



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

GABRIELA TAGLIANI LOPEZ

**EFEITOS DO ANTIMONIATO DE N-METILGLUCAMINA E Sb^V SOBRE
PARÂMETROS CITOTÓXICOS, GENOTÓXICOS E MUTAGÊNICOS EM
CULTURA DE LEUCÓCITOS HUMANOS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Uruguaiana, RS, Brasil.

2015

GABRIELA TAGLIANI LOPEZ

**EFEITOS DO ANTIMONIATO DE N-METILGLUCAMINA E Sb^V SOBRE
PARÂMETROS CITOTÓXICOS, GENOTÓXICOS E MUTAGÊNICOS EM
CULTURA DE LEUCÓCITOS HUMANOS**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

. Orientador: Prof. Dr. Luís Flávio Souza de Oliveira

Co-orientador: Prof. Dr. Michel Mansur Machado

Uruguiana

2015

Ficha catalográfica elaborada automaticamente com os dados fornecidos
pelo(a) autor(a) através do Módulo de Biblioteca do
Sistema GURI (Gestão Unificada de Recursos Institucionais) .

L864e Lopez, Gabriela Tagliani

EFEITOS DO ANTIMONIATO DE N-METILGLUCAMINA E SbV SOBRE
PARÂMETROS CITOTÓXICOS, GENOTÓXICOS E MUTAGÊNICOS EM CULTURA
DE LEUCÓCITOS HUMANOS / Gabriela Tagliani Lopez.

108 p.

Dissertação(Mestrado)-- Universidade Federal do Pampa,
MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, 2015.

"Orientação: Luís Flávio Souza de Oliveira".

1. leishmaniose. 2. antimoniato de meglumina. 3. genética
toxicológica. 4. saúde pública. 5. mutagenicidade. I. Título.

AGRADECIMENTOS

GABRIELA TAGLIANI LOPEZ

**EFEITOS DO ANTIMONIATO DE N-METILGLUCAMINA E Sb^V SOBRE
PARÂMETROS CITOTÓXICOS, GENOTÓXICOS E MUTAGÊNICOS EM
CULTURA DE LEUCÓCITOS HUMANOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

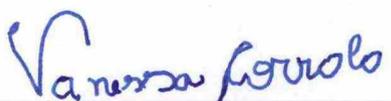
Área de concentração: Farmácia

Dissertação defendida e aprovada em: 14 de agosto de 2015.

Banca examinadora:



Prof. Dr. Luis Flavio Souza de Oliveira
Orientador
UNIPAMPA



Prof.ª Dr.ª Vanessa Corralo
UNOCHAPECÓ



Prof.ª Dr.ª Cláudia Acosta Duarte
UNIPAMPA

AGRADECIMENTOS

Primeiramente aos meus pais, Jussára e Rogério, e irmãos, Fernanda e Rubens, pelo alicerce e carinho em todos os momentos.

Ao meu querido marido, Fabiano, por ser o meu grande incentivador. Obrigada por me apoiar e acreditar que eu era capaz.

Ao meu orientador, Prof^o. Dr^o. Luís Flávio Souza de Oliveira, e ao meu co-orientador, Prof^o. Dr^o. Michel Mansur Machado, exemplos de pessoas e profissionais. Sou extremamente grata pela orientação, convívio, ensinamentos, conversas e risadas. A todos os professores do PPG-Ciências Farmacêuticas que de alguma forma contribuíram para a minha formação, em especial a Prof^a. Dr^a. Fabiana Ernestina Barcelos da Silva pelas ajudas ao longo do caminho percorrido.

Aos colegas do grupo NUBIOTOXIM, que me acolheram e colaboraram em todas as etapas do desenvolvimento deste trabalho.

Ao Laboratório de Análises Químicas Industriais e Ambientais (LAQIA) da Universidade Federal de Santa Maria, pela disponibilidade em realizar a análise quantitativa de antimônio intracelular.

Ao Instituto de Radioterapia e Oncologia e a Pharmavet, meus locais de trabalho, por me darem apoio durante a realização do curso.

Enfim, agradeço a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a conclusão deste trabalho.

RESUMO

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO ANTIMONIATO DE N-METILGLUCAMINA SOBRE PARÂMETROS CITOTÓXICOS, GENOTÓXICOS E MUTAGÊNICOS EM CULTURA DE LEUCÓCITOS HUMANOS

A leishmaniose é uma doença infecciosa que pode acometer a pele, as mucosas e os órgãos internos. Apesar desta doença atingir, anualmente, cerca de 1,5 milhão de pessoas em todo o mundo, ainda possui poucas alternativas terapêuticas. O fármaco recomendado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) para o tratamento das leishmanioses é o antimoniato de N-metilglucamina (Sb-AMG). O tratamento com esse fármaco pode induzir o indivíduo a um quadro de toxicidade, já que é derivado do antimônio (Sb), um metal encontrado livremente na crosta terrestre, principalmente sob a forma trivalente e pentavalente de oxidação. A forma trivalente mostrou-se clastogênica e com potencial cancerígeno tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Dentro dessa problemática, estudos envolvendo o Sb-AMG são escassos, levando-se em consideração parâmetros genotóxicos. Este trabalho, portanto, teve como objetivo, avaliar comparativamente os efeitos de cinco diferentes concentrações (5-50 µg/mL) de Sb-AMG e de Sb^V sobre parâmetros citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos em leucócitos humanos. Para os testes de citotoxicidade e genotoxicidade aplicamos a análise estatística de variância (ANOVA) de uma via e para os testes de mutagenicidade a ANOVA de duas vias. Entre as múltiplas comparações utilizamos o teste de Tukey e consideramos um resultado estatisticamente significativo quando $p < 0,05$. Testes de proliferação celular, instabilidade cromossômica, teste do cometa alcalino e ensaio de quebra de fita dupla de DNA, demonstraram que ambas as formas de Sb testadas foram capazes de induzir alterações genotóxicas significativas, quando comparado ao controle negativo em, pelo menos, uma das concentrações ensaiadas. Os testes de viabilidade celular e micronúcleo foram utilizados para avaliar, respectivamente, a citotoxicidade e a mutagenicidade. Adicionalmente, foi avaliado o número de células apoptóticas e necróticas, bem como o índice de divisão nuclear citotóxico. Todos esses parâmetros demonstraram significantes alterações. De uma forma sem precedentes, o nível de Sb intracelular foi quantificado e relacionado com as diferentes concentrações de exposição e, a partir disso, nós sugerimos que o influxo de Sb ocorre de forma concentração dependente, mas com cinética de ordem zero. Tomando conjuntamente os dados obtidos, os resultados evidenciam claramente que o Sb-AMG possui efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos em leucócitos humanos nas concentrações testadas.

Palavras chave: Leishmaniose, antimoniato de meglumina, genética toxicológica, mutagenicidade, citotoxicidade, saúde pública, farmacovigilância.

ABSTRACT

EFFECTS OF N-METILGLUCAMINE ANTIMONIATE AND Sb^V ON CITOTOXIC, GENOTOXIC AND MUTAGENIC PARAMETERS IN HUMAN CULTURE LEUKOCITE

Leishmaniasis is an infectious disease that can affect the skin, mucosa and internal organs. Although affecting about 1.5 million people each year, leishmaniasis has few therapeutic alternatives. N-methylglucamine antimoniate (Sb-GAM) is the drug of choice to treat leishmaniasis according to the World Health Organization. The treatment with this drug can induce the individual to a frame of toxicity, since it is derived from the antimony (Sb), a metal free found in the earth's crust, principally in the form trivalent and pentavalent oxidation. The trivalent form has clastogenic and carcinogenic potential both *in vitro* and *in vivo*. However, there are few genotoxic studies involving Sb-GAM. The main contribution of this study was to evaluate *in vitro* the cytotoxic, genotoxic and mutagenic parameters of five different concentrations (5, 10, 20, 40 and 50 µg/mL) of Sb-GAM and Sb^V in human leukocyte. For the cytotoxicity and genotoxicity tests we apply statistical one-way analysis of variance (ANOVA) and for mutagenicity tests the two-way ANOVA. Among the multiple comparisons we used the Tukey test and consider a statistically significant result when $p < 0.05$. Cell proliferation, chromosomal instability, the alkaline comet assay and double-stranded DNA breaks assays, showed that both forms of Sb were genotoxic when compared to the negative control, at least, in one of the concentrations tested. Cell viability and micronucleus tests were used to evaluate, respectively, cytotoxicity and the mutagenicity. Additionally, there was assessed the number of apoptotic and necrotic cells, as well as nuclear division cytotoxicity index. All these parameters showed significant changes. In an unprecedented strategy, the intracellular Sb level was quantified and correlated with the different exposure concentrations and, from this, we could induce that the Sb inflow occurs in a concentration-dependent, but with a zero-order kinetics. Altogether, our results show clearly that Sb-GAM has cytotoxic, genotoxic and mutagenic effects on human leukocytes at the concentrations tested.

Keywords: Leishmaniasis, meglumine antimoniate, genetic toxicology, mutagenicity, cytotoxicity, public health, farmacovigilance.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	Página
Figura 1 – Aspecto clínico da lesão de pele na leishmaniose cutânea.	18
Figura 2 – Aspecto clínico da lesão de pele na leishmaniose cutânea disseminada.	19
Figura 3 – Aspecto clínico da lesão de pele na leishmaniose cutânea difusa.	20
Figura 4 – Aspecto clínico da lesão na leishmaniose mucosa.	20
Figura 5 – Aspecto clínico do paciente com leishmaniose visceral.	21
Figura 6 – Distribuição de pessoas contaminadas com leishmaniose no mundo no ano de 2009.	22
Figura 7 – Casos notificados de leishmaniose no Brasil no período de 2007- 2013.	23
Figura 8 – Ciclo biológico de parasitas do gênero <i>Leishmania</i> .	24
Figura 9 – Proposta da estrutura química do antimoniato de N-metilglucamina.	29
Figura 10 – Fases do ciclo celular com indicação do local de ação dos complexos Cdk-ciclina redutoras.	33
Figura 11 – Diferenças morfológicas da necrose e da apoptose.	36
Figura 12 – Indução da apoptose pela via receptores de morte e por via intrínseca.	39
Figura 13 – Estrutura do DNA.	43
Figura 14 – Método de contagem de leucócitos em câmara de Neubauer.	53
Figura 15 – Classificação dos nucleoides conforme comprimento de cauda.	54
Figura 16 – Teste de viabilidade celular em leucócitos humanos expostos a diferentes concentrações de antimônio a partir do antimoniato de meglumina (Sb-AMG) ^A e padrão de antimônio (Sb ^V) ^B .	59
Figura 17 – Ensaio de proliferação celular em leucócitos humanos expostos a diferentes concentrações de antimônio a partir do antimoniato de meglumina (Sb-AMG) ^A e padrão de antimônio (Sb ^V) ^B .	61

- Figura 18** – Ensaio de instabilidade cromossômica numérica em leucócitos humanos expostos a diferentes concentrações de antimônio a partir do antimoniato de meglumina (Sb-AMG)^A e padrão de antimônio (Sb^V)^B. 62
- Figura 19** – Ensaio de índice mitótico em leucócitos humanos expostos a diferentes concentrações de antimônio a partir do antimoniato de meglumina (Sb-AMG)^A e padrão de antimônio (Sb^V)^B. 64
- Figura 20** – Índice de dano de DNA gerado pelo ensaio cometa alcalino em leucócitos humanos expostos a diferentes concentrações de antimônio a partir do antimoniato de meglumina (Sb-AMG)^A e padrão de antimônio (Sb^V)^B. 66
- Figura 21** – Ensaio de quebra de fita dupla de DNA em leucócitos humanos expostos a diferentes concentrações de antimônio a partir do antimoniato de meglumina (Sb-AMG)^A e padrão de antimônio (Sb^V)^B. 67
- Figura 22** – Contabilização de micronúcleos em leucócitos humanos mononucleados expostos a diferentes concentrações de antimônio a partir do antimoniato de meglumina (Sb-AMG)^A e padrão de antimônio (Sb^V)^B. 69
- Figura 23** – Contabilização de leucócitos humanos binucleados expostos a diferentes concentrações de antimônio a partir do antimoniato de meglumina (Sb-AMG)^A e padrão de antimônio (Sb^V)^B. 71
- Figura 24** – Contabilização de um micronúcleo em leucócitos humanos binucleados expostos a diferentes concentrações de antimônio a partir do antimoniato de meglumina (Sb-AMG)^A e padrão de antimônio (Sb^V)^B. 73
- Figura 25** – Contabilização de dois micronúcleos em leucócitos humanos binucleados expostos a diferentes concentrações de antimônio a partir do antimoniato de meglumina (Sb-AMG)^A e padrão de antimônio (Sb^V)^B. 74
- Figura 26** – Contabilização de três ou mais micronúcleos em leucócitos humanos binucleados expostos a diferentes concentrações de antimônio a partir do antimoniato de meglumina (Sb-AMG)^A e padrão de antimônio (Sb^V)^B. 76
- Figura 27** – Contabilização de leucócitos humanos em condição de

- necrose expostos a diferentes concentrações de antimônio a partir do antimoniato de meglumina (Sb-AMG)^A e padrão de antimônio (Sb^V)^B. 79
- Figura 28** – Contabilização de leucócitos humanos em condição de apoptose expostos a diferentes concentrações de antimônio a partir do antimoniato de meglumina (Sb-AMG)^A e padrão de antimônio (Sb^V)^B. 81
- Figura 29** – Índice de divisão nuclear citotóxico em leucócitos humanos expostos a diferentes concentrações de antimônio a partir do antimoniato de meglumina (Sb-AMG)^A e padrão de antimônio (Sb^V)^B. 83
- Figura 30** – Análise quantitativa de antimônio intracelular em leucócitos humanos expostos a diferentes concentrações de antimônio a partir do antimoniato de meglumina (Sb-AMG)^A e padrão de antimônio (Sb^V)^B. 84

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA – análise de variância

Ap – células apoptóticas

Apaf-1 – fator citosólico associado a apoptose

As – arsênio

ATP – adenosina trifosfato

Bax – molécula pró-apoptótica

Bcl-2 – família de proteínas reguladoras da apoptose

Bid – molécula pró-apoptótica

Cdk – cinase dependente de ciclinas

CN – controle negativo

CP – controle positivo

DNA – ácido desoxirribonucleico

ERN – espécie reativa de nitrogênio

ERO – espécie reativa de oxigênio

Fas – receptor de membrana

FasL – ligante de Fas

g – gramas

H₂O₂ – peróxido de hidrogênio

ICP-MS – espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado

IDNC – índice de divisão nuclear citotóxico

IM – índice mitótico

Kg – quilogramas

LC – leishmaniose tegumentar americana cutânea

LCD – leishmaniose tegumentar americana cutânea disseminada

LCDf – leishmaniose tegumentar americana cutânea difusa

LM – leishmaniose tegumentar americana mucosa

LTA – leishmaniose tegumentar americana

LV – leishmaniose visceral ou Calazar

mg – miligramas

min – minuto

mL – mililitros

mm – milímetro

mm³ – milímetro cúbico

MN – micronúcleo

mRNA – ácido ribonucleico mensageiro

NAD⁺ – nicotinamida-adenina-dinucleotídeo

Nec – células necróticas

NF-kB – fator nuclear Kappa B

ng – nanograma

nm – nanômetro

O₂ – oxigênio

⁻O₂ – radical superóxido

⁻OH – radical hidroxila

OMS – Organização Mundial de Saúde

p53 – proteína citoplasmática

PARP-1 – enzima nuclear poli(ADP-ribose) polimerase 1

pg – picograma

pRB – proteína intracelular

RNA – ácido ribonucleico

rTNF – receptor de fatores de necrose tumoral

Sb – antimônio

Sb₂O₃ – trióxido de antimônio

Sb₂S₃ – trissulfeto de antimônio

Sb-AMG – antimoniato de N-metilglucamina

Sb^{III} – antimônio trivalente

Sb^V – antimônio pentavalente

TNF – fator de necrose tumoral

W – watts

µg – microgramas

µL – microlitro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1	Leishmaniose	17
2.1.1	Patologia da leishmaniose	17
2.1.1.1	Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA)	17
2.1.1.2	Leishmaniose Visceral (LV)	21
2.1.2	Epidemiologia da leishmaniose	22
2.1.3	Patogenia da leishmaniose	23
2.1.4	Tratamento das leishmanioses	25
2.2	Antimônio (Sb)	26
2.3	Antimoniato de N-metilglucamina (Sb-AMG)	29
2.4	Toxicidade do tratamento	30
2.4.1	Processos homeostáticos e de toxicidade celulares	31
2.4.1.1	Ciclo celular e processo homeostático	31
2.4.1.2	Necrose e Apoptose	34
2.4.2	Genotoxicidade	42
2.4.2.1	DNA – Estrutura	42
2.4.2.2	Danos e sistemas de reparo do DNA	43
2.4.2.3	Genética toxicológica	45
2.4.3	Mutagenicidade	47
2.4.3.1	Tipos de mutações	47
3	OBJETIVOS	50
3.1	Geral	50
3.2	Específicos	50
4	MATERIAIS E MÉTODOS	51
4.1	Substâncias químicas	51
4.2	Preparo da cultura de leucócitos humanos	51
4.3	Avaliação dos parâmetros citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos em cultura de leucócitos humanos	52
4.3.1	Viabilidade celular	52
4.3.2	Proliferação celular	52

4.3.3	Instabilidade cromossômica numérica e índice mitótico	53
4.3.4	Teste do cometa alcalino	54
4.3.5	Quebra de fita dupla de DNA	54
4.3.6	Teste de micronúcleo	55
4.3.7	Contagem de células necróticas e apoptóticas	55
4.3.8	Índice de divisão nuclear citotóxico (IDNC)	56
4.4	Análise quantitativa de antimônio intracelular	56
4.5	Análise estatística	57
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
5.1	Citotoxicidade	58
5.2	Genotoxicidade	60
5.3	Mutagenicidade	68
5.4	Análise quantitativa de antimônio intracelular	84
6	CONCLUSÕES	86
7	PERSPECTIVAS FUTURAS	88
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89
	ANEXOS	102
	ANEXO A - Confirmação de submissão de manuscrito	102
	ANEXO B - Manuscrito submetido à revista Toxicology Letters	103

1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose é uma doença infecciosa, que afeta homens e animais ocasionando lesões na pele, nas mucosas e/ou nas vísceras. O vetor da leishmaniose é um mosquito do gênero *Phlebotomus*, que se infecta ao succionar sangue contaminado do hospedeiro com formas amastigotas de *Leishmania* spp. (REITHINGER; DUJARDIN, 2006).

A leishmaniose é considerada uma doença tropical negligenciada pela Organização Mundial de Saúde (OMS), encontrando-se intrinsecamente associada aos bolsões de pobreza e à precariedade das condições de vida afetando, principalmente, pessoas que vivem em zonas rurais presentes em países pobres e em desenvolvimento (WHO, 2009).

Apesar de acometer, todos os anos, cerca de 1,5 milhão de pessoas espalhadas em 88 países de quatro continentes, a leishmaniose possui poucas alternativas terapêuticas. Nas últimas três décadas houve um grande avanço na área da biologia celular e imunologia, mas o tratamento medicamentoso da infecção não foi aprimorado em igual proporção (FREZÁRD et al., 2013).

Nos últimos 90 anos, preparações à base de antimônio são os medicamentos de escolha no tratamento da leishmaniose. Como a indústria pouco tem contribuído no desenvolvimento de novos medicamentos para o tratamento das leishmanioses, no Brasil o fármaco de eleição continua sendo o antimoniato de N-metilglucamina (Sb-AMG) (RATH et al., 2003).

Por outro lado, sabe-se que o tratamento com esse fármaco, por ser derivado do metal antimônio (Sb), pode induzir a um quadro de toxicidade e ocasionar vários efeitos adversos, como o desenvolvimento de hepatites e cardiopatias (NASCIMENTO et al., 2010).

Estudos envolvendo o Sb-AMG são escassos, levando-se em consideração parâmetros genotóxicos. Considerando que existem vários questionamentos em relação aos efeitos toxicológicos do fármaco em questão, bem como concentrações capazes de induzir dano celular, este trabalho teve a finalidade de avaliar comparativamente os efeitos sobre parâmetros citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos de cinco diferentes concentrações (5, 10, 20, 40 e 50 µg/mL) de Sb-AMG e de Sb^V em células leucocitárias humanas *in vitro*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Leishmaniose

As leishmanioses são infecções endêmicas, crônicas, de difícil controle e não contagiosas causadas por diversas espécies de protozoários da família Trypanosomatidae, gênero *Leishmania* (SAMPAIO; DE PAULA, 1999; SAMPAIO; RIVITTI, 2001). Os humanos podem ser infectados com esse protozoário, sendo considerados, portanto, agentes disseminadores da doença (AMATO et al., 1998; ALTAMIRANO-ENCISO, 2000).

Dentro dessa problemática, há de se destacar alguns animais domésticos e silvestres, que servem como reservatórios e fontes potenciais para a transmissão aos seres humanos, como os roedores, as raposas e os cães (RUBIN et al., 2006).

A leishmaniose é transmitida por picadas de mosquitos flebotomíneos fêmeas contaminados pertencentes à família Psychodidae e subfamília Phlebotominae. Este tipo de mosquito se reproduz em áreas de florestas e cavernas onde ocorre a maior parte da transmissão para os humanos (BASANO; CAMARGO, 2004; WHO, 2010). O ambiente característico e propício à ocorrência da leishmaniose é aquele de baixo nível socioeconômico, pobreza, promiscuidade, ocorrendo, principalmente, no meio rural e na periferia das grandes cidades (BRASIL, 2014).

Existem muitas espécies distintas de *Leishmania* em seus habitats naturais e tipos de doença que produzem, mas de um modo geral, as leishmanioses estão divididas em: tegumentar americana (LTA), que acomete a pele e as mucosas; e visceral ou Calazar (LV), que atinge os órgãos internos (REITHINGER; DUJARDIN, 2006).

2.1.1 Tipos clínicos da leishmaniose

2.1.1.1 Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA)

A LTA é uma doença que acompanha o homem desde a antiguidade, existindo relatos e descrições encontrados na literatura desde o século I d.C. (CAMARGO; BARCINSKI, 2003). Entretanto, no Brasil, a natureza leishmaniótica das lesões cutâneas e nasofaríngeas só foi registrada em 1909, por Lindenberg, que

encontrou formas de *Leishmania* cutâneas em indivíduos que trabalhavam nas matas do interior do Estado de São Paulo.

É admitida a existência de seis espécies de *Leishmania* envolvidas na doença humana, e mais de 200 de flebotomíneos responsáveis por sua transmissão no Brasil (BASANO; CAMARGO, 2004).

A LTA pode ser dividida em quatro tipos: cutânea (LC), cutânea disseminada (LCD), cutânea difusa (LCDf) e mucosa (LM), diferenciando-se entre si pelas manifestações clínicas apresentadas pelos pacientes infectados.

As lesões mais típicas são as úlceras localizadas encontradas na LC (Figura 1). Essas lesões são indolores, com formato arredondado ou ovalado, medindo de alguns milímetros até alguns centímetros. Apresentam base eritematosa, infiltrada, com consistência firme e suas bordas são bem delimitadas e elevadas, com granulações grosseiras. A infecção bacteriana associada pode causar dor local e produzir exsudato seropurulento. Caso não tratadas, tendem à cura espontânea em período de alguns meses a poucos anos, podendo também permanecer ativas por mais tempo (FURTADO, 1994).



Figura 1 – Aspecto clínico da lesão de pele na leishmaniose cutânea. Observar o formato arredondado e as bordas elevadas da lesão característica neste tipo de leishmaniose.

Fonte: BRASIL, 2010.

Já a LCD inicia com a manifestação de um nódulo único, mas que lentamente acaba envolvendo grande parte da pele. Caracteriza-se pelo aparecimento de múltiplas pápulas de aparência acneiforme, que acomete vários segmentos corporais, com mais frequência na face e tronco (Figura 2), podendo alcançar centenas de lesões. Este tipo é mais raro e pode ser observado em até 2% dos casos registrados. As duas espécies reconhecidas como causadoras desta

síndrome difusa são a *Leishmania (V.) braziliensis* e a *Leishmania (L.) amazonensis* (BRASIL, 2010).



Figura 2 – Aspecto clínico da lesão de pele na leishmaniose cutânea disseminada. Observar as múltiplas pápulas de aparência acneiforme da lesão característica neste tipo de leishmaniose.

Fonte: BRASIL, 2010.

A LCDf desenvolve-se em alguns pacientes que não possuem respostas imunológicas celulares específicas para a *Leishmania* (RUBIN et al., 2006). Essa modalidade de leishmaniose é causada pela *L. (L.) amazonensis*, constituindo-se de uma forma clínica rara, porém grave, que inicia de maneira insidiosa, como uma lesão única e de má resposta ao tratamento, evoluindo de forma lenta, com formação de placas e múltiplas nodulações não ulceradas recobrando grandes extensões cutâneas (Figura 3) (BRASIL, 2010).



Figura 3 – Aspecto clínico da lesão de pele na leishmaniose cutânea difusa. Observar as múltiplas nodulações não ulceradas da lesão característica neste tipo de leishmaniose.

(Imagem disponível em <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/parasitologia/leishmaniosis.html> acesso em 07/12/2014).

Em relação à LM, suas manifestações clínicas são mucocutâneas, com evolução e alterações patológicas iniciais parecidas com a LC, mas após decorridos anos da cicatrização da lesão primária, desenvolve-se uma úlcera em alguma junção mucocutânea, como laringe, septo nasal (Figura 4), ânus ou vulva. A lesão mucosa é lentamente progressiva, muito destrutiva e desfigurante, erodindo superfícies mucosas e cartilagens, podendo ainda culminar com a morte do paciente por obstrução das vias respiratórias (RUBIN et al., 2006).



Figura 4 – Aspecto clínico da lesão na leishmaniose mucosa. Observar a úlcera na junção mucocutânea do septo nasal uma lesão característica neste tipo de leishmaniose.

(Imagem disponível em http://www.your-doctor.net/dermatology_atlas/english/?id=429 acesso em 07/12/2014).

2.1.1.2 Leishmaniose Visceral (LV)

A LV é uma infecção potencialmente fatal do sistema monócito/macrófago com registros de aumento do número de casos tanto no Brasil como em diferentes países da Ásia, África, Américas e Europa (ANSTEAD et al., 2001). Anualmente estima-se que ocorram 600 mil novos casos clínicos e 75 mil óbitos em todo o mundo. Cerca de 90% dos casos são registrados em apenas seis países, incluindo o Brasil, onde a LV foi descrita inicialmente em 1930 (FURLAN, 2010).

A doença é produzida por diferentes subespécies de *L. donovani*. A infecção começa com uma coleção localizada de macrófagos infectados no local da picada do mosquito, que disseminam os microorganismos através do sistema fagocitário mononuclear. A maioria das pessoas infectadas destrói a *L. donovani* por meio de uma resposta imunológica celular, mas 5% não conseguem conter os microorganismos e desenvolvem a doença disseminada. O fígado, o baço e os linfonodos tornam-se bastante aumentados à medida que os fagócitos mononucleares nestes órgãos são preenchidos com formas amastigotas de *Leishmania* em proliferação. Ao final, macrófagos parasitados podem acumular-se em outros órgãos, como coração e os rins (RUBIN et al., 2006).

Em meses, o paciente com LV torna-se profundamente caquético e o baço aumenta de forma maciça (Figura 5). Se não for tratada, a doença é invariavelmente fatal (BRASIL, 2014).



Figura 5 – Aspecto clínico do paciente com leishmaniose visceral. Observar o baço aumentado característico neste tipo de leishmaniose.

Fonte: BRASIL, 2014.

2.1.2 Epidemiologia da leishmaniose

A leishmaniose é a terceira doença mais prevalente transmitida por vetor e é amplamente distribuída pelo mundo todo, o que a torna um problema de saúde pública em 88 países. Em 2009, a maior concentração de pessoas infectadas estava localizada na região sudeste da Ásia, com 66% dos casos de todo o mundo (Figura 6). A cada ano, aproximadamente 1,5 milhão de novos casos são registrados, e mais de 350 milhões de pessoas estão sob risco de desenvolver a infecção e a doença (REITHINGER; DUJARDIN, 2006; FREZÁRD et al., 2013).

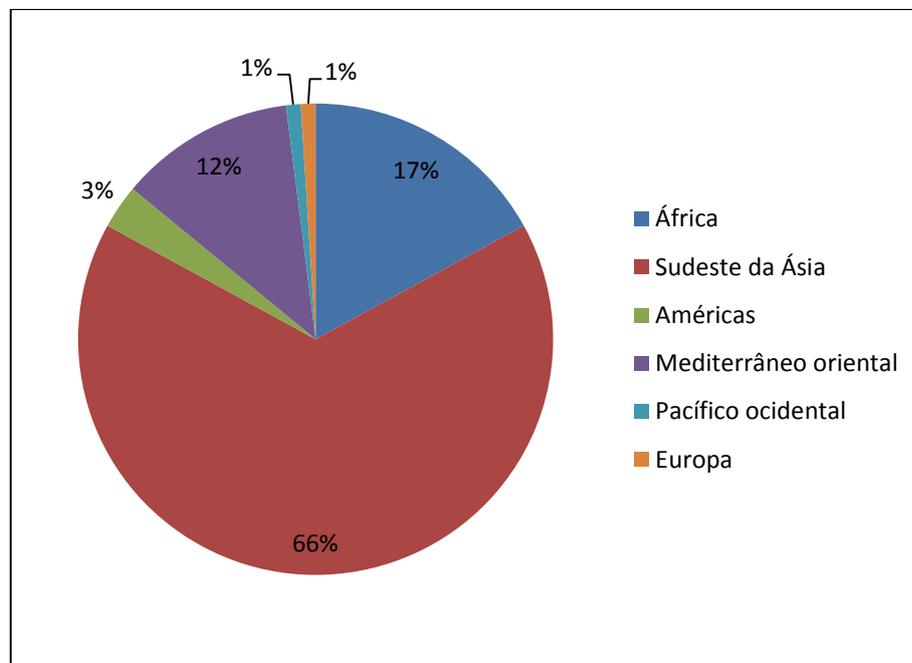


Figura 6 – Distribuição de pessoas contaminadas com leishmaniose no mundo no ano de 2009.

Fonte: WHO, 2010.

A leishmaniose é uma doença considerada como uma das endemias de interesse prioritário no Brasil, como também em grande parte dos continentes americano, asiático, europeu e africano. Sua importância levou a OMS a considerá-la uma das seis mais importantes doenças infecciosas, pelo seu alto coeficiente de detecção e capacidade de produzir deformidades (WHO, 1990).

Apresenta ampla distribuição geográfica no país, sendo que o número de casos vem aumentando progressivamente com uma média anual de 35 mil indivíduos infectados nos últimos 20 anos (BRASIL, 2010). Mas, é importante

ressaltar, que se esbarra na problemática da subnotificação de novos casos. Entre os anos de 2007 e 2013 o número de casos notificados no Brasil não sofreu muita variação (Figura 7). Este dado, contudo, não traz a certeza de que a doença deixou de acometer novos indivíduos ou se não houve, de modo eficaz, a notificação de novos casos.

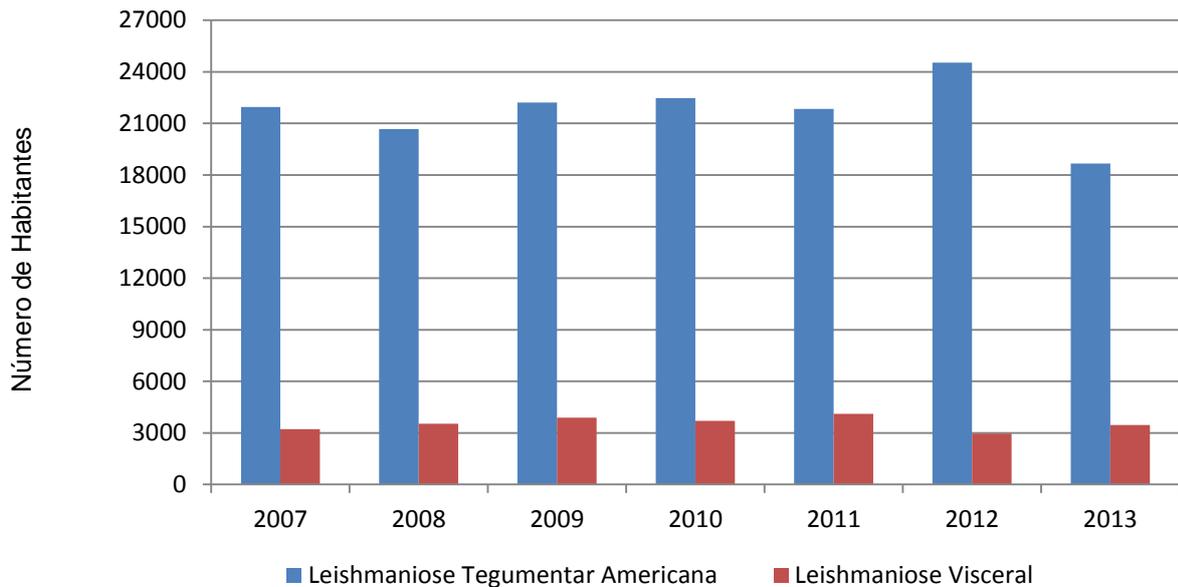


Figura 7 – Casos notificados de leishmanioses no Brasil no período de 2007- 2013. (Dados compilados pela autora disponível em: <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/> acesso em 15/01/2015).

