VTE											
(1) $2,5 \cdot 10^{-6}$ M	152	6	3	12	8	0	0	0	12	15	[9] ⁺
(2) $5,0 \cdot 10^{-6}$ M	200	9	6	16	22	0	0	0	14	19	[15] ⁺
MGZ											
(1) $2,81 \cdot 10^{-4}$ M	176	30	3	30	23	0	0	0	41	59	18
(2) $5,63 \cdot 10^{-4}$ M	77	9	3	14	5	0	0	0	15	20	8
VTE + MGZ											
(1) + (1)	165	10	6	10	23	0	0	0	26	36	19
(1) + (2)	75	12	1	12	11	0	0	0	17	22	8
(2) + (1)	200	16	5	24	27	0	0	0	35	44	23
(2) + (2)	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1

Os valores (falhas e aberrações) indicam o número total (N) de alterações encontradas nas metáfases analisadas. Alterações: F': Falha cromatídica; F'': Falha cromossômica; Q': Quebra cromatídica; Q'': Quebra cromossômica; Trir: Cromossoma trirradial; Quad: Cromossoma quadrirradial. (-) F: Metáfases alteradas sem incluir falhas. (+) F: Metáfases alteradas incluindo as falhas. DMSO: Dimetil sulfóxido; VTE: α -tocoferol ou Vitamina E; MGZ: Megazol. ND: não determinado. []⁺: células metafásicas em 2000 células examinadas.

Diferentemente do que esperávamos, entretanto, a VTE (α -tocoferol), nas concentrações testadas, foi claramente citotóxica (diminuiu acentuadamente o IM) e elevou – em duas a três vezes – a incidência de aberrações cromossômicas nos linfócitos quando comparado ao observado no controle negativo (Tabelas 3 e 4). O aumento da

frequência de células metafásicas com aberrações cromossômicas causado pela VTE foi concentração dependente embora a redução do IM não tenha sido (Tabelas 3 e 4).

Tabela 4: Frequência de aberrações cromossômicas e índice mitótico em culturas de linfócitos humanos expostos por 20 horas a diferentes concentrações de vitamina E (VTE), megazol (MGZ) e à associações de VTE e MGZ.

Tratamento	Metáfases Analisadas	Metáfases Anormais		Aberrações Cromossômicas		IM (%)
		(-) Falhas	(+) Falhas	(-) Falhas	(+) Falhas	
DMSO						
0,5% v/v	200	4,0 ± 1,63	7,5 ± 1,91	4,0 ± 1,63	7,5 ± 1,91	1,18
VTE						
(1) 2,5·10 ⁻⁶ M	152	13,0 ± 2,02^a	16,9 ± 3,38	13,0 ± 2,02^a	18,8 ± 4,06^a	0,45*
(2) 5,0·10 ⁻⁶ M	200	16,5 ± 0,71^a	22,0 ± 0,00	19,0 ± 1,41^a	26,5 ± 0,71^a	0,75
MGZ						
(1) 2,81·10 ⁻⁴ M	176	23,3 ± 4,99^a	33,2 ± 4,61^a	31,1 ± 8,84^a	49,5 ± 5,22^a	0,45*
(2) 5,63·10 ⁻⁴ M	77	21,0 ± 7,02^a	27,7 ± 8,01^a	27,5 ± 13,46^a	45,5 ± 24,72^a	0,20*
VTE + MGZ						
(1) + (1)	165	15,2 ± 7,77^{a,b}	21,0 ± 6,36^{a,b}	19,2 ± 10,35^{a,b}	28,0 ± 13,54^{a,b}	0,48*
(1) + (2)	75	17,0 ± 3,83^a	21,5 ± 1,91^a	25,5 ± 6,19^a	36,0 ± 4,90^a	0,20*
(2) + (1)	200	17,0 ± 1,91^{a,b}	21,5 ± 0,96^{a,b}	25,5 ± 3,10^{a,b}	36,0 ± 2,45^{a,b}	0,58*
(2) + (2)	0	ND	ND	ND	ND	0,01*

Valores: Média ± DP da percentagem de alterações encontradas em cada cultura tratada. IM (%): Índice mitótico: % de células metafásicas (1000 células examinadas por cultura). DMSO: Dimetil sulfóxido; VTE: α -tocoferol ou Vitamina E; MGZ: Megazol. As comparações entre médias foram assinaladas por sobrescritos como se segue: ^a Diferente do controle negativo ($p \leq 0,05$, Mann-Whitney U-test). ^{a'} Diferente do controle negativo ($p \leq 0,05$, Qui-quadrado). ^b Diferente de MGZ 2,81·10⁻⁴ M ($p \leq 0,05$, Mann-Whitney U-test). ^{b'} Diferente de MGZ 2,81·10⁻⁴ M ($p \leq 0,05$, Qui-quadrado). * $\rightarrow p \leq 0,05$ (Qui-quadrado). ND: Não determinado.

Este inesperado efeito clastogênico e citotóxico das concentrações selecionadas de VTE, evidentemente, comprometeu a avaliação de um eventual efeito antagônico do α -tocoferol sobre a genotoxicidade do MGZ. Nas condições do ensaio, portanto, analisamos a interação entre a VTE e o MGZ.

O efeito clastogênico (frequência de células metafásicas com aberrações) da associação de VTE $2,5 \cdot 10^{-6} \text{M}$ e MGZ $2,81 \cdot 10^{-4} \text{M}$ foi discretamente menor do que o da mesma concentração de MGZ na ausência de VTE, e próximo ao que foi registrado para a mesma concentração de VTE na ausência de MGZ (Tabela 4). Uma pequena diminuição do efeito clastogênico da menor concentração de MGZ ($2,81 \cdot 10^{-4} \text{M}$) foi observada também com a administração conjunta da concentração mais elevada de VTE ($5,0 \cdot 10^{-6} \text{M}$) (Tabela 4). A mesma tendência foi notada com a associação da menor concentração de VTE ($2,5 \cdot 10^{-6} \text{M}$) com a maior concentração de MGZ ($5,63 \cdot 10^{-4} \text{M}$), embora neste caso a diferença não tenha sido detectada estatisticamente (Tabela 4). O efeito clastogênico da associação da maior concentração de VTE ($5,0 \cdot 10^{-6} \text{M}$) com a menor concentração de MGZ ($2,81 \cdot 10^{-4} \text{M}$) foi menor do que o da mesma concentração de MGZ na ausência de VTE. Nas culturas expostas concomitantemente à maior concentração de VTE ($5,0 \cdot 10^{-6} \text{M}$) e à concentração mais elevada de MGZ ($5,63 \cdot 10^{-4} \text{M}$), em virtude do acentuado efeito citotóxico, com drástica redução do índice mitótico, não restaram células metafásicas para que fosse possível examinar as alterações cromossômicas (Tabelas 3 e 4).

Como pode ser visto nas Tabelas 3 e 4, diferentemente do que havia ocorrido no experimento anterior (Tabelas 1 e 2), as duas concentrações de MGZ ($2,81 \cdot 10^{-4} \text{M}$ e $5,63 \cdot 10^{-4} \text{M}$) causaram neste experimento uma drástica diminuição do índice mitótico. Nas associações de VTE e MGZ testadas, a menor concentração de VTE ($2,5 \cdot 10^{-6} \text{M}$) não alterou a citotoxicidade (IM) das duas concentrações de MGZ ($2,81 \cdot 10^{-4} \text{M}$ e $5,63 \cdot 10^{-4} \text{M}$) (tabela 4). A associação da maior concentração de VTE ($5,0 \cdot 10^{-6} \text{M}$) com a menor concentração de MGZ ($2,81 \cdot 10^{-4} \text{M}$) também parece não ter afetado a citotoxicidade deste último composto. A associação das concentrações mais elevadas de VTE ($5,0 \cdot 10^{-6} \text{M}$) e MGZ ($5,63 \cdot 10^{-4} \text{M}$), todavia, exacerbou – como vimos – a citotoxicidade do MGZ.

Em resumo, os resultados deste experimento sugerem que – nas concentrações testadas – não houve sinergismo ou aditividade dos efeitos clastogênicos do MGZ e VTE, havendo, ao contrário, indícios de que a VTE reduziu o efeito genotóxico do MGZ. Exceto pela exacerbação da redução do IM na associação das duas maiores concentrações, não houve aparentemente interações ao nível da citotoxicidade.

4.2 Ação do Megazol sobre a Frequência de Micronúcleos em Células da Medula Óssea de Camundongos (teste *in vivo*)

A genotoxicidade de diferentes doses de MGZ, administradas por via oral, foi avaliada pela determinação da frequência de eritrócitos policromáticos (Foto 2) contendo micronúcleos coletadas na medula óssea de camundongos machos e fêmeas.

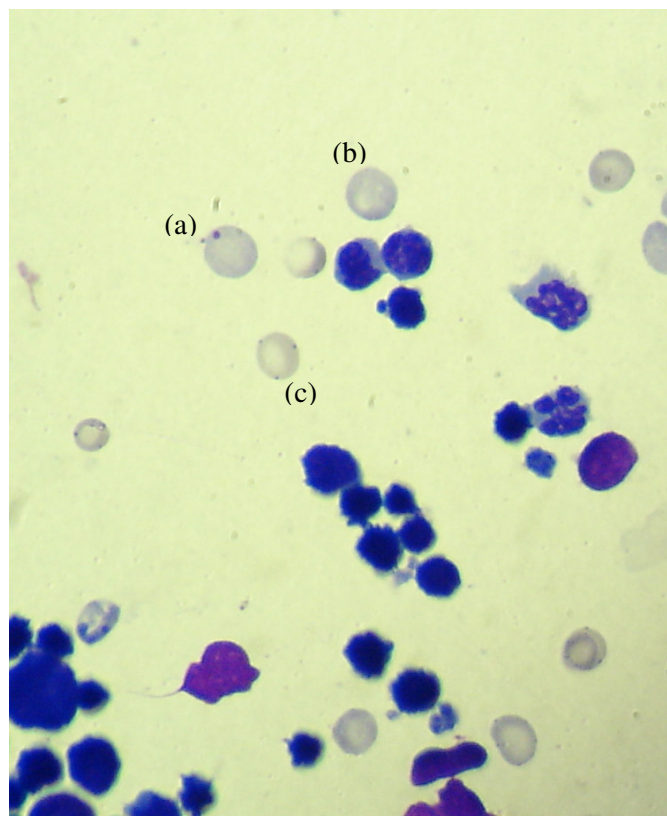


Foto 2: Células da medula óssea de camundongo coradas com Giemsa. (a) Eritrócito policromático com micronúcleo (EPCMN); (b) Eritrócito policromático (EPC) e (c) Eritrócito normocromático (ENC).

Para avaliar o potencial genotóxico (clastogênico) do MGZ, a medula óssea de camundongos foi coletada em três intervalos de tempo (24, 36 e 48 horas) após o tratamento com a substância, segundo as recomendações contidas nas diretrizes da OECD 474. Camundongos foram tratados apenas com o veículo do MGZ, a carboximetilcelulose (CMC, controle negativo), administrado por via oral, e com o agente alquilante ciclofosfamida (CPA), administrado - por via intraperitoneal - como controle positivo.

Por ocasião do sacrifício dos animais para remoção da medula óssea, foi observado que a urina dos camundongos que receberam MGZ apresentava coloração

amarelo-escuro, bem diferente da cor da urina dos controles negativo e positivo. Esta alteração da cor da urina foi observada a partir da dose 250mg/kg, quando os animais foram mortos 24 horas após o tratamento. A partir da dose de 500mg/kg, a alteração de cor foi notada também nos animais mortos 36 e 48 horas após o tratamento.

Vinte e quatro horas após o tratamento com MGZ por via oral, um discreto aumento da frequência de células (eritrócitos policromáticos) com micronúcleos, em relação à frequência registrada nos controles negativos, já pode ser notado a partir da menor dose testada (125mg/kg) tanto em camundongos machos quanto em fêmeas, embora a elevação da incidência de MN na menor dose testada só tenha sido estatisticamente significativa entre as fêmeas (Tabela 5). Trinta e seis e quarenta e oito horas após o tratamento foram notadas também discretas elevações da frequência de eritrócitos policromáticos com micronúcleos nos camundongos machos e fêmeas que receberam – por via oral – as diferentes doses de MGZ (Tabela 5). Examinando a Tabela 5, pode-se notar que apenas em alguns casos a análise estatística detectou a maior frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados nos camundongos tratados com MGZ em relação aos respectivos controles negativos. Como os controles negativos sacrificados 24 horas após o tratamento exibiram frequência de células com MN ligeiramente inferior à registrada nos controles (negativos) mortos 36 e 48 horas após o tratamento, a análise estatística detectou mais diferenças entre tratados e controles neste primeiro grupo (24 horas). O exame do conjunto dos resultados mostrados na Tabela 5, entretanto, sugere que – nas condições deste experimento – o intervalo entre o tratamento e a morte do animal não alterou a intensidade do efeito clastogênico (frequência de MN) do MGZ. Digno de nota também é o fato do fraco efeito clastogênico do MGZ após administração oral não ter sido claramente dose-dependente em nenhum dos intervalos (24, 36 e 48 horas) pós-tratamento (Tabela 5).

Tabela 5: Efeitos genotóxico (EPCMN, eritrócitos policromáticos com micronúcleos / 2000 EPC, eritrócitos policromáticos / animal) e mielotóxico (EPC / 200 eritrócitos / animal) do megazol (0, 125, 250, 500, 1000 e 2000 mg/kg) administrado por entubação gástrica e da ciclofosfamida (25 mg/kg ip) em camundongos *Swiss Webster*.

Tratamento	Sexo (N)	Tempo pós-tratamento					
		24 horas		36 horas		48 horas	
		EPCMN / 2000 EPC	EPC / 200 Eritrócitos	EPCMN / 2000 EPC	EPC / 200 Eritrócitos	EPCMN / 2000 EPC	EPC / 200 Eritrócitos
Controle veículo ou negativo CMC 10mL/kg, po	M (5)	2,2 ± 0,84	0,49 ± 0,04	3,4 ± 1,82	0,50 ± 0,07	2,8 ± 1,64	0,51 ± 0,04
	F (5)	1,6 ± 0,89	0,49 ± 0,04	3,2 ± 1,10	0,49 ± 0,05	3,4 ± 1,14	0,48 ± 0,05
	M + F (10)	1,9 ± 0,88	0,49 ± 0,04	3,3 ± 1,42	0,49 ± 0,06	3,1 ± 1,37	0,49 ± 0,04
Controle positivo CPA 25mg/kg, ip	M (5)	23,6 ± 3,97^a	0,40 ± 0,05*	18,6 ± 2,51^a	0,37 ± 0,05*	12,8 ± 4,15^a	0,37 ± 0,07*
	F (5)	14,0 ± 2,92^a	0,39 ± 0,06*	10,6 ± 1,14^a	0,38 ± 0,03*	6,6 ± 1,67^a	0,39 ± 0,05*
	M + F (10)	18,8 ± 6,03^a	0,39 ± 0,05*	14,6 ± 4,60^a	0,37 ± 0,04*	9,7 ± 4,42^a	0,38 ± 0,06*
MGZ 125mg/kg, po	M (5)	4,0 ± 2,12	0,48 ± 0,05	4,8 ± 2,49	0,49 ± 0,06	4,6 ± 0,89	0,44 ± 0,04*
	F (5)	3,4 ± 1,14^a	0,48 ± 0,05	2,6 ± 0,89	0,52 ± 0,05	3,2 ± 0,45	0,49 ± 0,06
	M + F (10)	3,7 ± 1,64^a	0,48 ± 0,04	3,7 ± 2,11	0,51 ± 0,05	3,9 ± 0,99	0,46 ± 0,05
MGZ 250mg/kg, po	M (5)	4,8 ± 1,30^a	0,46 ± 0,04	6,0 ± 1,58^a	0,49 ± 0,07	7,2 ± 3,42	0,45 ± 0,04*
	F (5)	4,4 ± 1,14^a	0,49 ± 0,06	3,0 ± 1,00	0,51 ± 0,01	5,0 ± 3,77	0,49 ± 0,05
	M + F (10)	4,6 ± 1,17^a	0,48 ± 0,05	4,5 ± 2,01	0,50 ± 0,05	6,0 ± 3,20^a	0,47 ± 0,05

Tratamento	Sexo (N)	Tempo pós-tratamento (Continuação)					
		24 horas		36 horas		48 horas	
		EPCMN / 2000 EPC	EPC / 200 Eritrócitos	EPCMN / 2000 EPC	EPC / 200 Eritrócitos	EPCMN / 2000 EPC	EPC / 200 Eritrócitos
MGZ 500mg/kg, po	M (5)	7,8 ± 3,11^a	0,47 ± 0,07	3,8 ± 2,39	0,47 ± 0,08	5,6 ± 2,88	0,51 ± 0,11
	F (5)	3,8 ± 1,79	0,49 ± 0,04	2,8 ± 1,92	0,48 ± 0,05	5,6 ± 2,07^b	0,49 ± 0,05
	M + F (10)	5,8 ± 3,19^a	0,48 ± 0,06	3,3 ± 2,11	0,48 ± 0,06	5,6 ± 3,37^{a,b}	0,50 ± 0,08
MGZ 1000mg/kg, po	M (5)	5,0 ± 2,00^a	0,51 ± 0,14	7,2 ± 4,02	0,49 ± 0,06	7,4 ± 2,61^a	0,43 ± 0,04*
	F (5)	2,8 ± 1,30	0,45 ± 0,03*	3,4 ± 1,95	0,47 ± 0,05	5,2 ± 2,39	0,42 ± 0,02*
	M + F (10)	3,9 ± 1,97^a	0,48 ± 0,10	5,3 ± 3,59	0,48 ± 0,05	6,3 ± 2,63^{a,b}	0,43 ± 0,03*
MGZ 2000mg/kg, po	M (5)	5,8 ± 2,17^a	0,47 ± 0,07	4,8 ± 3,11	0,46 ± 0,05	5,2 ± 2,17	0,46 ± 0,06*
	F (5)	3,8 ± 1,92	0,45 ± 0,04	3,6 ± 0,55	0,47 ± 0,03	8,2 ± 3,90^{a,b}	0,42 ± 0,05*
	M + F (10)	4,8 ± 2,20^a	0,46 ± 0,05	4,2 ± 2,20	0,46 ± 0,04	6,7 ± 3,37^{a,b}	0,44 ± 0,06*

Valores: Média ± DP. EPCMN: Eritrócito policromático com micronúcleo; EPC: Eritrócito policromático. CMC: Carboximetilcelulose; CPA: Ciclofosfamida; MGZ: Megazol. ip: Via intraperitoneal. po: Via oral por entubação gástrica. N: Número de animais. M: Macho; F: Fêmea; M + F: Macho e fêmea. ^a Diferente do controle negativo ($P \leq 0,05$, Mann-Whitney U-test). ^b Diferente da dose de 125mg/kg MGZ ($P \leq 0,05$, Mann-Whitney U-test). * $\rightarrow P \leq 0,05$ (Qui-quadrado).