2.1.3 Patogenia da leishmaniose

Os parasitas do gênero *Leishmania* apresentam-se sob duas formas principais: a promastigota, encontrada no tubo digestório das fêmeas dos hospedeiros invertebrados, e a amastigota, observada dentro das células do sistema fagocitário mononuclear em tecidos dos hospedeiros vertebrados (GENARO, 2002).

Os insetos vetores ou transmissores são conhecidos como flebotomíneos. A infecção do inseto ocorre quando a fêmea pica o hospedeiro vertebrado, ingerindo macrófagos infectados por formas amastigotas (Figura 8). Esses macrófagos se rompem liberando as amastigotas, que se transformam rapidamente em promastigotas multiplicando-se no sangue ingerido durante a picada. Após a digestão do sangue as formas promastigotas do parasita são liberadas e vão

colonizar diferentes regiões do tubo digestório do vetor, dependendo da espécie do parasita (LAINSON; SHAW, 1987).

A infecção no hospedeiro vertebrado se estabelece no momento em que a fêmea do flebotomíneo infectada, ao realizar uma outra picada, regurgita formas promastigotas infectantes na pele do homem ou do animal. Algumas dessas formas promastigotas escapam dos mecanismos de defesa inatos do hospedeiro e são fagocitadas por macrófagos da pele, para em seguida se transformarem em formas amastigotas. A seguir, as formas amastigotas liberam-se no meio extracelular e são fagocitadas por outros macrófagos, iniciando-se uma reação inflamatória que será responsável pela manutenção do parasita na pele ou pelo escape para as vísceras, dependendo da espécie de *Leishmania* inicialmente inoculada pelo vetor (GENARO, 2002).

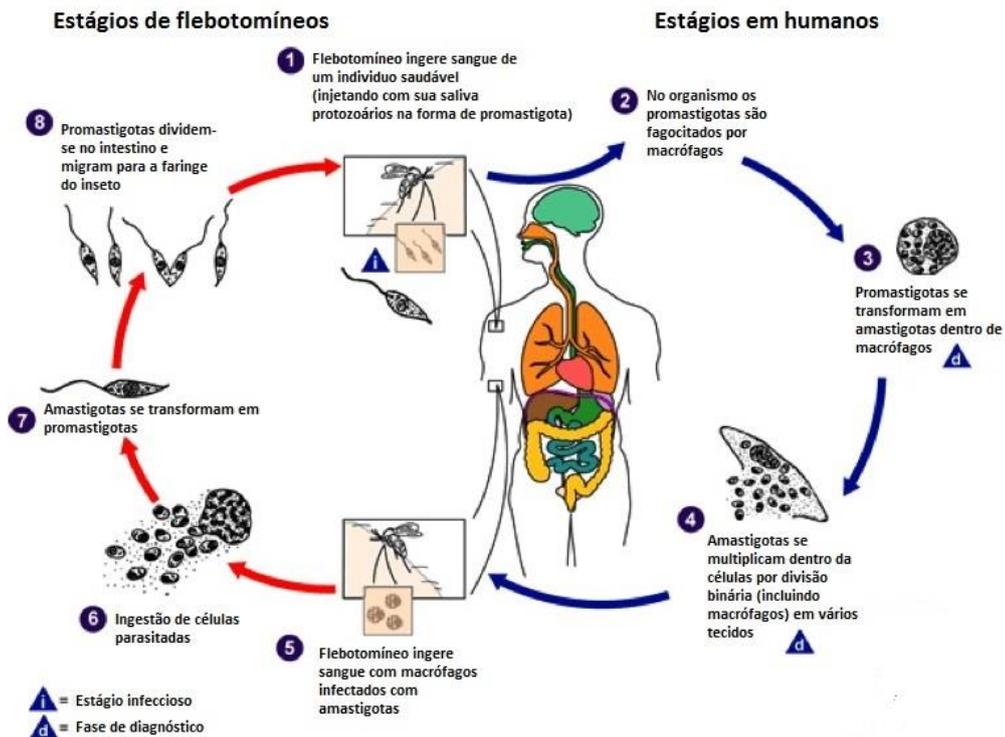


Figura 8 – Ciclo biológico de parasitas do gênero *Leishmania*.

(Imagem disponível em <http://www.cdc.gov/dpdx/leishmaniasis/index.html> acesso em 13/05/2015).

2.1.4 Tratamento das leishmanioses

O fármaco de primeira linha recomendado pela OMS para o tratamento das leishmanioses visceral e tegumentar é o antimoniato de N-metilglucamina (Sb-AMG), também conhecido como antimoniato de meglumina (RATH et al., 2003; LIMA et al., 2010).

Esse fármaco é derivado do antimônio (Sb) e apesar do uso medicinal de compostos de antimônio já ser conhecido desde a antiguidade para diversos fins terapêuticos, coube a um cientista brasileiro, Gaspar de Oliveira Vianna, em 1912, a vanguarda de utilizar um composto antimonial trivalente, o tártaro emético, para o tratamento da leishmaniose tegumentar pela primeira vez (RATH et al., 2003; AMATO, 2006).

Entretanto, devido aos efeitos colaterais e tóxicos deste princípio ativo, como a intolerância gastrointestinal e efeito cardiotoxicos, os compostos de Sb^{III} foram substituídos por compostos antimoniais pentavalente (ULRICH, 1998; MARSDEN, 1985).

Com o objetivo de padronizar o esquema terapêutico, a OMS recomenda que a dose do antimonial pentavalente seja calculada em mg Sb^V/kg/dia, sendo utilizado para tratamento das leishmanioses a dosagem de 10 a 20 mg/Sb^V/kg/dia. Existem dois tipos de antimoniais pentavalentes que podem ser utilizados, o Sb-AMG e o estibogluconato de sódio, sendo este último não comercializado no Brasil (BRASIL, 2010).

De acordo com o Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana (BRASIL, 2010), sugere-se, em lesões cutâneas nas formas localizada e disseminada, a dose de 15 mg Sb^V/Kg/dia, tanto para adultos quanto para crianças durante 20 dias seguidos, nunca ultrapassando a dose máxima de 1,2 g de antimônio para o adulto. A dose máxima para crianças de até 12 anos é estimada em metade da dose máxima para adultos. Se não houver cicatrização completa após três meses do término do tratamento, o esquema deverá ser repetido apenas uma vez, prolongando-se a duração da série para 30 dias.

Nas lesões mucosas, a dose recomendada é de 20 mg Sb^V/Kg/dia durante 30 dias consecutivos, preferencialmente em ambiente hospitalar. Se não houver cicatrização completa após três meses do término do tratamento, o esquema deverá ser repetido apenas uma vez (BRASIL, 2010).

Já para o tratamento da leishmaniose visceral, o Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral (BRASIL, 2014) recomenda a dose de 20 mg de Sb^{V} /Kg/dia, com aplicação endovenosa ou intramuscular, por no mínimo 20 e no máximo 40 dias, utilizando-se o limite máximo de 4,5 g/dia do produto, com bons índices de cura.

Nos casos mais avançados da doença, onde a resposta clínica nos primeiros 20 dias não é evidente, o tempo mínimo de tratamento deverá ser estendido para 30 dias. Tal recomendação baseia-se no fato de que tratamentos por tempo mais prolongado têm sido necessários para lograr índices de cura satisfatórios (BRASIL, 2014).

Nos casos de recidiva da doença, deve ser instituído um segundo tratamento com a mesma dose, porém por tempo mais prolongado (no máximo 40 dias), antes de se rotular o caso como refratário ao tratamento com os antimoniais pentavalente (BRASIL, 2014).

Para ambos os tipos de leishmaniose, quando ocorre uma resposta insatisfatória ou ainda ausência de resposta ao tratamento, o recomendado é a utilização de um dos fármacos de segunda escolha, que no Brasil os disponíveis são: anfotericina B e pentamidina (BRASIL, 2014).

2.2 Antimônio (Sb)

Antimônio (denominação proveniente do latim: *stibium*) é um metal branco prateado com número atômico 51, que é encontrado livremente na crosta terrestre em uma variedade de estados oxidativos (-III, 0, III e V). O Sb^{III} e o Sb^{V} são encontrados em maior quantidade, sendo a forma trivalente considerada 10 vezes mais tóxica que a pentavalente (OKKENHAUG et al., 2011).

As principais aplicações do Sb são de caráter industrial. O Sb elementar pode ser utilizado para a produção de semicondutores, diodos e detectores de infravermelhos. Por causa de sua relativa falta de flexibilidade, é geralmente misturado em ligas para outras aplicações, como por exemplo, na fabricação de baterias de armazenamento de chumbo, solda, chapas e tubos metálicos, rolamentos, peças fundidas e estanho, entre outras (SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2010).

A população em geral é raramente exposta ao antimônio. Em caso de exposição ocupacional, a inalação e o contato com a pele são as principais vias de absorção. O trióxido de antimônio (Sb_2O_3) é a forma comercial mais significativa de compostos antimoniais em todo o mundo, considerando aspectos quantitativos. É usado principalmente como um retardador de chamas na borracha, na produção de plásticos, pigmentos, vidro, têxteis e fogos de artifício (BOECK et al., 2003).

Entretanto, alguns compostos de Sb têm sido usados como medicamentos desde a sua introdução pelo alquimista John de Rupescissa no século XIV, principalmente no tratamento de duas doenças parasitárias, a esquistossomose e a própria leishmaniose (SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2010).

A toxicidade de metais e de seus compostos depende largamente da sua biodisponibilidade e da capacidade de bioacumular-se, ou seja, dos mecanismos de captação através de membranas celulares, distribuição intracelular e ligações a macromoléculas celulares. Além disso, alguns compostos metálicos ainda sofrem transformações metabólicas, tais como redução a estados oxidativos menores ou alquilação. Assim, a avaliação dos efeitos toxicológicos de metais não é simples, o que é especialmente verdadeiro para os mecanismos envolvidos na indução de carcinogenicidade por metais (BEYERSMANN; HARTWIG, 2008).

De forma geral, a genotoxicidade dos metais é causada por mecanismos indiretos. Apesar das diversas propriedades físico-químicas, três mecanismos predominantes se sobressaem e parecem ser comuns a alguns metais: 1) interferência com regulação celular redox e indução de estresse oxidativo, o qual pode causar dano oxidativo ao DNA (do inglês desoxirribonucleic acid) ou desencadear cascatas sinalizadoras que levam a estimulação do crescimento celular; 2) inibição do principal sistema de reparo do DNA, resultando em instabilidade genômica e acúmulo de mutações críticas; e 3) desregulação da proliferação celular pela indução de vias sinalizadoras ou inativação de controles de crescimento, tais como os genes supressores de tumor (BEYERSMANN; HARTWIG, 2008).

Outra provável forma de carcinogenicidade induzida por metais é através da indução de quebras simples no DNA. Apesar desse tipo de lesão ser, de modo geral, rapidamente reparada, representa uma forma de dano que pode levar ao câncer (ROJAS et al., 1996).

Ao que se sabe, as características químico-toxicológicas do Sb se

assemelham às do arsênio (As). No estado trivalente, ambos são clastogênicos, ou seja, induzem a fragmentação de estruturas cromossômicas, e apresentam um potencial cancerígeno tanto *in vitro* quanto *in vivo*, mas não induzem mutações de gene *in vitro*. Em humanos, as evidências são insuficientes para a carcinogenicidade do Sb_2O_3 e do trissulfeto de antimônio (Sb_2S_3), mas há provas suficientes para a carcinogenicidade do Sb_2O_3 e limitada do Sb_2S_3 em animais experimentais (BOECK et al., 2003). A partir desses pressupostos, prospectado no campo da biossegurança, se decidiu classificar o Sb_2O_3 como possível agente cancerígeno para os seres humanos (Grupo 2B), enquanto que para o Sb_2S_3 não fora atribuída propriedade carcinogênica (Grupo 3) (IARC, 1989).

Não obstante, a exposição por inalação a certos compostos de antimônio tem sido relatada como causadora de tumores de pulmão em roedores e trabalhadores de fornos de fundição. Deve-se, contudo, salientar que, tanto em sistemas experimentais, bem como em trabalhadores, a exposição simultânea a outros compostos cancerígenos como o As, não pode ser excluída (BOECK et al., 2003).

Apesar do Sb^{III} ser considerado agente clastogênico, não é reconhecido como mutagênico. A forma trivalente acumula-se, em geral, em órgãos vascularizados, principalmente rins e fígado, além de possuir grande afinidade pelo baço e pelo sangue. Uma quantidade expressiva de Sb no sangue pode ser relacionada com a grande afinidade do Sb^{III} pelos eritrócitos (RATH et al., 2003).

Há pouco conhecimento sobre o mecanismo genotóxico do Sb. Entretanto, existem evidências de que o Sb^{III} atua inibindo enzimas envolvidas no reparo do DNA. Estudos *in vitro* e *in vivo* relatam efeitos genotóxicos e mutagênicos em linhagem de células fibroblásticas de pulmão de hamster (V79) e em camundongos quando estes foram expostos a níveis elevados de Sb, tais como a indução de micronúcleo, quebras de fita dupla de DNA e aberrações cromossômicas (GEBEL, 1998; GURNANI et al., 1992).

Azacura et al. (2009) avaliaram a genotoxicidade do Sb utilizando células pulmonares de hamster. Foram realizados testes de proliferação celular e de instabilidade cromossômica numérica com concentrações de 5, 10, 20, 30, 40 e 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Sb e, em ambos os testes, os resultados apresentaram efeito genotóxico nas duas maiores concentrações analisadas.

2.3 Antimoniato de N-metilglucamina (Sb-AMG)

No Brasil, o Sb-AMG é fornecido pelo Ministério da Saúde (MS) e apresenta-se comercialmente em ampolas de 5 mL contendo 1,5 g do antimoniato bruto, o que corresponde a 405 mg de Sb^V. Portanto, cada mL do medicamento contém 81 mg de Sb^V (BRASIL, 2014).

O Sb-AMG é absorvido escassa e lentamente pelo trato digestório. Por outro lado, quando administrado por via parenteral, apresenta boa absorção, que corrobora positivamente com sua ação antileishmânica, atingindo níveis plasmáticos bem mais elevados que aqueles registrados com os antimoniais trivalentes. Outros estudos farmacocinéticos apontam para um volume de distribuição aparente maior nos tecidos hepático e esplênico, além de elevada taxa de excreção urinária (90%) nas primeiras 48 horas após sua administração (SILVA, 1994).

As aplicações do Sb-AMG devem ser realizadas por via parenteral (intramuscular ou endovenosa), preferencialmente no final do dia, para possibilitar o repouso após a aplicação. A via intramuscular pode apresentar o inconveniente da dor local. Sugere-se então alternância dos locais de aplicação. Por via endovenosa, não há necessidade de diluição e a aplicação, com agulha de fino calibre (25 x 8), deve ser lenta (5 minutos). Esta é a melhor via, pois permite a aplicação de doses mais adequadas sem o inconveniente da dor local (BRASIL, 2010; AVENTIS PHARMA, 2006).

O Sb-AMG é obtido sinteticamente a partir do ácido antimônico e da N-metilglucamina e o seu mecanismo de ação ainda não está totalmente elucidado, bem como sua estrutura química (Figura 9). Sabe-se, porém, que atua nas formas amastigotas do parasita, inibindo sua atividade glicolítica e a via oxidativa de ácidos graxos (RATH et al., 2003; BRASIL, 2014).

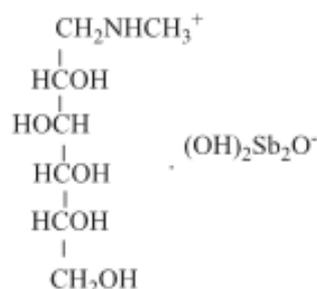


Figura 9 – Proposta da estrutura química do antimoniato de N-metilglucamina.

Fonte: RATH et al., 2003.

Quanto à ação do Sb-AMG, existem indícios de que o Sb^{III} seja mais eficaz que o Sb^V contra as formas promastigotas e amastigotas de pelo menos três espécies de *Leishmania*. Esses resultados reforçam a hipótese de uma conversão metabólica intramacrofágica do Sb^V em Sb^{III}, sendo, neste caso, o Sb^{III} o elemento tóxico às leishmanias no estado intracelular. Miekeley et al. (2002) verificaram que após administração intramuscular de Sb-AMG em pacientes com leishmaniose, ocorre conversão *in vivo* do composto orgânico estibiado para as formas iônicas Sb^{III} e Sb^V. Também foi observado biorredução do Sb^V para a sua forma trivalente, corroborando com outros estudos que evidenciam que a formação *in vivo* do Sb^{III} seja responsável tanto pela toxicidade do fármaco como pela atividade terapêutica do mesmo. Assim, Roberts et al. (1998), sugerem que o Sb^V possa ser um pró-fármaco, transformando-se na forma trivalente no local de ação.

Nos últimos anos, doses progressivamente maiores dos antimoniais têm sido recomendadas pela OMS e pelo Centro de Controle de Doenças dos Estados Unidos da América, devido ao aparecimento de resistência primária do parasita a esses fármacos, principalmente em países como Sudão, Quênia e Índia (BRASIL, 2014).

2.4 Toxicidade do tratamento

Os efeitos colaterais mais comumente descritos do Sb-AMG são, em ordem de frequência: artralgia, mialgia, inapetência, náuseas, vômitos, plenitude gástrica, epigastralgia, dor abdominal, prurido, febre, fraqueza, cefaleia, tontura, palpitação, insônia, nervosismo, choque pirogênico, edema, insuficiência renal aguda e erupção de herpes zoster (AVENTIS PHARMA, 2006).

Essas queixas são geralmente discretas ou moderadas e raramente exigem a suspensão do tratamento. Porém, nas doses de 20 mg/Sb^V/Kg/dia, o antimonial pode atingir o limiar de toxicidade, podendo levar a alterações cardíacas e/ou renais que obriguem a interrupção do tratamento, existindo na literatura casos descritos de curso letal. Por isso, deve-se proceder com acompanhamento eletrocardiográfico semanal e avaliação da função renal, especialmente em pacientes acima de 50 anos de idade (BRASIL, 2010).

Algumas vezes, no início do tratamento, há uma exacerbação do quadro clínico, com aumento do infiltrado, da secreção nasal e faríngea e do eritema das

lesões. Presume-se que isto ocorra devido a uma resposta aos antígenos liberados com a morte do parasita (reação de tipo Jarich-Herxheimer). Em casos de lesões de laringe, podem ocorrer edema e insuficiência respiratória aguda. Por isso, é aconselhável que a medicação seja administrada por equipe especializada, em ambiente hospitalar e com possibilidade de se realizar traqueostomia de urgência (BRASIL, 2010).

Estudos envolvendo o Sb-AMG são escassos, levando-se em consideração parâmetros genotóxicos. Estudos *in vitro* não apontaram dano à molécula de DNA em linfócitos humanos, entretanto, o mesmo estudo realizou análise *in vivo* utilizando camundongos e constatou que o Sb-AMG induziu dano no DNA (LIMA et al., 2010).

2.4.1 Processos homeostáticos e de toxicidade celulares

2.4.1.1 Ciclo celular e processo homeostático

Considerando-se o processo mitótico, uma célula se reproduz ao executar uma sequência organizada de eventos em que ela duplica seu conteúdo para, então, resultar em um cômputo final de duas células idênticas. Esse ciclo de duplicação e divisão, conhecido como ciclo celular, tem como função básica duplicar, de forma fidedigna, toda a estrutura de DNA dos cromossomos e segregar, com precisão, as cópias em duas células filhas geneticamente idênticas (ALBERTS et al., 2010).

A duplicação dos cromossomos acontece durante a fase S onde ocorre um direcionamento para a síntese de DNA, e que requer de 10 a 12 horas para que se efetue integralmente, ocupando assim, cerca de metade do tempo do ciclo celular de uma célula típica de mamífero. Após a fase S, a segregação dos cromossomos e a divisão celular ocorrem na fase M que compreende a divisão celular (mitose) e a divisão citoplasmática (citocinese) e tem duração de aproximadamente uma hora (SCHAFER, 1998).

Na mitose, as cromátides irmãs são separadas e segregadas a um par de núcleos-filhos idênticos, cada um com sua própria cópia do genoma. A mitose é tradicionalmente dividida em cinco estágios: prófase (os cromossomos se condensam), prometáfase (desintegração do envelope nuclear), metáfase (cromossomos ligados aos microtúbulos a meio caminho dos polos do fuso), anáfase

(separação das cromátides irmãs formando dois cromossomos filhos, sendo cada um deles puxado em direção ao polo do fuso ao qual está ligado) e telófase (os dois cromossomos filhos se descondensam e um novo envelope nuclear é formado ao redor de cada conjunto). Uma vez concluída a mitose, o segundo principal evento da fase M, a citocinese, divide a célula em duas metades, cada uma com um núcleo idêntico (ALBERTS et al., 2010).

A maioria das células necessita de muito mais tempo para crescer e duplicar sua massa de proteínas e organelas do que o necessário para duplicar os seus cromossomos e se dividir. Por esse motivo, a maioria dos ciclos celulares possui fases de intervalo extras: a fase G_1 , entre a fase M e a fase S, com duração de nove horas, e a fase G_2 , entre a fase S e a mitose, com duração de até quatro horas (Figura 10) (BRANZEI; FOIANI, 2008).

Em G_1 , as células também monitoram o ambiente interno e externo a fim de assegurar as condições adequadas para a replicação do DNA. Se as condições são desfavoráveis, as células retardam a progressão de G_1 e podem entrar em um estado de repouso conhecido como G_0 e permanecer por um tempo indeterminado antes de retomar à proliferação, ou ainda, ficar permanentemente em G_0 até que elas ou o organismo morram (SCHAFER, 1998).

O crescimento celular e a preparação para as células entrarem em mitose ocorrem em G_2 . Como durante a replicação pode ocorrer de ficarem lacunas ou quebras de fita dupla no DNA, este intervalo serve justamente para realizar o reparado antes da célula entrar em mitose (BRANZEI; FOIANI, 2008).

As células eucarióticas desenvolveram uma complexa rede de proteínas reguladoras, conhecida como sistema de controle, o qual coordena a progressão do ciclo celular. Esse sistema assegura que os eventos sejam devidamente sincronizados e ocorram de forma correta e ordenada. Para tanto, ele responde a vários sinais intracelulares e extracelulares e interrompe o ciclo quando encontra condições ambientais ou intracelulares desfavoráveis, como alguma falha metabólica ou de sinalização (ALBERTS et al., 2010).

Os componentes centrais do sistema de controle do ciclo celular são membros de uma família de cinases conhecidas como cinases dependentes de ciclinas (Cdks) (Figura 10). As atividades dessas cinases variam conforme o avanço da célula no ciclo celular, levando a mudanças cíclicas na fosforilação de proteínas

intracelulares (pRBs) que iniciam ou regulam os principais eventos do ciclo celular (MALUMBRES; BARBACID, 2009).

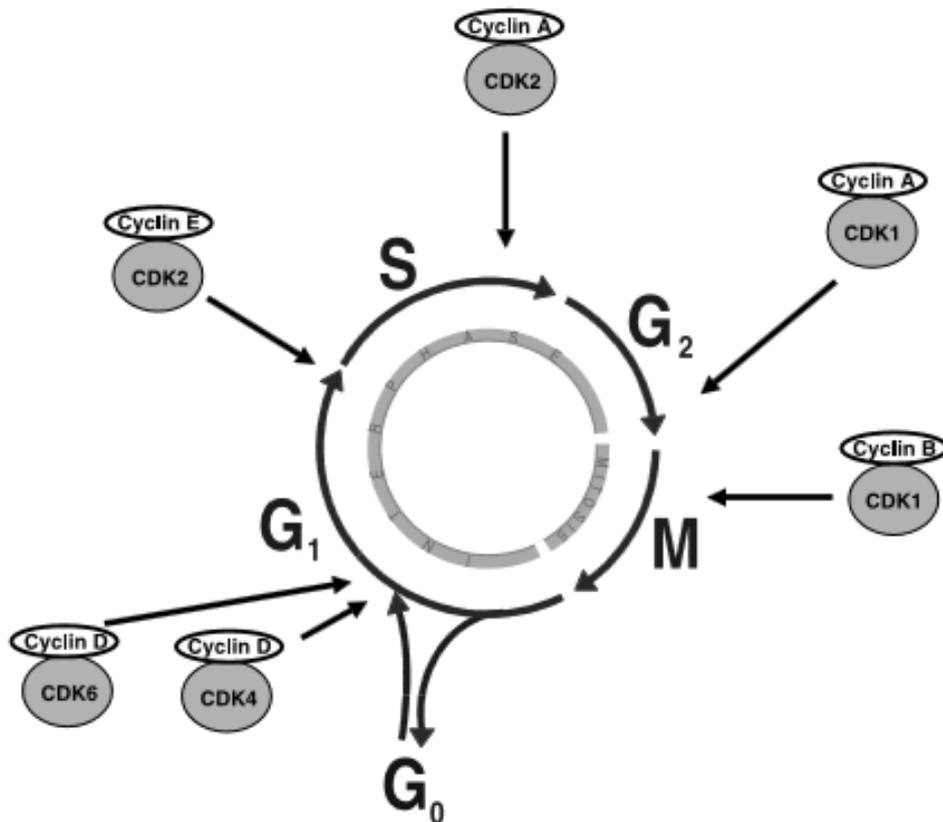


Figura 10 – Fases do ciclo celular com indicação do local de ação dos complexos Cdk-ciclina reguladoras.

Fonte: VERMEULEN et al., 2003.

As mudanças cíclicas na atividade das Cdks são controladas por um complexo arranjo de enzimas e outras proteínas que regulam essas cinases. O mais importante desses reguladores das Cdks são proteínas conhecidas como ciclinas. Como as Cdks são dependentes de ciclinas, elas só entrarão em atividade se estiverem fortemente ligadas a uma ciclina, caso contrário, elas não apresentam atividade cinásica (ALBERTS et al., 2010).

As ciclinas são sintetizadas e catabolizadas em tempos específicos durante o ciclo celular, regulando, assim, a atividade das Cdks. As células humanas contêm vários complexos Cdk-ciclina, mas apenas alguns estão diretamente envolvidos na condução do ciclo celular. Entre eles, cita-se: três Cdks interfase (Cdk2, Cdk4 e Cdk6) e uma Cdk mitótica (Cdk1, também conhecido como proteína de controle de divisão celular 2 - Cdc2) (MALUMBRES; BARBACID, 2009).

Outra proteína de relevante participação no processo regulatório do ciclo celular é a p53. Esta proteína está envolvida na regulação do ponto de checagem de G₁, que é fundamental à manutenção da integridade do genoma, pois permite a ação de mecanismos de reparo do DNA ou a remoção de células danificadas através do processo de apoptose. Danos no DNA promovem a superexpressão e consequente ativação da p53, permitindo a iniciação do processo (LEMOINE, 1990).

Existem fortes evidências da participação da proteína p53 na supressão da tumorigênese, uma vez que a maioria dos cânceres apresenta mutações no p53 ou defeitos em sua regulação. Mutações no gene p53 resultam em um descontrole do ponto de checagem de G₁, possibilitando que células danificadas progridam para a fase S sem reparar as lesões, ou entrar em apoptose (AGARWAL et al., 1998).

Contudo, uma lesão celular pode ser reversível, até certo ponto, e recuperar-se a fim de manter a funcionalidade celular. Entretanto, se o estímulo nocivo persistir, ou for muito intenso desde o início, a célula tende a sofrer alterações de maior magnitude, de forma a se deflagrar uma condição de irreversibilidade, com uma progressão à condição de morte celular, que é um dos eventos mais cruciais na evolução de quadros patológicos ou condições clínicas relevantes, ampliando sua área de domínio para tecidos e ou órgãos que as insere. Por outro lado, a morte celular também se constitui de um processo fisiológico e essencial na embriogênese, no desenvolvimento dos órgãos e na manutenção da homeostasia corporal (ROBBINS; COTRAN, 2010).

O desenvolvimento de células tumorais, além do arrazoado até aqui, também é caracterizado por uma desregulação do crescimento e diferenciação celulares. Assim, xenobióticos, como compostos metálicos considerados cancerígenos, podem alterar o crescimento celular por mecanismos distintos, tanto estimulando a expressão de fatores que estimulam o crescimento quanto inativando mecanismos de controle do crescimento (BEYERSMANN; HARTWIG, 2008).

2.4.1.2 Necrose e Apoptose

Existem duas vias principais de morte celular: a necrose e a apoptose, ambas desencadeadas por agressões intracelulares ou extracelulares. O processo de necrose ocorre principalmente devido às perturbações externas e não fisiológicas, enquanto que o processo de apoptose pode ocorrer através das vias extrínseca

(citoplasmática) ou intrínseca (mitocondrial) (PAROLIN; REASON, 2001; AMARANTE-MENDES, 2003; GRIVICICH et al., 2007).

Em relação à necrose celular, pode-se inferir que é um processo metabólico e morfológico gerado a partir de um determinado insulto à célula e que induz a sua morte. Estas agressões às células podem ocorrer por meio de agentes físicos (temperatura, radiação e ação mecânica, principalmente), agentes químicos (substâncias tóxicas) e agentes biológicos, como bactérias, vírus, leveduras, fungos e parasitas intestinais e teciduais, incluindo-se aqui o tecido sanguíneo (GUIDUGLI-NETO, 1997).

Neste processo, as células apresentam um aumento do volume celular, agregação da cromatina, desorganização do citoplasma, com formação de agregados amorfos, vacuolização, perda da integridade da membrana plasmática e consequente ruptura celular (Figura 11). Durante a necrose, o conteúdo celular é liberado, causando dano às células vizinhas e uma reação inflamatória local (ZIEGLER; GROSCURTH, 2004).

No processo necrótico, não há um controle sobre o número de células que serão objeto de sua ação. Sendo, portanto, a amplitude da população celular afetada de acordo com o tipo e intensidade da agressão celular imputada. Outrossim, o processo apoptótico é controlado e dependente de energia, podendo ser reduzido a instalação em uma única célula ou mesmo em grupos celulares (FABRIS, 1992).

Em relação à mecanística geral do processo necrótico, é bem estabelecido que o mesmo se desencadeia por diferentes vias, contudo, se reconhece duas como sendo principais, a saber: 1) Interferência no fornecimento de energia celular; e 2) Dano direto às membranas, que pode ser proveniente da ação enzimática da própria célula em curso necrótico – autólise, ou em consequência da ação de enzimas extracelulares, advindas de macrófagos e leucócitos que aportam ao local do centro necrótico – heterólise (ELMORE, 2007).

Dentro do ambiente celular, a organela que apresenta ação crítica no processo de necrose é a mitocôndria, que sofre tumefação devido a precipitação de cristais de fosfato de cálcio. Neste ponto, a mitocôndria não consegue responder adequadamente à demanda energética, uma vez que há prejuízo na manutenção do equilíbrio de seus gradientes iônicos e da fosforilação oxidativa. Com a depleção de adenosina trifosfato (ATP) e consequente disfunção das bombas de íons da membrana plasmática, as células entumecidas pelo influxo de água acabam se

rompendo. A lise libera conteúdo intracelular para o meio extracelular tais como lipídeos, proteases e moléculas de baixo peso molecular que, de um modo geral, são dotadas de propriedades pró-inflamatórias. Esses eventos corroboram com a diapedese de leucócitos, principalmente macrófagos, para a remoção dos detritos celulares e resolução da lesão (COHEN, 1999).

Além das alterações nas membranas e organelas celulares - principalmente mitocondriais, ocorrem alterações ao nível de núcleo celular, que podem ser traduzidas por três eventos: 1) picnose, onde o núcleo apresenta um volume reduzido e torna-se hipercondensado tendo sua cromatina condensada; 2) cariórrexe, evento que a cromatina adquire uma distribuição irregular, podendo se acumular em grumos na membrana nuclear e há perda dos limites nucleares; e 3) cariólise ou cromatólise, onde se constata dissolução da cromatina e perda da coloração do núcleo, o qual desaparece completamente (GUIDUGLI-NETO, 1997).

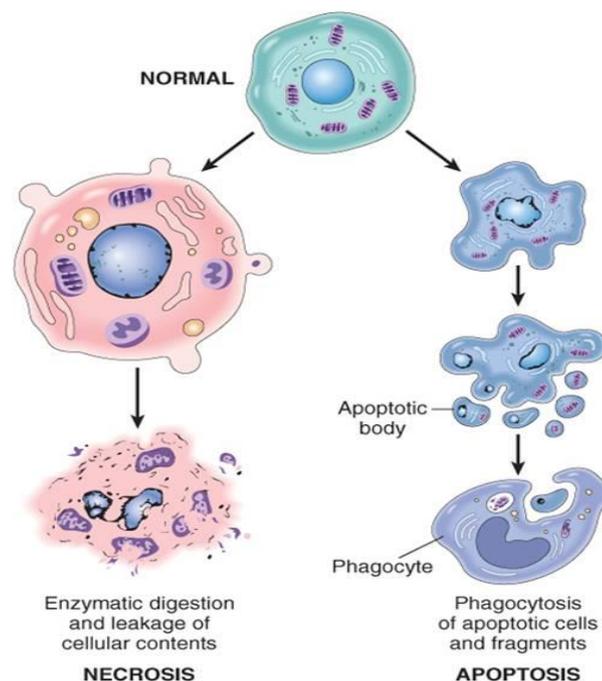


Figura 11 – Diferenças morfológicas da necrose e da apoptose.

Fonte: ROBBINS e COTRAN, 2010.

Quanto à apoptose é bem estabelecido que é um processo ativo fundamentado pela autodigestão controlada dos constituintes celulares, devido a ativação de proteases intracelulares e endonucleases, sendo comparada, metaforicamente, a um "suicídio celular". A ativação dessas proteases compromete

a integridade do citoesqueleto, provocando verdadeiro colapso da estrutura celular. Em resposta à contração do volume citoplasmático, a membrana celular forma bolhas e acaba por comprometer a conformação de seus lipídeos e, por extensão, a fisiologia membrano-celular (PAROLIN; REASON, 2001).

O processo apoptótico divide-se em três fases: a fase de iniciação, a fase efetora e a fase de degradação. A fase de iniciação é caracterizada por depender do tipo de estímulo apoptótico recebido pela célula pelas vias intrínseca ou extrínseca. A primeira fase influencia a eficácia das fases subsequentes (efetora e de degradação). Na fase efetora, ocorre a ativação da cascata de caspases, constituída da ativação de proteases, nucleases, e de outros intermediários que participam dessa fase. E na fase de degradação, a célula adquire as características bioquímicas e morfológicas características do processo em si (GREEN; KROEMER, 1998).

Durante a apoptose ocorrem alterações características no núcleo celular graças à ativação de endonucleases que degradam a molécula de DNA. Como resultado, o núcleo torna-se picnótico e a cromatina se condensa nas porções adjacentes à membrana nuclear. Finalmente, o núcleo entra em colapso e se fragmenta. Simultaneamente, as bolhas que se formam no citoplasma separam a célula em fragmentos circundados por membrana, contendo partes do núcleo e organelas intactas, que passam a ser denominadas de corpos apoptóticos (Figura 11). Os restos celulares são então fagocitados pelos macrófagos teciduais ou por células adjacentes (THOMPSON, 1999).

Um dos aspectos que distingue a apoptose da necrose é a preservação da integridade da membrana plasmática na primeira, que evita a liberação dos constituintes celulares para o meio extracelular e, conseqüentemente, a modulação da intensidade da resposta de quimiotaxia e de ativação de células fagocíticas. No entanto, algumas vezes, a apoptose e a necrose coexistem; além disso, a apoptose induzida por alguns estímulos patológicos pode progredir para a necrose (PAROLIN; REASON, 2001).

Células em curso de processo apoptótico não apenas possuem uma característica morfológica peculiar, mas também alterações bioquímicas características, que podem ser usadas para identificá-las. Dentro deste contexto, o fosfolípido fosfatidilserina, carregado negativamente, é localizado exclusivamente na camada interna da bicamada lipídica da membrana plasmática, mas se desloca

para a camada externa nas células apoptóticas, onde pode servir como marcador dessas células. Assim, a fosfatidilserina da superfície celular atua como um biossinalizador para as células vizinhas e macrófagos fagocitarem a célula morta (PALLARDY et al., 1999).

Quanto aos mecanismos apoptóticos, são reconhecidamente complexos e sofisticados, envolvendo uma cascata de eventos moleculares, onde as caspases, enzimas proteolíticas que ganham notoriedade por serem cruciais na catálise do citoesqueleto e da ativação de endonucleases, são protagonistas do processo em todas as células animais nucleadas, onde estão presentes, antes da deflagração do processo apoptótico, como pró-caspases (ELMORE, 2007).

As células utilizam ao menos duas vias distintas para ativar as pró-caspases iniciadoras e disparar a cascata de caspases levando à apoptose: a via extrínseca, ativada pelo acoplamento de ligantes extracelulares a receptores de morte na superfície celular; e a via intrínseca, ativada por biossinalização deflagrada a partir de estresse ou dano celulares (Figura 12) (BENN; WOOLF, 2004).

Na via extrínseca, os receptores de membrana envolvidos no processo apoptótico pertencem à superfamília dos receptores de fatores de necrose tumoral (rTNF). O TNF (fator de necrose tumoral) é um dos principais mediadores do fenómeno de apoptose, bem como de processos bastante importantes tais como respostas inflamatórias e imunitárias (CHEN et al., 2002).

Todos os membros da família rTNF possuem um subdomínio extracelular rico em cisteína, o qual permite que eles reconheçam os seus ligantes além de uma região citoplasmática, chamada domínio de morte ("death domain"), essencial para transdução intracelular do sinal apoptose. Entre esses receptores, um dos mais estudados e melhor caracterizado é o receptor Fas, que forma um complexo com o seu respectivo ligante (FasL) agindo na regulação fisiológica do processo apoptótico (BUDIARDJO et al., 1999; FAUBION; GORES, 1999).

Os receptores de membranas específicos do TNF são denominados por TNF-R1 e TNF-R2, sendo que ao longo dos tempos inúmeras abordagens experimentais revelaram que o TNF-R1 é o responsável pela maioria das atividades biológicas relacionadas com o TNF. Assim, a ligação do TNF ao TNF-R1, provoca uma série de eventos intracelulares cujo resultado final implica a ativação de dois fatores de transcrição: o fator nuclear kappa B (NF-kB) e o c-Jun. O primeiro, relacionado a ativação de genes antiapoptóticos, como FAP1, cFLP, IAP/XIAP, Gadd45, TRAF 1/2,

BCL-X e A1; e o segundo, na ativação de genes pró-apoptóticos, como p53 (BAX), FAS, FASL e BIM/HRK (CHEN et al., 2002).

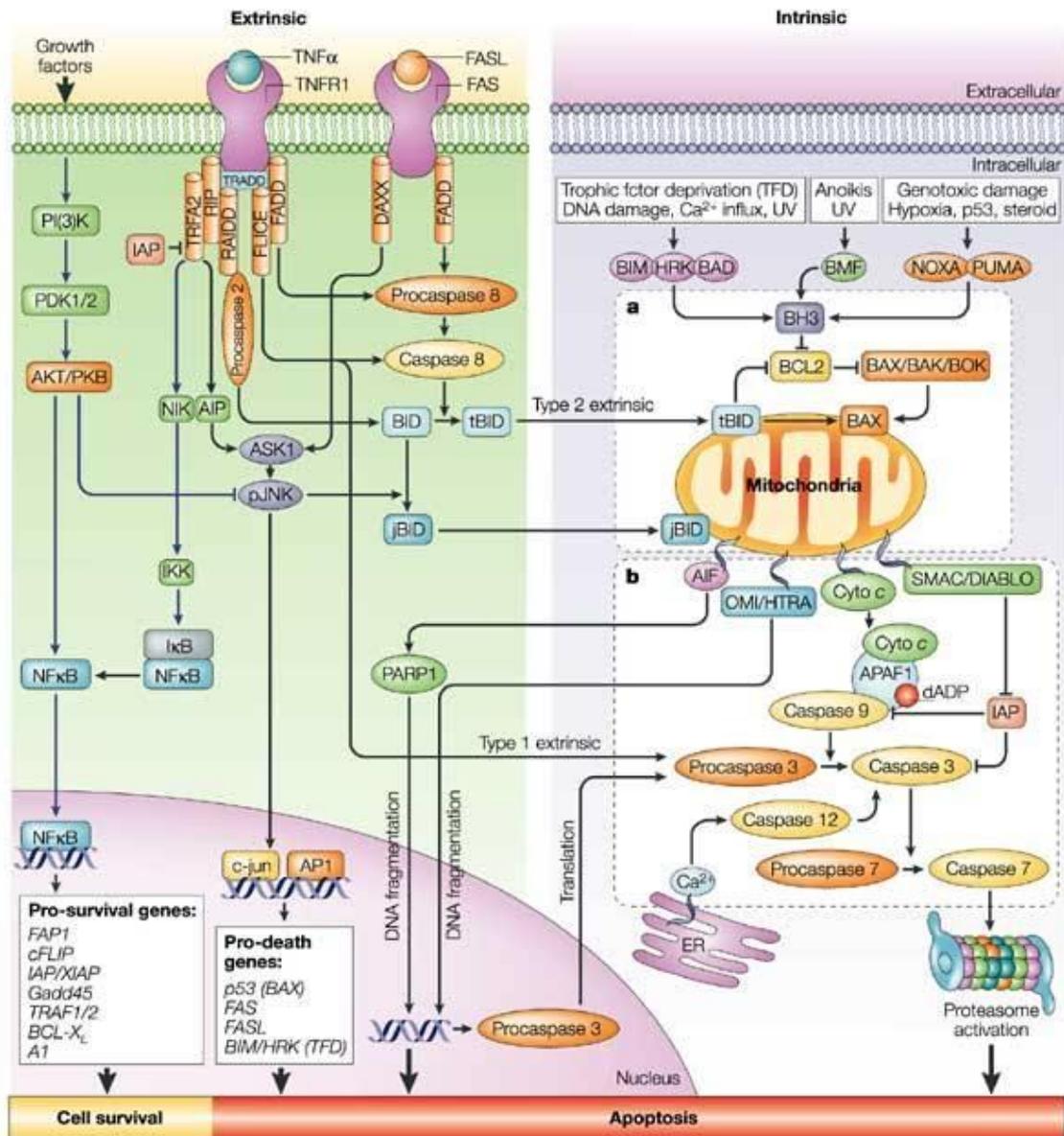


Figura 12 – Indução da apoptose pela via receptores de morte e por via intrínseca.
Fonte: BENN e WOOLF, 2004.

Os sinais que são transduzidos em resposta aos estímulos pró-apoptóticos na via intrínseca, convergem, principalmente, para a mitocôndria. Essa organela integra os estímulos de morte celular, induzindo a permeabilização mitocondrial e consequente liberação de moléculas pró-apoptóticas (Bax e Bid) nela presentes. Essas proteínas são membros da família de proteínas Bcl-2, que exercem

importante função reguladora da apoptose, tanto como indutoras quanto repressoras do processo (DESAGHER; MARTINOU, 2000).

Alguns membros da família Bcl-2 inibem a apoptose ao prevenir a liberação de citocromo-c mitocondrial. Por essa razão são chamados de reguladores antiapoptóticos. A expressão de Bcl-2 é capaz de inibir a geração de espécies reativas do oxigênio e a acidificação intracelular, bem como estabilizar o potencial de membrana da mitocôndria (BORNER, 2003).

Entre os diferentes genes em questão, os mais detalhadamente estudados são os bloqueadores Bcl-2 e Bcl-XL e os promotores Bax, Bcl-XS, Bad e Bak. Uma particularidade interessante consiste no fato de o Bcl-XL e Bcl-XS serem, efetivamente, codificados por ácido ribonucleico mensageiro (mRNA) de um só gene: o Bcl-X. Este gene pode ser transcrito numa forma longa (Bcl-XL) cuja proteína bloqueia a apoptose, ou numa forma curta (Bcl-XS) cuja proteína promove a apoptose (BOUDET et al., 1996).

As proteínas que contêm uma região transmembrana, do tipo Bcl-2, Bcl-XL e Bax, localizam-se nas membranas intracitoplasmáticas (membrana nuclear, retículo endoplasmático rugoso e, particularmente, mitocôndrias), enquanto as proteínas sem região transmembrana, como a Bad e a Bid, existem no citosol. A diferente localização subcelular dos membros da família Bcl-2 sugere, de imediato, mecanismos diferentes de participação na regulação da apoptose, independentemente da qualidade de bloqueador ou promotor (BOUDET et al., 1996).

Dentre as proteínas pró-apoptóticas, destacamos a Bax, a Bid e a Bak. A homeostasia celular é mantida pelo equilíbrio de diversos fatores, o que inclui o controle da expressão e ativação de proteínas antiapoptóticas e pró-apoptóticas. Estímulos, como dano ao DNA, levam ao aumento na expressão das proteínas pró-apoptóticas e esse desequilíbrio induz à apoptose (PETROS et al., 2004).

Adicionalmente, sabe-se que alguns membros da família Bcl-2 contêm regiões onde se localizam sequências ricas em serina, alvos potenciais de fosforilação, como Bad que, uma vez fosforilada, induz a dissociação dos heterodímeros Bcl-2/Bad, promotores de apoptose, e, conseqüentemente, disponibiliza Bcl-2 para dimerizações bloqueadoras. As conseqüências funcionais da fosforilação de Bad favorecem a noção de que modificações pós-translacionais de

alguns membros da família Bcl-2 podem constituir um nível adicional de regulação da apoptose (ABASTADO, 1996).

A translocação das proteínas pró-apoptóticas para a mitocôndria resulta na liberação para o citosol do citocromo-c, presente no espaço existente entre a membrana mitocondrial externa e interna. No citosol, o citocromo-c forma um complexo com o fator ativador da apoptose 1 levando à ativação da caspase-9, que ativa caspases efetoras. Portanto, a ativação das caspases pode ser desencadeada via receptores da morte ou via disfunção mitocondrial, com liberação do citocromo-c (PAROLIN; REASON, 2001).

No entanto, o citocromo-c liberado pelas mitocôndrias requer a presença de outros fatores citosólicos para a propagação do estímulo apoptótico. Alguns destes componentes citosólicos foram, também recentemente, caracterizados e parecem funcionar num complexo que associa o citocromo-c, um "fator citosólico associado à apoptose" (Apaf-1) e à procaspase-9; sabe-se que a formação deste complexo na presença de ATP resulta na ativação da caspase-9 e, subsequentemente, de uma cascata de caspases (GARLAND; RUDIN, 1998).

Yu et al. (2002) descobriram que a libertação de uma citotoxina mitocondrial promove o processo apoptótico através da ativação da enzima nuclear poli(ADP-ribose) polimerase 1 (PARP-1). Esta enzima é altamente expressa no núcleo e catalisa a conversão do nicotinamida-adenina-dinucleotídeo (NAD⁺) em nicotinamida e poli(ADP-ribose), sendo que em condições homeostáticas este enzima participa em ações de reparação e replicação do DNA bem como na regulação destes processos. Além disto, em resposta a fatores de estresse oxidativo, tóxicos para o genoma, a atividade catalítica do PARP-1 aumenta substancialmente e parece ser crucial para a manutenção da integridade genômica. No entanto, uma hiperativação desta enzima tende a esgotar as reservas celulares de NAD⁺ e ATP, o que concorre para um prejuízo energético tão significativo que induz a célula à morte.

Entretanto, há evidências de que as duas vias podem estar ligadas e que moléculas de uma via podem influenciar a outra. Ambas as vias convergem para o mesmo terminal, ou via de execução (IGNEY; KRAMMER, 2002).

As alterações moleculares nas células advindas de um câncer começam a ser compreendidas e relacionadas aos mecanismos que regulam a divisão celular normal, a proliferação e a morte celular. Mudanças nos genes que regem a apoptose

acarretam em um maior acúmulo de células neoplásicas por induzir uma elevada taxa de crescimento celular e diminuição nos níveis de destruição das células mutadas (IGNEY; KRAMMER, 2002).

2.4.2 Genotoxicidade

A genotoxicidade estuda os processos que alteram a base genética da vida, quer seja em sua estrutura físico-química, o DNA, quer seja na alteração do determinismo genético ao nível celular ou orgânico, identificados respectivamente como carcinogênese e teratogênese (SILVA et al., 2003).

2.4.2.1 DNA – Estrutura

Há pouco mais de 50 anos os cientistas descobriram os genes, onde estão contidas as informações hereditárias passadas de geração a geração, constituídos pelo ácido desoxirribonucleico, o DNA, sendo considerada a principal das macromoléculas biológicas, como um repositório das informações genéticas. As sequências de nucleotídeos do mesmo codificam estruturas primárias de todos os RNA (do inglês ribonucleic acid) e proteínas celulares e, por meio de enzimas, pode afetar indiretamente a síntese de todos os constituintes celulares (ALMEIDA, 2006).

DNA consiste de duas cadeias helicoidais que se enrolam ao redor do mesmo eixo formando uma dupla hélice. As desoxirriboses ficam externas em relação às bases nitrogenadas, expostas ao meio aquoso. O espaço entre uma fita e outra forma um sulco que é ligado por pareamento de bases nitrogenadas através de pontes de hidrogênio (MARZZOCO; TORRES, 1999).

As bases nitrogenadas derivadas das purinas são a adenina (A) e a guanina (G), e as derivadas das pirimidinas são a citosina (C) e a timina (T). O pareamento das bases de cada fita se dá de maneira específica, de forma que uma purina sempre seja pareada com uma pirimidina, especificamente: adenina (A) com timina (T) e citosina (C) com guanina (G). A dupla hélice de DNA é, portanto, mantida por duas forças: as pontes de hidrogênio formadas entre as bases complementares e por interações hidrofóbicas (Figura 13) (SILVA et al., 2003).

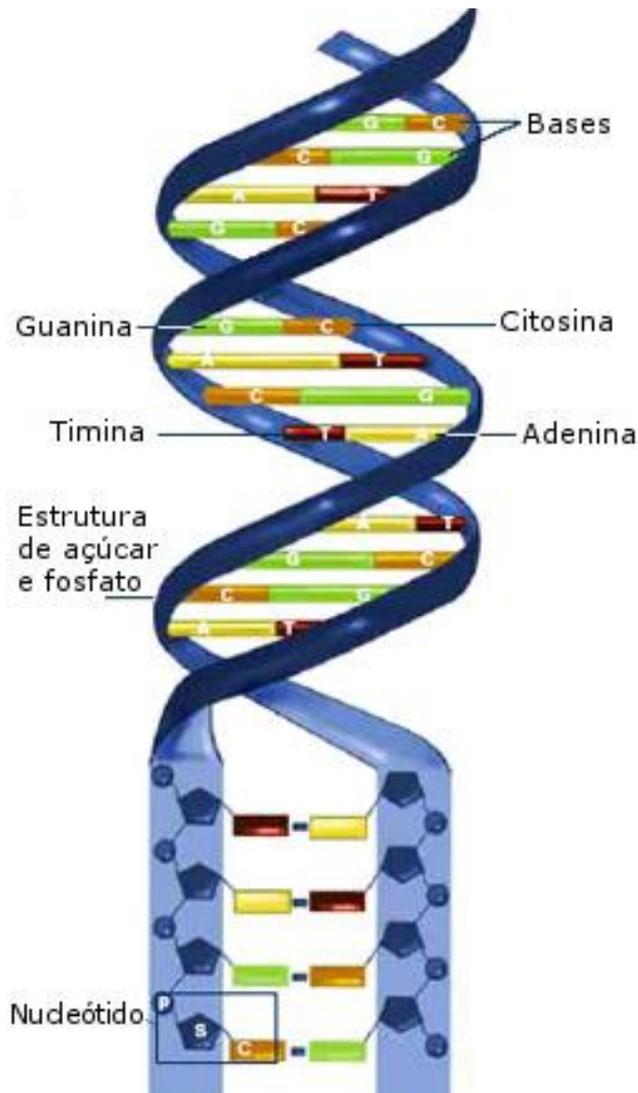


Figura 13 – Estrutura do DNA.

(Imagem disponível em <http://publications.nigms.nih.gov/thenewgenetics/chapter1.html>, acesso em 06/06/2015).

2.4.2.2 Danos e sistemas de reparo do DNA

No decorrer da vida, o DNA sofre alterações denominadas mutações, que podem ser causadas por erros durante a duplicação do mesmo. O aparecimento de mutações ocorre em todos os seres vivos, sendo um processo fundamental para a evolução e diversidade das espécies. Muitas das mutações não implicam em mudanças detectáveis na atividade metabólica da célula ou do organismo e, por isso, passam despercebidas; mas outras mutações podem levar à morte celular. Assim, um pequeno número de mutações em genes específicos pode acarretar em

um crescimento desordenado das células, levando ao início de um processo cancerígeno (RIBEIRO et al., 2003).

No entanto, o próprio DNA possui mecanismos naturais de reparação de sua estrutura, tanto para as mutações próprias como para algumas substâncias mutagênicas e genotóxicas a que está frequentemente exposto, como produtos farmacêuticos, agroquímicos, drogas, solventes, poluentes atmosféricos e contaminantes alimentares. Os processos de reparo da estrutura do DNA são classificados em quatro vias: via de reparo por reversão, via de reparo por excisão, via de reparo recombinacional e tolerância a lesões (FRIEDBERG et al., 2005).

A via de reparo por reversão consiste em uma única enzima restaura a estrutura lesada, sem a necessidade de substituir a base lesada, mantendo a molécula de DNA original. Três mecanismos de reparo direto são utilizados neste processo, a fotorreativação, a alquiltransferência e o reparo oxidativo direto (RIBEIRO et al., 2003).

O reparo por excisão se dá pela ação coordenada e sequencial de enzimas no DNA lesado. Esta é dividida em três etapas: 1) a porção alterada da fita de DNA danificada é reconhecida e retirada pelas enzimas nucleases e helicases, que hidrolisam as ligações fosfodiéster adjacentes à lesão, resultando em uma região de DNA fita simples; 2) essa região da fita é polimerizada por meio da DNA polimerase, que a usa como molde e 3) ocorre a ligação da extremidade da fita recém sintetizada ao restante da molécula pela DNA ligase (KAO et al., 2005).

Os danos à fita que causam modificações ou perdas de bases do DNA podem ser corrigidos por enzimas que as reconhecem e as removem, restaurando as distorções na hélice da molécula. O reparo por excisão de nucleotídeos é o mais versátil, pois atua em vários tipos de lesões ao DNA. Ele consiste em remover quase todo o tipo de dano que produza distorções na dupla hélice do DNA, por ação de enzimas de forma sequencial no reparo das lesões (KAO et al., 2005).

Há ainda o reparo de bases mal emparelhadas, decorrentes de bases erroneamente incorporadas durante a recombinação, ou ainda, de inserções ou deleções na molécula de DNA corrigidas por esse sistema (FRIEDBERG et al., 2005).

A via de reparo recombinacional, repara quebras da fita dupla do DNA causadas por exposição a radiações ionizantes, raios-X, radicais livres ou agentes químicos, durante a sua replicação. A correção de quebra da fita dupla do DNA pode

ser realizada de duas formas, por recombinação homóloga e junção de extremidades não homólogas. Se esses sistemas estiverem saturados ou incapazes de reparar estes danos antes da fase S do ciclo celular, a célula poderá morrer (OGA et al., 2008).

Assim, quando o sistema de reparo não é eficiente, o dano é cumulativo. Defeitos no sistema de reparo de dano no DNA têm sido associados a muitas patologias, tais como câncer, imunodeficiência e neurodegeneração (EL-KHAMISY; CALDECOTT, 2006).

Muitos compostos metálicos em baixas concentrações têm sido identificados como inibidores de reparo aos danos causados no DNA, quer seja por agentes xenobióticos ou por fatores endógenos (BEYERSMANN; HARTWIG, 2008). A atuação dos metais na inibição do sistema de reparo está relacionada à interferência dos mesmos na ação de importantes proteínas com função no sistema de reparo (GIAGINIS et al., 2006).

2.4.2.3 Genética toxicológica

A genética toxicológica é a área da toxicologia que engloba o estudo dos possíveis agentes causadores de genotoxicidade e seus mecanismos de ação, onde os agentes genotóxicos são as substâncias que interagem com o DNA produzindo alterações em sua estrutura ou função (FERNANDES, 2005).

Outrossim, o estresse oxidativo é a maneira melhor descrita na literatura de indução de dano no DNA, ocorrendo quando há um desequilíbrio ocasionado pela excessiva geração de oxidantes e/ou uma diminuição da capacidade antioxidante de enzimas específicas e das defesas não enzimáticas – como glutathiona reduzida, vitaminas C e E, entre outras, produzindo radicais livres, espécies reativas de oxigênio (ERO) e espécies reativas de nitrogênio (ERN) (GUO et al., 2008).

A geração de radicais livres, ERO e ERN está presente em algumas vias metabólicas, dentro de uma concepção homeostásica celular e corporal, de modo singular nas mitocôndrias, nas membranas celulares e no citoplasma. Entretanto, as mitocôndrias, por meio da cadeia transportadora de elétrons, é a principal fonte geradora de radicais livres (GREEN et al., 2004).

Em condições fisiológicas, os organismos aeróbicos metabolizam 85% a 90% do oxigênio (O₂) consumido na mitocôndria, por meio da cadeia transportadora de

elétrons. Os restantes 10% a 15% são utilizados por diversas enzimas oxidases e oxigenases e, ainda, por reações químicas de oxidação direta (SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004).

Na mitocôndria, a citocromo oxidase oxida quatro moléculas de citocromo-c, removendo um elétron de cada uma delas para transferi-los ao O₂ para formar água. A ação da citocromo oxidase controla a geração de radicais livres, impedindo sua geração excessiva na mitocôndria. No entanto, cerca de 2% a 5% do oxigênio metabolizado nas mitocôndrias são desviados para outra via metabólica, e reduzidos de forma univalente, dando origem aos radicais livres (SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004).

Em face da redução univalente do O₂ são gerados os radicais superóxido ($\cdot\text{O}_2$), hidroxila ($\cdot\text{OH}$) e, ainda, peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Esse processo se dá mediante reações específicas, catalisadas por enzimas e com a participação dos íons ferro e de cobre. O H₂O₂, apesar de não ser um radical livre, por não ter um elétron desemparelhado na sua última camada eletrônica, é uma espécie com alto potencial reativo e deletério, pois participa da reação de geração de $\cdot\text{OH}$, o qual é considerado como o mais reativo dos radicais livres, pois pode alterar qualquer estrutura celular às suas adjacências. Comparativamente, aos radicais livres, o H₂O₂ apresenta uma meia vida maior e é capaz de atravessar as membranas celulares, o que corrobora para sua citotoxicidade (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

Os metais pesados têm se mostrado capazes de induzir estresse oxidativo em organismos, sobrecarregando a capacidade da célula de se manter em um estado reduzido. ERO induzidas por metais causam danos a proteínas celulares, ácidos nucléicos, lipídeos e muitas outras disfunções, incluindo a morte celular (SIMMONS et al., 2011).

A vulnerabilidade do material genético às agressões impostas pelo ambiente motivou um aumento no número de estudos sobre as lesões e alterações induzidas por substâncias químicas, físicas e biológicas e sobre os possíveis agentes causadores das mesmas, que podem ser de diferentes origens, incluindo medicamentos (EL-ZEIN, 2005; BRAMBILLA, 2009).

Ao longo dos últimos 40 anos, uma imensa variedade de testes, para avaliar a genotoxicidade, foram desenvolvidos e colocados em uso. Entre eles estão o de instabilidade cromossômica, o de proliferação celular, teste cometa e de quebra de fita dupla de DNA. Esses testes passaram a oferecer aos pesquisadores uma

maneira relativamente rápida e pouco onerosa de predizer se um material de interesse apresenta comportamento mutagênico ou carcinogênico, comparado aos estudos de longo prazo com animais (HAYES, 2001).

Os testes *in vitro* permitem um maior controle sobre o metabolismo dos xenobióticos, como por exemplo, ativação ou inibição enzimática, facilitando assim, o estudo dos mecanismos que podem ocorrer *in vivo*. Estes testes geralmente fornecem uma aproximação razoável do potencial que um agente tem em causar algum efeito sobre o material genético. O recomendado é que se utilizem, em um mesmo estudo, diferentes ensaios que possam avaliar os diversos tipos de danos genéticos que podem ocorrer (HAYES, 2001).

2.4.3 Mutagenicidade

Quando as lesões no DNA se fixam de forma capaz de serem transmitidas a novas gerações de células elas são denominadas de mutações (ZAHA et al., 2003).

As mutações podem ocorrer em qualquer célula e em qualquer estágio do ciclo celular, causando deleção parcial ou completa de um gene. Ainda, como ocorre com maior frequência, pode afetar uma única base (ZAHA et al., 2003; ROBBINS; COTRAN, 2010).

2.4.3.1 Tipos de mutações

As mutações podem ser divididas em gênicas ou cromossômicas. As mutações gênicas são caracterizadas por alteram a sequência de nucleotídeos do DNA, por substituição, adição ou remoção de bases. As substituições podem resultar em: 1) mutações silenciosas, que decorrem da substituição de uma base por outra resulta na codificação de um mesmo aminoácido; 2) mutações com perda de sentido, presentes quando decorre a substituição de uma base por outra resulta na codificação de um aminoácido diferente e causa pequenas mudanças na proteína sintetizada; ou 3) mutação sem sentido, que se instala quando a substituição altera um códon codificador de aminoácido para um códon “finalizador”, que resulta na síntese de uma proteína incompleta, que será desprovida de sua participação na homeostase celular, ou seja, impõe relevante prejuízo à célula (DENAMUR; MATIC, 2006).

Já as mutações por adição ocorrem quando uma ou mais bases são adicionadas ao DNA em um novo *locus*. Quando esta adição é de um número que não seja múltiplo de três, ocorre uma completa alteração na mensagem do gene. Já as mutações por remoção de bases, ocorrem quando uma ou mais bases do DNA são perdidas ou deletadas (SHIBUTANI et al., 1991).

Por outro lado, as mutações cromossômicas podem afetar uma determinada região de um cromossomo, um cromossomo inteiro ou todo o complemento cromossômico de um indivíduo. Quando as mutações cromossômicas provocam uma alteração da estrutura, esta é denominada mutação cromossômica estrutural e, quando a alteração é no número de cromossomos, a mutação é classificada em cromossômica numérica (SCHOFIELD; HIEH, 2003).

As mutações cromossômicas estruturais podem ser por: 1) deleção, decorrente da falta de uma porção de um cromossomo, e podem ocorrer nas zonas terminais ou intersticiais da molécula de DNA; 2) duplicação, que ocorre quando há duas cópias de uma dada região cromossômica; 3) translocação, onde acontece a transferência de segmentos entre cromossomos não homólogos, podendo ser translocação simples (transferência de um segmento de um cromossomo para outro), translocação recíproca (troca de partes entre dois cromossomos) ou translocação robertsoniana (dois cromossomos acrocêntricos sofrem quebra nas regiões centroméricas havendo troca de braços cromossômicos inteiros) ou 4) inversão, que ocorre com a remoção de um segmento de DNA e inserção numa posição invertida em um outro local do cromossomo. No caso da inversão incluir parte de um segmento de DNA que codifica uma proteína, esta será muito diferente e não funcional (NAJAFI; PEZESHKI, 2013).

As mutações cromossômicas numéricas podem acontecer sob suas formas: por euploidia, com alteração completa do genoma; e por aneuploidia, quando se observa cromossomos a mais ou a menos em relação ao número normal. Geralmente a mutação aneuploidia envolve apenas um único par de cromossomos podendo ser autossômica ou heterossômica (SCHOFIELD; HIEH, 2003).

A análise genética das mutações no homem é baseada em heredogramas e, nos animais de laboratório, em esquemas específicos de cruzamentos entre espécies com diferentes fenótipos. De um modo geral, é possível estabelecer se a mutação é dominante ou recessiva e se está localizada em cromossomos autossômicos ou sexuais (OGA et al., 2008).

Quando não é letal para a própria célula, a mutação pode propagar-se em crescimento, quando então é denominada de mutação somática; ou transmitir-se às gerações seguintes, conhecida como mutação germinativa (RABELLO-GAY, 1991).

Quando a mutação ocorre nas células somáticas, há várias consequências, sendo as mais comuns: formação de tumores benignos ou malignos, morte celular, envelhecimento precoce, ocorrência de malformações e abortos durante o desenvolvimento embrionário. Segundo De Flora e Ramel (1998), há também evidências de mutações na patogenia de doenças degenerativas crônicas, que são as principais causas de mortalidade em humanos.

Durante a evolução dos organismos, o material genético sofreu mutações benéficas e deletérias, o que permitiu o aumento da variabilidade, levando a adaptações em resposta às pressões seletivas do meio (MARTIN, 1996). Essas mutações podem ser resultantes do próprio processo celular ou da exposição aos diferentes agentes mutagênicos que os indivíduos estão sujeitos rotineiramente (GOMES, 2007; GU et al., 2002).

Desta maneira, todos os seres vivos sofrem certo número de mutações, seja como resultado de funções celulares normais ou de interações com o ambiente, também denominadas de mutações espontâneas. A ocorrência das mutações pode ser aumentada pela exposição ou tratamento com determinados compostos, denominados agentes mutagênicos. As modificações que elas causam são chamadas de mutações induzidas (ZAHA et al., 2003).

Os testes de mutagenicidade, como o teste de frequência de micronúcleo são empregados, na maioria das vezes, para prever o desenvolvimento de câncer, pois uma das teorias de carcinogênese química indica o desenvolvimento de uma mutação como evento inicial deste processo. Assim, os testes de mutagênese têm sido utilizados como triagem no intuito de prever o potencial carcinogênico das substâncias; entretanto, apenas avaliam as substâncias que produzem câncer por mecanismos genotóxicos, isto é, que interagem diretamente com o material genético (LOUREIRO et al., 2002).

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar a exposição *in vitro* de células leucocitárias humanas ao medicamento à base de Sb-AMG e à solução padrão de Sb^V sobre parâmetros citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos.

3.2 Específicos

- Avaliar comparativamente a viabilidade celular de leucócitos humanos expostos a diferentes concentrações de Sb-AMG e Sb^V;
- Avaliar comparativamente a proliferação celular em culturas de leucócitos humanos expostos a diferentes concentrações de Sb-AMG e Sb^V;
- Avaliar comparativamente a instabilidade cromossômica numérica em culturas de leucócitos humanos expostos a diferentes concentrações de Sb-AMG e Sb^V;
- Avaliar comparativamente o índice mitótico em culturas de leucócitos humanos expostos a diferentes concentrações de Sb-AMG e Sb^V;
- Avaliar comparativamente o teste do cometa em culturas de leucócitos humanos expostos a diferentes concentrações de Sb-AMG e Sb^V;
- Avaliar comparativamente o ensaio de quebra de fita dupla de DNA por fluorimetria em culturas de leucócitos humanos expostos a diferentes concentrações de Sb-AMG e Sb^V;
- Avaliar comparativamente a frequência de micronúcleo em culturas de leucócitos humanos expostos a diferentes concentrações de Sb-AMG e Sb^V;
- Avaliar comparativamente o número de células em processo necrótico e o número de células em processo apoptótico em culturas de leucócitos humanos expostos a diferentes concentrações de Sb-AMG e Sb^V;
- Avaliar comparativamente o índice de divisão nuclear citotóxico em culturas de leucócitos humanos expostos a diferentes concentrações de Sb-AMG e Sb^V;
- Determinar a quantidade de antimônio intracelular, em culturas de leucócitos humanos, após exposição ao Sb-AMG e ao Sb^V.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

A obtenção da matriz biológica utilizada no estudo, ou seja, leucócitos humanos para a realização das culturas e, por extensão, utilização nos protocolos deste trabalho, foi aprovada pelo Comitê de Ética da Universidade Federal do Pampa, sob o número 27045614.0.0000.5323.