Embora em muitos casos os machos tenham, aparentemente, exibido proporção de células micronucleadas superior à apresentada pelas fêmeas, não é possível afirmar que haja uma clara diferença entre sexos quanto à sensibilidade ao MGZ.

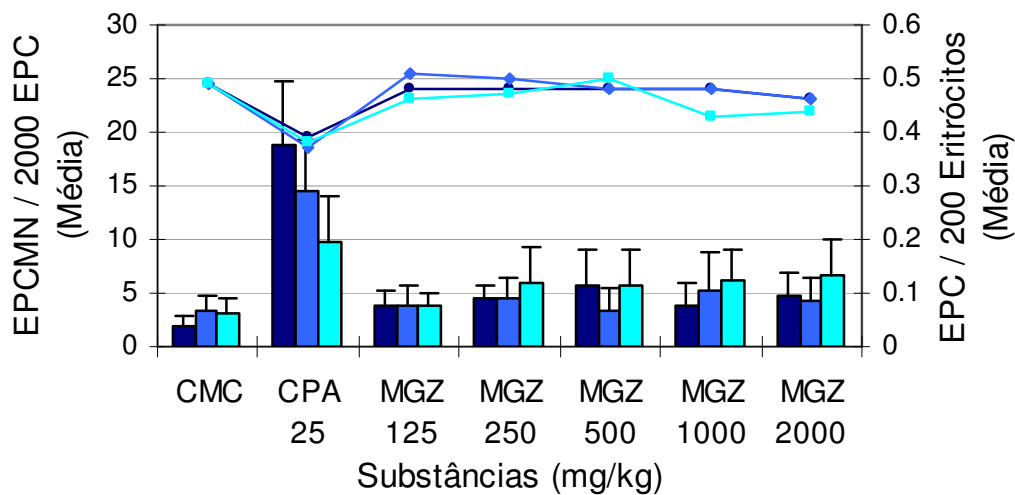
Exceto por uma pequena redução da razão de eritrócitos policromáticos (*i.e.*, número de EPC por 200 eritrócitos examinados) 48 horas após o tratamento por via oral com as duas maiores doses (MGZ 1000 e 2000 mg/kg), não foram encontrados indícios de mielotoxicidade do MGZ (Tabela 5). Uma leve mielotoxicidade foi detectada também 24 horas após o tratamento com MGZ, mas somente em fêmeas que receberam a dose de 1000mg/kg po.

O efeito mielotóxico da CPA (25mg/kg, ip), todavia, foi claramente evidenciado (como diminuição no número de eritrócitos policromáticos em relação ao número total de eritrócitos, *i.e.*, eritrócitos policromáticos + eritrócitos normocromáticos) em camundongos machos e fêmeas nos três intervalos (24, 36 e 48 horas) após o tratamento (Tabela 5). Embora a dose de CPA (25 mg/kg ip), escolhida para ser empregada como controle positivo, tenha sido relativamente baixa, o efeito genotóxico (clastogênico) deste agente alquilante foi evidente nos três intervalos pós-tratamento (24, 36 e 48 horas). O aumento expressivo da frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados foi registrado nos três intervalos pós-tratamento, mas tendeu a ser ligeiramente mais acentuado nas primeiras 24 horas do que nos intervalos maiores (36 e 48 horas). Esses resultados demonstram não só que o ensaio foi sensível, mas que o efeito genotóxico do MGZ, administrado por via oral, foi muito fraco em comparação com o da CPA ip.

Os dados, em termos de número total de eritrócitos policromáticos micronucleados encontrado para cada camundongo tratado com MGZ ou CPA, encontram-se nas tabelas 9, 10 e 11 (anexo).

Os gráficos 1 e 2 mostram o efeito genotóxico e citotóxico do MGZ para as células da medula óssea de camundongos, machos e fêmeas, avaliado 24, 36 e 48 horas após o tratamento.

Gráfico 1: Efeito genotóxico / clastogênico do megazol administrado a camundongos machos e fêmeas por via oral. O efeito clastogênico foi avaliado pela frequência de eritrócitos policromáticos com micronúcleos presentes na medula óssea de camundongos, determinadas 24, 36 e 48 horas após o tratamento.



Mutagenicidade



24 horas



36 horas



48 horas

Citotoxicidade



24 horas



36 horas



48 horas

EPCMN: Eritrócito policromático micronucleado.

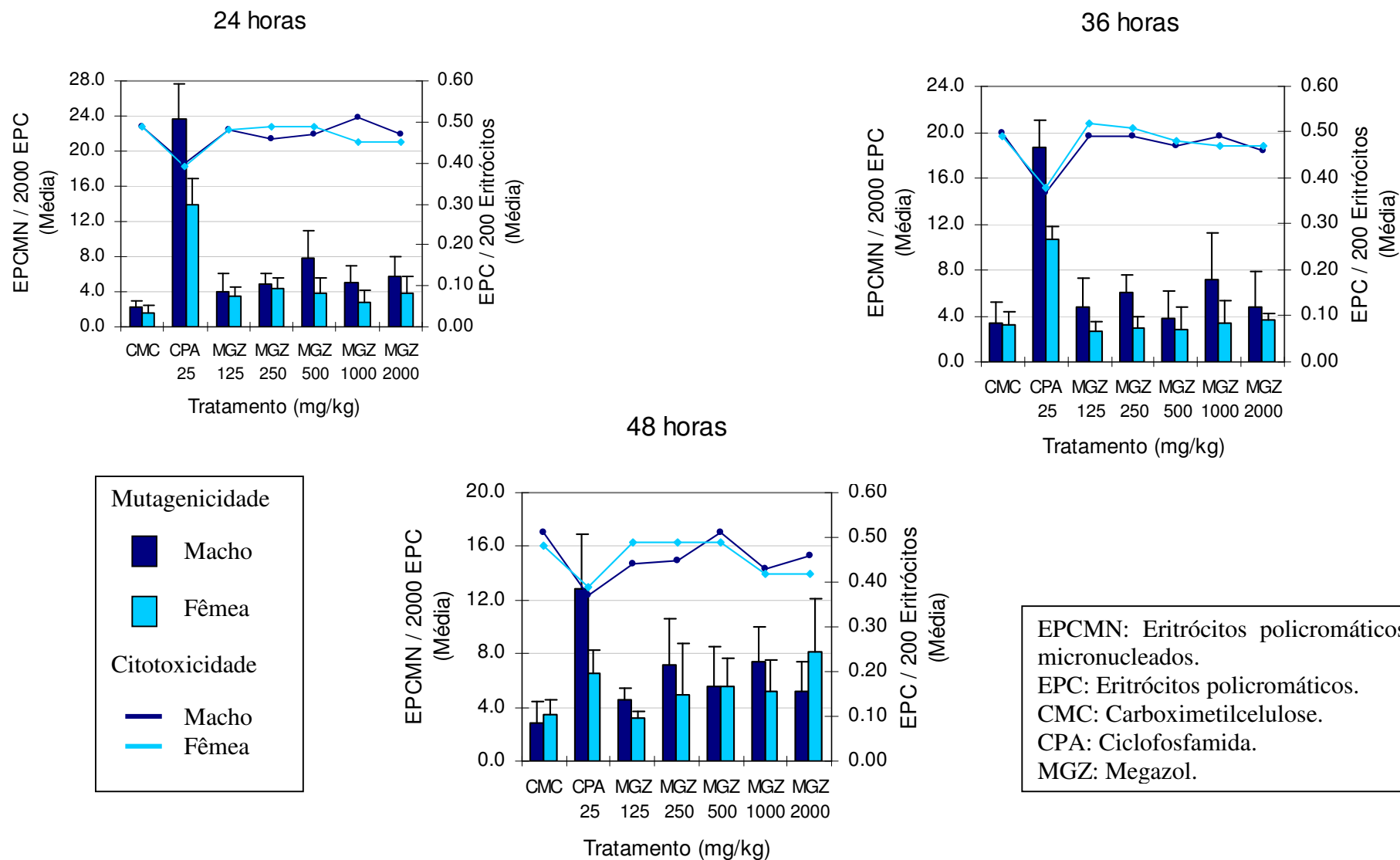
EPC: Eritrócito policromático.

CMC: Carboximetilcelulose.

CPA: Ciclofosfamida.

MGZ: Megazol

Gráfico 2: Efeito clastogênico do megazol administrado por via oral a camundongos machos e fêmeas.



5 DISCUSSÃO

As duas tripanosomíases humanas, a americana (doença de Chagas) e a africana (doença do sono), têm sido consideradas como duas das doenças mais negligenciadas. Ambas têm acentuada morbidade e mortalidade e atingem um grande número de indivíduos nos dois continentes. Embora não haja tratamento satisfatório para essas doenças parasitárias, a indústria farmacêutica não tem procurado desenvolver novos medicamentos para tratá-las. Neste contexto, e particularmente para as fases avançadas da doença do sono, o MGZ poderia ser uma alternativa promissora aos fármacos existentes. Em modelos experimentais da doença do sono, com ou sem comprometimento cerebral, o MGZ mostrou-se eficaz mesmo quando administrado por curto período de tempo. Poucos foram os fármacos tripanosomicidas já testados que exibiram atividade tão promissora para tratar esta grave condição que, se não for adequadamente tratada, inexoravelmente leva à morte do paciente. Em virtude das evidências de genotoxicidade, o interesse da OMS no desenvolvimento do MGZ como medicamento para a doença do sono sofreu duro golpe. A verificação do efeito clastogênico / mutagênico de um composto químico via de regra é um sério obstáculo à continuidade do desenvolvimento do medicamento devido aos riscos associados à carcinogênese e ao processo reprodutivo. A decisão de continuar ou não o desenvolvimento do fármaco depende entretanto da ponderação risco / benefício que leva em conta a severidade da condição a ser tratada e a existência de alternativas. Assim sendo, há casos em que a constatação de mutagenicidade não impede o desenvolvimento posterior do medicamento como ocorre, por exemplo, com os antineoplásicos existentes no mercado que, em grande parte, são substâncias antimitóticas com reconhecida ação genotóxica. Nesses casos não há outras formas eficazes de tratamento e a severidade a curto prazo da doença justifica os riscos a longo prazo associados.