As concentrações utilizadas de Sb neste estudo, foram baseadas nas obtidas pelo doseamento sanguíneo de pacientes submetidos a terapia medicamentosa com o Sb-AMG (30, 40 e 50 µg/mL) para o tratamento de leishmaniose (CRUZ et al., 2007). Todavia, utilizamos uma curva de concentração de 5, 10, 20, 40 e 50 µg/mL levando-se em consideração as concentrações do trabalho supracitado e concentrações inferiores.

4.1 Substâncias químicas

O medicamento Glucantime® 300 mg/mL, ampola de 5 mL (antimoniato de N-metilglucamina) do laboratório Sanofi Aventis lote 015073 foi adquirido através de doação da Universidade Federal de Santa Maria – RS.

A solução padrão de Sb^V 1000 mg/L utilizada foi do fabricante Merck.

4.2 Obtenção e preparo da cultura de leucócitos humanos

As culturas de leucócitos foram preparadas utilizando 1 mL de sangue venoso coletado por venopunção de voluntário adulto jovem, maior de 18 anos não usuário de medicação. Os leucócitos, obtidos através de gradiente de centrifugação, foram imediatamente transferidos para o meio de cultura contendo 9 mL de meio RPMI 1640, suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de penicilina, conforme descrito em trabalho prévio de SANTOS MONTAGNER et al. (2010). Para todas as análises, o controle negativo foi preparado utilizando 500 µL de tampão PBS 7,4 e o controle positivo com 3 µg/mL de bleomicina. As concentrações testadas foram de 5, 10, 20, 40 e 50 µg/mL correspondentes a Sb^V presente no fármaco Sb-AMG e na solução padrão de Sb^V. Os frascos de cultura celular foram colocados em estufa a 37°C por 72 horas e todos os grupos foram ensaiados em triplicata.

4.3 Avaliação dos parâmetros citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos em cultura de leucócitos humanos

A técnica escolhida para avaliar a citotoxicidade foi a viabilidade celular, enquanto que os parâmetros genotóxicos foram avaliados através das seguintes técnicas: proliferação celular, instabilidade cromossômica, índice mitótico e teste cometa alcalino. A mutagenicidade foi avaliada através da técnica de frequência de micronúcleos.

4.3.1 Viabilidade celular

A viabilidade foi avaliada por meio da perda da integridade da membrana leucocitária utilizando o azul de tripam (BUROW et al., 1998). Nesta técnica, as amostras provenientes das culturas de linfócitos foram submetidas ao reativo de Turk e, após três minutos, uma alíquota foi colocada em uma câmara de Neubauer e visualizada em microscópio no aumento de 400X. A diferenciação entre as células vivas e mortas foi observada através da coloração azul nas células mortas. Um total de 300 células foi contabilizado por lâmina.

4.3.2 Proliferação celular

Em um microtubo foi adicionado 400 µL de solução de Turk e 20 µL da amostra homogeneizada. Após, a câmara de Neubauer foi preenchida com esta suspensão e a contagem dos leucócitos foi realizada nos campos assinalados com a letra “L” conforme a figura 14.

A fórmula utilizada foi:

$$\text{Número total de leucócitos/mm}^3 = \text{n}^\circ \text{ células contadas} \times 10 \text{ (altura)} \times 20 \text{ (diluição)} / 4 \text{ (número de quadrados)}$$

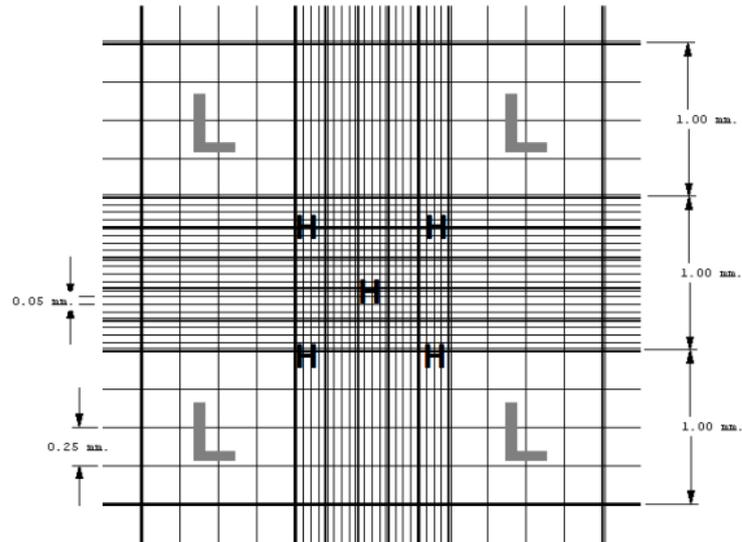


Figura 14 – Método de contagem de leucócitos em câmara de Neubauer.
(Imagem disponível em:

<http://www.fmvz.unesp.br/takahira/PDFs/T%C3%A9cnicas%20especializa%C3%A7%C3%A3o.pdf>,
acesso em 08/06/2015).

4.3.3 Instabilidade cromossômica numérica e índice mitótico

O ensaio de instabilidade cromossômica foi desenvolvido utilizando a técnica de citogenética da banda G descrita por Yunis (1976), que prevê a adição de colchicina 10 µg/mL em cada cultura de leucócitos submetendo-a à incubação por 60 min a 37°C. Após, as células foram centrifugadas a 1800 RPM durante 10 min. Os sedimentos de células foram ressuspensos em solução hipotônica à base de cloreto de potássio e incubados a 37°C durante 16 min. Após uma nova centrifugação, os sedimentos de células foram ressuspensos em ácido acético/metanol (3:1) seguido por centrifugação. As lâminas foram preparadas com 3 gotas de suspensão de células e em seguida foram secas à temperatura ambiente. Cinquenta células por amostra foram analisadas com aumento de 400X no microscópio para verificar a densidade e distribuição de cromossomos em metáfase.

Para a obtenção dos índices mitóticos, foram consideradas as porcentagens das células em divisão e das células em intérfase, levando-se em consideração a leitura de 10 campos de cada lâmina, seguindo a aplicação da fórmula a seguir:

$$\text{IM (índice mitótico)} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de células em divisão}}{\text{n}^\circ \text{ total de células observadas}} \times 100$$

4.3.4 Teste do cometa alcalino

Este teste foi realizado seguindo os procedimentos ensaiados por Singh et al. (1988) e em concordância com as diretrizes para uso do ensaio cometa (TICE et al., 2000; HARTMANN et al., 2003; NADIN et al., 2001). Após a incubação, as amostras (leucócitos) foram homogeneizadas com agarose de baixo ponto de fusão 0,75% e adicionadas em lâminas de microscópio pré-revestidas com agarose 1,5%. As lâminas foram imersas em uma solução de lise, para na sequência realizar corrida eletroforética (20 min a 300 mA e 25 V) em tampão hidróxido de sódio 300 mM e pH > 13. Ao final da eletroforese, as lâminas foram neutralizadas e submetidas à secagem em temperatura ambiente *overnight*. As lâminas secas foram reidratadas, fixadas, secas e coradas com nitrato de prata. Danos no DNA foram determinados utilizando o índice de dano do DNA. Cem nucleoides por lâmina (em triplicata para cada grupo) foram selecionados e analisados. Os nucleoides foram classificados de acordo com o comprimento da cauda e receberam pontuação de 0 (sem migração) a 4 (migração máxima) (Figura 15). Portanto, o índice de dano para as células pode variar de 0 (não ocorreu migração) a 400 (presença de migração máxima).

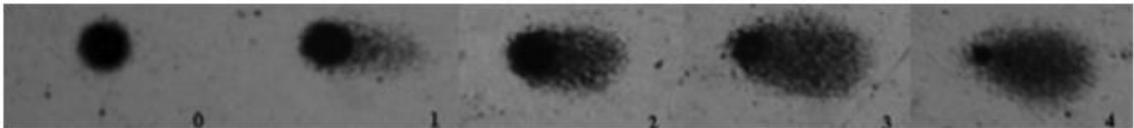


Figura 15 – Classificação dos nucleoides conforme comprimento da cauda: 0: classe 0; 1: classe 1; 2: classe 2; 3: classe 3; e 4: classe 4.

Fonte: GÜEZ et al., 2012.

4.3.5 Quebra de fita dupla de DNA

Para este ensaio foi utilizado o kit de quantificação de DNA por fluorescência do laboratório Sigma® composto por: solução padrão de DNA, solução de bisBenzimide H 33258 e solução tampão para teste de fluorescência.

Primeiramente foi realizada uma curva de calibração com a solução padrão de DNA. O valor encontrado para o coeficiente de determinação (R^2) foi de 0,9998 para a equação da reta $y = 0,1371x + 206,69$, na qual y é a fluorescência medida e x é a concentração de DNA em ng/mL. O fluorímetro foi configurado com um

comprimento de onda de excitação de 360 nm e um comprimento de onda de emissão de 460 nm.

Após, uma solução de 1 µg/mL de bisBenzimide foi preparada conforme orientações do fabricante utilizando o tampão para fluorescência. Um mL desta solução foi adicionado em uma cubeta para a leitura do branco. Com a cubeta ainda dentro do fluorímetro, 50 µL da amostra foram adicionados e, após a homogeneização, efetuou-se a leitura da fluorescência.

4.3.6 Teste de micronúcleo

O teste de micronúcleo foi realizado segundo a técnica descrita por Schmid (1975). Neste ensaio, as lâminas foram analisadas em microscópio com 1.000X de ampliação. Para cada lâmina, 1.000 células foram contabilizadas e classificadas quanto a quantidade de: células mononucleadas com presença de micronúcleos; células binucleadas e células binucleadas com micronúcleos, células em processo necrótico e células em processo apoptótico em intervalos de 24, 48 e 72 h após a incubação.

4.3.7 Contagem de células necróticas e apoptóticas

Neste ensaio, as lâminas foram analisadas em microscópio com aumento de 1.000X. Para cada lâmina, um total de 1.000 células foram contabilizadas (FENECH, 2000) em intervalos de 24, 48 e 72 h após a incubação, onde, deste total, para os referidos intervalos de tempo, foram identificadas as células necróticas e apoptóticas.

Para as células necróticas, se levou em consideração a presença das seguintes características: aumento do volume celular, agregação da cromatina, desorganização do citoplasma, formação de agregados amorfos, vacuolização e perda da integridade da membrana plasmática. Para as células apoptóticas, se considerou as células com integridade membranar e presença de corpos apoptóticos (FENECH, 2000).

4.3.8 Índice de divisão nuclear citotóxico (IDNC)

O IDNC é um parâmetro que avalia a intensidade da atividade tóxica de determinado xenobionte sobre as células, o qual é obtido aplicando-se a seguinte fórmula (FENECH, 2000):

$$\text{IDNC} = \frac{\text{Ap} + \text{Nec} + \text{M1} + 2(\text{M2}) + 3(\text{M3}) + 4(\text{M4})}{\text{N}}$$

Onde, Ap=número de células apoptóticas, Nec=número de células necróticas, M1-M4=número de células viáveis com 1-4 núcleos e N=número total de células contatas.

As lâminas contendo as células foram analisadas em microscópio com aumento de 1.000X. Para cada lâmina, um total de 1.000 células foram contabilizadas.

4.4 Análise quantitativa de antimônio intracelular

Foi feita a pesagem de massa da amostra diretamente nos frascos de polipropileno (15 mL) e, após a pesagem, foi adicionado lentamente, 500 µL de ácido nítrico (65% m/m, d=1,39 g cm⁻³, Merck, Alemanha). A solução permaneceu em repouso por 30 minutos com as tampas semiabertas e, posteriormente, os frascos foram submetidos a aquecimento em forno micro-ondas doméstico para decomposição. O aquecimento foi repetido sete vezes, totalizando sete ciclos de 40 segundos em cada ciclo com potência de 30%, sendo suficiente para obtenção de aparência límpida da solução. Após a decomposição, o volume foi completado com água ultrapura até 10 mL para posterior determinação.

A determinação de Sb nas amostras de soro sanguíneo foi feita por espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) empregando um espectrômetro modelo Elan DRC II (PerkinElmer-SCIEX, Thornhill, Canadá), equipado com nebulizador concêntrico, câmara de nebulização ciclônica e tocha com injetor de quartzo de 2 mm de diâmetro interno. A potência foi de 1400 W e a vazão de argônio foi de 15, 1,2 e 1,04 L min⁻¹, para o gás do plasma, auxiliar e de nebulização, respectivamente. As medições foram feitas utilizando o isótopo ¹²¹Sb.

4.5 Análise estatística

Os dados provenientes dos testes de citotoxicidade e genotoxicidade foram expressos em média \pm desvio padrão. As comparações entre os grupos foram realizadas utilizando análise de variância (ANOVA) de uma via. Para o teste de mutagenicidade (micronúcleo), onde, além da comparação entre os grupos, se analisou o comportamento entre três períodos de incubação, os dados foram submetidos à ANOVA de duas vias. Ambos os tratamentos estatísticos foram complementados com o teste de Tukey para múltiplas comparações. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0.05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Citotoxicidade

Os resultados obtidos a partir do ensaio de viabilidade celular em leucócitos humanos (Figura 16 A-B) expostos às diferentes concentrações de Sb a partir do Sb-AMG e do padrão de Sb^V demonstraram que ambas as formas de Sb testadas reduziram significativamente a viabilidade das células quando comparados ao controle negativo ($p < 0.0001$).

O controle negativo apresentou um percentual de células viáveis de 95%, enquanto o controle positivo demonstrou uma redução aproximada de 27% em relação ao controle negativo, com um percentual de 69% de células viáveis. As cinco diferentes concentrações testadas de Sb-AMG (5-50 $\mu\text{g/mL}$) apresentaram, respectivamente, 62%, 63%, 64%, 65% e 64% de viabilidade, com uma redução de células viáveis concentração não-dependente de 33% a 35% em relação ao controle negativo, contudo, não diferiram estatisticamente do controle positivo (Figura 16 A).

Ao se analisar a viabilidade celular dos leucócitos humanos submetidos às diferentes concentrações (5-50 $\mu\text{g/mL}$) do padrão de Sb^V, se observou, respectivamente, um percentual de viabilidade concentração-dependente de 72%, 71%, 69%, 55% e 55% (Figura 16 B), com uma redução aproximada da viabilidade celular de 23% a 41% ao comparar-se com o controle negativo. De forma diferente ao ocorrido com a exposição às concentrações testadas de Sb-AMG, as duas maiores concentrações do metal a partir do padrão (40 $\mu\text{g/mL}$ e 50 $\mu\text{g/mL}$ de Sb^V) apresentaram níveis de viabilidade celular significativamente menores às outras três concentrações de Sb^V testadas e a encontrada para o controle positivo ($p < 0.001$).

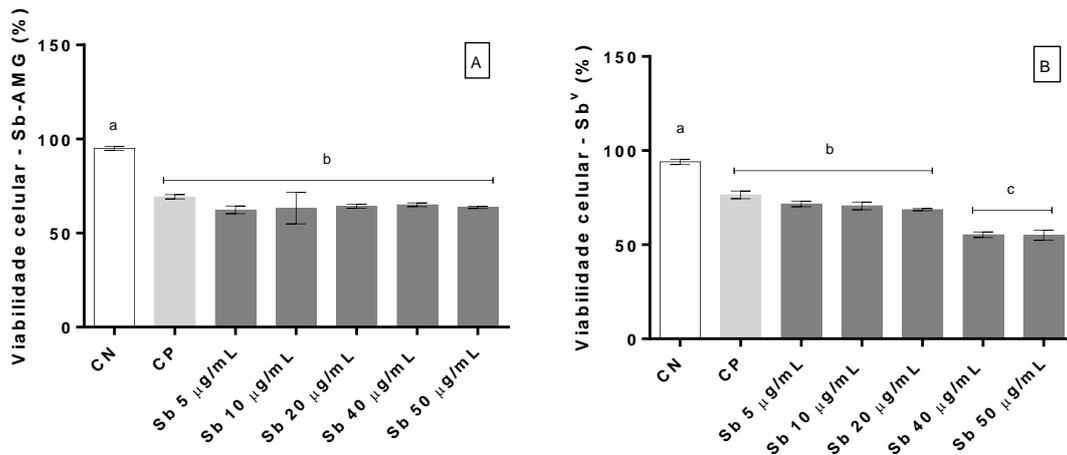


Figura 16 - Teste de viabilidade celular em leucócitos humanos expostos a diferentes concentrações de antimônio a partir do antimoniato de meglumina (Sb-AMG)^A e padrão de antimônio (Sb^V)^B. Os dados estão expressos em média \pm desvio padrão, n=3; p<0.001. As letras sobre as barras representam diferenças significativas entre os grupos; CN=controle negativo; CP=controle positivo.

A partir dos resultados encontrados, observa-se que o Sb presente no Sb-AMG apresenta citotoxicidade menor que a encontrada para o Sb^V nas concentrações testadas. Este dado pode estar relacionado ao processo de captação celular do Sb, parecendo, a princípio, haver um menor impedimento à forma livre que a ligada, presente no fármaco em questão. Quanto ao mecanismo de indução de citotoxicidade, há de se levar em consideração as vias intracelulares e a induzida na membrana celular. De qualquer forma, ambas as vias, de forma direta ou indireta, ocasionam danos as membranas celulares. Pelo teste de viabilidade celular realizado, não se pode afirmar se houve o curso dos dois processos. Entretanto, a observação do fenômeno *per se* é importante, pois trata de um estudo pautado em células humanas, onde a literatura é escassa, quanto mais dos mecanismos de indução de citotoxicidade pela exposição ao Sb, em suas diferentes formas de apresentação.

É importante destacar que as reações oxidativas, de natureza química ou bioquímica, são capazes de gerar radicais livres e espécies reativas, como $\cdot\text{O}_2$, $\cdot\text{OH}$ e H_2O_2 , respectivamente, as quais são capazes de atravessar ou destruir membranas celulares, induzindo citotoxicidade (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004).

Não obstante, os metais, de modo geral, apresentam comportamento redox diferentes, especialmente sob variações do pH do meio em que se encontram. Neste sentido, a especiação metálica traz em si uma problemática: a garantia de seu

estado inicial, especialmente quando se trata de culturas celulares ou de estudos *in vivo*, tendo a compreensão de que, em função dos processos metabólicos inerentes às células e ou tecidos, há variação de pH e, assim, há variação do estado redox do metal. No caso do Sb, é bem estabelecido que a forma Sb^{III} é mais tóxica que a forma Sb^V – presente no Sb-AMG. Todavia, é difícil de garantir de que esta última, não tenha se convertido na primeira. De qualquer forma, as duas induzem toxicidade. A contribuição diferenciada deste estudo fora a de demonstrar que mesmo, em concentrações na ordem de 5-50 $\mu\text{g/mL}$, há indução de toxicidade celular pelo Sb-AMG e pelo Sb em células leucocitárias humanas.

Neste sentido, é importante destacar que o presente trabalho traz um dado novo e importante em relação à segurança do Sb-AMG, e que difere bastante do encontrado por Lima et al. (2010), que avaliou *in vitro*, utilizando linfócitos humanos, concentrações de Sb^V provenientes do Sb-AMG, onde a menor concentração testada, 1060 $\mu\text{g/mL}$, apresentou 80,6% de viabilidade celular. Em nosso estudo, a maior concentração testada, 50 $\mu\text{g/mL}$ – aproximadamente 21 vezes menor, apresentou uma viabilidade de 64%, ou seja, aproximadamente 20% menor. É importante destacar que, em estudos *in vitro* com cultivo celular, não é aconselhável utilizar concentrações acima de 500 $\mu\text{g/mL}$, pois, a partir desta concentração, ocorrerá mascaramento dos dados obtidos (ANVISA, 2013).

5.2 Genotoxicidade

No ensaio de proliferação celular (Figura 17 A-B), não houve diferença estatisticamente significativa nos resultados encontrados entre as diferentes concentrações testadas de ambas as formas de Sb (9.500 a 11.500 leucócitos/ mm^3). Entretanto, tanto o fármaco quanto o padrão de Sb^V apresentaram uma redução significativa ($p < 0,05$) no número de leucócitos totais, quando comparados ao controle negativo (13.500 leucócitos/ mm^3), mas maiores que o controle positivo (7.667 leucócitos/ mm^3) ($p < 0,05$). A contagem inicial de leucócitos para todos os tratamentos foi de 5.565 leucócitos/ mm^3 .

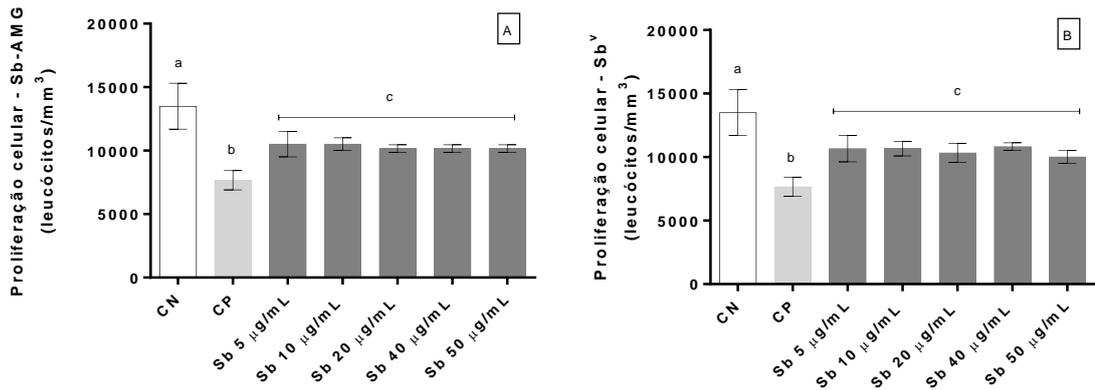


Figura 17 - Ensaio de proliferação celular em leucócitos humanos expostos a diferentes concentrações de antimônio a partir do antimoniato de meglumina (Sb-AMG)^A e padrão de antimônio (Sb^V)^B. Os dados estão expressos em média \pm desvio padrão, n=3; p<0.05. As letras sobre as barras representam diferenças significativas entre os grupos; CN=controle negativo; CP=controle positivo.

A proliferação celular é um importante parâmetro de avaliação genotóxica, pois demonstra a capacidade de determinada célula ou grupo de células proliferarem-se mediante situações que podem ser adversas. No caso, ambas formas de Sb - Sb-AMG e o Sb^V, e concentrações analisadas, demonstraram interferir com o processo de proliferação, o qual dispõe de vários alvos moleculares passíveis de sofrer interferência, incluindo a manutenção da estrutura da molécula de DNA que, no caso, como será visto adiante, sofreu danos oxidativos e quebras em sua estrutura.

Interessante notar que em um estudo realizado por Azacura et al. (2009) utilizando células pulmonares de hamster, em concentrações muito semelhantes às ensaiadas neste estudo, a saber, 5, 10, 20, 30, 40 e 50 $\mu\text{g/mL}$, eles encontraram diminuição na proliferação celular nas duas maiores concentrações testadas. Aqui, se verificou que a diminuição da proliferação celular nos leucócitos humanos ensaiados se deu em toda faixa de concentração testada, 5-50 $\mu\text{g/mL}$, denotando maior sensibilidade dessas células ao Sb (Sb-AMG e Sb^V) que as testadas pelo autor supracitado e seus colaboradores.

A Figura 18 A-B apresenta os resultados obtidos a partir do ensaio de instabilidade cromossômica numérica para leucócitos humanos submetidos as diferentes concentrações de Sb-AMG e padrão Sb^V, onde é possível observar que tanto o fármaco quanto o padrão, apresentaram porcentagens muito maiores de instabilidade cromossômica do que o controle negativo (p<0.05). Adicionalmente, no caso do Sb-AMG, as três maiores concentrações testadas (20, 40 e 50 $\mu\text{g/mL}$)

apresentaram um número maior de instabilidade cromossômica em relação ao controle positivo ($p < 0.01$). Em relação ao padrão Sb^V , foi observado um aumento da instabilidade cromossômica numérica maior que o controle positivo ($p < 0.0001$) em duas das maiores concentrações testadas (20 e 40 $\mu\text{g/mL}$). Não foi possível contabilizar o número de instabilidade cromossômica da maior concentração de padrão Sb^V testada (50 $\mu\text{g/mL}$) pelo elevado grau de lesão celular observado neste grupo.

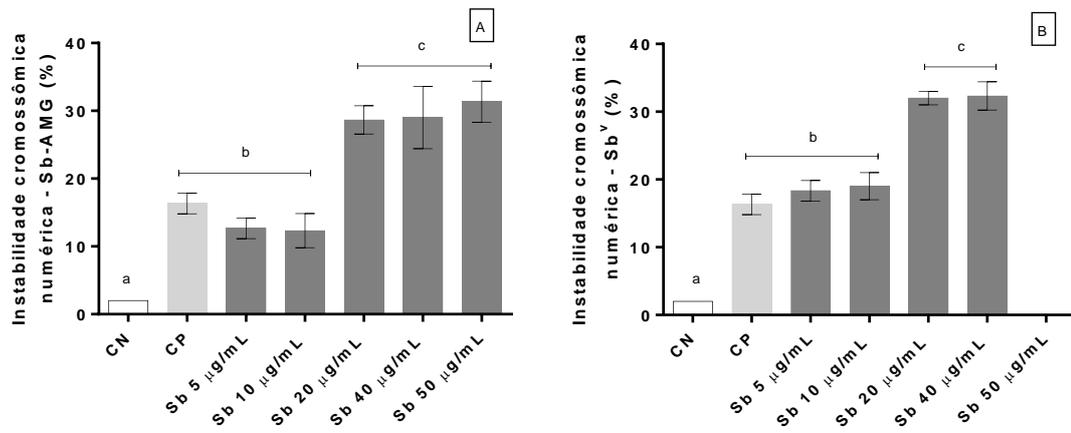


Figura 18 - Ensaio de instabilidade cromossômica numérica em leucócitos humanos expostos a diferentes concentrações de antimônio a partir do antimoniato de meglumina ($Sb\text{-AMG}$)^A e padrão de antimônio (Sb^V)^B. Os dados estão expressos em média \pm desvio padrão, $n=3$; $p < 0.05$. As letras sobre as barras representam diferenças significativas entre os grupos; CN=controle negativo; CP=controle positivo.

O controle negativo apresentou 2% de instabilidade cromossômica numérica nas células analisadas, enquanto o controle positivo e as cinco concentrações de $Sb\text{-AMG}$ apresentaram, respectivamente, 16%, 13%, 12%, 29%, 29% e 31%. Em relação ao padrão Sb^V (5-40 $\mu\text{g/mL}$), os percentuais de instabilidade cromossômica numérica celular encontrados foram de 18%, 19%, 32% e 32%, respectivamente. Embora não demonstrado, foi possível observar que, tanto para o $Sb\text{-AMG}$ quanto para o Sb^V , as alterações cromossômicas numéricas mais frequentemente observadas foram, respectivamente, 25 (5%), 37 (32%) e 42 (51%).

A instabilidade cromossômica resulta em complexos numéricos e estruturais cromossômicos alterados, onde, em diversos estudos, suas presenças estão associadas a lesões celulares relevantes e, ainda, a um mau prognóstico em tumores sólidos (BIRKBAK et al., 2011). Nossos resultados demonstram que todas as concentrações do $Sb\text{-AMG}$ e do padrão Sb^V ensaiadas apresentaram porcentagens

de anormalidade cromossômica muito superiores a encontrada para o controle negativo.

Segundo estudo realizado por Paton e Allison (1972), onde leucócitos humanos em cultura foram expostos ao Sb sob a forma de tartarato sódico, também foi observado um aumento de 12% de instabilidade cromossômica no grupo exposto ao Sb, quando comparado ao controle negativo.

A caracterização da instabilidade genômica se dá pela dificuldade de determinada célula em manter homeostaticamente o número correto de cromossomos durante o processo mitótico, o qual é diferente daquele que induz ao aparecimento de mutações (CHAUFFAILLE, 2008). Ademais, é bem estabelecido que a instabilidade genômica, incluindo-se a numérica, é dependente da persistência do dano à molécula de DNA e da capacidade de dano de xenobiontes (PACHECO; HACKEL, 2002). Sendo assim, considerando-se um período aproximado de 24 horas (SNUSTAD; SIMMONS, 2013) para o último dos três ciclos viáveis para a cultura de leucócitos, ou seja, em nosso estudo, 72 horas de incubação, é plausível aceitar de que as células estiveram expostas de forma persistente ao Sb-AMG e Sb^V, sofrendo, assim, os efeitos de suas respectivas toxicidades.

A Figura 19 A-B apresenta os resultados obtidos a partir do ensaio de índice mitótico para leucócitos humanos submetidos as diferentes concentrações de Sb-AMG e padrão Sb^V. Na Figura 19 A é possível verificar que o fármaco nas concentrações testadas (5-50 µg/mL) não apresentou índices mitóticos estatisticamente diferentes do encontrado para o controle negativo ($p < 0.05$). Em relação ao padrão Sb^V (Figura 19 B), as três maiores concentrações testadas (20, 40 e 50 µg/mL) apresentaram um índice mitótico menor em relação ao encontrado no controle negativo ($p < 0.05$), mas semelhantes ao encontrado para o controle positivo. O controle negativo apresentou índice mitótico de $64,50 \pm 15,93$ e o controle positivo de $43,60 \pm 16,55$. As cinco concentrações de Sb-AMG apresentaram, respectivamente, $53,80 \pm 7,87$, $53,51 \pm 19,00$, $52,89 \pm 11,92$, $52,00 \pm 12,11$ e $46,20 \pm 10,94$ de índice mitótico, enquanto que nas cinco concentrações do padrão Sb^V (5-50 µg/mL) os índices mitóticos foram de, respectivamente, $51,73 \pm 15,90$, $48,60 \pm 14,22$, $44,41 \pm 10,10$, $43,30 \pm 10,13$ e $41,00 \pm 6,79$.

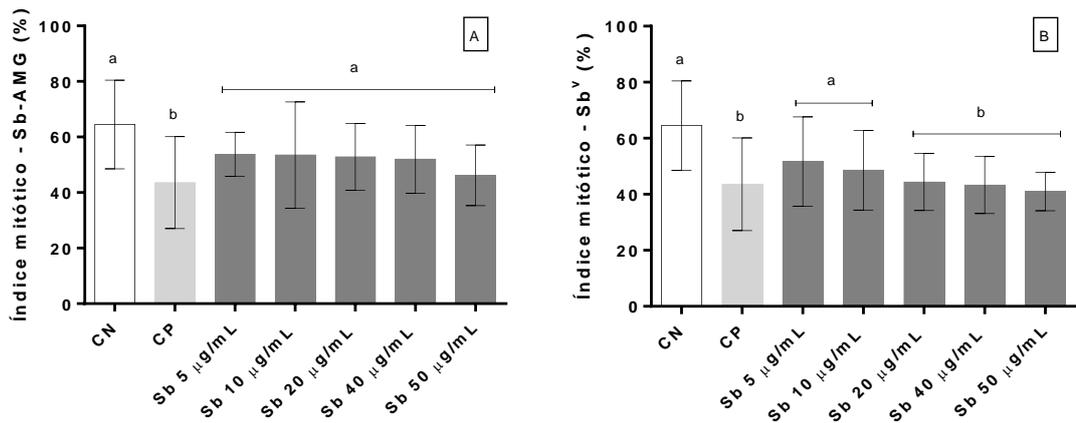


Figura 19 - Ensaio de índice mitótico em leucócitos humanos expostos a diferentes concentrações de antimônio a partir do antimoniato de meglumina (Sb-AMG)^A e padrão de antimônio (Sb^V)^B. Os dados estão expressos em média \pm desvio padrão, $n=3$; $p<0.05$. As letras sobre as barras representam diferenças significativas entre os grupos; CN=controle negativo; CP=controle positivo.

A partir desses resultados, é possível perceber que o Sb-AMG não alterou o número de células em divisão ao término das 72 horas de exposição, apesar de ter sido observado uma redução na proliferação celular em relação ao controle negativo no mesmo período. Analisando esses dois parâmetros conjuntamente, é possível sugerir que a diminuição da proliferação está muito mais ligada à morte celular, caracterizadas pela diminuição da viabilidade celular e no maior número de células apoptóticas e necróticas (esses últimos dois parâmetros mostrados mais adiante) que propriamente em alguma interferência sobre a regulação do ciclo celular ou, mais especificamente, ao processo mitótico.

Por outro lado, o Sb^V reduziu a proliferação celular e apresentou índices mitóticos semelhantes ao controle positivo nas três maiores concentrações testadas (20, 40 e 50 $\mu\text{g/mL}$). Com esses resultados, pode-se sugerir que o Sb livre interfere no processo mitótico, inibindo-o de forma concentração dependente, enquanto o Sb ligado ao Sb-AMG não foi capaz de fazê-lo.

Existem poucos dados na literatura relacionando metais pesados e Cdk, de modo especial, que versem sobre a toxicologia de Sb sobre o ciclo celular, mais especificamente sobre a família Cdk. Todavia, apesar de poucos, existem dois estudos relacionando As - sob a forma de trióxido de arsênio, com Cdk, onde o primeiro demonstra sua inibição sobre a expressão da ciclina E e da Cdk2 em células humanas de linfoma de Burkitt; e o segundo, refere-se a ativação de três

tipos de inibidores de Cdk (Cdkl P15, 16 e 21) em células de mieloma múltiplo. (CHEN et al, 2003; 2013).

Dentro desse contexto de regulação do ciclo celular, sabe-se que a proteína pRB exerce um papel fundamental na fase G₁ do ciclo, favorecendo a passagem para a próxima fase, quando encontrada sob condição de fosforilação. Por outro lado, a inibição de Cdkl P16 e Cdkl P21 desfavorece a fosforilação de pRB por bloqueio da atividade dos complexos ciclina-Cdks que a fosforilam, promovendo, assim, a parada do ciclo celular (FERRAZ et al., 2012).

Em função disso, e considerando nossos resultados, é plausível sugerir que o Sb possa interferir nessa etapa do ciclo, sem excluir outras participações, tendo em vista que este metal apresenta efeitos biológicos reconhecidamente semelhantes a alguns dos encontrados para o As (BOECK et al., 2003).

Os resultados obtidos a partir do ensaio do cometa alcalino em leucócitos humanos expostos as diferentes concentrações de Sb-AMG (Figura 20 A) demonstraram que as cinco concentrações testadas apresentaram um índice de dano do DNA superior ao grupo controle negativo ($p < 0.001$).

O controle negativo apresentou um índice de dano de DNA contabilizado como $3,00 \pm 1,00$, enquanto o controle positivo apresentou um índice igual a $86,00 \pm 3,01$. As cinco diferentes concentrações testadas de Sb-AMG (5-50 $\mu\text{g/mL}$) apresentaram, respectivamente, índice de dano de DNA de $21,00 \pm 3,81$, $19,31 \pm 2,64$, $20,03 \pm 1,00$, $20,02 \pm 1,54$ e $23,03 \pm 5,60$, com um aumento aproximado de 6 a 8 vezes em relação ao controle negativo, contudo, de maneira concentração não dependente.

De forma diferente ao ocorrido com a exposição às concentrações testadas de Sb-AMG, apenas as três maiores concentrações do metal (20, 40 e 50 $\mu\text{g/mL}$) apresentaram índice de dano significativamente maior às outras duas concentrações de Sb^V (5 e 10 $\mu\text{g/mL}$) e ao controle negativo (Figura 20 B) ($p < 0.05$).

As cinco concentrações do padrão Sb^V (5-50 $\mu\text{g/mL}$) apresentaram, respectivamente, um índice de dano de DNA igual a $5,33 \pm 1,53$, $8,67 \pm 0,58$, $12,67 \pm 2,52$, $14,33 \pm 2,52$ e $57,00 \pm 3,00$. Nota-se que a concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$ do padrão Sb^V apresentou um índice de dano quase 2,5 vezes maior do que o encontrado para a mesma concentração de Sb-AMG.

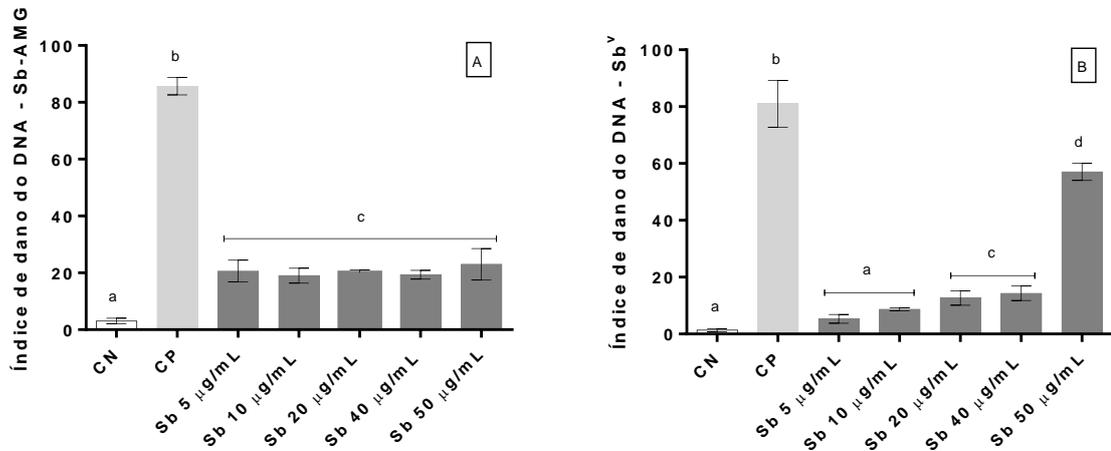


Figura 20 - Índice de dano de DNA gerado pelo ensaio cometa alcalino em leucócitos humanos expostos a diferentes concentrações de antimônio a partir do antimoniato de meglumina (Sb-AMG)^A e padrão de antimônio (Sb^V)^B. Os dados estão expressos em média ± desvio padrão, n=3; p<0.05. As letras sobre as barras representam diferenças significativas entre os grupos; CN=controle negativo; CP=controle positivo.

O ensaio cometa alcalino é um ensaio genotóxico amplamente utilizado para quantificar as lesões oxidativas e detectar os efeitos de reparo na molécula de DNA em células individualizadas (MUKHOPADHYAY et al., 2004) e que, não necessariamente, estejam em curso de divisão celular. A metodologia permite a detecção da migração de fragmentos de DNA livres, os quais advém de lesões ao material genético, que podem ter sido geradas por quebra de fita simples, quebras de fita dupla, sítios de reparo por excisão, *crosslinks* e lesões álcali-lábeis (TICE et al., 2000).

No estudo realizado por Lima et al. (2010), já citado anteriormente, não foi encontrado dano oxidativo ao DNA de linfócitos, embora tenham utilizado um tempo diferente de incubação – 3h e 24h, assim como concentrações bem superiores.

Por outro lado, no presente estudo, foi demonstrado que, após 72 horas de exposição, foi possível observar dano oxidativo significativo ao DNA das células leucocitárias induzido tanto pelo Sb-AMG quanto pelo Sb^V, com um índice de dano maior para a concentração mais alta do metal livre, o que sugere, novamente, que a forma livre (Sb^V) é mais deletéria que a ligada ao fármaco. Entretanto, não se pode amenizar o dano apresentado pelo Sb-AMG ao DNA leucocitário, outrossim, deve ser levado em conta na discussão dualística do risco-benefício de seu uso e, quem

sabe, ajudar a basilar a prospecção para busca de novos fármacos para o tratamento da leishmaniose.

A Figura 21 A-B apresenta os resultados obtidos a partir do ensaio de quebra de fita dupla de DNA para leucócitos humanos submetidos as diferentes concentrações de Sb-AMG e padrão Sb^V, onde é possível observar que tanto o fármaco quanto o padrão, apresentaram quantidades maiores de quebra de fita dupla nas duas maiores concentrações testadas (40 µg/mL e 50 µg/mL) que a encontrada para o grupo controle negativo ($p < 0.01$). Adicionalmente, no caso do padrão Sb^V, a concentração de 50 µg/mL apresentou um número maior de quebras de fita dupla de DNA que a encontrada para o controle positivo ($p < 0.0001$).

O controle negativo apresentou lesões de quebra de fita dupla em $413,60 \pm 26,99$ ng DNA/mL, enquanto o controle positivo e as cinco concentrações de Sb-AMG apresentaram quebras de fita dupla em, respectivamente, $553,40 \pm 44,74$, $381,30 \pm 32,90$, $479,30 \pm 6,10$, $480,00 \pm 12,56$, $507,00 \pm 6,35$ e $521,30 \pm 7,74$ ng DNA/mL. Em relação ao padrão Sb^V (5-50 µg/mL), a quantidade de quebras de fita dupla de DNA encontradas foram, respectivamente, de $407,00 \pm 9,85$, $407,30 \pm 13,52$, $455,80 \pm 17,15$, $510,30 \pm 10,72$ e $713,10 \pm 17,54$ ng DNA/mL.

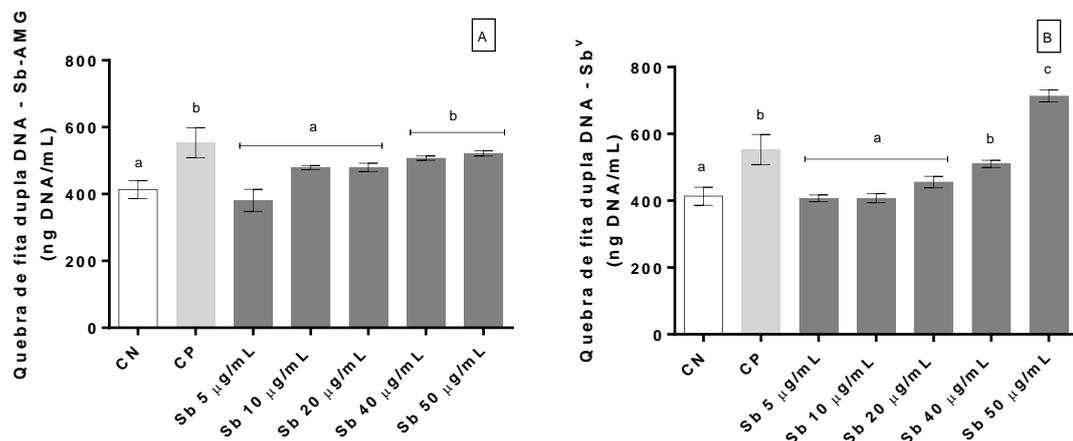


Figura 21 - Ensaio de quebra de fita dupla de DNA em leucócitos humanos expostos a diferentes concentrações de antimônio a partir do antimoniato de meglumina (Sb-AMG)^A e padrão de antimônio (Sb^V)^B. Os dados estão expressos em média \pm desvio padrão, $n=3$; $p < 0.01$. As letras sobre as barras representam diferenças significativas entre os grupos; CN=controle negativo; CP=controle positivo.

É bem estabelecido que o Sb é capaz de depletar os níveis de glutathiona, corroborando, assim, com o processo oxidativo nas moléculas expostas ao metal (BURFORD et al., 2005), onde inclui-se a molécula de DNA.

Adicionalmente, Grosskopf et al. (2010) demonstraram que o Sb^{III} interfere com proteínas envolvidas na via de reparo por excisão de nucleotídeos, imputando, pelo menos em parte, prejuízo à via, mas evidenciando um de seus mecanismos genotóxicos.

Não obstante, Takahashi et al. (2002) demonstraram que o tricloreto de antimônio e tartarato de potássio de antimônio podem afetar a reparação de quebras da fita dupla do DNA induzidas por irradiação gama em células de ovário de hamster chineses, de forma dose dependente.

Em nossos resultados, verifica-se que tanto o Sb-AMG quanto o padrão Sb^{V} induziram quebra de fita dupla de DNA de forma concentração dependente, com um comportamento semelhante, se consideradas as concentrações testadas, onde as duas maiores concentrações de ambos apresentaram um dano maior, contudo, mais proeminente para a concentração de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ do padrão Sb^{V} .

Considerando a possibilidade de conversão do Sb^{V} em Sb^{III} , é plausível sugerir que as apresentações de Sb utilizadas possam estar interferindo no sistema de reparo por excisão. Dentro desse mesmo contexto, com sopeso de nossos resultados a partir do ensaio cometa, que revela danos oxidativos à molécula de DNA, também é razoável sugerir que há um conjunto de alvos moleculares envolvendo a homeostase celular como um todo, incluindo seu material genético, que sejam objeto da ação oxidativa das diferentes formas de Sb.

5.3 Mutagenicidade

O teste de micronúcleo fornece um índice confiável que representa perdas ou quebras cromossômicas. O micronúcleo é expresso em células no processo de divisão, as quais possam conter quebras cromossômicas com falta de centrômeros (fragmentos acêntricos) e/ou cromossomos inteiros, porém, que não são capazes de migrar para os polos durante a mitose (FENECH, 2000).

Os resultados para o teste de micronúcleo após os períodos de 24, 48 e 72 h de incubação foram agrupados da seguinte maneira: células mononucleadas com micronúcleos (MN) (Figura 22 A-B); células binucleadas (Figura 23 A-B); células binucleadas com um micronúcleo (1MN) (Figura 24 A-B), células binucleadas com

dois micronúcleos (2MN) (Figura 25 A-B) e células binucleadas com três ou mais micronúcleos (≥ 3 MN) (Figura 26 A-B).

A quantidade de células mononucleadas com presença de MN analisada após os três intervalos de tempo de incubação, apresentou resultados estatisticamente significativos em relação ao controle negativo ($p < 0.05$) para quase todas as concentrações de Sb (Sb-AMG e padrão Sb^V) e tempos de incubação ensaiados (Figura 22 A-B).

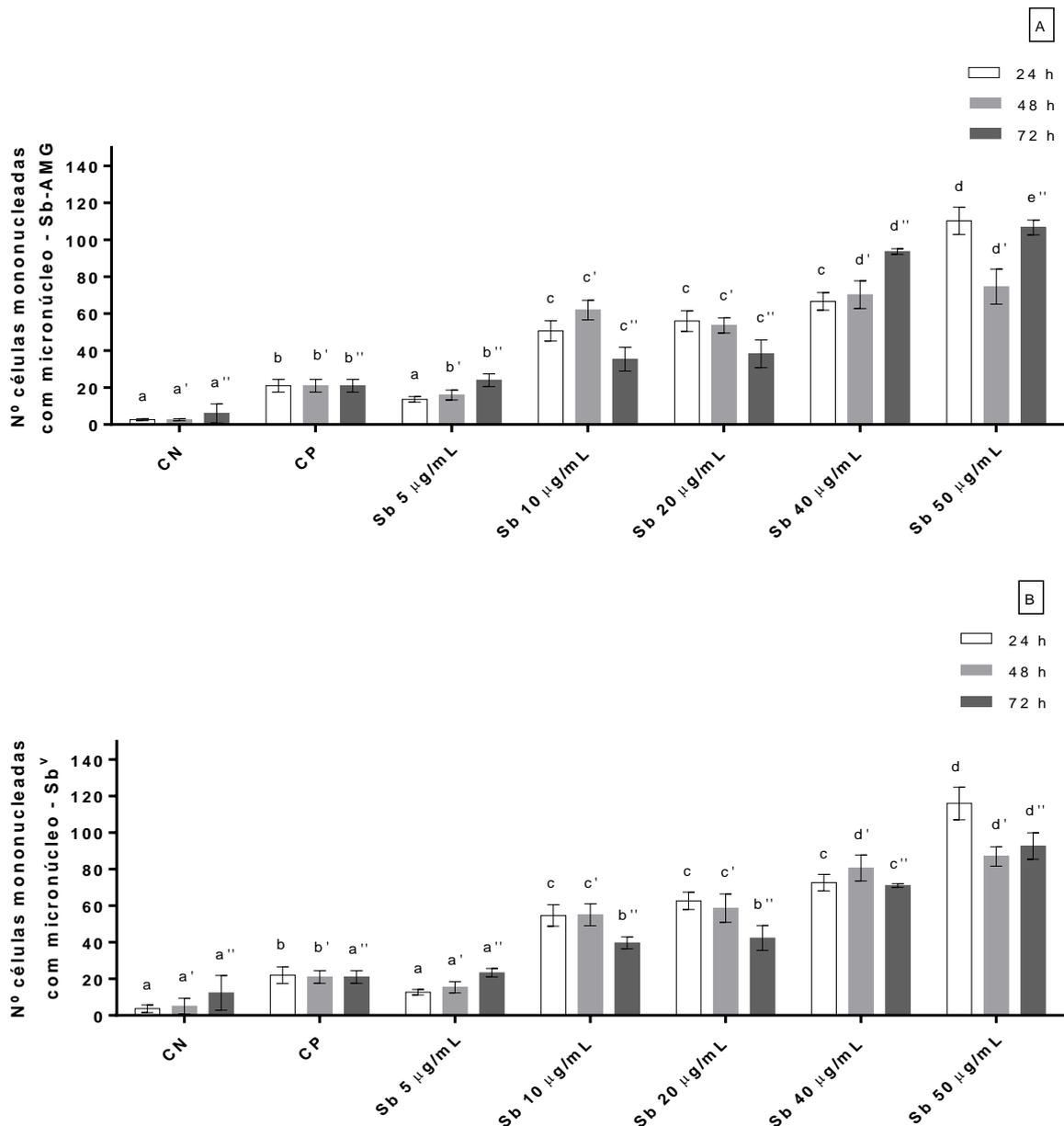


Figura 22 - Contabilização de micronúcleos em leucócitos humanos mononucleados expostos a diferentes concentrações de antimônio a partir do antimoniato de meglumina (Sb-AMG)^A e padrão de antimônio (Sb^V)^B. Os dados estão expressos em média \pm desvio padrão, $n=3$; $p < 0.05$. *a,b,c,d* representam diferenças significativas entre os grupos; as linhas sobrescritas representam diferenças significativas entre os intervalos de tempo (sem linha = 24 h; ' = 48 h e '' = 72 h); CN=controle negativo; CP=controle positivo.

O maior número de células mononucleadas com MN encontrado foi $116,00 \pm 8,91$, e corresponde a maior concentração do padrão Sb^{V} analisada ($50 \mu\text{g/mL}$) após incubação de 24 h. Os controles negativo e positivo, neste mesmo período de incubação, apresentaram respectivamente, $4,03 \pm 2,12$ e $22,34 \pm 4,64$ células mononucleadas com formação de MN.

As amostras que foram tratadas com Sb-AMG^{V} também tiveram o maior número de células mononucleadas com presença de MN na concentração de $50 \mu\text{g/mL}$ ($110,01 \pm 7,41$) após incubação de 24 h. Os controles negativo e positivo, neste mesmo período, apresentaram, respectivamente, $2,67 \pm 0,64$ e $21,11 \pm 3,54$ células mononucleadas com presença de MN.

A Figura 23 A-B apresenta a quantidade de células binucleadas encontradas após os três períodos de incubação ensaiados para as amostras contendo diferentes concentrações de Sb-AMG e de Sb^{V} . Semelhante ao ocorrido com a contabilização de micronúcleos em leucócitos humanos mononucleados, o tempo de incubação que mais apresentou células binucleadas foi o de 24 h e a concentração de Sb com maior número de células binucleadas foi a de $50 \mu\text{g/mL}$, para ambas apresentações de Sb utilizadas, com exceção para a incubação de 72 h para o Sb-AMG , que apresentou número de células binucleadas maior ao encontrado para o período de 24 h de incubação.

As amostras que receberam a maior concentração de Sb ($50 \mu\text{g/mL}$) provenientes do Sb-AMG (Figura 23 A), após os três períodos de incubação, apresentaram, respectivamente, $80,00 \pm 8,54$, $54,33 \pm 3,21$ e $91,33 \pm 3,51$ células binucleadas; e as amostras que receberam Sb^{V} (Figura 23 B), nestes mesmos períodos e concentração de Sb , apresentaram $85,00 \pm 4,09$, $58,67 \pm 4,05$ e $41,00 \pm 5,57$ de células binucleadas, respectivamente.

Todas as cinco concentrações testadas ($5-50 \mu\text{g/mL}$) apresentaram resultados estatisticamente significativos, nos três intervalos de tempo de incubação, quando comparadas ao controle negativo ($p < 0,05$). O número de células binucleadas encontradas para os controles negativo e positivo após os três períodos de incubação para análise das concentrações de Sb-AMG (Figura 23 A) foram de $11,33 \pm 1,53$ e $25,67 \pm 3,05$, enquanto que para análise das concentrações de Sb^{V} (Figura 23 B) foi contabilizado para os controles, respectivamente, $12,22 \pm 3,67$ e $26,67 \pm 3,05$ de células binucleadas.

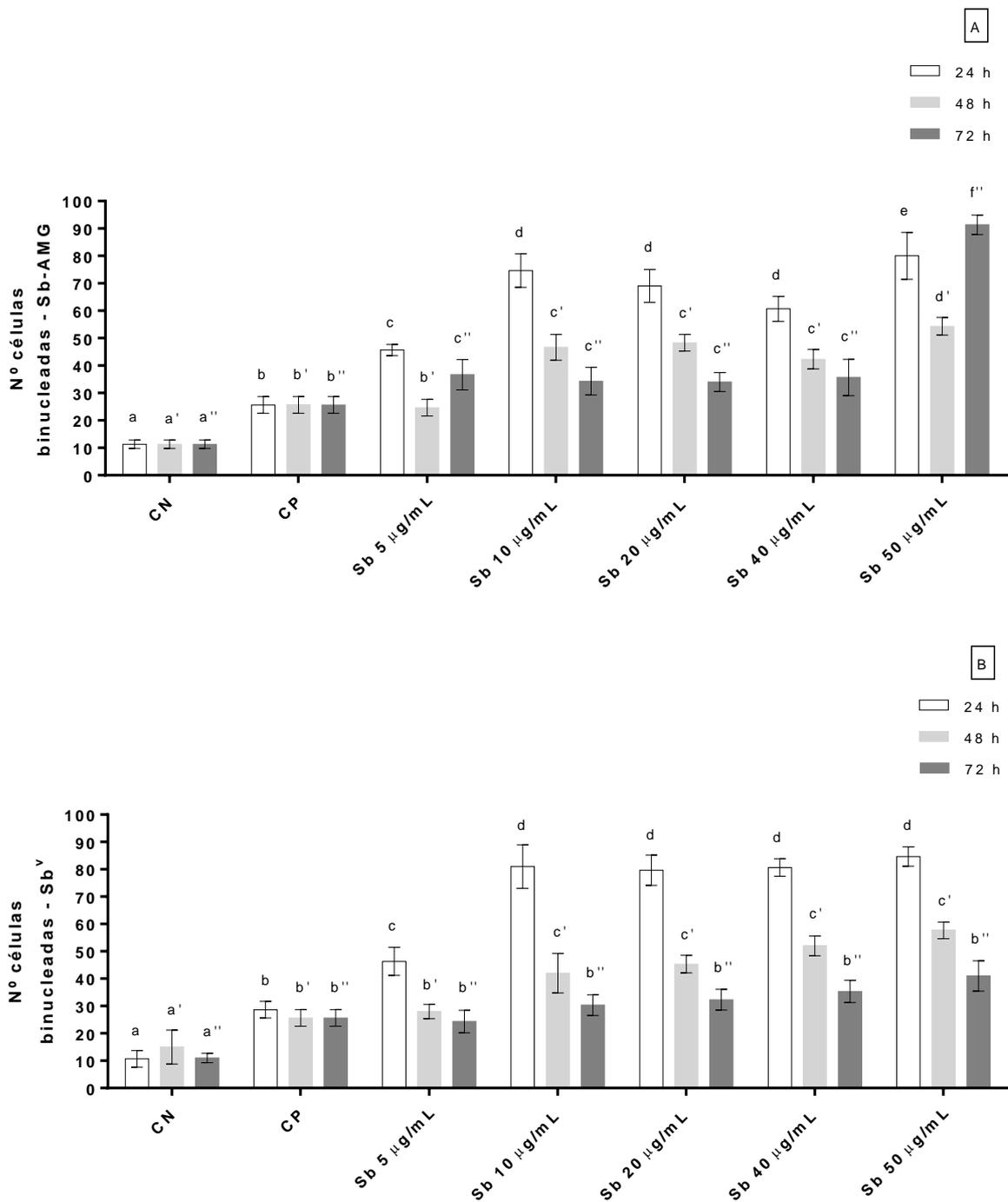


Figura 23 - Contabilização de leucócitos humanos binucleados expostos a diferentes concentrações de antimônio a partir do antimoniato de meglumina (Sb-AMG)^A e padrão de antimônio (Sb^V)^B. Os dados estão expressos em média \pm desvio padrão, n=3; p<0.05. a,b,c,d,e,f representam diferenças significativas entre os grupos; as linhas sobrescritas representam diferenças significativas entre os intervalos de tempo (sem linha = 24 h; ' = 48 h e '' = 72 h); CN=controle negativo; CP=controle positivo.

É bem estabelecido que a presença de células binucleadas é indicativo de citotoxicidade, a qual decorre de alguma falha no processo de citocinese (HOLLAND et al., 2008). O aumento na sua incidência pode prever uma falha no mecanismo de diferenciação celular ou ser secundária a agentes genotóxicos, muito embora os

mecanismos envolvidos ainda não sejam totalmente elucidados (BURGAZ et al., 1999; REVAZOVA et al., 2001; CELIK et al., 2003; BASU et al., 2002; CARVALHO et al., 2002). Por outro lado, a citotoxicidade e genotoxicidade induzida por xenobiontes, apesar de complexa, aponta para alvos moleculares pertencentes a mecanismos de reparo, eliminação e fixação de danos, mutações e morte celular (KAINA, 2003; FRITZ; KAINA, 2006).

Os dados que demonstram a presença de leucócitos humanos binucleados apresentando MN após exposição aos diferentes tratamentos, concentrações e períodos de incubação estão representados nas Figuras 24 (1MN), 25 (2MN) e 26 (≥ 3 MN). Podemos observar, a partir dos dados da Figura 24 A-B, que a menor concentração analisada (5 $\mu\text{g/mL}$) de Sb para as duas apresentações de Sb ensaiadas, em todos os períodos de incubação (24, 48 e 72 h), não apresentou diferença estatisticamente significativa quanto ao número de células binucleadas com MN, quando comparada ao controle negativo ($p < 0.05$).

Entretanto, para as outras concentrações testadas, tanto para o Sb-AMG quanto para o padrão Sb^V, de modo geral, apresentaram maior contabilização de número de MN para o período de 24 horas, com destaque à concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$ ($33,67 \pm 6,11$ MN para Sb-AMG e $43,33 \pm 1,53$ MN para Sb^V), se comparado aos controles negativo ($3,00 \pm 1,00$ MN) e positivo ($7,33 \pm 0,57$ MN) ($p < 0.05$) para o mesmo período.

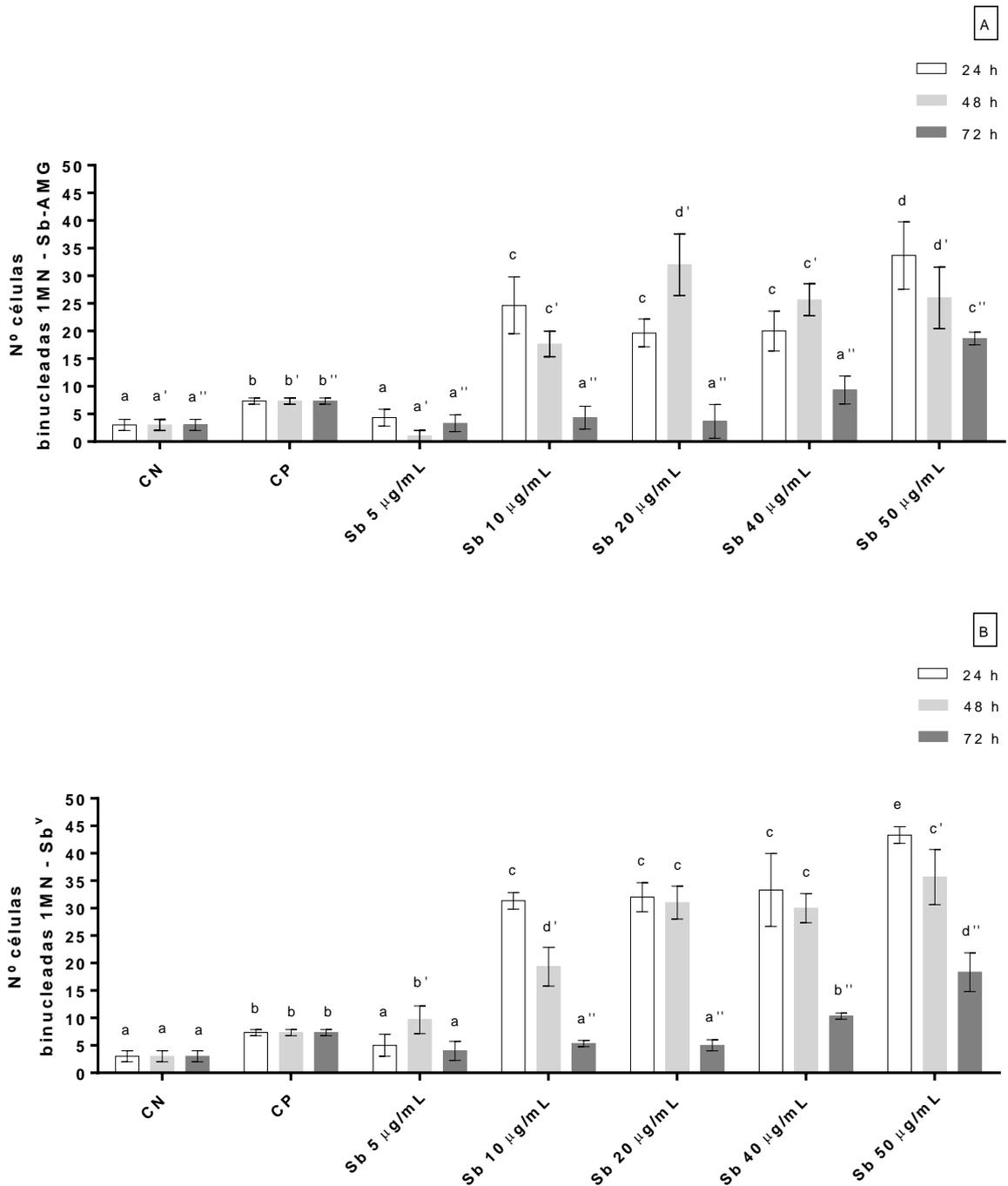


Figura 24 - Contabilização de um micronúcleo em leucócitos humanos binucleados expostos a diferentes concentrações de antimônio a partir do antimoníato de meglumina (Sb-AMG)^A e padrão de antimônio (Sb^V)^B. Os dados estão expressos em média \pm desvio padrão, $n=3$; $p<0.05$. a,b,c,d,e representam diferenças significativas entre os grupos; as linhas sobreescritas representam diferenças significativas entre os intervalos de tempo (sem linha = 24 h; ' = 48 h e '' = 72 h); CN=controle negativo; CP=controle positivo.

O número de células binucleadas com 2MN e com ≥ 3 MN (Figuras 25 A-B e 26 A-B) após o período de 72 h de incubação foi bastante reduzido quando comparado aos tempos de 24 e 48 h. Na maior concentração testada (50 $\mu\text{g/mL}$) de Sb-AMG (Figura 25 A), houve uma redução de 94 % no número de células binucleadas com

2MN, se comparados os períodos de incubação de 48 h ($16,33 \pm 1,51$) com o de 72 h ($1,00 \pm 1,00$). Todavia, o período de 24 h foi o que apresentou o maior número de células binucleadas com 2MN ($21,03 \pm 2,61$).

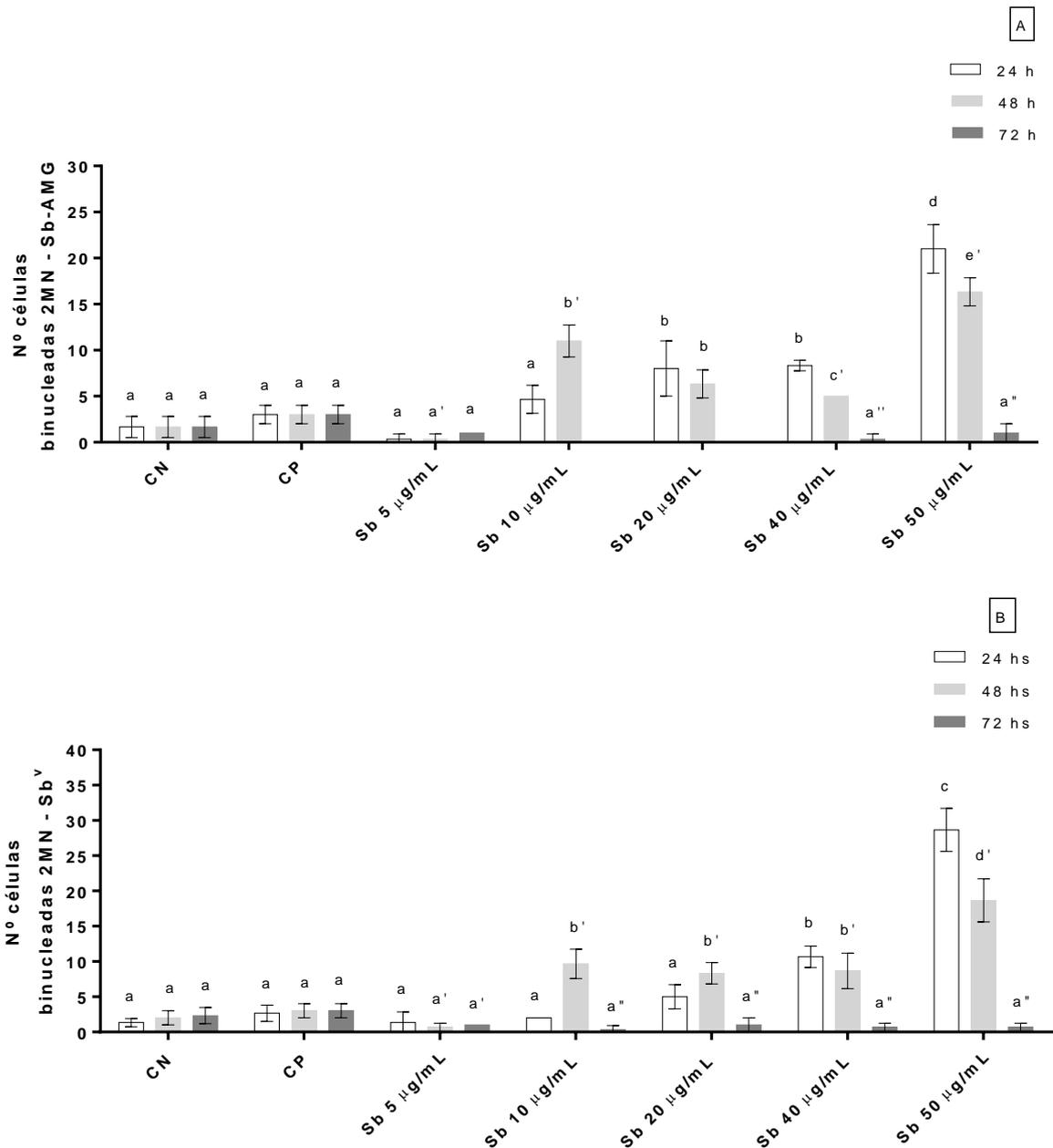


Figura 25 - Contabilização de dois micronúcleos em leucócitos humanos binucleados expostos a diferentes concentrações de antimônio a partir do antimoniato de meglumina (Sb-AMG)^A e padrão de antimônio (Sb^V)^B. Os dados estão expressos em média \pm desvio padrão, $n=3$; $p<0.05$. ^{a,b,c,d,e} representam diferenças significativas entre os grupos; as linhas sobscritas representam diferenças significativas entre os intervalos de tempo (sem linha = 24 h; ' = 48 h, '' = 72 h); CN=controle negativo; CP=controle positivo.