O MGZ é um derivado nitroheterocíclico e, compostos deste tipo têm sido usados para uma ampla gama de finalidades de conservantes de alimentos a antibióticos³¹. Os derivados 5-nitroimidazólicos são compostos nitroheterocíclicos usados há muito tempo para tratar infecções causadas por bactérias, fungos e protozoários^{45, 46}. Entre estes compostos, o MTZ destaca-se por ser um dos medicamentos de escolha para tratar infecções por *Helicobacter pylori*, amebíases, giardíases e tricomoníases, e por outros agentes⁴⁷. Apesar do MTZ ser muito

empregado como agente antibacteriano, antifúngico e antiprotozoário, a Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC) classificou o MTZ como sendo pertencente ao grupo 2B, *i.e.*, um comprovado carcinógeno animal e possível carcinógeno humano ⁴⁸. O MTZ é oxidado no fígado por enzimas do citocromo P450 (CYP450) dando origem ao *1-(hidroxietil)-2-hidroxi metil-5-nitroimidazol hidróxido* e ao *2-metil-5-nitroimidazol-1-aético ácido*, sendo estes metabólitos, e o próprio MTZ, moléculas com atividade biológica ^{47, 49, 50}. Embora não haja consenso a este respeito, acredita-se que o MTZ, assim como os derivados nitroimidazólicos de uma maneira geral, tenham atividade antimicrobiana porque ocorre a redução do nitro grupamento, formando metabólitos reativos tóxicos para os microorganismos. Esta redução parece também ser a via pela qual estes compostos exercem o efeito mutagênico ^{47, 50}.

A severidade da doença do sono na sua fase de comprometimento cerebral e a inexistência de alternativas eficazes de tratamento poderiam, eventualmente, justificar o uso do MGZ para este fim. Os controles positivos empregados neste estudo, a CPA e a MMC, por exemplo, são medicamentos antineoplásicos usados correntemente na prática médica. Comparando o uso clínico da CPA e MMC no tratamento do câncer, com o eventual uso do MGZ na tripanosomíase africana, o MGZ teria a vantagem de ser eficaz em tratamento de curta duração enquanto os antineoplásicos via de regra são usados repetidamente em vários ciclos de quimioterapia. Situado neste contexto, o objetivo deste trabalho foi reavaliar o potencial genotóxico do MGZ, e iniciar uma série de estudos para verificar se é possível bloqueá-lo com substâncias antimutagênicas, sem comprometer a eficácia tripanossomicida.

Nossa avaliação do potencial genotóxico do MGZ com ensaios *in vitro*, *i.e.*, teste de indução de aberrações cromossômicas em linfócitos humanos em cultura, mostrou que este fármaco foi clastogênico em todas as concentrações testadas. Nas concentrações mais elevadas ($2,81 \cdot 10^{-4} \text{M}$ e $5,63 \cdot 10^{-4} \text{M}$) o MGZ foi também citotóxico. O potente efeito genotóxico do MGZ que observamos neste trabalho confirma portanto o que tem sido descrito em outros estudos com testes *in vitro* e *in vivo* de genotoxicidade. Na tabela 6 estão relacionados os estudos de mutagenicidade do MGZ publicados na literatura (bases de dados MEDLINE / TOXLINE).

Tabela 6: Resultados do megazol em diferentes ensaios *in vitro* e *in vivo* preditivos de genotoxicidade / clastogenicidade.

Ensaio	MGZ (doses / concentrações)	Resultado	Referência
1. Teste de Ames – <i>Salmonella typhimurium</i> (cepas TA98, TA100 e TA102) com e sem ativação metabólica	<u>TA98:</u> 0,1 – 8,0 µg/placa <u>TA100:</u> Não divulgado <u>TA102:</u> 0,1 – 40,0 µg/placa	<u>TA98:</u> Mutagênico de 0,1 – 2,0 µg/placa e citotóxico a partir de 2,0 µg/placa <u>TA100:</u> Não mutagênico <u>TA102:</u> Mutagênico de 0,1 – 20,0 µg/placa e citotóxico a partir de 20,0 µg/placa - Não houve variações nos resultados obtidos com ou sem ativação metabólica	Ferreira & Ferreira, 1986
2. Ensaio da levedura – <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (cepa D7) com e sem ativação metabólica	1,0 µg/mL 2,0 µg/mL 5,0 µg/mL 7,5 µg/mL 10,0 µg/mL	- Citotóxico na ausência de ativação metabólica - Não houve efeito genotóxico entre as concentrações 1 – 10 µg/mL	Poli <i>et al.</i> , 2002
3. Ensaio do cometa – leucócitos de ratos e camundongos	1,0 µg/mL 2,0 µg/mL 4,0 µg/mL 8,0 µg/mL	<u>Ratos:</u> Clastogênico de 1,0 – 8,0 µg/mL <u>Camundongos:</u> Clastogênico de 4,0 – 8,0 µg/mL	Poli <i>et al.</i> , 2002
4. Ensaio do micronúcleo em microescala – células do linfoma de camundongos (células L5178Y) com e sem ativação metabólica	0,313mM 0,652mM 1,25mM	<u>(+) mistura S9:</u> Clastogênico e citotóxico em 1,25mM de MGZ <u>(-) mistura S9:</u> Clastogênico de 0,313 – 1,25mM de MGZ	Nesslany <i>et al.</i> , 2004

Ensaio (Continuação)	MGZ (doses / concentrações)	Resultado	Referência
5. Teste de aberrações cromossômicas – linfócitos humanos com e sem ativação metabólica	(+) mistura S9: 0,156mM 0,312mM 0,625mM (-) mistura S9: 0,204mM 0,357mM 0,625mM	(+) mistura S9: Clastogênico e citotóxico de 0,156 – 0,625mM de MGZ (-) mistura S9: Clastogênico de 0,204 – 0,625mM e citotóxico em 0,625mM de MGZ	Nessler <i>et al.</i> , 2004
6. Ensaio do micronúcleo – células da medula óssea de ratos	500mg/kg 1000mg/kg 2000mg/kg	- Clastogênico e citotóxico de 500 – 1000mg/kg de MGZ - Tratamento repetido com intervalo de 24 horas por via oral	Nessler <i>et al.</i> , 2004
7. Teste de aberrações cromossômicas – linfócitos humanos sem ativação metabólica	0,141mM 0,281mM 0,563mM	(-) mistura S9: Clastogênico de 0,141 – 0,563mM e citotóxico de 0,281 – 0,563mM de MGZ	Nosso Estudo
8. Ensaio do micronúcleo – células da medula óssea de camundongos	125mg/kg 250mg/kg 500mg/kg 1000mg/kg 2000mg/kg	<u>24 horas:</u> Clastogênico de 125 – 2000mg/kg <u>36 horas:</u> Clastogênico em 250mg/kg <u>48 horas:</u> Clastogênico de 250 - 2000mg/kg e citotóxico de 1000 – 2000mg/kg - Tratamento em dose única por via oral	Nosso Estudo

MGZ: Megazol. (+) mistura S9: Adição de sistema extrínseco de ativação metabólica. (-) mistura S9: Ausência de ativação metabólica extrínseca.

Neste estudo, a maior concentração de MGZ ($5,63 \cdot 10^{-4} \text{M}$) apresentou efeito clastogênico semelhante ao da MMC ($3,83 \cdot 10^{-7} \text{M}$). A MMC é um antibiótico produzido pelo *Streptomyces caespitosus* que é capaz de inibir a síntese de DNA, RNA e proteínas⁵¹. Em virtude de suas propriedades antimitóticas, a MMC, é usada na terapia oncológica para bloquear a proliferação de células neoplásicas.

Os resultados do ensaio *in vitro* em células eucarióticas apresentados neste trabalho confirmam portanto o efeito genotóxico / clastogênico do MGZ (ver estudos anteriores na Tabela 6) que, como não requer a adição de sistema extrínseco de ativação metabólica para manifestar-se, possivelmente se deve à molécula original e não a um de seus metabólitos.

A partir desta constatação, realizamos um experimento preliminar para investigar se seria possível atenuar o efeito clastogênico do MGZ *in vitro* com o uso da VTE cujas propriedades antioxidantes em diferentes sistemas biológicos são bem conhecidas. As concentrações de VTE empregadas, entretanto, revelaram-se citotóxicas inibindo acentuadamente a taxa de divisão celular (índice mitótico) dos linfócitos humanos em cultura. Nestas condições de acentuada citotoxicidade notamos também um pequeno aumento da frequência de aberrações cromossômicas nas culturas de células tratadas com VTE.

Apesar da superposição dos efeitos citotóxicos das concentrações de VTE e do MGZ utilizadas neste experimento inicial, os resultados sugeriram que na presença da VTE ($2,5 \cdot 10^{-6} \text{M}$ e $5,0 \cdot 10^{-6} \text{M}$) o efeito clastogênico induzido pelo MGZ $2,81 \cdot 10^{-4} \text{M}$ foi discretamente atenuado. É possível portanto que, em ensaios *in vitro*, a VTE tenha um efeito protetor em relação a genotoxicidade produzida pelo MGZ mas experimentos adicionais devem ser realizados com menores concentrações de VTE para comprovar esta hipótese.