De forma semelhante, os leucócitos expostos as diferentes concentrações de padrão Sb^V (Figura 25 B) apresentaram uma redução do número de células

binucleadas com 2MN de 95% entre o período de 48 h ($18,70 \pm 3,00$) e 72 h ($0,71 \pm 0,63$). Também se constatou, assim como para o Sb-AMG, que, na maior concentração testada para o padrão Sb^V ($50 \mu\text{g/mL}$), o período de 24 h foi o que apresentou maior número de células binucleadas com 2MN ($28,68 \pm 3,03$) entre os períodos de incubação ensaiados.

O número de leucócitos humanos contabilizados como células binucleadas com $\geq 3\text{MN}$ para as diferentes concentrações de Sb-AMG (Figura 26 A) apresentou um resultado diferente do perfil observado até o momento, considerando que somente para a concentração de $50 \mu\text{g/mL}$ e período de incubação de 48 h, apresentou um número de células ($19,70 \pm 5,02$) nessa condição diferente estatisticamente do controle positivo ($0,66 \pm 0,57$) ($p < 0,05$). Ao passo que nos outros parâmetros, de modo geral, a maior diferença se deu no período de incubação de 24 h.

Por outro lado, a exposição dos leucócitos humanos as diferentes concentrações de padrão Sb^V (Figura 26 B), apresentou um perfil diferente ao observado para a exposição ao Sb-AMG, no que diz respeito à contabilização de células binucleadas com $\geq 3\text{MN}$, considerando que para a exposição ao padrão Sb^V , se observou um aumento do número desse parâmetro para as concentrações de 20 e $40 \mu\text{g/mL}$, após 24 h de incubação ($4,33 \pm 1,31$ e $3,70 \pm 1,81$, respectivamente), e, para a concentração de $50 \mu\text{g/mL}$, para a incubação de 48 h ($4,73 \pm 2,10$), quando comparado ao controle positivo ($0,66 \pm 0,57$) ($p < 0,05$).

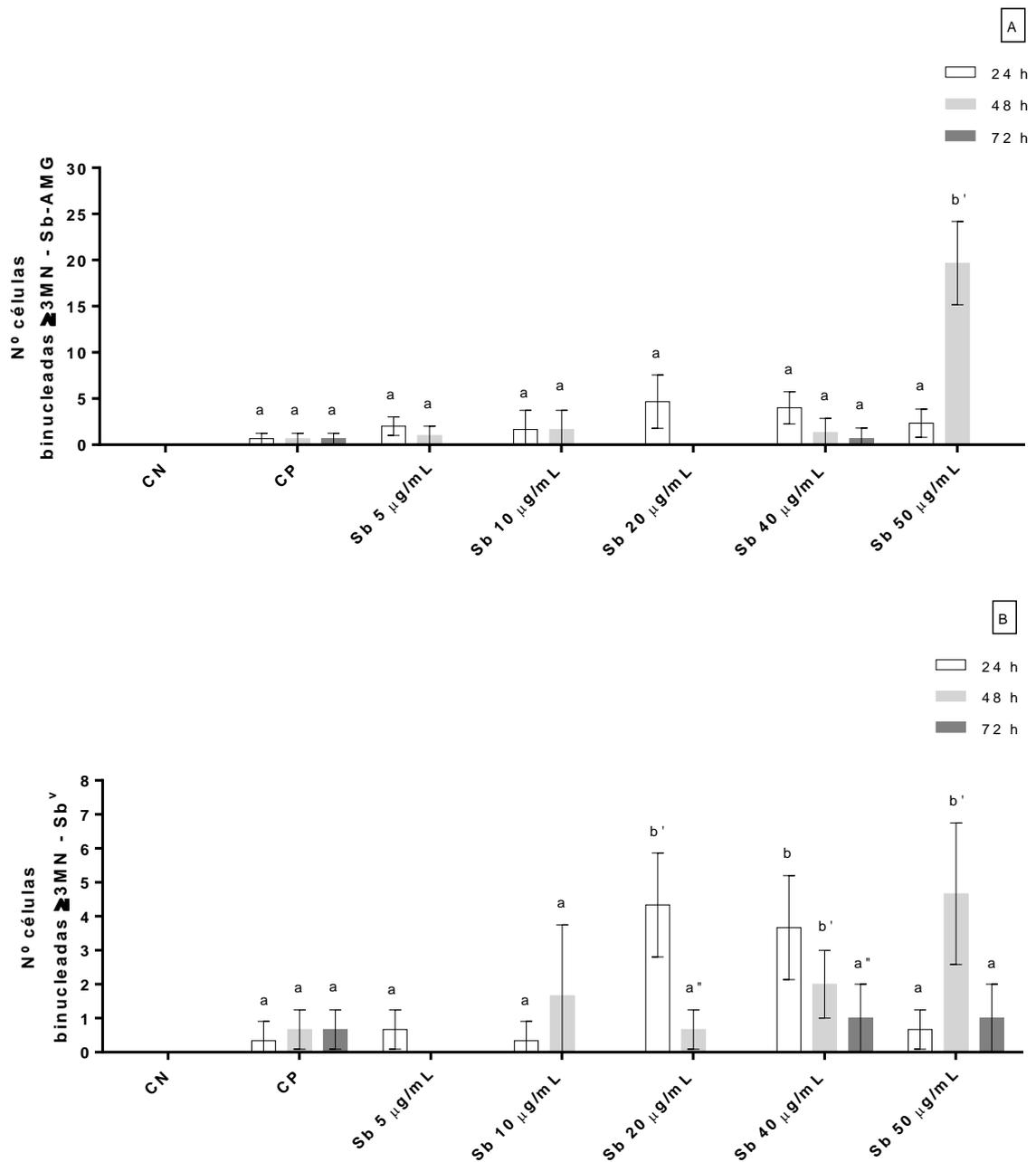


Figura 26 - Contabilização de três ou mais micronúcleos em leucócitos humanos binucleados expostos a diferentes concentrações de antimônio a partir do antimoniato de meglumina (Sb-AMG)^A e padrão de antimônio (Sb^V)^B. Os dados estão expressos em média \pm desvio padrão, n=3; p<0.05. ^{a,b} representam diferenças significativas entre os grupos; as linhas sobrescritas representam diferenças significativas entre os intervalos de tempo (sem linha = 24 h; ' = 48 h, '' = 72 h); CN=controle negativo; CP=controle positivo.

Tomando conjuntamente os resultados observados no parâmetro de contabilização de micronúcleos em células binucleadas, de modo geral, fica evidenciado que os danos induzidos ao material genético para as duas formas de Sb, Sb-AMG e Sb^V, é dependente do fator tempo de exposição, onde o período de incubação de 24 h apresentou a maior contabilização de micronúcleos e, portanto,

de lesão. Adicionalmente, na maior parte das vezes, os danos também foram dependentes das concentrações utilizadas, sendo as maiores concentrações, 20, 40 e 50 µg/mL responsáveis pelos danos observados, com proeminência para a concentração de 50 µg/mL. Não obstante, foi possível observar que os maiores danos estiveram presentes para o Sb^v, muito embora dos danos induzidos pelo Sb-AMG também tenham sido significativos.

Em relação aos resultados deste estudo, é importante considerar os pressupostos de que micronúcleos resultam de lesões no DNA ou cromossomos, ou ao nível de proteínas envolvidas na segregação cromossômica, como a tubulina, seja de forma direta ou indireta. Ademais, o teste do micronúcleo é rotineiramente utilizado como teste padrão durante o primeiro estágio de desenvolvimento de novos fármacos, no intuito de identificar previamente possíveis aberrações cromossômicas (KIRSCH-VOLDERS et al., 2003; PHELPS et al., 2002). Como mencionamos no decorrer do trabalho, preparações à base de Sb são os medicamentos de escolha para o tratamento da leishmaniose há mais de 90 anos, portanto, muito provavelmente, o Sb-AMG não tenha passado por este tipo de teste durante o seu desenvolvimento, já que essa exigência passou a ser cobrada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) a partir do ano de 2013 (ANVISA, 2013).

Agravando mais o contexto do uso do medicamento Sb-AMG, existem poucos estudos de sua interferência sobre a estrutura celular, incluindo sua organização genética. Ademais, há uma lacuna na determinação da concentração mínima de indução de citotoxicidade, genotoxicidade e indução mutagênica. De fato, existem alguns apontamentos, mas são esparsos e não definem essas questões. A título de ilustração desta problemática, citamos um estudo envolvendo um paciente de 51 anos de idade sob terapia aplicada à leishmaniose visceral com o Sb-AMG, onde foi encontrado um aumento da indução de micronúcleos em linfócitos de sangue periférico no 7^o e 15^o dia após o início do tratamento. Os autores desse estudo sugerem que o fármaco interfira na distribuição dos cromossomos durante a mitose, sem, entretanto, afetar diretamente a sua estrutura (HANTSON et al., 1996).

Em nosso estudo, no entanto, levando em consideração os dados apontados até aqui, demonstramos que ocorre lesão na estrutura de DNA, concorrendo para alterações cromossômicas, como evidenciado no teste de instabilidade cromossômica numérico. Por outro lado, é evidente, também, que há alterações na distribuição cromossômica, uma vez que há formação de células binucleadas e

formação de micronúcleos, caracterizando não só lesão de DNA, mas efeito mutagênico, tanto para o Sb^V quanto para o Sb-AMG.

Corroborando com nossos dados, Fenech (2000) afirma que perdas cromossômicas e a não segregação de cromossomos são importantes eventos celulares causados por defeitos no fuso, no centrômero, ou ainda, como uma consequência da não condensação da estrutura cromossômica antes da etapa da metáfase do ciclo celular. Tais eventos, afirma o mesmo autor, concorrem para processos carcinogênicos.

Como discutido anteriormente, o processo de lesão celular, incluindo-se a lesão do material genético, juntamente com a impossibilidade de reparo, conduz a célula a um complexo processo de biossinalização que culmina com a morte da célula, ou seja, ativa-se mecanismos apoptóticos. Outrossim, quando a lesão é muito severa, impossibilitando a instalação do processo apoptótico, tem-se a necrose celular. Ademais, pode haver evolução da apoptose para a necrose.

À luz desses pressupostos, apresentamos, na figura 27 A-B, a contabilização de células em condição de necrose após exposição as diferentes concentrações de Sb-AMG e padrão de Sb^V testadas (5-50 µg/mL), após os três períodos de incubação avaliados (24, 48 e 72 h).

Como podemos observar, em ambos tratamentos com Sb (Sb-AMG e padrão Sb^V) o período de incubação que mais apresentou leucócitos humanos em processo necrótico foi o de 48 h. As amostras que foram tratadas com o fármaco por este período de tempo tiveram um total de $208,84 \pm 3,73$ células em processo necrótico de 5.000 células analisadas (Figura 27 A), enquanto o controle negativo não apresentou nenhuma célula em necrose e o controle positivo apresentou $7,25 \pm 1,78$ ($p < 0.05$). O número de células necróticas contabilizado para os tempos de 24 e 72 horas foi semelhante a partir da segunda concentração analisada (10 µg/mL), demonstrando que o efeito apresentado não é concentração dependente.

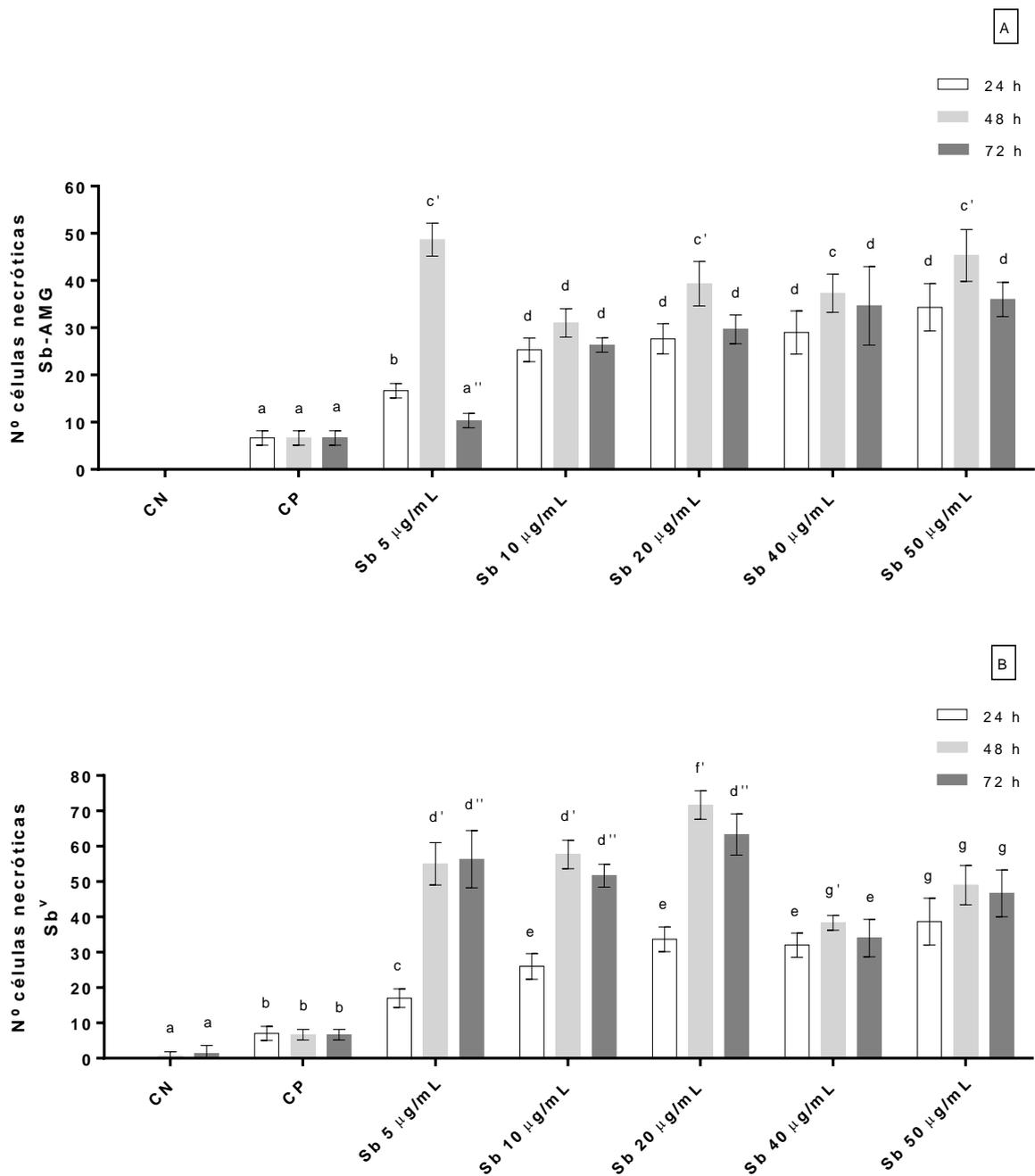


Figura 27 - Contabilização de leucócitos humanos em condição de necrose expostos a diferentes concentrações de antimônio a partir do antimoniato de meglumina (Sb-AMG)^A e padrão de antimônio (Sb^v)^B. Os dados estão expressos em média \pm desvio padrão, $n=3$; $p<0.05$. *a,b,c,d,e,f,g* representam diferenças significativas entre os grupos; as linhas sobrescritas representam diferenças significativas entre os intervalos de tempo (sem linha = 24 h; ' = 48 h e '' = 72 h); CN=controle negativo; CP=controle positivo.

No tratamento com Sb^v, o número total de células em condição de necrose no período de 48 h foi de $271,67 \pm 4,35$ de 5.000 células analisadas (Figura 27 B), onde o controle negativo apresentou $0,67 \pm 1,15$ células em necrose, e o controle positivo $7,00 \pm 3,00$ ($p<0.05$). Entretanto, diferentemente do perfil observado para o

tratamento com Sb-AMG, o tratamento com Sb^V apresentou um aumento do número de células necróticas para os períodos de tempo de 48 e 72 horas nas três menores concentrações (5, 10 e 20 µg/mL), e uma diminuição da presença de necrose para as duas maiores concentrações (40 e 50 µg/mL). Demonstrando, assim, embora com perfil diferente, também não ser concentração dependente.

No presente estudo, observou-se um número expressivos de células em condição de necrose, tanto para o tratamento com Sb-AMG quanto para o tratamento com padrão Sb^V. Segundo Grivicich et al. (2007), o dano causado pelo Sb nas células pode decorrer de sua capacidade de interferir na regulação do estado redox celular, induzindo estresse oxidativo e levando a célula à morte celular devido ao acúmulo de ERO. Este aumento dos níveis de ERO conduz à oxidação de lipídios, proteínas e ácidos nucleicos pelo Sb, aumentando o colapso do potencial de membrana mitocondrial interna, que leva a perda da homeostasia celular interrompendo a biossíntese de ATP que, por fim, caracteriza molecularmente o dano celular por necrose.

Sendo assim, chamamos atenção para o potencial lesivo do Sb-AMG que, embora menor que o observado para o Sb^V, também, nesses últimos três parâmetros analisados, mostrou-se significativo, o que traz preocupação quanto à segurança de seu uso na terapia.

Ainda dentro do contexto da análise de lesões e alterações celulares, na figura 28 A-B é demonstrada a contabilização de células em condição de apoptose para os tratamentos com Sb-AMG e Sb^V, nos três períodos de incubação ensaiados. A partir de nossos resultados, podemos constatar que o processo apoptótico aconteceu de forma mais pronunciada que o processo necrótico, para ambos tratamentos. Contudo, no caso da exposição das células às concentrações de Sb-AMG, se observou um comportamento concentração dependente, com maior indução apoptótica para as três maiores concentrações ensaiadas (20, 40 e 50 µg/mL), com uma proeminência do número de células apoptóticas para o período de incubação de 48 h, embora todos os outros períodos e concentrações ensaiados também apresentassem significância ao serem comparadas com os controles negativo e positivo ($p < 0.001$).

Para o referido período (48 h), foram contabilizadas $1.034,73 \pm 5,51$ células em apoptose de 5.000 células analisadas no grupo das amostras que receberam Sb-AMG (Figura 28 A) e $1.367,70 \pm 4,41$ nas amostras que receberam o padrão Sb^V

(Figura 28 B). O número de células apoptóticas para 3.000 células analisadas para os controles negativo e positivo foi, respectivamente, de $2,68 \pm 0,58$ e $34,60 \pm 3,36$.

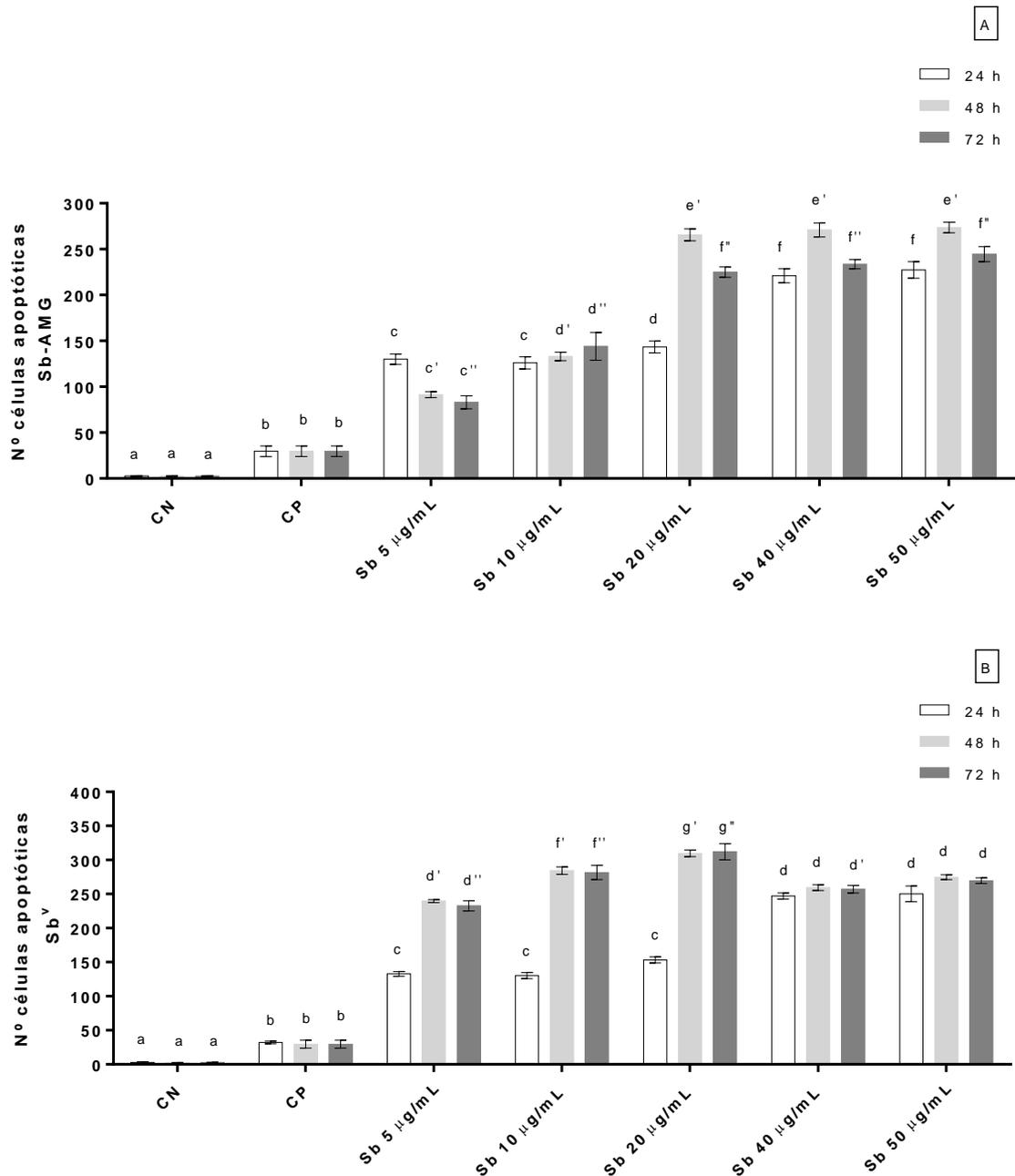


Figura 28 - Contabilização de leucócitos humanos em condição de apoptose expostos a diferentes concentrações de antimônio a partir do antimoniato de meglumina (Sb-AMG)^A e padrão de antimônio (Sb^V)^B. Os dados estão expressos em média \pm desvio padrão, n=3; p<0.05. a,b,c,d,e,f,g representam diferenças significativas entre os grupos; as linhas sobreescritas representam diferenças significativas entre os intervalos de tempo (sem linha = 24 h; ' = 48 h e '' = 72 h); CN=controle negativo; CP=controle positivo.

Como já mencionado anteriormente, o processo apoptótico é altamente complexo. Entretanto, considerando-se os danos ao nível de material genético

observados pelas análises dos parâmetros genotóxicos analisados pelo presente estudo, é plausível sugerir que a via que está mais diretamente relacionada ao desencadeamento da condição de apoptose após exposição das células leucocitárias ao Sb-AMG e Sb^V seja a via intrínseca.

Dentro deste contexto, é bem estabelecido que os sinais liberados por dano genotóxico convergem, principalmente, para a mitocôndria. Essa organela integra os estímulos de morte celular, induzindo a permeabilização mitocondrial e consequente liberação de moléculas pró-apoptóticas como a Bax e Bid nela presentes (DESAGHER; MARTINOU, 2000). Pesquisas relacionadas a atuação da mitocôndria sobre os mecanismos de morte celular evidenciam que esta organela contribui tanto para o processo de apoptose quanto para a necrose, em ambos os casos, há uma disfunção mitocondrial (NIEMINEM, 2003).

Interessante notar que a constatação da presença mais pronunciada de processo apoptótico em detrimento de processo necrótico, para esse estudo, reitera e corrobora com os outros resultados apresentados, principalmente no que tange a presença de genotoxicidade, tanto para o Sb-AMG quanto para o Sb^V, nas concentrações e períodos de incubação ensaiados. Este contexto sugere que após a irreversibilidade de lesão celular que, pelo menos em parte, se dá ao nível de seu DNA, os leucócitos deflagraram o processo apoptótico.

Ainda, com a quantificação das lesões celulares, de necrose e apoptose, foi possível calcularmos o IDNC, que traduz o quão tóxica foi a exposição de células a determinado xenobionte. A Figura 29 A-B apresenta os resultados encontrados no cálculo do IDNC de leucócitos humanos expostos a diferentes concentrações de antimônio a partir do Sb-AMG e do padrão Sb^V. O IDNC foi estatisticamente superior em todas as concentrações testadas, de ambos os tipos de apresentação de Sb, quando comparados ao controle negativo (IDNC = 0,01), sendo, inclusive, superiores ao encontrado para o controle positivo (IDNC = 0,13) ($p < 0.001$).

O maior IDNC encontrado foi de 0,61, no grupo das amostras tratadas com o fármaco Sb-AMG sob a concentração de 50 µg/mL após incubação de 48 h. A amostra tratada com o padrão Sb^V, com a mesma concentração e com o mesmo tempo de incubação, apresentou um IDNC de 0,50, porém, sem diferença estatística significativa. Sendo assim, as duas formas de Sb, demonstraram, por este parâmetro de avaliação, serem igualmente tóxicas aos leucócitos humanos, sob as condições experimentais ensaiadas.

É interessante observar que o IDNC foi concentração dependente para as duas apresentações ensaiadas, contudo, se observou um crescimento de dano com maior evidência para o período de incubação de 48 h para o Sb-AMG, e 24 h para o Sb^V.

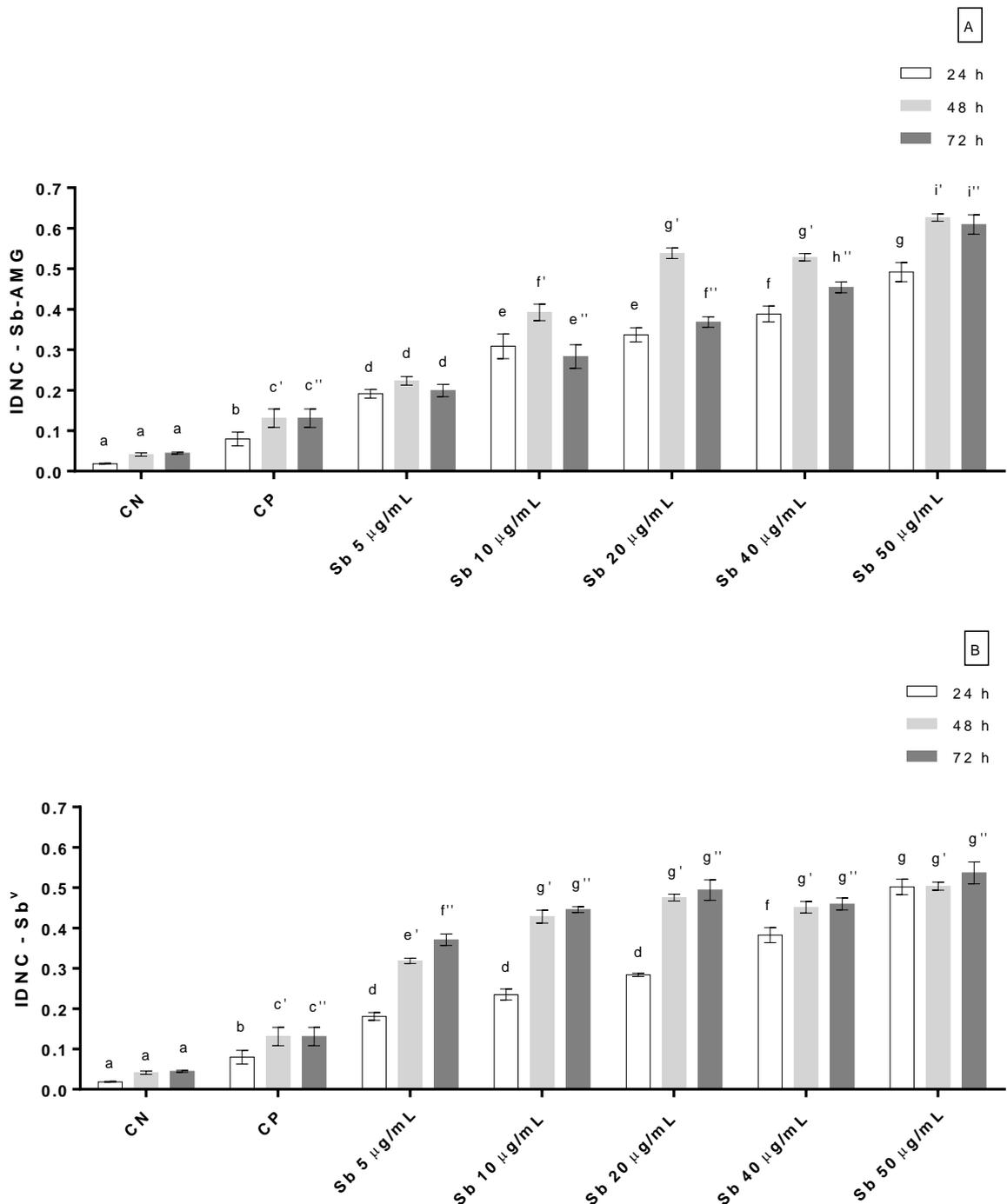


Figura 29 - Índice de divisão nuclear citotóxico em leucócitos humanos expostos a diferentes concentrações de antimônio a partir do antimoniato de meglumina (Sb-AMG)^A e padrão de antimônio (Sb^V)^B. Os dados estão expressos em média \pm desvio padrão, n=3; p<0.05. ^{a,b,c,d,e,f,g,h,i} representam diferenças significativas entre os grupos; as linhas sobrescritas representam diferenças significativas entre os intervalos de tempo (sem linha = 24 h; ' = 48 h e '' = 72 h); CN=controle negativo; CP=controle positivo.

Os dados aqui apresentados corroboram com as citações de Balanã-Fouce et al. (1998) ao afirmar que o Sb-AMG não é um fármaco seguro. A capacidade do Sb-AMG de provocar elevada quantidade de morte celular por necrose e apoptose demonstra bem este efeito e comprova que o fármaco é tão tóxico quanto o metal Sb^V. Porém, com caráter inovador, nosso trabalho demonstra a presença de toxicidade do Sb-AMG em uma faixa de concentração inferior à terapêutica, com capacidade de induzir genotoxicidade, elevado grau de morte celular por necrose e apoptose, demonstrando, ainda, ser quase tão tóxico quanto o próprio Sb^V presente em sua formulação.

5.4 Análise quantitativa de antimônio intracelular

Na figura 30 A-B é apresentada a concentração intracelular em picogramas de Sb após exposição às diferentes concentrações de Sb, a partir do fármaco Sb-AMG e do padrão de Sb^V. É possível perceber que há uma diferença concentração dependente do influxo do fármaco e, conseqüentemente do Sb intracelular em células leucocitárias humanas nas três maiores concentrações ensaiadas de Sb-AMG e nas duas maiores concentrações ensaiadas de Sb^V ($p < 0.001$). Não foi encontrado Sb intracelular para os controles negativo e positivo, já que foram utilizados os mesmos controles preparados para os demais ensaios presentes neste estudo.

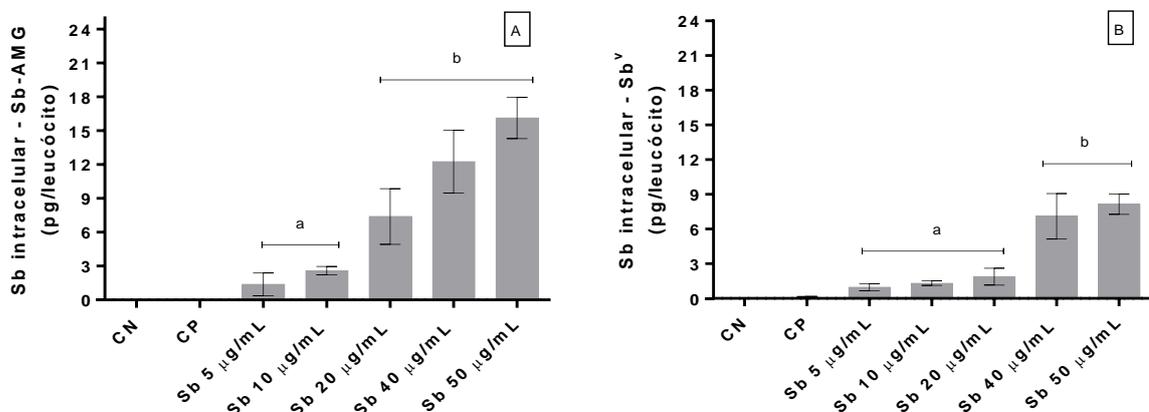


Figura 30 – Análise quantitativa de antimônio intracelular em leucócitos humanos expostos a diferentes concentrações de antimônio a partir do antimoniato de meglumina (Sb-AMG)^A e padrão de antimônio (Sb^V)^B. Os dados estão expressos em média ± desvio padrão, n=3; $p < 0.05$. As letras sobre as barras representam diferenças significativas entre os grupos; CN=controle negativo; CP=controle positivo.

As quantidades encontradas de Sb nas amostras contendo o fármaco (5-50 $\mu\text{g/mL}$) foram, respectivamente, $1,38 \pm 1,02$, $2,60 \pm 0,37$, $7,40 \pm 2,46$, $12,26 \pm 2,77$ e $16,13 \pm 1,82$ pg/leucócito. Enquanto as quantidades quantificadas de Sb intracelular, nas cinco concentrações analisadas de Sb^{V} (5-50 $\mu\text{g/mL}$), foram $0,98 \pm 0,30$, $1,32 \pm 0,20$, $1,89 \pm 0,73$, $7,11 \pm 1,97$, $8,15 \pm 0,88$ pg/leucócito respectivamente.

Com a quantificação de Sb intracelular podemos demonstrar que a entrada tanto do Sb-AMG quanto do Sb^{V} em leucócitos humanos ocorre de modo concentração dependente, mas a entrada na célula apresentou cinética de ordem zero, considerando a porcentagem constante de entrada celular encontrado, independente da concentração de exposição de Sb-AMG e Sb^{V} . Entretanto, o fármaco apresentou uma porcentagem superior (0,00003%) de entrada celular que o Sb^{V} (0,000015%). Sugerindo, assim, que o Sb associado ao fármaco tem uma maior facilidade de penetração nos leucócitos humanos do que o Sb^{V} . Entretanto, o padrão Sb^{V} através dos outros ensaios aqui demonstrados foi capaz de produzir uma toxicidade mais proeminente que o Sb-AMG, mesmo com um influxo menor que Sb-AMG nos leucócitos humanos.

Tomando conjuntamente nossos resultados, é possível afirmar que o Sb-AMG possui efeito citotóxico, genotóxico e mutagênico, na faixa de concentração encontrada por Cruz et al. (2007) de Sb^{V} no organismo de pacientes pediátricos e adultos sob tratamento com este fármaco para leishmaniose, bem como concentrações menores.

Adicionalmente, os dados aqui apresentados trazem à tona a necessidade de se descobrir novos fármacos antileishmânicos com maior segurança para os pacientes usuários dessa classe de fármacos, ou seja, fármacos que apresentem efetividade frente ao parasita, mas que também ofereçam menores riscos de citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade.

6 CONCLUSÕES

Considerando a exposição de células leucocitárias ao Sb-AMG e ao Sb^V em uma faixa de concentração de 5, 10, 20, 40 e 50 µg/mL, e período de incubação de 72 horas ou 24, 48 e 72 horas, foi possível concluir que:

- O fármaco Sb-AMG possui atividade citotóxica sobre leucócitos humanos em todas as concentrações testadas (5-50 µg/mL) de forma concentração dependente. Ao mesmo tempo, também se observou que o Sb^V apresentou elevada citotoxicidade, entretanto, com um percentual mais elevado para as concentrações de 40 e 50 µg/mL.

- Tanto o Sb-AMG quanto o Sb^V foram capazes de interferir negativamente no processo de proliferação celular, diminuindo o número de células proliferadas em todas as concentrações testadas.

- Ao se avaliar o efeito o Sb-AMG e Sb^V sobre a capacidade de induzir danos cromossômicos, valendo-se da avaliação de alterações cromossômicas numéricas, se observou que ambos induziram alterações nesse parâmetro em todas as concentrações testadas e de forma concentração dependente. Entretanto, as concentrações de 20, 40 e 50 µg/mL de Sb^V induziram maior interferência cromossomal que a observada para o Sb-AMG, embora este último também tenha sido bastante significativo.

- Para a avaliação do índice mitótico, não foi observada alteração nas concentrações de Sb-AMG testadas. Por outro lado, o Sb^V foi capaz de interferir no índice mitótico nas concentrações de 20, 40 e 50 µg/mL, de forma concentração dependente.

- Na avaliação do índice de dano ao DNA (teste cometa), foi observado dano à estrutura de DNA nas concentrações 20, 40 e 50 µg/mL, tanto para o Sb-AMG quanto para o Sb^V. Contudo, para este último, o comportamento fora concentração dependente, com maior indução de dano para a concentração de 50 µg/mL.

- Em relação à quantificação de quebras de fita dupla de DNA, foi observado comportamento concentração dependente tanto para Sb-AMG quanto para Sb^V, porém, o Sb-AMG com um número de quebras semelhante ao controle positivo nas concentrações de 40 e 50 µg/mL, enquanto que o Sb^V apresentou um número maior

de quebras de fita dupla, quando comparado ao mesmo controle, na concentração de 50 µg/mL.

- Na análise da presença de micronúcleos, foi observado que tanto o Sb-AMG quanto o Sb^V foram capazes de induzir alterações na organização cromossômica, nos três períodos de incubação e concentrações ensaiadas. Todavia, o maior número de células com micronúcleos foi encontrado nos leucócitos humanos expostos ao Sb^V.

- Na contabilização do número de células necróticas, todas as concentrações avaliadas induziram necrose, contudo, fora observado um maior número de células em condição de necrose para o Sb^V que para o Sb-AMG.

- Na contabilização do número de células apoptóticas, todas as concentrações testadas foram capazes de induzir apoptose, de forma concentração dependente, com um maior número de apoptoses para o Sb^V em relação ao Sb-AMG. Todavia, para este último o processo apoptótico foi maior para o período de 48 horas.

- Na avaliação do IDNC, todas as concentrações testadas, tanto para o Sb-AMG quanto para o Sb^V, de maneira concentração dependente, apresentaram índice bem superior aos encontrados para os controles negativo e positivo, sugerindo alta toxicidade.

- Na quantificação de Sb intracelular encontramos cinética de ordem zero, considerando a porcentagem constante de entrada celular encontrado, independente da concentração de exposição de ambas as formas de Sb analisadas.

7 PERSPECTIVAS FUTURAS

Diante dos resultados apresentados, surge a necessidade de estudos complementares para avaliar se há reprodutibilidade, em humanos, dos resultados aqui demonstrados.

Adicionalmente, há o interesse do grupo de continuar os estudos dentro do contexto mecanístico das lesões observadas, tanto para o Sb-AMG quanto para o Sb^V, prospectando a elucidação dos fenômenos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos observados neste estudo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABASTADO, J. P. Apoptosis: function and regulation of cell death. **Research in Immunology**, v. 147, p. 443-456, 1996.

AGARWAL, M. L.; TAYLOR, W. R.; CHERNOV, M. V.; CHERNOVA, O. B.; STARK, G. R. The p53 network. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 1, p. 1-4, 1998.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Biologia Molecular da Célula**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

ALMEIDA, W. B. **Atividade nucleásica do complexo do complexo trans-[Ru (II)CL₂ (nic)₄] sobre o ácido desoxirribonucléico “in vitro e in vivo”**. Trabalho de Conclusão de curso (graduação em Farmácia) - Universidade do Extremo Sul Catarinense. Criciúma: 2006.

ALTAMIRANO-ENCISO, A. J. **Comprometiendo la estructura osteo-facial de las poblaciones humanas Del Antiguo Perú por la Leishmaniasis Tegumentária de forma mucosa**. Dissertação (Doutorado) - Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, 2000.

AMARANTE-MENDES, G. P. Apoptose: programa molecular de morte celular. **Einstein**, v. 1, p. 15-18, 2003.

AMATO, V. S.; OLIVEIRA, L. S.; SILVA, A. C. M.; MACHADO, F. R.; AMATO, J. G. P.; NICODEMO, A. C.; NETO, V. A. Um caso de leishmaniose cutâneo-mucosa tratado com sucesso com baixa dose de antimônio pentavalente. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 31, n. 2, p. 221-224, 1998.

AMATO, V. S. Tratamento da Leishmaniose Tegumentar Americana. **Boletim Epidemiológico Paulista (BEPa)**, São Paulo, ano 3, n. 26, fev. 2006.

ANSTEAD, G. M.; CHANDRASEKAR, B.; ZHAO, W.; YANG, J.; PEREZ, L. E.; MELBY, P. C. Malnutrition alters the innate immune response and increases early visceralization following *Leishmania donovani* infection. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 8, p. 4709-4718, 2001.

ANVISA. Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos, **Gerência de Avaliação de Segurança e Eficácia – GESEF**, Brasília, v. 2, 2013. Disponível em:

<<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/e0f1d9004e6248049d5fddd762e8a5ec/Guia+de+Estudos+N%C3%A3o+Cl%C3%ADnicos++vers%C3%A3o+2.pdf?MOD=AJPERES>>. Acesso em 08/05/2015.

AVENTIS PHARMA. **Bula do medicamento Glucantime®**. Brasil, 2006.

AZACURA, K.; SATOH, H.; CHIBA, M.; OKAMOTO, M.; SERIZAWA, K.; NAKANO, M.; OMAE, K. Genotoxicity studies of heavy metals: lead, bismuth, indium, silver and antimony. **Journal of Occupational Health**, v. 51, p. 498-512, 2009.

BALANÃ-FOUCE, R.; REGUERA, R. M.; CUBRÍA, J. C.; ORDÓNEZ, D. The Pharmacology of Leishmaniasis. **General Pharmacology**, v. 30, n. 4, p. 435-443, 1998.

BASANO, S. A.; CAMARGO, L. M. A. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, n. 3, p. 328-337, 2004.

BASU, A.; MAHATA, J.; ROY, A. K.; SARKAR, J. N.; PODDAR, G.; NANDY, A. K.; SARKAR, P. K.; DUTTA, P. K.; BANERJEE, A.; ROYCHAUDHURY, S.; NATARAJAN, A. T.; NILSSON, R.; GIRI, A. K. Enhanced frequency of micronuclei in individuals exposed to arsenic through drinking water in West Bengal, India. **Mutation Research**, v. 516, n. 1-2, p. 29-40, 2002.

BENN, S. C.; WOOLF, C. J. Adult neuron survival strategies — slamming on the brakes. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 5, n. 9, p. 686-700, 2004.

BEYERSMANN, D.; HARTWIG, A. Carcinogenic metal compounds: recent insight into molecular and cellular mechanisms. **Archives Toxicology**, v. 82, n. 8, p. 493-512, 2008.

BIRKBAK, N. J.; EKLUND, A. C.; LI, Q.; MCCLELLAND, S. E.; ENDESFELDER, D.; TAN, P.; TAN, I. B.; RICHARDSON, A. L.; SZALLASI, Z.; SWANTON, C. Paradoxical relationship between chromosomal instability and survival outcome in cancer. **Cancer Research**, v. 71, n. 10, p. 3447-3452, 2011.

BOECK, M.; KIRSCH-VOLDERS, M.; LISON, D. Cobalt and antimony: genotoxicity and carcinogenicity. **Mutation Research**, v. 533, p. 135-152, 2003.

BORNER, C. The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. **Molecular Immunology**, v. 39, n. 11, p. 615-47, 2003.

BOUDET, F.; LECOEUR, H.; GOUGEON, M. L. Apoptosis associated with ex vivo down-regulation of Bcl-2 and up-regulation of Fas in potencial cytotoxic CD8 lymphocytes during HIV infection. **Journal of Immunology**, v. 156, n. 6, p. 2282-2293, 1996.

BRAMBILLA, G.; MARTELLI, A. Update on genotoxicity and carcinogenicity testing of 472 marketed Pharmaceuticals. **Mutation Research**, v. 681, n. 2-3 p. 209–229, 2009.

BRANZEI, D.; FOIANI, M. Regulation of DNA repair throughout the cell cycle. **Nature Reviews: Molecular Cell Biology**, v. 9, n. 4, p. 297-308, 2008.

BRASIL. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. 2. ed. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2010.

_____. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. 1. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2014.

BUDIHardjo, I.; OLIVER, H.; LUTTER, M.; LUO, X.; WANG, X. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 15, p. 269-290, 1999.

BURFORD, N.; EELMAN, M. D.; GROOM, K. Identification of complexes containing glutathione with As(III), Sb(III), Cd(II), Hg(II), Tl(I), Pb(II) or Bi(III) by electrospray ionization mass spectrometry. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 99, p. 1992-1997, 2005.

BURGAZ, S.; KARAHALIL, B.; BAYRAK, P.; TASKIN, L.; YAVUZASLAN, F.; BÖKESOV, I.; ANZION, R. B.; BOS, R. P.; PLATIN, N. Urinary cyclophosphamide excretion and micronuclei frequencies in peripheral lymphocytes and in exfoliated buccal epithelial cells of nurses handling antineoplastics. **Mutation Research**, v. 439, n. 1, p. 97-104, 1999.

BUROW, M. E.; WELDON, C. B.; TANG, Y.; NAVAR, G. L.; KRAJEWSKI, S.; REED, J. C.; HAMMOND, T. G.; CLEJAN, S.; BACKMAN, B. S. Differences in susceptibility

to tumour necrosis factor alpha-induced apoptosis among MCF-7 breast cancer cell variants. **Cancer Research**, v. 58, n. 21, p. 4940-4946, 1998.

CAMARGO, L. M. A.; BARCINSKI, M. A. Leishmanioses, feridas bravas e kalazar. **Ciência e Cultura**, v. 55, n. 1, p. 34-37, 2003.

CARVALHO, M. B.; RAMIREZ, A.; GATTÁS, G. J. F.; AMAR, A.; RAPOPORT, A.; NETO, J. C. B.; CURIONI, O. A. Relationship between the outcome and the frequency of micronuclei in cells of patients with oral and oropharyngeal carcinoma. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 48, n. 4, p. 317-322, 2002.

CELIK, A.; CAVAS, T.; ERGENE-GÖZÜKARA, S. Cytogenetic biomonitoring in petrol station attendants: micronucleus test in exfoliated buccal cells. **Mutagenesis**, v. 18, n. 15, p. 417-421, 2003.

CHAUFFAILLE, M. L. L. F. Análise citogenética e FISH no monitoramento da LMC em tratamento com inibidores da tirosina quinase. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 30, n. 1, p. 13-19, 2008.

CHEN, G.; CAO, P.; GOEDEL, D. V. TNF-Induced Recruitment and Activation of the IKK Complex Require Cdc37 and Hp90. **Molecular Cell**, v. 9, n. 2, p. 401-410, 2002.

CHEN, Y. B.; FU, W. J.; HOU, J.; DING, S. Q.; WANG, D. X.; YUAN, Z. G.; KONG, X. T. Effects of arsenic trioxide on cell cycle and expression of cyclin dependent kinase inhibitors of multiple myeloma cells. **Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi**, v. 24, n. 4, p. 193-196, 2003.

CHEN, Y.; LI, H. M.; LU, W.; QING, C. Blocking effect of arsenic trioxide on the proliferation and cell cycle of human Burkitt lymphoma cells and its related mechanism. **Journal of Experimental Hematology**, v. 21, n. 6, p. 1454-1459, 2013.

COHEN, J. J. Apoptosis: Mechanisms of life and death in the immune system. **The Journal Allergy Clinical Immunology**, v. 103, n. 4, p. 548-554, 1999.

CRUZ, A.; RAINEY, P. M.; HERWALDT, B. L.; STAGNI, G.; PALACIOS, R.; TRUJILLO, R.; SARAIVA, N. G. Pharmacokinetics of antimony in children treated for leishmaniasis with meglumine antimoniate. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 195, p. 602-608, 2007.

DE FLORA, S.; RAMEL, C. Mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. Classification and overview. **Mutation Research** , v. 202, n. 2, p. 285-306, 1998.

DENAMUR, E.; MATIC, I. Evolution of mutation rates in bacteria. **Molecular Microbiology**, v. 60, n. 4, p. 820-827, 2006.

DESAGHER, S.; MARTINOU, J. C. Mitochondrial as the central control point of apoptosis. **Trends in Cell Biology**, v. 10, n. 9, p. 369-376, 2000.

EL-KHAMISY, S. F; CALDECOTT, K. W. TDP1-dependent DNA single-strand break repair and neurodegeneration. **Mutagenesis**, v. 21, n. 4, p. 219-224, 2006.

ELMORE, S. Apoptosis: A review of programmed cell death. **Toxicology Pathology**, v. 35, n. 4, p. 495-516, 2007.

EL-ZEIN, R.A.; ABDEL-RAHMAN, S.Z.; HAY, M.J.; LOPEZ, M.S.; BONDY, M.L.; MORRIS, D.L.; LEGATOR, M.S. Cytogenetic effects in children treated with methylphenidate. **Cancer Letters**, v. 230, n. 2, p. 1-8, 2005.

FABRIS, V. E. Morte e Necrose Celular – Revisão. **Medicina**, v. 25, n. 2, p. 143-152, 1992.

FAUBION, W. A; GORES, G. J. Death receptors in liver biology and pathobiology. **Hepatology**, v. 29, n. 1, p. 1-4, 1999.

FENECH, M. The *in vitro* micronucleus technique. **Mutation Research**, v. 455, n. 1-2, p. 81-95, 2000.

FERNANDES, T. C. C. **Investigação dos efeitos tóxicos, mutagênicos e genotóxicos do herbicida trifluraina , utilizando *Allium cepa* e *Oreochromis niloticus* como sistemas-testes.** Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Instituto de Biociências. Universidade Estadual Paulista. Rio Claro: 2005.

FERRAZ, L. C.; SANTOS, A. B. R.; DISCACCIATI, M. G. Ciclo celular, HPV e evolução da neoplasia intraepitelial cervical: seleção de marcadores biológicos. **Journal of the Health Sciences Institute**, v. 30, n. 2, p. 107-111, 2012.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.

FRIEDBERG, E. C.; WALKER G. C.; SIEDE W.; WOOD R. D.; SCHUKTZ R. A.; ELLENBERGER T. **DNA Repair and Mutagenesis**. 2. ed. Washington, DC: American Society for Microbiology, 2005.

FREZÁRD, F.; DEMICHELI, C.; KATO, K. C.; REIS, P. G.; LIZARAZO-JAIMES, E. H. Chemistry of antimony-based drugs in biological systems and studies of their mechanism of action. **Reviews in Inorganic Chemistry**, v. 33, n. 1, p. 1-12, 2013.

FRITZ, G.; KAINA, B. Rho GTPases: promising cellular targets for novel anticancer drugs. **Current Cancer Drug Targets**, v. 6, n. 1, p.1-14, 2006.

FURLAN, M. B. G. Epidemia de leishmaniose visceral no Município de Campo Grande-MS, 2002 a 2006. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 19, n. 1, p. 15-24, 2010.

FURTADO, T. Leishmaniose tegumentar Americana, In: Machado Pinto J. **Doenças infecciosas com manifestações dermatológicas**. Rio de Janeiro: Médica e científica, p. 319-328, 1994.

GARLAND, J.; RUDIN, C. Cytochrome c induces caspase-dependent apoptosis in intact hematopoietic cells and overrides apoptosis suppression mediated by bcl-2, growth factor signaling, MAP-Kinase, and malignant change. **Blood**, v. 92, n. 4, p. 1235-1246, 1998.

GEBEL, T. Suppression of arsenic-induced chromosome mutagenicity by antimony. **Mutation Research**, v. 412, p. 213-218, 1998.

GENARO, O. **Parasitologia Humana**. 10. ed. São Paulo: Atheneu S.A, 2002.

GIAGINIS, C.; GATZIDOU, E.; THEOCHARIS, S. DNA repair systems as targets of cadmium toxicity. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 213, n. 3, p. 282-290, 2006.

GOMES, F.S. Carotenóides: uma possível proteção contra o desenvolvimento de câncer. **Revista de Nutrição**, v. 20, n. 5, p. 537-548, 2007.

GREEN, D.; KROEMER, G. The central executioners of apoptosis: caspases or mitochondria. **Trends in Cell Biology**, v. 8, n. 7, p. 267-271, 1998.

GREEN, K.; BRAND, M. D.; MURPHY, M. P. Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes. **Diabetes**, v. 53, n. 1, p. 110-118, 2004.

GRIVICICH, I; REGNER, A; ROCHA, A. Morte celular por apoptose. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 53, n. 3, p. 335-343, 2007.

GROSSKOPF, C.; SCHWERDTLE, T.; MULLENDERS, L. H.; HARTWING, A. Antimony impairs nucleotide excision repair: XPA and XPE as potential molecular targets. **Chemical Research in Toxicology**, v. 23, p. 1175-1183, 2010.

GU, Y. S.; KIMB, I. S.; AHN, J. K.; PARK, D. C.; YEUM, D. M.; JI, C. I.; KIM, S. B. Mutagenic and carcinogenic heterocyclic amines as affected by muscle types/skin and cooking in pan-roasted mackerel. **Mutation Research**, v. 515, n. 1-2, p. 189-195, 2002.

GÜEZ, C. M.; WACZUK, E. P.; PEREIRA, K. B.; QUEROL, M. V. M.; ROCHA, J. B. T.; OLIVEIRA, L. F. S. *In vivo* and *in vitro* genotoxicity studies of aqueous extract of *Xanthium spinosum*. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 48, n. 3, p. 461-467, 2012.

GUIDUGLI-NETO, J. **Elementos de Patologia Geral**. São Paulo: Santos Livraria, 1997.

GUO, L.; YANG, J. Y.; WU, C. F. Oxidative DNA damage induced by ethanol in mouse peripheral leucocytes. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 103, n. 3, p. 222-227, 2008.

GURNANI, N.; SHARMA, A.; TALUKDER, G. Comparison of the clastogenic effects of antimony trioxide in mice *in vivo* following acute and chronic exposure. **Biometals**, v. 5, n. 1, p. 47-50, 1992.

HANTSON, P.; LEONARD, E. D.; CRUTZEN-FAYT, M. C.; LEONARD A.; VANDERCAM, B.; DELAERE, B.; MAHIEU, P. Cytogenetic observations after meglumine antimoniate therapy for visceral leishmaniasis. **Pharmacotherapy**, v. 16, n. 5, p. 869-871, 1996.

HARTMANN, A.; AGURELL, E.; BEEVERS, C.; BRENDLER-SCHWAAB, S.; BURLINSON, B.; CLAY, P.; COLLINS, A.; SMITH, G.; SPLEIT, G.; THYBAUD, V.; TICE, R. R. Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline comet assay. **Mutagenesis**, v. 18, n. 1, p. 45-51, 2003.

HAYES, A. W. **Principles and Methods of Toxicology**. 4. ed. Philadelphia: Taylor & Francis, 2001.

HOLLAND, N.; BOLOGNESI, C.; KIRSCH-VOLDERS, M.; BONASSI, S.; ZEIGER, E.; KNASMUELLER, S.; FENECH, M. The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for biomonitoring DNA damage: the HUMN project perspective on current status and knowledge gaps. **Mutation Research**, v. 659, N. 1-2, p. 93-108, 2008.

IGNEY, F. H.; KRAMMER, P. H. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, n. 4, p. 277-288, 2002.

IARC. **Some organic solvents, resin monomers and related compounds, pigments and occupational exposures in paint manufacture and painting**. International Agency for Research on Cancer: monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, v. 47:1-535, 1989.

KAINA, B. DNA damage-triggered apoptosis: critical role of DNA repair, double-strand breaks, cell proliferation and signaling. **Biochemical Pharmacology**, v. 66, n. 8, 1547-1554, 2003.

KAO, J.; ROSENSTEIN, B. S.; PETERS, S.; MILANO, M. T.; KRON, S. J. Cellular response to DNA damage. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1066, p. 243-258, 2005.

KIRSCH-VOLDERS, M.; SOFUNI, T.; AARDEMA, M.; ALBERTINI, S.; EASTMOND, D.; FENECH, M.; ISHIDATE, M. J.; KIRCHNER, S.; LORGE, E.; MORITA, T. Report from the *in vitro* micronucleus assay working group. **Mutation Research**, v. 540, p. 153-163, 2003.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. **Evolution, classification and geographical distribution: the leishmaniases in biology and medicine**. London: Academic Press, 1987.

LEMOINE, N. R. **The c-ras oncogenes and GAP**. London: John Willey & Sons, 1990.

LIMA, M. I. S.; ARRUDA, V. O.; ALVES, E. V. C.; AZEVEDO, A. P. S.; MONTEIRO, S. G.; PEREIRA, S. R. F. Genotoxic effects of the antileishmanial drug glucantime®. **Archives of Toxicology**, v. 84, p. 227-232, 2010.

LOUREIRO, A. P. M.; DI MASSIO, P.; MEDEIROS, M. H. G. Formação de adutos exocíclicos com bases de DNA: implicações em mutagênese e carcinogênese. **Química Nova**, v. 25, n. 5, p. 777-793, 2002.

MALUMBRES, M.; BARBACID, M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. **Nature Reviews: Cancer**, v. 9, n. 3, p. 153-166, 2009.

MARSDEN, P. D. Pentavalent antimonials: old drugs for new diseases. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 18, n. 3, p. 187-198, 1985.

MARTIN, G. M. Somatic mutagenesis and antimutagenesis in aging research. **Mutation Research**, v. 350, n. 1, p. 35-41, 1996.

MARZZOCO, A.; TORRES, S. B. **Bioquímica Básica**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.

MIEKELEY, N.; MORTARI, S. R.; SCHUBACH, A. O. Monitoring of total antimony and its species by ICP-MS and on-line ion chromatography in biological samples from patients treated for leishmaniasis. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 372, n. 3, p. 495-502, 2002.

MUKHOPADHYAY, I.; CHOWDHURI, D. K.; BAJPAYEE, M.; DHAWAN, A. Evaluation of in vivo genotoxicity of cypermethrin in drosophila melanogaster using the alkaline comet assay. **Mutagenesis**, v. 19, n. 2, p. 85-90, 2004.

NADIN, S.; VARGAS-ROIG, L.; CIOCCA, D. A silver staining method for single-cell gel assay. **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 49, n. 9, p. 1183-1186, 2001.

NAJAFI, M. B. H.; PEZESHKI, P. Bacterial mutation; types, mechanisms and mutant detection methods: a review. **European Scientific Journal**, v. 4, p. 628- 638, 2013.

NASCIMENTO, E.; CAMPOS-NETO, A.; VIEIRA, E. P.; ASHMAN, J. A.; FERNANDES, D. F. A clinical trial to evaluate the safety and immunogenicity of the LEISH-F1+MPL-SE vaccine when used in combination with meglumine antimoniate for the treatment of cutaneous leishmaniasis. **Vaccine**, v. 28, p. 6581-6587, 2010.

NIEMINEM, A. L. Apoptosis and necrosis in health and disease: role of mitochondria. **International Review of Cytology**, v. 224, p. 29-55, 2003.

OGA, S.; CAMARGO, M.M.A.; BATISTUZZO, J.A.O. **Fundamentos de Toxicologia**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2008.

OKKENHAUG, G.; ZHU, Y-G.; LUO, L.; LEI, M.; LI, X.; MULDER, J. Distribution, speciation and availability of antimony (Sb) in soils and terrestrial plants from an active Sb mining area. **Environmental Pollution**, v. 159, n. 10, p. 2427-2434, 2011.

PACHECO, A. O.; HACKEL, C. Instabilidade cromossômica induzida por agroquímicos em trabalhadores rurais na região de Passo Fundo, Rio Grande do Sul, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 18, n. 6, p. 1675-1683, 2002.

PALLARDY, M.; BIOLA, A.; LEBREC, H.; BRÉRAD, J. Assessment of Apoptosis in Xenobiotic-Induced Immunotoxicity. **Methods**, v. 19, n. 1, p. 36-47, 1999.

PAROLIN, M. B.; REASON, I. J. M. Apoptose como mecanismo de lesão nas doenças hepatobiliares. **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 38, n. 2, p. 138-144, 2001.

PATON, G. R.; ALLISON, A. C. Chromosome damage in human cell cultures induced by metal salts. **Mutation Research**, v. 16, n. 3, p. 332-336, 1972.

PETROS, A. M.; OLEJNICZAK, E. T.; FESIK, S. W. Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1644, n. 2-3, p. 83-94, 2004.

PHELPS, J. B.; GARRIOT, M. L.; HOFFMAN, W. P. A. Protocol for micronucleus test II. Contributions for the validation of a protocol suitable for regulatory submissions from a examination of 10 chemicals with different mechanisms of action and different levels of activity. **Mutation Research**, v. 521, p. 103-112, 2002.

RABELLO-GAY, M. N.; RODRIGUES, M. A. R.; MONTELEONE-NETO, R. Mutagênese, teratogênese e carcinogênese: métodos e critérios de avaliação. **Revista Brasileira de Genética**, p. 83-89, 1991.

RATH, S.; TRIVELIN, L. A.; REBECCA, T. I.; TOMAZELA, D. M.; JESUS, M. N. J.; MARZAL, P. C. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose. **Química Nova**, v. 26, n. 4, p. 550-555, 2003.

REITHINGER, R.; DUJARDIN, J. C.; Molecular diagnosis of leishmaniasis: current status and future applications. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 1, p. 21-25, 2006.

REVAZOVA, J.; YURCHENKO, V.; KATOSOVA, L.; PLATONOVA, V.; SYCHEVA, L.; KHRIPACH, L.; INGEL, F.; TSUTSMAN, T.; ZHURKOV, V. Cytogenetic investigation of women exposed to different levels of dioxins in Chapaevsk town. **Chemosphere**, v. 43, n. 4-7, p. 999-1004, 2001.

RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. **Mutagênese ambiental**. 1. ed. Canoas: Ulbra, 2003.

ROBBINS, S. L.; COTRAN, R. S. **Patologia: bases patológicas das doenças**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.

ROBERTS, W. L.; MCMURRAY, W. J.; RAINEY, P. M. Characterization of the antimonial antileishmanial agent meglumine antimonate (Glucantime), **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 42, n. 5, p. 1076-1082, 1998.

ROJAS, E.; VALVERDE, M.; SORDO, M.; ALTAMIRANO-LOZANO, M.; OSTROSKY-WEGMAN, P. Single cell gel electrophoresis assay in the evaluation of metal carcinogenicity. In: COLLERY, P.; CORBELLA, J.; DOMINGO, J. L.; ETIENNE, J. C.; LLOBET J. M. **Metal Ions in Biology and Medicine**, v. 4, p. 375-377, 1996.

RUBIN, E.; GORSTEIN, F.; SCHWARTING, R.; RUBIN, R.; STRAYER, D. **Patologia: bases clinicopatológicas da medicina**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

SAMPAIO, R. N. R. ; DE PAULA, C. D. R. Leishmaniose tegumentar americana no Distrito Federal. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 32, n. 5, p. 523-528, 1999.

SAMPAIO, S. A. P.; RIVITTI, E. A. **Dermatologia**. 2. ed. São Paulo: Artes Médicas, 2001.

SANTOS MONTAGNER, G. F. F.; SAGRILLO, M.; MACHADO, M. M.; ALMEIDA, R. C.; MASTARDEIRO, C. P.; DUARTE, M. M. M. F.; CRUZ, I. B. M. Toxicological effects of ultraviolet radiation on lymphocyte cells with different manganese superoxide dismutase Ala16Val polymorphism genotype. **Toxicology in Vitro**, v. 24, p. 1410-1416, 2010.

SCHAFFER, K. A. The cell cycle: a review. **Veterinary Pathology**, v. 35, n. 6, p. 461-478, 1998.

SCHMID, W. The micronucleus test. **Mutation Research**, v. 31, n. 1, p. 09-15, 1975.

SCHNEIDER, C. D.; OLIVEIRA, A. R. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 10, n. 10, p. 308-313, 2004.

SCHOFIELD, M. J.; HIEH, P. DNA mismatch repair: molecular mechanisms and biological function. **Annual Review Microbiology**, v. 57, p. 579-608, 2003.

SHIBUTANI, S.; TAKESHITA, M.; GROLLMAN, A. P. Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxodG. **Nature**, v. 349, n. 6308, p. 431-434, 1991.

SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J. A. P. **Genética toxicológica**. Porto Alegre: Alcance, 2003.

SILVA, P. **Farmacologia**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994.

SIMMONS, S. O.; FAN, C.Y., YEOMAN; WAKERFIELD, J.; RAMABHADHAN, R. NRF2 oxidative estresse induced by heavy metals is cell type dependent. **Current Chemical Genomics**, v. 5, p. 1-12, 2011.

SINGH, N. P.; MCCOY, M. T.; TICE, R. R.; SCHNEIDER, E. L. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individuals cells. **Experimental Cell Research**, vol. 175, n. 1, p. 184-191, 1988.

SNUSTAD, D. P.; SIMMONS, M. J. **Fundamentos da Genética**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

SUNDAR, S.; CHAKRAVARTY, J. Antimony toxicity. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 7, p. 4267-4277, 2010.

TAKAHASHI, S.; TAKEDA, E.; KUBOTA, Y.; OKAYASU, R. Inhibition of repair of radiation induced DNA-double strand break repair by nickel and arsenite. **Radiation Research**, v. 154, p. 686-691, 2000.

THOMPSON, C. B. Apoptosis. In: Paul W. E. **Fundamental immunology**. 4 ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1999. p. 813-829.

TICE, R. R.; AGURELL, D.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J. C.; SASAKI, Y. F. Single cell gel/cometa assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 35, n. 3, p. 206-221, 2000.

ULRICH, N. Speciation of antimony(III), antimony(V) and trimethylstiboxide by ion chromatography with inductively coupled plasma atomic emission spectrometric and mass spectrometric detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 359, p. 245-253, 1998.

VERMEULEN, K.; BOCKSTAELE, D. R. V.; BERNEMAN, Z. N. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. **Cell Proliferation**, v. 36, n. 3, p. 131-149, 2003.