Diversos estudos publicados na literatura têm evidenciado um efeito protetor da vitamina E em relação ao dano genotóxico, o que tem sido geralmente atribuído às ações antioxidantes do α -tocoferol. Neste sentido tem sido relatado por diferentes autores que a VTE é capaz de:

- Diminuir o efeito clastogênico do benznidazol em camundongos ovariectomizados e não ovariectomizados. Este estudo foi realizado determinando a frequência de aberrações cromossômicas em macrófagos⁵²;
- Reduzir o efeito clastogênico da bleomicina em linfócitos periféricos de camundongos, o que foi evidenciado pela diminuição da frequência de células com micronúcleos⁵³;

- Proteger linfócitos humanos em cultura do efeito clastogênico da ciclofosfamida e do Trp-P-2 (*3-amino-1-metil-5H-pirido[4,3-b]indole*), determinando a frequência de troca de cromátides irmãs em linfócitos metafásicos⁵⁴ e;
- Atenuar o efeito mutagênico causado pelo benzil isotiocianato (BITC) na bactéria *Escherichia coli*⁵⁵.

É possível também, por outro lado, que o efeito citotóxico (e levemente genotóxico) das concentrações de VTE empregadas nesse estudo ($2,5 \cdot 10^{-6} \text{M}$ ou $5,0 \cdot 10^{-6} \text{M}$) se devam a alterações do estado redox. Recentemente foi relatado que o α -tocoferol apresenta efeito dicotômico, ou seja, atividade antioxidante e pró-oxidante⁵⁶⁻⁵⁸. A atividade pró-oxidativa estaria relacionada ao processo de peroxidação lipídica das lipoproteínas e lipídeos presentes no plasma desencadeado pela vitamina E. Nestes casos, o baixo fluxo de radicais presentes no meio aquoso, ou presença de radicais muito reativos, fariam o α -tocoferol ser consumido lentamente e conseqüentemente, ser oxidado a radical α -tocoferoxil ($\alpha\text{-TO}^{\bullet}$) no processo chamado 'fase de transferência'. O $\alpha\text{-TO}^{\bullet}$ teria a capacidade de iniciar o processo de peroxidação lipídica das partículas lipoprotéicas, produzindo radicais livres no processo chamado 'transferência da cadeia'. Esta atividade pró-oxidativa da VTE poderia ser inibida ou minimizada através de co-antioxidantes que teriam a capacidade de reduzir o $\alpha\text{-TO}^{\bullet}$ a um produto desprovido de radical, impedindo desta forma a peroxidação de lipoproteínas e lipídios presentes no plasma⁵⁶⁻⁵⁸.

Outra explicação para a atividade pró-oxidativa da vitamina E foi proposta por Haafte e colaboradores⁵⁹. Segundo esses autores, quando o α -tocoferol está atuando como um antioxidante durante o processo de proteção da peroxidação lipídica, a VTE é oxidada a um radical α -tocoferol que por sua vez é regenerado a tocoferol através da vitamina C ou pela glutatona reduzida (GSH). Nem todos os radicais de α -tocoferol seriam regenerados a tocoferol, podendo neste caso dar origem ao α -tocoferol quinona, que não possui qualquer atividade antioxidante. O α -tocoferol quinona competiria com o tocoferol pelo sítio redutor de radicais livres do microsomo, catalisando as reações de peroxidação lipídica e danificando a membrana lipídica em células do fígado de ratos. Isso, todavia, só ocorreria nos casos em que a concentração de VTE é muito baixa (diferente da situação que vimos no ensaio realizado no presente trabalho).

Além destas ações antioxidante e pró-oxidante, tem-se sugerido que o α -tocoferol regula, ao nível celular, a proteína quinase C (PKC) em monócitos, macrófagos, neutrófilos, fibroblastos, célula vascular muscular lisa e célula epitelial

mamária^{58, 60, 61}. A PKC pertence a uma família de isoenzimas que tem papel importante na transdução celular de sinais, sendo responsável, ao menos em parte, pela regulação do crescimento, diferenciação e secreção celular⁶⁰. Tem-se sugerido que o processo de inibição da PKC pela VTE não ocorre por meio da interação direta destes compostos, nem pela inibição de sua expressão enzimática, mas sim pela inibição da fosforilação da PKC, o que impediria a sua ativação, além de induzir a defosforilação das proteínas previamente ativadas – a proteína PP2A é ativada, *in vitro*, pelo α -tocoferol, induzindo a defosforilação das PKCs ativadas, diminuindo sua atividade⁵⁸.

De qualquer forma, é possível que o efeito pró-oxidativo da VTE e sua aparente ação reguladora sobre a PKC em algumas situações, explique a citotoxicidade das concentrações empregadas no ensaio realizado neste estudo, visto que não houve adição de co-antioxidantes para reduzir os radicais α -tocoferoxil a produtos não radicalares⁵⁶⁻⁵⁸.

O efeito clastogênico do MGZ observado *in vitro* foi de certo modo confirmado pelo estudo *in vivo* em que este fármaco foi administrado, por via oral, a camundongos (machos e fêmeas) e determinamos a frequência de células com micronúcleos na medula óssea, retirada a diferentes intervalos de tempo após o tratamento.

Em contraste com o potente – e claramente concentração-dependente – efeito genotóxico notado *in vitro*, o efeito clastogênico do MGZ *in vivo*, após tratamento com dose única por via oral, foi discreto e não exibiu uma relação de dose-dependência em nenhum dos intervalos de tempo pós-tratamento. Possivelmente o efeito genotóxico *in vivo* foi tênue por que o MGZ seria mal absorvido por via oral, ou não alcançaria concentrações mais elevadas no tecido alvo (medula óssea).

Estudos da farmacocinética do MGZ em camundongos e macacos sugerem que ele é em certa medida absorvido por via oral, mas não há dados sobre distribuição por diferentes tecidos nem a respeito dos níveis que seriam alcançados na medula óssea^{62, 63}.

Enanga e colaboradores⁶² determinaram, em camundongos tratados com dose única de MGZ (80mg/kg), a concentração plasmática máxima (C_{max}) e a área sob a curva da concentração plasmática *versus* tempo (Area Under the Curve, AUC, ou ASC) após tratamento por via oral e via intraperitoneal.

Nesse estudo Enanga e colaboradores⁶² verificaram que, após a administração oral, a concentração máxima (C_{max}) é menor e o tempo (T_{max}) para alcançá-la é maior, indicando que o MGZ é absorvido lentamente quando o tratamento é por via oral.

Primatas tratados com dose única de MGZ (100mg/kg) por via oral também apresentaram uma certa absorção da droga. Isto foi constatado pela presença de concentração tripanossomicida do MGZ nos fluidos cérebro-espinhal (1,3 µg/mL de MGZ – determinado 8 horas após a infecção) e no plasma (0,5 µg/mL de MGZ – determinado 24 horas após a infecção) ⁶³.

Os dados apresentados nesse trabalho indicam que o MGZ é em certa medida absorvido por via oral mas, como vimos, sugerem que esta absorção é lenta e que possivelmente os níveis atingidos na medula óssea são baixos.

A absorção parece também variar muito entre os indivíduos da mesma espécie o que é sugerido, por exemplo, por resultados obtidos em ovelhas tratadas com dose única de MGZ (80mg/kg) por via oral ²⁰. Ovelhas infectadas com *Trypanosoma brucei brucei* apresentaram diferentes concentrações plasmáticas de MGZ que variaram entre indivíduos de 0,12 a 1,16 µg/mL, 8 horas após o tratamento. O mesmo ocorreu em relação às concentrações plasmáticas máximas de MGZ em ovelhas não infectadas (variação de 0,85 a 5,99 µg/mL). Neste estudo Boda e colaboradores ²⁰ verificaram que somente as ovelhas infectadas com *Trypanosoma brucei brucei* que alcançaram as concentrações plasmáticas máximas de MGZ mais elevadas foram curadas. Esse estudo sugere não só que há ampla variação inter-individual em termos da absorção de MGZ dado por via oral mas, também, que a absorção interfere decisivamente com a efetividade do tratamento com o fármaco.

Os camundongos tratados com dose única de MGZ por via oral no presente trabalho também exibiram pronunciada variação inter-individual e entre sexos quanto aos efeitos genotóxicos nos diferentes intervalos de tempo pós-tratamento (24, 36 e 48 horas).

O presente trabalho é o único estudo que mostra os efeitos genotóxicos / clastogênicos do MGZ, em dose oral única, em células da medula óssea de camundongos machos e fêmeas. Neste sentido é importante destacar que os estudos com modelos experimentais de tripanosomíases humana, empregando camundongos e macacos ^{16, 26}, usualmente tratam a fase aguda da doença com dose única do MGZ por via intraperitoneal (20mg/kg ou 80mg/kg - camundongos) ou por via oral (80mg/kg – camundongos; 100mg/kg – macacos).

O tratamento de doses repetidas de MGZ associado com suramina ou melarsoprol foi usado também para curar a fase crônica da tripanosomíase experimental em camundongos e macacos ^{16, 24 - 26}.

A avaliação da genotoxicidade do MGZ após tratamento repetido por via oral foi realizada por Nesslany e colaboradores⁸ empregando ratos e mostrou um efeito clastogênico e citotóxico do MGZ mais acentuado que o que vimos no presente estudo após administração de dose única oral a camundongos. As diferenças de intensidade do efeito, portanto, podem ter sido devidas às diferenças de esquema de tratamento (dose repetida *versus* única) ou a espécie (ratos *versus* camundongos) ou a ambas.