WHO (World Health Organization). **Control of the Leishmaniasis**. Geneva, 1990.

_____. **A human rights-based approach to neglected tropical diseases**. 2009. Disponível em: <<http://www.who.int/tdr/>> Acesso em 19/08/2015.

_____. **Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases**. France, 2010.

YU, S. W.; WANG, H.; POITRAS, M. F.; COOMBS, C.; BOWERS, W. J.; FEDEROFF, H. J.; POIRIER, G. G.; DAWSON, T. M.; DAWSON, V. L. Mediation of poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent cell death by apoptosis-inducing factor. **Science**, v. 297, n. 5579, p. 259–263, 2002.

YUNIS, J. J. High resolution of human chromosomes. **Science**, v. 191, n. 4233, p. 1268-1270, 1976.

ZAHA, A.; FERREIRA, H. B.; PASSAGLLA, L. M. P. **Biologia Molecular Básica**. 3 ed. Porto Alegre: Mercado Aberto, 2003.

ZIEGLER, U.; GROSCURTH, P. Morphological features of cell death. **News in Physiological Sciences**, v. 19, p.124-128, 2004.

ANEXOS

ANEXO A - Confirmação de submissão de manuscrito

6/7/2015

Gmail - Submission Confirmation for



Gabriela Lopez <gabrielatlopez@gmail.com>

Submission Confirmation for

1 mensagem

Toxicology Letters <toxlet@mgreditorial.com>
Para: gabrielatlopez@gmail.com

6 de julho de 2015 23:30

Dear Mrs. GABRIELA TAGLIANI LOPEZ,

Your submission entitled "In vitro N-methylglucamine antimoniate cytotoxicity, genotoxicity and mutagenicity in human leukocytes: Zero-order kinetic influx" has been received by Toxicology Letters

You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/toxlet/>.

Your username is: gabrielatlopez@gmail.com

If you need to retrieve password details, please go to: http://ees.elsevier.com/toxlet/automail_query.asp.

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Elsevier Editorial System
Toxicology Letters

ANEXO B - Manuscrito submetido à revista Toxicology Letters***In vitro* N-methylglucamine antimoniate cytotoxicity, genotoxicity and mutagenicity in human leukocytes: Zero-order kinetic influx**

Gabriela Tagliani Lopez^{a*}, Camila Martins Güzé^a, Raul Oliveira de Souza^a, Érico Marlon de Moraes Flores^b, Clarissa Marques Moreira^b, Paola de Azevedo Mello^b, Fabiana Ernestina Barcellos da Silva^a, Michel Mansur Machado^a, Luís Flávio Souza de Oliveira^a

^aGraduate Program in Pharmaceutical Sciences – Universidade Federal do Pampa, Brazil; ^bGraduate Program in Chemistry – Universidade Federal de Santa Maria, Brazil

Abstract

N-methylglucamine antimoniate (Sb-GAM) is the drug of choice to treat leishmaniasis according to the World Health Organization. The literature describes this drug's toxic effects, especially due to the presence of antimony (Sb) in its molecule. However, we do not know the minimum plasma concentration responsible for inducing cell damage. This study aimed to evaluate *in vitro* the cytotoxic, genotoxic and mutagenic effects of Sb-GAM in human leukocytes at concentrations of 5, 10, 20, 40 and 50 µg/mL, which represent the Sb-GAM plasma concentrations in pediatric and adult patients under therapy. Our results showed a decrease in cell viability and a significant increase in DNA damage using the following assays: numerical chromosomal instability, alkaline comet and double-stranded DNA breaks. The micronuclei assay showed the presence of mutagenicity. Moreover, the Sb-GAM increased the number of apoptotic and necrotic cells post-treatment, as well as the nuclear division cytotoxicity index. Additionally, Sb-GAM enters cells using zero-order kinetics.

Keywords: Leishmaniasis, meglumine antimoniate, genotoxicity, mutagenicity, cytotoxicity, pharmacovigilance.

1. Introduction

Leishmaniasis is an infectious disease that affects humans and animals, causing damage to the skin, mucosa and/or viscera. The leishmaniasis vector is a mosquito of the genus *Phlebotomus*, which is contaminated by sucking the contaminated blood of a host with amastigotes forms of *Leishmania* spp. (REITHINGER; DUJARDIN, 2006).

Although affecting about 1.5 million people each year, spread across 88 countries on four continents, leishmaniasis has few therapeutic alternatives (FREZÁRD et al., 2013). In the last 90 years, preparations based on antimony (Sb), such as N-methylglucamine antimoniate (Sb-GAM), have been the drugs of choice in the treatment of leishmaniasis (RATH et al., 2003).

On the other hand, it is well-known that treatment with this antimony-based drug can induce toxicity, leading to several adverse effects, such as heart disease and hepatitis (NASCIMENTO et al., 2010).

Few studies of Sb-GAM take into account genotoxic parameters and the concentrations that are able to induce cell damage. The main contribution of this work was to evaluate the cytotoxic, genotoxic and mutagenic effects of five concentrations (5, 10, 20, 40 and 50 $\mu\text{g/mL}$) of Sb present in Sb-GAM in human leukocytes *in vitro*; these concentrations represent the peak plasma levels of pediatric and adult patients undergoing therapy with this drug.

2. Materials and methods

2.1 Chemicals

For this study, the Analytical Chemistry Laboratory of the Federal University of Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil, acquired 5 mL doses of Glucantime[®] (300 mg/mL of N-methylglucamine antimoniate), Sanofi Aventis, bath 015073. We purchased all other reagents and chemicals from Sigma[®].

The Sb concentrations in this study are according to the plasma peaks of patients undergoing therapy with Sb-GAM (30, 40 and 50 $\mu\text{g/mL}$) and the lower concentrations of 5, 10 and 20 $\mu\text{g/mL}$ (CRUZ et al., 2007).

2.2 Cell cultures

The cell cultures of leukocytes were prepared according to a previous study by Santos-Montagner et al. (2010). Cells were kept at 37°C for 72 hours. The negative

control was prepared with a 500 μL phosphate buffer (pH 7.4) and the positive control was prepared with 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of bleomycin. The tested concentrations of Sb (present in Sb-GAM) were 5, 10, 20, 40 and 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. All groups were tested in triplicate.

2.3 Viability assay

Viability is assessed using trypan blue based on the loss of membrane integrity (BUROW et al., 1998). The cells were analyzed with 400X magnification. The differentiation of living or dead cells was based on the presence of blue coloration in dead cells. A total of 300 cells were counted per slide.

2.4 Chromosomal instability

The chromosomal instability assay was performed according Yunis (1976), who added colcemid to each leukocyte culture and incubated them at 37°C for 60 min. After this, the slides were prepared, and the cells were analyzed with 400X magnification to verify the density and distribution of metaphase chromosomes.

2.5 Alkaline comet DNA assay

The alkaline comet assay was performed following the procedures of Singh et al. (1988), and in accordance with the general usage guidelines for this assay (TICE et al., 2000; HARTMANN et al., 2003; NADIN et al., 2001). The DNA damage was calculated from cells in different damage classes (completely undamaged: 100 cells \times 0 to maximum damaged – 100 cells \times 4).

2.6 Breaking double-stranded DNA (BDS-DNA)

The double-stranded DNA assay was performed using both a kit for fluorescence quantification of BDS-DNA (Sigma®), following the manufacturer's guidelines, and a fluorimeter apparatus (Perkin-Elmer, London, England).

2.7 Micronuclei assay

The micronuclei assay was performed in accordance with Schmid (1975). The slides were stained using the panoptic method and then analyzed under optical microscopy in an immersion lens. For each slide, 1,000 cells were counted.

2.8 Counting of apoptotic and necrotic cells

For these assays, the slides were analyzed with 1,000X magnification, a total of 1,000 cells were counted per slide, and the apoptotic and necrotic cells were identified according to the characteristics proposed by Fenech (2000).

2.9 Nuclear division cytotoxicity index (NDCI)

The NDCI is a parameter that evaluates the intensity of the toxic activity of a xenobiotic on cells, which is obtained by applying the following formula:

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

Where Ap = number of apoptotic cells, Nec = number of necrotic cells, M1-M4 = number of viable cells with 1-4 nuclei and N = total number of cells scored.

2.10 Quantitative analysis of intracellular antimony

For the determination of intracellular Sb^V, leukocytes underwent chemical digestion by wet heating with microwave radiation. To determine how much Sb was extracted from the leukocytes, a cell mass spectrometer (Perkin-Elmer SCIEX, Elan DRC II model, Thornhill, Canada) with inductively coupled plasma (ICP-MS) was used (PEREIRA et al., 2015). The power was 1,400 W, and the argon flow was 15.0, 1.2 and 1.04 L/min for plasma gas, auxiliary and fogging, respectively. The measurements were carried out using the isotope ¹²¹Sb.

2.11 Statistical analysis

Data were expressed as mean ± standard deviation. Comparisons between groups were performed using one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's test for multiple comparison tests. Results were considered statistically significant when p<0.05.

3. Results

3.1 Viability assay

The Sb-GAM, at the concentrations tested, decreased cell viability significantly (33-35%) at all concentrations when compared to the negative control (p<0.0001). However, the Sb-GAM samples did not differ statistically from the positive control (Figure 1A).

3.2 Chromosomal instability

The five Sb-GAM concentrations showed decreases of 13%, 12%, 29%, 29% and 31% in total number of chromosomes, respectively (Figure 1B). On the other hand, the negative and positive controls showed, respectively, decreases of 2% and 16% in this parameter ($p < 0.05$).

3.3 Alkaline comet DNA assay

The data from the alkaline comet assay (Figure 1C) showed that all Sb-GAM concentrations were able to induce a DNA damage index 6- to 8-fold higher than that of the negative control but not in a concentration-dependent manner. However the damage was more minor than that of the positive control ($p < 0.001$).

3.4 Breaking double-stranded DNA (BDS-DNA)

Figure 1D shows that Sb-GAM was able to induce BDS-DNA levels similar to those of the positive control in the four highest concentrations (10-50 $\mu\text{g/mL}$) tested, while the minor concentration (5 $\mu\text{g/mL}$) did not differ statically from negative control ($p < 0.01$).

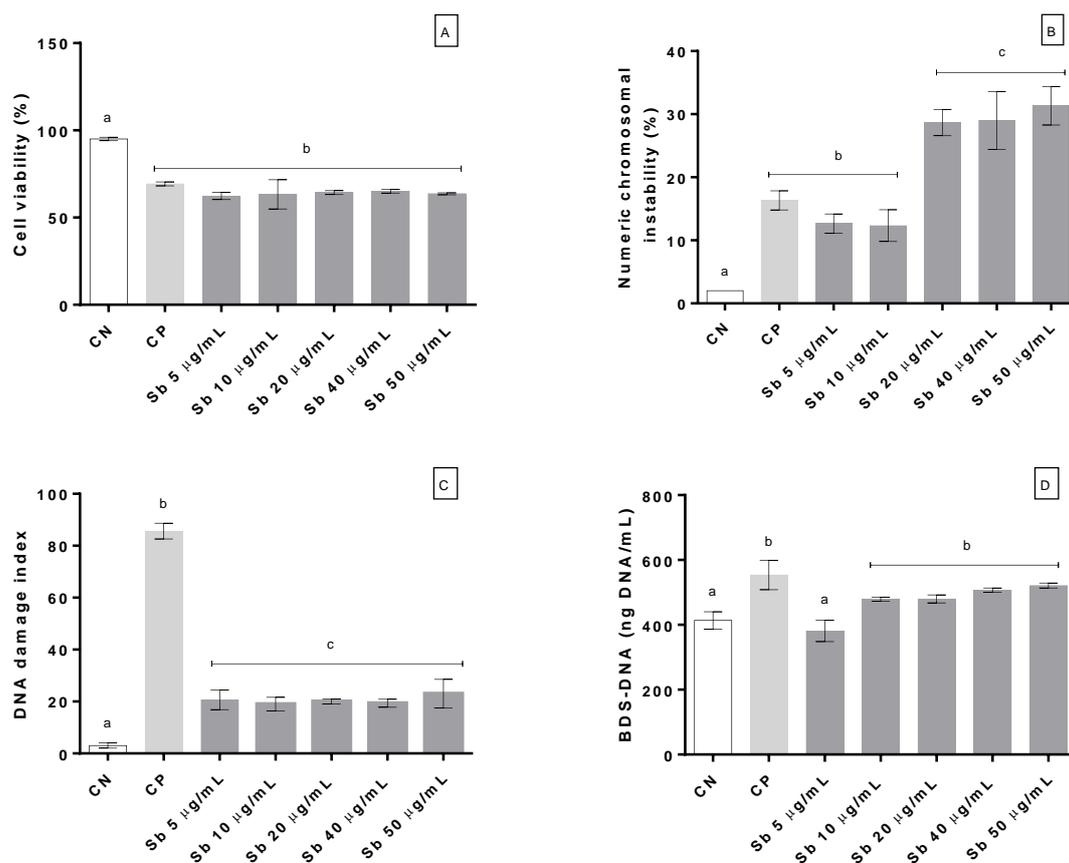


Figure 1 - Analysis of cytotoxic and genotoxic parameters in human leukocytes exposed to different concentrations of antimony from antimony of glucamine (Sb-GAM). A: cell viability; B: numeric chromosomal instability; C: DNA damage index; D: breaking double-stranded DNA. Data are expressed as mean \pm standard deviation, $n=3$, $p<0.05$. Different letters represent statistically different results among columns. NC=negative control; PC=positive control.

3.5 Micronuclei assay

The data from the micronucleus test are grouped as follows: binucleated cells (Figure 2A) and binucleated cells with micronuclei (Figure 2B). All five Sb-GAM concentrations exhibited an increased number of binucleated cells compared to both the negative and positive controls ($p<0.001$). In particular, the highest concentration (50 $\mu\text{g/mL}$) showed an 8-fold increase compared to that of the negative control.

In accounting for the number of binucleated cells with micronuclei, only the highest concentration of Sb-GAM showed an increase in this parameter relative to the negative and positive controls ($p<0.01$).

3.6 Necrotic and apoptotic cells

Figure 2C shows the number of necrotic cells. The concentration of 5 $\mu\text{g/mL}$ did not differ from the positive control, but all other concentrations (10-50 $\mu\text{g/mL}$) showed increases in the number of necrotic cells ($p < 0.001$). No necrotic cells were found in the negative control.

Figure 2D shows the number of apoptotic cells. All the Sb-GAM concentrations showed an expressive number of cells in the apoptotic process (83 ± 7.21 to 244.7 ± 8.33) when compared to that of the negative control (2.68 ± 0.58) or even that of the positive control (29.67 ± 5.69) ($p < 0.001$).

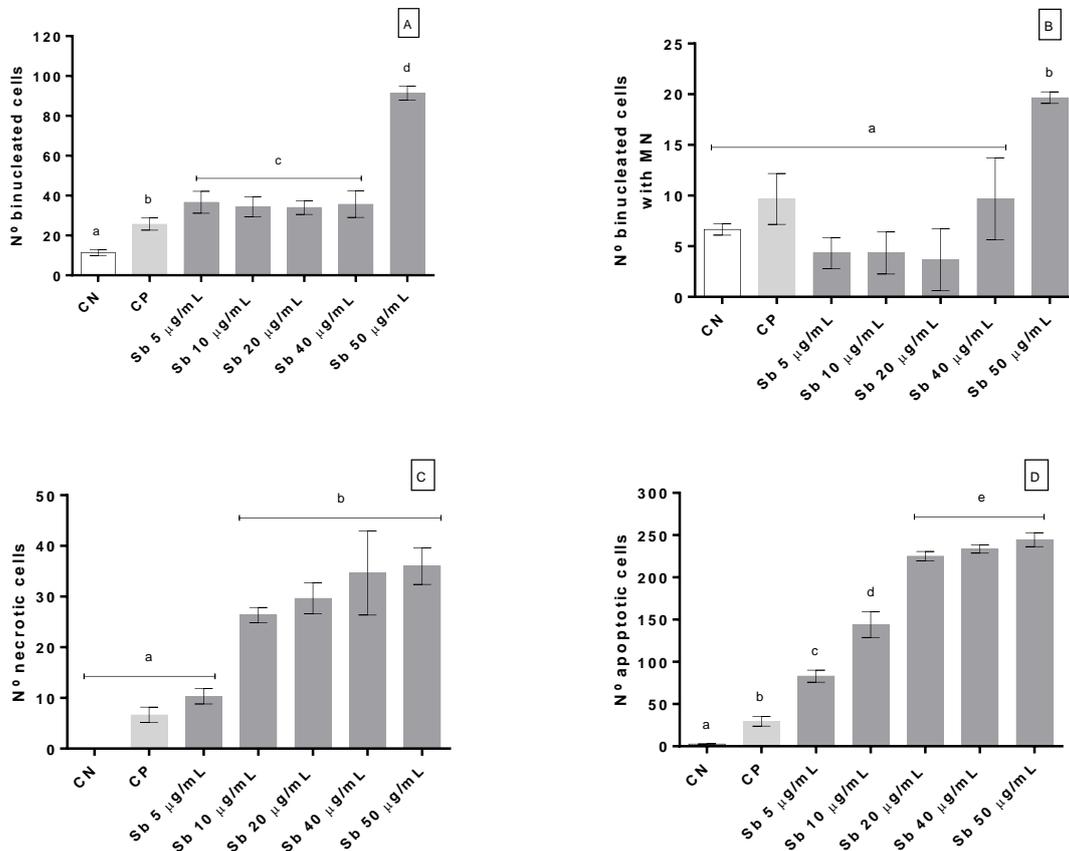


Figure 2 - Micronucleus test and accounting human leukocytes necrosis and apoptosis condition exposed to different concentrations of antimony from antimony in glucamine (Sb-GAM). A: binucleated cells; B: binucleated cells with micronuclei; C: necrotic cells; D: apoptotic cells. Data are expressed as mean \pm standard deviation, $n=3$, $p < 0.05$. Different letters represent statistically different results among columns. MN=micronuclei NC=negative control; PC=positive control.

3.7 Nuclear division cytotoxicity index (NDCI)

Figure 3A presents the NDCI for human leukocytes exposed to different Sb-GAM concentrations. In this parameter, all tested concentrations show an increase in this index (0.20 ± 0.02 to 0.61 ± 0.02) compared to those of the negative (0.04) and positive controls (0.13 ± 0.02), in a concentration-dependent manner ($p < 0.01$).

3.8 Quantitative analysis of intracellular antimony

Figure 3B shows the intracellular concentration (in picograms) of Sb after exposure to microgram concentrations of Sb-GAM. The data show that cellular entrance occurs in a concentration-dependent manner ($p < 0.001$). However, the cellular entrance percentage remains constant, around 0.03% Sb, independent of Sb-GAM exposure concentration. We did not find intracellular Sb in the negative and positive controls.

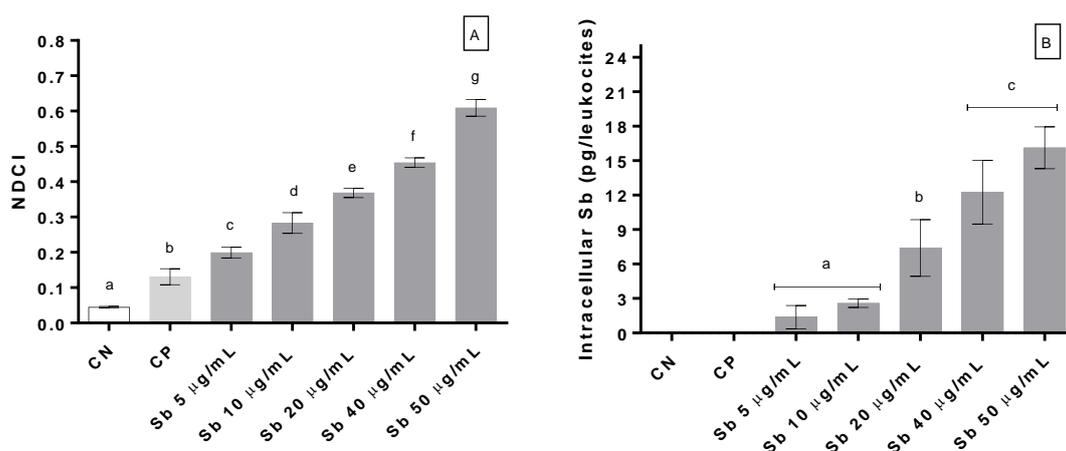


Figure 3 - Testing in human leukocytes exposed to different concentrations of antimony from antimony in glucamine (Sb-GAM). A: nuclear division cytotoxicity index; B: quantitative analysis of intracellular antimony. Data are expressed as mean \pm standard deviation, $n=3$, $p < 0.05$. Different letters represent statistically different results among columns. NC=negative control; PC=positive control.

4. Discussion

Our results from the cell viability assay indicate that Sb-GAM exhibits cytotoxicity at the concentrations tested. It is generally accepted that Sb generates free radicals, such as $\cdot\text{O}_2$ and $\cdot\text{OH}$, and reactive oxygen species, such as H_2O_2 , all of which are capable of inducing damage and crossing cell membranes, causing cytotoxicity (SCHNEIDER AND OLIVEIRA, 2004).

Chromosomal abnormalities, such as numerical or structural changes, are a form of cell damage (BIRKBAK et al., 2011). Herein, our results demonstrate that all Sb-GAM concentrations tested showed chromosomal abnormalities far larger than those found for the negative control.

It is well-known that genomic instability, including numeric chromosome abnormalities, is directly dependent on the exposure time and the inherent toxicity of the xenobiotic in the DNA molecule (PACHECO AND HACKEL, 2002). Therefore, considering the 72 hours of incubation, it is plausible to accept that the leukocyte cells were exposed persistently to Sb-GAM, suffering the full effects of its toxicity.

Within this context, it was observed that the oxidative damage to DNA demonstrated by the alkaline comet assay was not concentration-dependent, but the damage observed in the quantification of BDS-DNA was concentration-dependent for all concentrations except the lowest (5 µg/mL).

Our data differed from the data found by Lima et al. (2010), who did not find oxidative DNA damage in leukocytes after exposure to Sb-GAM. However, they used shorter incubation times (3h and 24h) and different concentrations (1060 to 4250 µg/mL) than those we tested. On the other hand, we demonstrated that, after 72 hours of exposure, Sb-GAM was able to induce significant oxidative DNA damage to leukocytes in much lower concentrations than those assayed by Lima et al. (2010). This discrepancy suggests that the exposure time is the determining factor for the level of damage induced by Sb-GAM.

Moreover, Sb is able to deplete cellular glutathione cell levels and thus accelerate the oxidation of the cellular environment (BURFORD et al., 2005), including that of the DNA molecule. This fact led us to suggest that, at least in part, the damage observed may be due to this pathway. Considering our results from the comet assay and BDS-DNA count, it is also reasonable to suggest that molecular targets involved in cellular homeostasis as a whole, including its genetic material, are subject to the oxidative effect of Sb from Sb-GAM.

The number of binucleated cells found in the samples treated with Sb-GAM show, at least in part, how the drug is cytotoxic, as the presence of binucleated cells is indicative of cytotoxicity arising from a failure in the cytokinesis process (HOLLAND et al., 2008). Furthermore, an increase in incidence can cause a failure in the cell differentiation mechanism or be secondary to genotoxic agents, although the mechanisms involved are not yet fully elucidated (CARVALHO et al., 2002).

The micronucleus test provides a reliable index for chromosome breaks, genetic instability and, eventually, risk of developing cancer (FENECH, 2000). Thus, our results indicate that for the experimental conditions and concentrations tested, Sb-GAM is potentially mutagenic.

Indeed, there are few publications about Sb-GAM toxicity, and those that exist are confined to the minimum concentration to induce cytotoxicity, genotoxicity and mutagenicity. However, Hantson et al. (1996) suggest that Sb-GAM interferes with the distribution of chromosomes during mitosis, without, however, directly affecting DNA structure, in patients under Sb-GAM therapy.

On the other hand, in our study, we demonstrated that damage occurs in DNA structure, contributing to chromosomal abnormalities, as evidenced in the numerical chromosomal instability test. Additionally, the change in chromosome distribution is evident, as binucleated cells and micronuclei are formed not only with DNA damage but with mutagenic effects.

Corroborating our data, Fenech (2000) states that chromosomal losses and the non-segregation of chromosomes are important cellular events caused by defects in the zone, at the centromere, or as a consequence of the non-condensing chromosome structure before the metaphase stage in the cell cycle, which contributes to carcinogenic processes. Furthermore, the genetic material injury, together with the impossibility of repair, leads the cell to apoptosis. Moreover, when the lesion is severe and does not favor apoptosis, the installation of cell necrosis is promoted.

In the present study, we observed a significant number of cells in necrosis. According to Grivicich et al. (2007), cellular damage caused by Sb may be due to its ability to interfere in the regulation of the cellular redox state, increasing the collapse of the inner mitochondrial membrane potential, which leads to a loss of cellular homeostasis, interrupting the biosynthesis of ATP, which, finally, causes cell damage by necrosis.

Our results demonstrate that apoptosis is more prominent than necrosis in leukocytes after Sb-GAM exposure. Considering that genetic damage is one of factors that induces the apoptotic process by the intrinsic pathway, it is plausible to suggest that this pathway may be the most likely mechanism involved in the onset of apoptosis following exposure to Sb-GAM (DESAGHER AND MARTINOU, 2000).

The mitochondrion is crucial to the mechanisms of cell death. This organelle is involved in both apoptosis and necrosis, which, in turn, both cause mitochondrial dysfunction (NIEMINEM, 2003). Furthermore, the calculated NDCI, when corroborated with the results presented, indicates a high toxicity of Sb-GAM in the experimental conditions and concentrations tested.

Additionally, with the quantification of intracellular Sb, we demonstrate that the Sb-GAM input in human leukocytes occurs in a concentration-dependent manner. However, the cell entrance showed zero-order kinetics, which, considering the constant percentage of cellular entrance found, was independent of Sb-GAM exposure concentration.

The data presented here are in accordance with Balana-Hoz et al. (1998), who claim that Sb-GAM is not a safe drug. The innovative character of our work demonstrates the presence of Sb-GAM toxicity in a range of lower therapeutic concentrations. Most likely, intracellular concentrations found after exposure are responsible for most of the damage to the genetic material.

5. Conclusions

Considering our results, it is clear that Sb-GAM has cytotoxic, genotoxic and mutagenic effects on human leukocytes in exposure concentrations equal to (30, 40 and 50 $\mu\text{g/mL}$) and lower than (5, 10 and 20 $\mu\text{g/mL}$) those found in the plasma of pediatric and adult patients under treatment for leishmaniasis.

These results should be taken into account in the dualistic discussion of the risks and benefits of this drug, and the data presented here reveal the need to discover new therapies for leishmaniasis that offer greater safety for patients.

6. References

BALANÁ-FOUCE, R.; REGUERA, R. M.; CUBRÍA, J. C.; ORDÓNEZ, D. The Pharmacology of Leishmaniasis. **General Pharmacology**, v. 30, n. 4, p. 435-443, 1998.

BIRKBAK, N. J.; EKLUND, A. C.; LI, Q.; MCCLELLAND, S. E.; ENDESFELDER, D.; TAN, P.; TAN, I. B.; RICHARDSON, A. L.; SZALLASI, Z.; SWANTON, C. Paradoxical relationship between chromosomal instability and survival outcome in cancer. **Cancer Research**, v. 71, n. 10, p. 3447-3452, 2011.

BURFORD, N.; EELMAN, M. D.; GROOM, K. Identification of complexes containing glutathione with As(III), Sb(III), Cd(II), Hg(II), Tl(I), Pb(II) or Bi(III) by electrospray

ionization mass spectrometry. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 99, p. 1992-1997, 2005.

BUROW, M. E.; WELDON, C. B.; TANG, Y.; NAVAR, G. L.; KRAJEWSKI, S.; REED, J. C.; HAMMOND, T. G.; CLEJAN, S.; BACKMAN, B. S. Differences in susceptibility to tumour necrosis factor alpha-induced apoptosis among MCF-7 breast cancer cell variants. **Cancer Research**, v. 58, n. 21, p. 4940-4946, 1998.

CARVALHO, M. B.; RAMIREZ, A.; GATTÁS, G. J. F.; AMAR, A.; RAPOPORT, A.; NETO, J. C. B.; CURIONI, O. A. Relationship between the outcome and the frequency of micronuclei in cells of patients with oral and oropharyngeal carcinoma. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 48, n. 4, p. 317-322, 2002.

CRUZ, A.; RAINEY, P. M.; HERWALDT, B. L.; STAGNI, G.; PALACIOS, R.; TRUJILLO, R.; SARAIVA, N. G. Pharmacokinetics of antimony in children treated for leishmaniasis with meglumine antimoniate. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 195, p. 602-608, 2007.

DESAGHER, S.; MARTINOU, J. C. Mitochondria as the central control point of apoptosis. **Trends in Cell Biology**, v. 10, n. 9, p. 369-376, 2000.

FENECH, M. The *in vitro* micronucleus technique. **Mutation Research**, v. 455, n. 1-2, p. 81-95, 2000.

FREZÁRD, F.; DEMICHELI, C.; KATO, K. C.; REIS, P. G.; LIZARAZO-JAIMES, E. H. Chemistry of antimony-based drugs in biological systems and studies of their mechanism of action. **Reviews in Inorganic Chemistry**, v. 33, n. 1, p. 1-12, 2013.

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A. Morte celular por apoptose. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 53, n. 3, p. 335-343, 2007.

HANTSON, P.; LEONARD, E. D.; CRUTZEN-FAYT, M. C.; LEONARD, A.; VANDERCAM, B.; DELAERE, B.; MAHIEU, P. Cytogenetic observations after meglumine antimoniate therapy for visceral leishmaniasis. **Pharmacotherapy**, v. 16, n. 5, p. 869-871, 1996.

HARTMANN, A.; AGURELL, E.; BEEVERS, C.; BRENDLER-SCHWAAB, S.; BURLINSON, B.; CLAY, P.; COLLINS, A.; SMITH, G.; SPLEIT, G.; THYBAUD, V.; TICE, R. R. Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline comet assay. **Mutagenesis**, v. 18, n. 1, p. 45-51, 2003.

HOLLAND, N.; BOLOGNESI, C.; KIRSCH-VOLDERS, M.; BONASSI, S.; ZEIGER, E.; KNASMUELLER, S.; FENECH, M. The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for biomonitoring DNA damage: the HUMN project perspective on current status and knowledge gaps. **Mutation Research**, v. 659, N. 1-2, p. 93-108, 2008.

LIMA, M. I. S.; ARRUDA, V. O.; ALVES, E. V. C.; AZEVEDO, A. P. S.; MONTEIRO, S. G.; PEREIRA, S. R. F. Genotoxic effects of the antileishmanial drug glucantime®. **Archives of Toxicology**, v. 84, p. 227-232, 2010.

NADIN, S.; VARGAS-ROIG, L.; CIOCCA, D. A silver staining method for single-cell gel assay. **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 49, n. 9, p. 1183-1186, 2001.

NASCIMENTO, E.; CAMPOS-NETO, A.; VIEIRA, E. P.; ASHMAN, J. A.; FERNANDES, D. F. A clinical trial to evaluate the safety and immunogenicity of the LEISH-F1+MPL-SE vaccine when used in combination with meglumine antimoniate for the treatment of cutaneous leishmaniasis. **Vaccine**, v. 28, p. 6581-6587, 2010.

NIEMINEM, A. L. Apoptosis and necrosis in health and disease: role of mitochondria. **International Review of Cytology**, v. 224, p. 29-55, 2003.

PACHECO, A. O.; HACKEL, C. Instabilidade cromossômica induzida por agroquímicos em trabalhadores rurais na região de Passo Fundo, Rio Grande do Sul, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 18, n. 6, p. 1675-1683, 2002.

PEREIRA, L. P.; SILVA, F. E. B.; FLORES, E. M. M.; SCHREKKER, H. S.; MACHADO, M. M.; OLIVEIRA, L. F. S. *In vitro* ZnCl₂ cytotoxicity and genotoxicity in human leukocytes: Zero-order kinetic cellular zinc influx. **Acta Scientiarum**, v. 37, n. 1, p. 63-68, 2015.

RATH, S.; TRIVELIN, L. A.; REBECCA, T. I.; TOMAZELA, D. M.; JESUS, M. N. J.; MARZAL, P. C. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose. **Química Nova**, v. 26, n. 4, p. 550-555, 2003.

REITHINGER, R.; DUJARDIN, J. C.; Molecular diagnosis of leishmaniasis: current status and future applications. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 1, p. 21-25, 2006.

SANTOS MONTAGNER, G. F. F.; SAGRILLO, M.; MACHADO, M. M.; ALMEIDA, R. C.; MASTARDEIRO, C. P.; DUARTE, M. M. M. F.; CRUZ, I. B. M. Toxicological effects of ultraviolet radiation on lymphocyte cells with different manganese superoxide dismutase Ala16Val polymorphism genotype. **Toxicology in Vitro**, v. 24, p. 1410-1416, 2010.

SCHMID, W. The micronucleus test. **Mutation Research**, v. 31, n. 1, p. 09-15, 1975.

SCHNEIDER, C. D.; OLIVEIRA, A. R. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 10, n. 10, p. 308-313, 2004.

SINGH, N. P.; MCCOY, M. T.; TICE, R. R.; SCHNEIDER, E. L. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individuals cells. **Experimental Cell Research**, vol. 175, n. 1, p. 184-191, 1988.

TICE, R. R.; AGURELL, D.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J. C.; SASAKI, Y. F. Single cell gel/cometa assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 35, n. 3, p. 206-221, 2000.

YUNIS, J. J. High resolution of human chromosomes. **Science**, v. 191, n. 4233, p. 1268-1270, 1976.