A alteração na coloração da urina dos animais (ratos) tratados com MGZ, que exibiam cor amarela intensa, fez com que Nesslany e colaboradores⁸ analisassem esta alteração em conjunto com o efeito mielotóxico e sugerissem que esta seria mais uma indicação da toxicidade sistêmica do fármaco. A alteração da cor da urina também notada no presente estudo com camundongos pode ser decorrente da simples eliminação do MGZ pela urina, não indicando necessariamente toxicidade. Estudos que avaliaram a farmacocinética do MGZ em camundongos e macacos demonstram ser esta a principal via de eliminação do MGZ sendo o fármaco não metabolizado encontrado em altas concentrações na urina dos animais tratados^{62, 63}.

5.1 Considerações Finais

Por insuficiência de tempo, não foi feita neste trabalho, como inicialmente planejado, a avaliação do possível efeito protetor do α -tocoferol sobre a genotoxicidade induzida pelo MGZ *in vivo*, *i.e.*, determinando a frequência de células com micronúcleos na medula óssea de camundongos machos e fêmeas.

Entretanto, a partir dos dados obtidos ficou evidente que, antes que esta etapa seja realizada, é necessário tentar melhorar a biodisponibilidade do MGZ administrado por via oral aos camundongos, ou escolher outra via de administração. Pretendemos realizar futuramente este estudo das ações da VTE sobre a genotoxicidade do MGZ. Um dos objetivos desta abordagem é tentar esclarecer se o mecanismo da genotoxicidade / clastogenicidade do MGZ está relacionado a danos oxidativos ao DNA.

É necessário também prosseguir os estudos *in vitro* da interação VTE e MGZ, empregando concentrações menores de VTE.

Apesar de o MGZ ter mostrado atividade clastogênica e citotóxica, tanto nos ensaios *in vitro* quanto *in vivo*, ainda é prematuro descartar o uso do MGZ para tratar a doença do sono porque, até o momento, não há tratamento eficaz, principalmente

durante a fase crônica da doença – quando ocorre o comprometimento neurológico que leva à morte a grande maioria dos pacientes.

Caso o efeito mutagênico do MGZ possa ser reduzido por antioxidantes, sem que o efeito tripanossomicida seja afetado, o MGZ pode vir a ser um eficiente medicamento para tratar milhares de pessoas do continente africano afetadas por esta doença.

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho permitem as seguintes conclusões:

- O MGZ exibiu claro efeito genotóxico e citotóxico em testes *in vitro*. O efeito genotóxico (clastogênico) foi evidenciado em culturas de linfócitos humanos sem adição de sistema extrínseco de ativação metabólica e apareceu como um aumento concentração-dependente da frequência de células com aberrações cromossômicas em cultura. O efeito citotóxico manifestou-se como uma redução do índice mitótico nas duas maiores concentrações de MGZ testadas.
- O MGZ mostrou fraco efeito genotóxico em testes *in vivo* em que foi administrado por via oral a camundongos. O MGZ aumentou a frequência de células (eritrócitos policromáticos) com micronúcleos na medula óssea de camundongos machos e fêmeas, mas este aumento foi discreto – em comparação com o da ciclofosfamida – e não foi dose relacionado. Um fraco efeito mielotóxico do MGZ foi notado em alguns intervalos de doses (48 horas) após o tratamento.
- É possível que o contraste entre o acentuado efeito clastogênico registrado *in vitro* e o fraco efeito genotóxico observado *in vivo* se deva à má absorção do MGZ por via oral.
- Em ensaio preliminar *in vitro*, a vitamina E (α -tocoferol) aparentemente antagonizou parcialmente o efeito genotóxico do MGZ em algumas situações. Entretanto, as concentrações de vitamina E testadas exibiram marcante efeito citotóxico, reduzindo o índice mitótico, nas culturas de linfócitos humanos, o que comprometeu a avaliação dos resultados. Esta hipótese merece portanto ser testada em estudos posteriores com menores concentrações de α -tocoferol.

7 REFERÊNCIAS

1. World and Health Organization / Center for Talent Development. WHO/CTD. <http://www.who.int/ctd/chagas/disease.htm> (acessado em 27/Nov/2004).
2. Rey L. Tripanosomíase por *Trypanosoma cruzi* (Doença de Chagas): O Parasito. Parasitologia: Parasitos e Doenças Parasitárias do Homem nas Américas e na África. Editora Guanabara Koogan; 2001. p. 151-60.
3. World and Health Organization. <http://www.who.int/chagas/burdens.htm> (acessado em 27/Nov/2004).
4. World and Health Organization. Strategic Direction for Research: African trypanosomiasis 2002; February. World and Health Organization / Tropical Disease Research. WHO/TDR. <http://www.who.int/disease/trypan/disease.inf.htm> (acessado em 27/Nov/2004).
5. Rey L. Tripanossomíase por *Trypanosoma brucei* e Doença do Sono. In: Rey L, organizador. Parasitologia: Parasitos e Doenças Parasitárias do Homem nas Américas e na África. Editora Guanabara Koogan; 2001. p. 200-14.
6. Rey L. Tripanossomíase por *Trypanosoma cruzi*: A Doença. In: Rey L, organizador. Parasitologia: Parasitos e Doenças Parasitárias do Homem nas Américas e na África. Editora Guanabara Koogan; 2001. p. 161-78.
7. Maya JD, Bollo S, Nunez-Vergara LJ, Squella JA, Repetto Y, Morello A, *et al.* *Trypanosoma cruzi*: effect and mode of action of nitroimidazole and nitrofurantoin derivatives. *Biochemical Pharmacology* 2003; 7571: 1-8.
8. Nesslany F, Brugier S, Mouriès MA, Currieux FL, Marzin D. *In vitro* and *in vivo* chromosomal aberrations induced by megalin. *Mutation Research* 2004; 560: 147-58.

9. Denise H, Barret MP. Uptake and mode of action of drugs used against sleeping sickness. *Biochemical Pharmacology* 2001; 61: 1-5.
10. Legros D, Olivier G, Gastellu-Etchegorry M, Paquet C, Burri C, Jannin J, *et al.* Treatment of human African trypanosomiasis – present situation and needs for research and development. *The Lancet Infectious Diseases* 2002; 2:437-40.
11. Dumas M, Bouteille B. Treatment of human African trypanosomiasis. *Bulletin of World Health Organization* 2000; 78 (12): 1474.
12. De Castro SL, Meirelles MN. Effect of drugs on *Trypanosoma cruzi* and on its interaction with heart muscle cell “in vitro”. *Memorial Instituto Oswaldo Cruz* 1986; 82 (2): 209-18.
13. Tshako M, Alves MJM, Colli W, Brener Z, Augusto O. Restricted bioreductive metabolism of a nitroimidazole-thiadiazole derivative with curative action in experimental *Trypanosoma cruzi* infections. *Biochemical Pharmacology* 1989; 38 (24): 4491-96.
14. De Castro SL, Meirelles MN. Mechanism of action of a nitroimidazole-thiadiazole derivative upon *Trypanosoma cruzi* tissue culture amastigotes. *Memorial Instituto Oswaldo Cruz* 1990; 85 (1): 95-9.
15. Lages-Silva E, Filardi LS, Brener Z. Effect of the host specific treatment in the phagocytosis of *Trypanosoma cruzi* blood forms by mouse peritoneal macrophages. *Memorial Instituto Oswaldo Cruz* 1990; 85 (4): 401-5.
16. Bouteille B, Marie-Daragon A, Chauvière G, Albuquerque C, Enanga B, Darde ML, *et al.* Effect of meglazol on *Trypanosoma brucei brucei* acute and subacute infections in Swiss mice. *Acta Tropica* 1995; 60 (2):73-80.
17. Yan W, Moreno SNJ. A method to assess invasion and intracellular replication of *Trypanosoma cruzi* based on differential uracil incorporation. *Journal of Immunological Methods* 1998; 220: 123-28.

18. Viodé C, Bettache N, Cenas N, Krauth-Siegel RL, Chauvière G, Bakarara N, *et al.* Enzymatic reduction studies of nitroheterocycles. *Biochemical Pharmacology* 1999; 57 (5): 549-57.
19. Barrett MP, Fairlamb AH, Rousseau B, Chauvière G, Perié J. Uptake of the nitroimidazole drug megazol by African Trypanosomes. *Biochemical Pharmacology* 2000; 59: 615-20.
20. Boda C, Enanga B, Dumet H, Chauvière G, Labrousse F, Couquet C, *et al.* Plasma kinetics and efficacy of oral megazol treatment in *Trypanosoma brucei brucei*-infected sheep. *Veterinary Parasitology* 2004; 121: 213-23.
21. Berkelhammer G, Aasato G. 2-Amino-5-(1-methyl-5-nitro-2-imidazolyl)-1,3,4-thiadiazole: a new antimicrobial agent. *Science* 1968; 162: 1146.
22. Winkelmann E, Raether W, Gebert U, Sinhara A. Chemotherapeutically active nitro compounds. *Drug Research* 1977; 27 (i): 2251-63.
23. Filards LS, Brener Z. Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 1987; 81: 755-59.
24. Jennings FW, Chauvière G, Viodé C, Murray M. Topical chemotherapy for experimental African trypanosomiasis with cerebral involvement: the use of melarsoprol combined with the 5-nitroimidazole, megazol. *Tropical Medicine and International Health* 1996; 3(I): 363-66.
25. Enanga B, Keita M, Chauvière G, Dumas M, Bouteille B. Megazol combined with suramim: a chemotherapy regimen which reversed the CNS pathology in a model of human African trypanosomiasis in mice. *Tropical Medicine and International Health* 1998; 3 (9): 736-41.
26. Chauvière G, Bouteille B, Enanga B, Albuquerque C, Croft SL, Dumas M *et al.* Synthesis and biological activity of nitro heterocycles analogues to megazol, a trypanocidal lead. *Journal of Medicinal Chemistry* 2003; 46: 427-40.

27. Ferreira RCC, Ferreira LCS. Mutagenicity of CL 64855, a potent anti-trypanosoma cruzi drug. *Mutation Research* 1986; 171: 11-15.
28. Poli P, Mello MA, Buschini A, Mortara RA, Albuquerque CN, Silva S, *et al.* Cytotoxic and genotoxic effects of megazol, an anti-Chagas' disease drug, assessed by different short-term tests. *Biochemical Pharmacology* 2002; 64: 1617-27.
29. Dobiás L, Cerná M, Rössner P, Srám R. Genotoxicity and carcinogenicity of metronidazole. *Mutation Research* 1994; 317: 177-94.
30. Ferreiro GR, Badías LC, Lopez-Nigro M, Palermo A, Mudry M, Elio PG *et al.* DNA single strand breaks in the peripheral blood lymphocytes induced by three nitroimidazole derivatives. *Toxicology Letters* 2002; 132: 109-15.
31. Nigro MML, Palermo AM, Mudry MD, Carballo MA. Cytogenetic evaluation of two nitroimidazole derivatives. *Toxicology in Vitro* 2003; 17: 35-40.
32. Abdalla DSP. Radicais livres e antioxidantes. In: Oga S, organizador. *Fundamentos de Toxicologia*. São Paulo: Editora Atheneu; 2003. p. 37-55.
33. Hoffmann GR. Genetic toxicology. In: Casarett & Doull's. *Toxicology. The basic science of poisons*. Ed. Klaassen C.D. Fifth Edidion; 1996. p. 269-300.
34. Heddle JA. A rapid *in vivo* test for chromosome damage. *Mutation Research* 1973; 18: 187-90.
35. Schimid W. The micronucleus test. *Mutation Research* 1975; 31: 9-15.
36. OECD Guideline for the Testing of Chemicals. No. 474: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test 1997; 21 July.
37. Beiguelman B. As aberrações cromossômicas. In: *Citogenética Humana*. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan; 1982. p. 132-78.

38. Beiguelman B. A multiplicação das células somáticas humanas. In: Citogenética Humana. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan; 1982. p.32-64.
39. International Atomic Energy Agency (IAEA). Beninson D, Lloyd DC, Natarajan AT, Obe G, Preston RJ, Sasaki MS. Biological Dosimetry: Chromosomal Aberration Analysis for Assessment. IAEA STI/DOC/10/260, Vienna; 1986.
40. Kirsch-Volders M, Sofuni T, Aardema M, Albertini S, Eastmond D, Fenech M, *et al.* Report from the in vitro micronucleus assay working group. Mutation Research 2003; 540: 153-63.
41. Fenech M. The in vitro micronucleus technique. Mutation Research 2000; 455: 81-95.
42. Ribeiro LR. Teste do micronúcleo em medula óssea de roedores *in vivo*. In: Ribeiro LR, Salvadori DMF, Marques EK, organizadores. Mutagênese ambiental. Rio Grande do Sul: Editora ULBRA; 2003. p. 173-200.
43. Moorhead PS, Nowell PC, Mellman WJ, Battips DM, Hungerford DA. Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. Experimental Cell Research 1960; 20: 613-16.
44. OECD Guideline for the Testing of Chemicals. No. 473: *In Vitro* Mammalian Chromosome Aberration Test 1997; 21 July.
45. Nair MD and Nagarajan K. Nitroimidazoles as chemotherapeutic agents. Progress in Drug Research 1983; 27: 163-252.
46. Castelli M, Malagoli M, Ruberto AI, Baggio A, Casorali C, Cermelli C *et al.* *In vitro* studies of two 5-nitroimidazole derivatives. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 1997; 40: 19-25.
47. Bendesky A, Menéndez D, Ostrosky-Wegman P. Is metronidazole carcinogenic? Mutation Research 2002; 511:133-44.

48. IARC. Evaluation of carcinogenic risk to humans. International Agency for Research on Cancer, Lyon, France 1987; 7:250-51.
49. Simms-Cendan JS. Metronidazole. Infectious Diseases Update 1996; 3 (5): 153-56.
50. Menéndez D, Bendesky A, Rojas E, Salamanca F, Ostrosky-Wegman P. Role of P53 functionality in the genotoxicity of metronidazole and its hydroxy metabolite. Mutation Research 2002; 501: 57-67.
51. Talmi YP, Orenstein A, Wolf M, Kronenberg J. Use of mitomycin C for treatment of keloid: A preliminary report. Otolaryngology: Head and Neck Surgery 2005; 132:598-601.
52. Lacava ZGM, Luna H. The anticlastogenic effect of tocopherol in peritoneal macrophages of benznidazole-treated and ovariectomized mice. Mutation Research 1994; 305: 145-50.
53. Anderson D, Basaran N, Blowers SD, Edwards AJ. The effect of antioxidants on bleomycin treatment in *in vitro* and *in vivo* genotoxicity assays. Mutation Research 1995; 329: 37-47.
54. Edenharder R, Kerkhoff G, Dunkelberg H. Effects of α - carotene, retinal, riboflavin, α - tocopherol and vitamins C and K₁ on sister-chromatid exchanges induced by 3-amino-1-methyl-5H-pyrido[4,3-*b*]indole (Trp-P-2) and cyclophosphamide in human lymphocyte cultures. Food and Chemical Toxicology 1998; 36: 897-906.
55. Kassie F, Pool-Zobel B, Parzefall W, Knasmüller S. Genotoxic effect of benzyl isothiocyanate, a natural chemopreventive agent. Mutagenesis 1999;14 (6): 5985-603.
56. Neuzil J, Thomas SR, Stocker R. Requirement for, promotion, or inhibition by α -tocopherol of radical-induced initiation of plasma lipoprotein lipid peroxidation. Free Radical Biology & Medicine 1997; 22(1/2): 57-71.

57. Stocker R. The ambivalence of vitamin E in atherogenesis. *TIBS* 1999; 24:219-223.
58. Azzi A, Stocker A. Vitamin E: non-antioxidant roles. *Progress in Lipid Research* 2000; 39: 231-55.
59. Haaften RIMV, Evelo CTA, Haenen GRMM, Bast A. No reduction of α -tocopherol quinone by glutathione in rat liver microsomes. *Biochemical Pharmacology* 2001; 61: 715-19.
60. Boscoboinik D, Szewczyk A, Hensey C, Azzi A. Inhibition of cell proliferation by α -Tocopherol. *The Journal of Biological Chemistry* 1991; 266(10): 6188-94.
61. Sylvester PW, McIntyre BS, Gaport A, Briski KP. Vitamin E inhibition of normal mammary epithelial cell growth is associated with a reduction in protein kinase C α activation. *Cell Proliferation* 2001; 34: 347-57.
62. Enanga B, Boudra H, Chauvière G, Labat C, Bouteille B, Dumas M. Pharmacokinetics, metabolism and excretion of megazol, a new potent trypanocidal drug in animals. *Arzneimittel-Forschung / Drug Research* 1999; 49 (I): 441-47.
63. Enanga B, Ndong JMM, Boudra H, Debrauwer L, Dubreuil G, Bouteille B. Pharmacokinetics, metabolism and excretion of megazol in a *Trypanosoma brucei* gambiense primate model of human African trypanosomiasis. *Arzneimittel-Forschung / Drug Research* 2000; 50 (I): 158-62.

8 ANEXO

Tabela 7: Distribuição de aberrações cromossômicas em linfócitos induzidas por mitomicina C e diferentes concentrações de megazol.

Tratamento	Metáfases Analisadas	Falhas		Aberrações Cromossômicas					Metáfases Alteradas		Metáfases / 1000 células
		F'	F''	Q'	Q''	Trir	Quad	Anel	(-) F	(+) F	
DMSO 0,5% v/v	100*	4	2	4	2	0	0	0	4	8	8
	100*	4	1	2	1	0	0	0	3	8	16
DMSO 1% v/v	100*	2	0	3	2	0	0	0	5	7	13
	100*	2	0	4	0	0	0	0	4	6	15
MMC 3,83·10 ⁻⁷ M	100	11	4	17	24	0	0	0	31	39	14
	100	13	10	25	22	0	1	0	31	43	15
	68	9	2	17	19	0	1	0	25	30	05
	100	14	4	21	27	0	0	1	37	42	08
MGZ 1,41·10 ⁻⁴ M	100	4	2	6	2	0	0	0	8	13	08
	100	5	0	5	1	0	0	0	6	10	11
	100	4	0	4	3	0	0	0	6	9	10
	100	7	0	3	3	0	1	0	6	12	07
MGZ 2,81·10 ⁻⁴ M	100	4	0	6	2	0	0	0	8	12	09
	100	8	0	11	3	0	0	0	12	17	09
	100	7	0	7	3	0	0	0	9	14	11
	90	11	2	11	6	0	0	0	14	23	07
MGZ 5,63·10 ⁻⁴ M	83	15	0	25	10	1	0	0	25	34	05
	75	9	2	19	12	0	0	1	21	25	05
	100	24	2	23	22	0	0	0	26	38	15
	100	21	2	29	16	0	0	0	23	29	12

Os valores (falhas e aberrações) indicam o número total (N) de alterações encontradas nas metáfases analisadas.

Alterações: F': Falha cromatídica, F'': Falha cromossômica; Q': Quebra cromatídica; Q'': Quebra cromossômica;

Trir: Cromossoma trirradial; Quad: Cromossoma quadrirradial. (-) F: Metáfases alteradas sem considerar as falhas.

(+) F: Metáfases alteradas incluindo as falhas. DMSO: Dimetil sulfóxido; MMC: Mitomicina C; MGZ: Megazol. *

Amostras sem réplica para os doadores.

Tabela 8: Distribuição de aberrações cromossômicas em linfócitos induzidos por diferentes concentrações de vitamina E (VTE), megazol (MGZ) e associação de VTE e MGZ.

Tratamento	Metáfases Analisadas	Falhas		Aberrações Cromossômicas					Metáfases Alteradas		Metáfases / 1000 células
		F'	F''	Q'	Q''	Trir	Quad	Anel	(-) F	(+) F	
DMSO 0,5% v/v	50	1	1	1	0	0	0	0	1	3	16
	50	0	1	1	1	0	0	0	2	3	08
	50	1	0	1	2	0	0	0	3	4	08
	50	1	2	1	1	0	0	0	2	5	15
VTE (1) $2,5 \cdot 10^{-6}$ M	50*	2	0	4	2	0	0	0	6	7	05
	50*	1	3	3	3	0	0	0	6	8	04
(2) $5,0 \cdot 10^{-6}$ M	50*	2	1	4	8	0	0	0	9	12	10
	50*	1	2	3	4	0	0	0	5	7	05
Megazol (1) $2,81 \cdot 10^{-4}$ M	50	7	1	4	9	0	0	0	11	15	04
	50	13	2	8	2	0	0	0	9	16	04
	26	3	1	5	5	0	0	0	6	8	03
	50	7	0	12	7	0	0	0	15	20	07
(2) $5,63 \cdot 10^{-4}$ M	27	6	1	8	2	0	0	0	7	9	02
	50	3	2	6	2	0	0	0	8	11	04
	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	01
	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	01
VTE + MGZ (1) + (1)	50	3	4	6	11	0	0	0	13	15	04
	32	0	1	3	3	0	0	0	5	6	04
	33	1	1	0	4	0	0	0	3	5	04
	50	6	0	1	5	0	0	0	5	10	07
(1) + (2)	50	8	1	11	6	0	0	0	13	16	03
	25	4	0	2	5	0	0	0	4	6	02
	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	02
	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	01
(2) + (1)	50	4	1	6	5	0	0	0	8	10	04
	50	3	0	5	8	0	0	0	10	12	06
	50	8	1	10	6	0	0	0	13	16	03
	25	4	0	2	5	0	0	0	4	6	02
(2) + (2)	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0
	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0
	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0
	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1

Os valores (falhas e aberrações) indicam o número total (N) de alterações encontradas nas metáfases analisadas.

Alterações: F': Falha cromatídica; F'': Falha cromossômica; Q': Quebra cromatídica; Q'': Quebra cromossômica;

Trir: Cromossoma trirradial; Quad: Cromossoma quadrirradial. (-) F: Metáfases alteradas sem incluir falhas. (+) F:

Metáfases alteradas incluindo as falhas. DMSO: Dimetil sulfóxido; VTE: α -tocoferol ou Vitamina E; MGZ:

Megazol. ND: não determinado. * Amostras sem réplica para os doadores.

Tabela 9: Efeitos genotóxico (EPCMN, eritrócitos policromáticos com micronúcleos / 2000 EPC, eritrócitos policromáticos / animal) e mielotóxico (EPC / 200 eritrócitos / animal) do megazol (0, 125, 250, 500, 1000 e 2000 mg/kg) administrado por entubação gástrica e da ciclofosfamida (25 mg/kg ip) em camundongos *Swiss Webster*. Medula óssea retirada 24 horas após o tratamento.

Tratamento	Macho		Fêmea	
	EPCMN / 2000 EPC	EPC / 200 Eritrócitos	EPCMN / 2000 EPC	EPC / 200 Eritrócitos
Controle veículo ou negativo	2	97	3	107
CMC 10mL/kg, po	1	98	2	85
	3	103	1	94
	2	86	1	101
	3	105	1	104
Controle positivo CPA 25mg/kg, ip	18	86	18	97
	29	93	11	84
	25	70	13	70
	23	78	16	66
	23	74	12	71
MGZ 125mg/kg, po	2	110	2	106
	4	103	3	93
	7	88	4	93
	2	91	5	85
	5	92	3	10
MGZ 250mg/kg, po	4	106	4	118
	4	88	6	90
	7	82	5	102
	4	95	4	89
	5	93	3	93
MGZ 500mg/kg, po	10	83	6	104
	9	100	2	91
	5	88	5	89
	4	81	4	108
	11	115	2	102
MGZ 1000mg/kg, po	7	101	1	95
	9	86	5	87
	5	115	3	84
	4	86	4	85
	4	81	6	101
MGZ 2000mg/kg, po	7	101	1	95
	9	86	5	87
	5	115	3	84
	4	86	4	85
	4	81	6	101

Valores: Total de EPCMN encontrados para o número de células analisadas em cada animal. EPCMN: Eritrócito policromático micronucleado; EPC: Eritrócito policromático. CMC: Carboximetilcelulose; CPA: Ciclofosfamida; MGZ: Megazol. ip: Via intraperitoneal. po: Via oral por entubação gástrica.

Tabela 10: Efeitos genotóxico (EPCMN, eritrócitos policromáticos com micronúcleos / 2000 EPC, eritrócitos policromáticos / animal) e mielotóxico (EPC / 200 eritrócitos / animal) do megazol (0, 125, 250, 500, 1000 e 2000 mg/kg) administrado por entubação gástrica e da ciclofosfamida (25 mg/kg ip) em camundongos *Swiss Webster*. Medula óssea retirada 36 horas após o tratamento.

Tratamento	Macho		Fêmea	
	EPCMN / 2000 EPC	EPC / 200 Eritrócitos	EPCMN / 2000 EPC	EPC / 200 Eritrócitos
Controle veículo ou negativo	2	113	4	103
CMC 10mL/kg, po	5	116	4	107
	4	81	2	102
	5	93	2	81
	1	98	4	92
Controle positivo	21	89	11	81
CPA 25mg/kg, ip	17	75	9	72
	20	73	11	80
	20	60	10	78
	15	68	12	67
MGZ 125mg/kg, po	3	104	3	107
	4	90	2	120
	9	117	2	93
	3	95	4	98
	5	87	2	101
MGZ 250mg/kg, po	7	102	3	101
	6	112	4	103
	8	74	2	103
	5	100	4	104
	4	102	2	97
MGZ 500mg/kg, po	2	113	3	104
	7	99	6	89
	4	104	2	108
	5	81	2	94
	1	77	1	81
MGZ 1000mg/kg, po	3	90	2	83
	7	92	2	89
	13	107	6	100
	9	115	5	108
	4	88	2	86
MGZ 2000mg/kg, po	4	87	3	94
	8	82	3	96
	8	83	4	93
	1	102	4	82
	3	105	4	101

Valores: Total de EPCMN encontrados para o número de células analisadas em cada animal. EPCMN: Eritrócito policromático micronucleado; EPC: Eritrócito policromático. CMC: Carboximetilcelulose; CPA: Ciclofosfamida; MGZ: Megazol. ip: Via intraperitoneal. po: Via oral por entubação gástrica.

Tabela 11: Efeitos genotóxico (EPCMN, eritrócitos policromáticos com micronúcleos / 2000 EPC, eritrócitos policromáticos / animal) e mielotóxico (EPC / 200 eritrócitos / animal) do megazol (0, 125, 250, 500, 1000 e 2000 mg/kg) administrado por entubação gástrica e da ciclofosfamida (25 mg/kg ip) em camundongos *Swiss Webster*. Medula óssea retirada 48 horas após o tratamento.

Tratamento	Macho		Fêmea	
	EPCMN / 2000 EPC	EPC / 200 Eritrócitos	EPCMN / 2000 EPC	EPC / 200 Eritrócitos
Controle veículo ou negativo	1	113	4	109
CMC 10mL/kg, po	5	100	3	94
	2	105	3	82
	4	93	5	94
	2	100	2	96
Controle positivo	20	80	4	86
CPA 25mg/kg, ip	12	66	6	87
	10	94	8	83
	10	60	7	68
	12	65	8	68
MGZ 125mg/kg, po	4	82	4	82
	4	85	3	90
	5	85	3	110
	6	93	3	107
	4	99	3	92
MGZ 250mg/kg, po	7	77	3	96
	9	90	6	113
	4	96	9	87
	12	91	2	97
	4	100	4	97
MGZ 500mg/kg, po	1	133	4	97
	8	99	4	107
	6	108	9	82
	8	101	6	105
	5	71	5	96
MGZ 1000mg/kg, po	7	77	3	87
	5	83	4	81
	9	87	6	81
	5	100	9	85
	11	82	4	90
MGZ 2000mg/kg, po	5	86	4	78
	2	86	10	72
	8	98	14	88
	6	109	6	99
	5	77	7	86

Valores: Total de EPCMN encontrados para o número de células analisadas em cada animal. EPCMN: Eritrócito policromático micronucleado; EPC: Eritrócito policromático. CMC: Carboximetilcelulose; CPA: Ciclofosfamida; MGZ: Megazol. ip: Via intraperitoneal. po: Via oral por entubação gástrica.